



Hairless Mice를 이용한 광노화 모델에서 APB-01의 경구반복투여에 의한 피부주름개선 효과 시험

이지해 · 이병석 · 변법선 · 김완기 · 이상준 · 심영철 · 김배환
(주)태평양기술연구원 의약건강연구소

Effect of APB-01 on the Ultraviolet-Induced Photoaging and Wrinkle Formation in the Hairless Mice

Ji-Hae Lee, Byung-Suk Lee, Bum-Sun Byun, Wan-Gi Kim, Sang-Jun Lee,
Young-Chul Sim and Bae-Hwan Kim

Pharmaceutical & Health Research Institute, AmorePacific Corporation/R&D Center, Yongin 449-729, Korea

Received October 31, 2003; Accepted December 10, 2003

ABSTRACT. Ultraviolet (UV) is thought to induce erythema, sun-burn, photo-toxicity, photo-allergy, photo-aging and sometimes skin tumor. To investigate the photo-protective effects of APB-01 (Amore-Pacific Beauty-01, the mixture of Jaummi-dan and Fujiflavone P10) on UV-induced skin damage, forty of SKH hairless female mice were orally administered with APB-01 or saline fifth a week, and irradiated with UV third a week for up to ten weeks. We examined the relationship between visible changes and skin damage in the dermis and epidermis. In the APB-01 treated group, a better skin and less wrinkles formation were observed when compared to the UV control group. This results demonstrated that oral administration of APB-01 seems to have photo-protective effects on UV-induced skin damage of hairless mice due to an inhibitory effect on collagen breakdown, and the model using hairless mice is very useful to investigate the efficacy of functional beauty foods.

Keywords: APB-01, Jaummi-dan, Fujiflavone P10, Ultraviolet (UV), Photoaging, Hairless mice.

서 론

피부는 외부 침입으로부터 신체를 보호하며, 수분과 온도를 보존하여 항상성을 조절하는데 중요한 역할을 한다. 그러나 피부는 여러 가지 위험한 환경 요소에 항상 노출되어 있다. 대표적인 위험 인자로는 ultraviolet(UV), free radicals, 독성 및 알러지 유발물질 그리고 물리적 자극 등이 있으며, 그 외 염증, 면역기능 억제, 표피 항상성의 불균형 및 기타 피부질환등도 피부 손상을 일으키는 원인이 된다(Fuchs 등, 1989; Scharffetter-Kochanek 등, 2000). 특히, 피부가 태양광이나 UV에 지속적으로 노출되면, 피부 구성의 변화와(Kligman 등, 1969; Uitto 등,

1989; Taylor 등, 1990) 표피조직의 즉각적인 손상이 유발될 수 있다. 즉, 광노화(Photoaging)를 일으켜 피부의 주름이나 처짐 같은 피부외관의 변화가 일어날 수 있으며, 발적, 광화상(sunburn), 광독성(phototoxicity), 광알러지(photoallergy) 등도 유발될 수 있다. 또한 지속적인 UV 조사는 피부 표피의 두께를 증가시키고, 피부 탄력성을 줄이며, 색소를 침착하게 하는 등의 피부 노화와 관련된 생리학적, 형태학적 변화를 일으킨다. 피부의 자연성 손상을 유발하여 드물게는 피부암을 유발하기도 한다(Epstein, 1983; Moan 등, 1992).

현재, 자외선에 의한 피부 손상을 막기 위한 방법으로 UV 차단제나 주름개선에 효과가 있는 물질이 함유된 기능성 화장품을 사용하거나, 의약품을 피부에 직접 도포하는 것이 일반적이다. 그러나 이러한 외용제들은 효과가 일시적이며 도포한 부위에만 국소적으로 효과를 나타낸다. 최근에는 식생활을 통해 피부와 연관성을 지닌 특정 영양

Correspondence to: Bae-Hwan Kim, Pharmaceutical & Health Research Institute, AmorePacific Corporation/R&D Center, Yongin 449-729, Korea.
E-mail: bhkim@amorepacific.com

성분을 섭취하여, 장기적인 피부 손상을 좀더 효과적으로 예방할 수 있는 방법에 대한 관심이 높아지고 있다 (Boelsma 등, 2001). 또한, 건강기능식품법이 공식적으로 제정되면서, 안전성 및 안정성을 지니면서 피부미용에 효과가 뛰어난 건강기능식품에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이런 효능 때문에 이와 같은 건강기능식품을 "먹는 화장품"으로 부르기도 한다.

예로부터 한의학에서는 한약을 내복하여 전신의 균형을 잡고 몸을 다스려 국부를 치료하거나 신체를 보양하는 방법을 통해 외적으로 아름다움을 표출하는 미용법을 활용해 왔다. 즉, 신체 내부의 근본적인 문제를 다스려 전신의 건강을 도모하고 노쇠를 억제하며 안면 미용을 유지하는 방법이다. 한의학에는 피부, 특히 여성 피부와 관련하여 보혈과 자음, 항노화 등을 위한 다양한 처방이 존재하나, 실제로 이러한 한방 처방이 피부 노화에 효과가 있다고 증명한 실험 연구는 거의 없다. 본 연구에서는 동의보감을 근거로 피부질환 및 여성 질환에 주로 사용되는 자음미단 엑기스(Kim 등, 2002)와, 여성 호르몬 효과를 나타내는 식물성 호르몬인 후지플라본 P10을 함께 처방한 APB-01(AmorePacific Beauty-01)을 제조하여, 건강기능식품의 개별인증형 미용기능식품으로 인정받을 수 있는지 여부를 판단하기 위하여, 암컷 Hairless mice(Bisset 등, 1987; Kligman 등, 1982)를 모델로 하여 경구반복투여한 후 피부 주름의 개선 효과를 측정하고자 하였다. 또한 (주)태평양기술연구원에서 확립한 "hairless mice를 이용한 광노화모델에서의 피부미용효과 시험법"에 대한 유용성도 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시험물질

실험에 사용한 APB-01은 (주)태평양기술연구원에서 개발한 건강식품으로, 자음미단 엑기스((주)한미향료화학, 서울, 20030415)와 후지플라본 P10 ((주)Fusico, 고베, 일본, 2003A-005)을 각각 25.8%와 11.0%의 성분비로 배합한 물질이며, 음성대조군으로는 주사용증류수(중외제약, APG1DS)를 사용하였다.

시험동물 및 사육조건

실험동물은 8~9주령된 20~25 g 정도의 특정병원체 부재(specific pathogen free, SPF) 암컷 hairless mice (Skh : HR-a)를 Charles River Laboratories(Wilmington, MA, USA)로 부터 구입하여 사용하였다. 실험동물들은 일주일 동안 동물실에서 적응시킨 후, 적응기간 중 일반 상태를 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 본 실험은 온도 23±3°C, 습도 50±10%, 소음 60 phone 이하, 취기 20 ppm 이하, 조도 50~300 Lux, 명암주기 12시간(07:00~19:00/조명시간)으로 설정된 (주)태평양기술연구원 전임상연구센터 동물실에서 실시하였으며, 시험기간 중 동물은 polycarbonate cage(26×42×18 cm, 명진기계)에 5마리씩 사육하였고, 사육상자에는 시험번호, 동물번호 및 투여량을 적은 tag를 붙였다. 사료는 마우스 전용사료 ((주)퓨리나)를 자유급이하였으며 음수는 자외선 소독한 상수도수를 자유급이하였다. 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물중에 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 군분리를 실시하였으며, 각 군의 평균체중에 대한 군간 차이는 통계학적 검증(ANOVA)을 실시하여 확인하였다. 동물의 개체식별은 피모색소표시법 및 사육상자별 tag 표시법을 이용하였다. 실험동물 사육 관리는 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"를 기준으로 유지하였다.

투여방법

시험물질의 투여: 실험동물은 정상군(control), UV대조군(UV control), UV/미용식품복용 저농도군(UV/APB-01(×5), UV/미용식품복용 고농도군(UV/APB-01(×10)) 등 5개군으로 나누어 실험을 실시하였다(Table 1). 미용식품 복용군은 추출물의 고형분을 기준으로 임상사용량의 5배(×5), 10배(×10)를 기준으로 체중 kg당 10 ml씩 존대를 이용하여 경구반복투여하였으며, 정상군과 UV대조군은 생리식염수를 투여하였다. 투여기간은 총 10주로 주 5일 동일한 시간(10:00~10:30)에 투여하였다. APB-01은 주 1회 조제하여 사용하였으며, 임상사용량이 3.75 g/50 kg/day이고 자음미단 엑기스와 후지플라본 P10이 각각 20 mg/kg/day, 8.25 mg/kg/day씩 포함되어 있음을 근거

Table 1. Experimental group and dose regimen

Group	Sex	Animal no.	UV 조사여부	투여량
Control	female	NF1~10	×	Saline: 10 ml/kg
UV control	female	PF1~10	○	Saline: 10 ml/kg
UV/APB-01(×5)	female	LF1~10	○	자음미단 엑기스: 100 mg/10 ml/kg 후지플라본 P10: 41.25 mg/10 ml/kg
UV/APB-01(×10)	female	HF1~10	○	자음미단 엑기스: 200 mg/10 ml/kg 후지플라본 P10: 82.5 mg/10 ml/kg

로 임상사용량의 5배 및 10배의 농도를 조제하였다.

UV 조사: 실험동물에 주 3회 10주간 동일한 시간(10:30~11:30)에 UV를 조사하였다. UV 조사는 태양광과 유사하게 UV를 방출하는 UVB 램프(Waldmann UB800, Germany)를 이용하였으며, 첫째 주는 1 MED(minimal erythemal dose, 약 55~60 mJ/cm²)를, 둘째 주는 2 MED, 셋째, 넷째 주는 3 MED, 다섯째 주 이후에는 4 MED를 조사하여 실험기간 중 총 UV 조사량이 140 MED가 되도록 하였다. 이때 UV 조사량은 Waldmann UV meter(Waldmann Lichttechnik GmbH, Germany)를 이용하여 확인하였다. 동물의 피부채취 시 즉각적인 UV 손상에 의한 영향을 받지 않도록 마지막 한 번의 UV 조사는 실시하지 않았다. 정상군(control)은 UV를 조사하지 않았다.

관찰 및 검사 항목

임상 증상 관찰 및 체중, 사료 및 음수량 측정: 적응 기간 및 시험 기간 동안 1일 1회 임상 증상의 변화 및 사망여부를 관찰하였다. 체중 측정은 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 시험 시작 전, 시험기간 중 주 2회(월, 목)에 실시하였다. 사육 상자별로 사료 및 음수 섭취량을 매주 1회 측정하였다.

피부의 육안 관찰 및 피부주형의 분석 (replica image analysis): 주름개선 효과의 판정을 위해 군당 10마리씩 6주, 8주, 10주째에 Hairless mice의 등쪽을 디지털 카메라(C-700, Olympus, Japan)를 이용해 근접 촬영하고, 주름정도를 객관적으로 평가하기 위해 실리콘폴리머(SILFLO impression material, Flexico, England)를 이용하여 피부주형(replica)을 채취하였다. 채취한 피부주형은 빛의 입사각을 20도로 고정하여, 주름 그림자 명암 영상을 CCD 카메라(SDC-45, Samsung, Korea)로 찍어 이미지 파일화 한 후, 컴퓨터 영상 분석 시스템인 Skin Visiometer SV600 software(Courage+Khazak)를 이용하여 R1~R5의 값을 측정하고 통계처리하여 군별 주름정도를 평가하였다. Replica의 분석은 (주)IEC Korea에 의뢰하여 실시하였다.

조직병리학적 관찰: 시험종료 후 모든 동물은 안락사 시킨 후 부검을 실시하였으며, 등쪽 피부는 떼어내어(2×2 cm), filter paper에 편평하게 부착하고, 10% 중성 포르말린에 고정시킨 다음 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매하여 4 μm 절편을 잘라 H&E(Hematoxylin & Eosin) stain, Verhoeff stain(Elastic fiber 및 collagen을 감별), Masson-trichrome stain(Collagen을 감별), Luna stain(Elastic fiber 검출) 등을 실시하였다.

통계학적 방법: 본 시험에서 얻은 결과치는 one-way ANOVA와 Student t-test를 이용하여 대조군과 시험물질 투여군 간의 통계학적 유의성을 검정하였다($p < 0.05$). 또한 병리조직학적으로 관찰된 피부 두께에 대해서도 검정을 실시하였다. 피부주형의 분석의 경우 각 그룹별로 시간 경과에 따른 주름 변화와 각 주별로 자외선 조사량에 따른 주름 변화를 비교 분석하였으며 Kruskal Wallis test로 통계 분석하여 $p < 0.05$ 에서 유의적 차이가 있음을 검정하였다.

결 과

임상증상 관찰 및 사망동물의 관찰

정상군을 포함한 모든 시험군에서 시험 기간 동안 사망한 동물은 관찰되지 않았으며, 전 동물에서 시험물질 투여로 인한 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다(Table 2).

체중변화 관찰

투여전 각 동물은 고른 체중범위(24.42±1.84~25.08 ± 1.65 g)를 나타내었으며, 시험물질 투여기간 중 정상군을 포함한 시험군 모두가 정상적인 체중증가를 나타내었

Table 2. Clinical signs and death rate in hairless mice orally treated with test materials

Group	Sex	Animal no.	Clinical signs	Mortality (%) ^b
Control	female	NF1~10	NAD ^a	0
UV control	female	PF1~10	NAD	0
UV/APB-01(× 5)	female	LF1~10	NAD	0
UV/APB-01(× 10)	female	HF1~10	NAD	0

^aNo abnormalities detected.

^bNo. of dead/No. of treated animals.

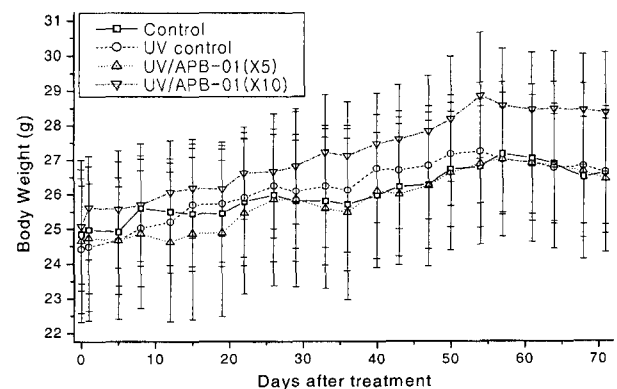


Fig. 1. Body weight changes in hairless mice orally treated with test materials. Each point represents the mean±S.D. □, control [n=10]; ○, UV control [n=10]; △, UV/APB-01 (×5) [n=10]; ▽, UV/APB-01 (×10) [n=10]

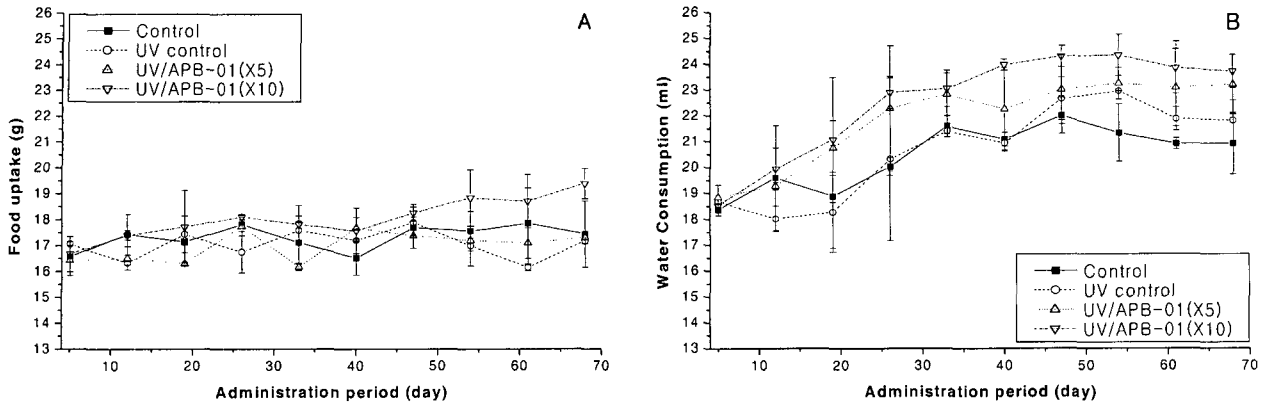


Fig. 2. Daily mean food uptake (A) and Water consumption (B) in hairless mice orally treated with test materials. Each point represents the mean±S.D. ■, control [n=10]; ○, UV control [n=10]; △, UV/APB-01(X5) [n=10]; ▽, UV/APB-01 (×10) [n=10].

다. UV/APB-01 고농도군이 다른 군에 비해 체중 증가율이 높았지만, 통계적으로($p < 0.05$) 유의한 변화는 관찰할 수 없었다(Fig. 1).

사료섭취량 및 음수섭취량

시험 전 기간에 걸쳐 사료, 음수 소비량에 대해 통계적으로 유의한 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

Replica 영상분석

UV 조사 기간 중, 육안으로 관찰시 정상군에 비해 UV 대조군의 피부주름 증가가 뚜렷하였으며, APB-01을 투여한 군은 UV 대조군에 비해 주름 증가가 현저히 억제되고, 정상군과 비슷한 정도의 양호한 피부상태를 보여 주었다 (Fig. 3). 주름 정도를 객관적으로 비교하기 위하여 6주, 8주, 10주에 제작된 replica를 image analyzer로 분석평

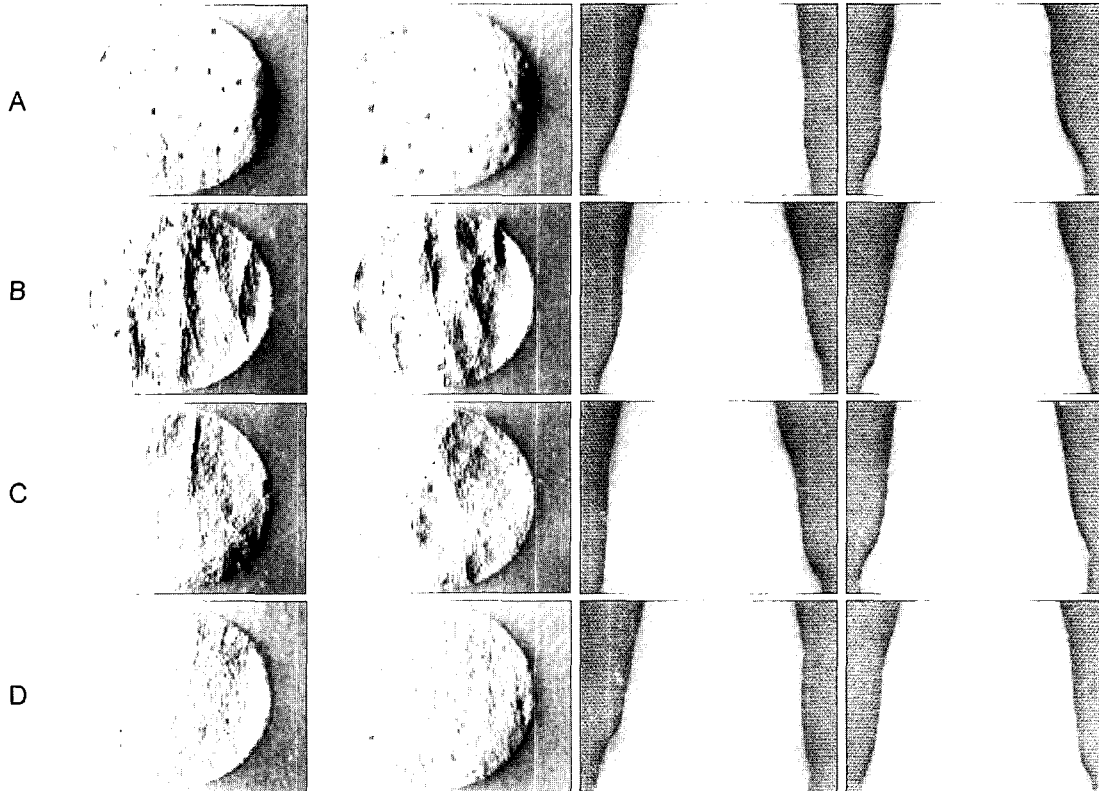


Fig. 3. Features of dorsal skin of hairless mice at the end of the irradiation period (10 weeks later). A, Control; B, UV Control; C, UV/APB-01 (×5); D, UV/APB-01 (×10).

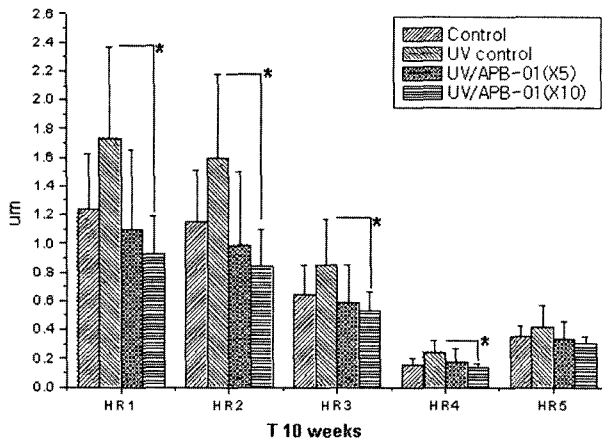


Fig. 4. Evaluation of microrelief of UV-damaged skin in hairless mice and age-matched unirradiated mice. Results are expressed as mean±S.D. for parameters of R1~R5 (um). H, horizontal; R1, distance between the highest mountain and the lowest value; R2, biggest value of those five maximum distances; R3, average of the five maximum distances R1; R4, smoothness depth; R5, arithmetic average roughness. *, Significantly different from UV-irradiated control group ($P<0.05$).

Table 3. Effects of UV irradiation on the epidermal thickness

Compounds	Thickness (n=10) (mm)
Control	15.6 ± 6.4
UV control	42.5 ± 10.5 (2.74)*
UV/APB-01(× 5)	32.5 ± 10.1 (2.08)*
UV/APB-01(× 10)	28.2 ± 9.3 (1.80)*

*Fold increase vs vehicle.

가 한 결과, APB-01을 경구반복투여한 UV/APB-01 고용량군과 UV/APB-01 저용량군은 UV 대조군에 비해 전체적으로 R1~R5 값이 감소하여 주름 감소효과를 나타냈다. 특히 실험 10주의 UV/APB-01 고용량군의 R1~R4 값은 UV 대조군에 비해 통계적으로 유의성 있는 감소를 나타냈다($p>0.05$)(Fig. 4).

부검소견

실험 중 또는 실험 종료 후의 부검시 모든 개체에서 본 시험물질에 의한 것이라고 인정되는 어떠한 유의한 병변도 관찰되지 않았다.

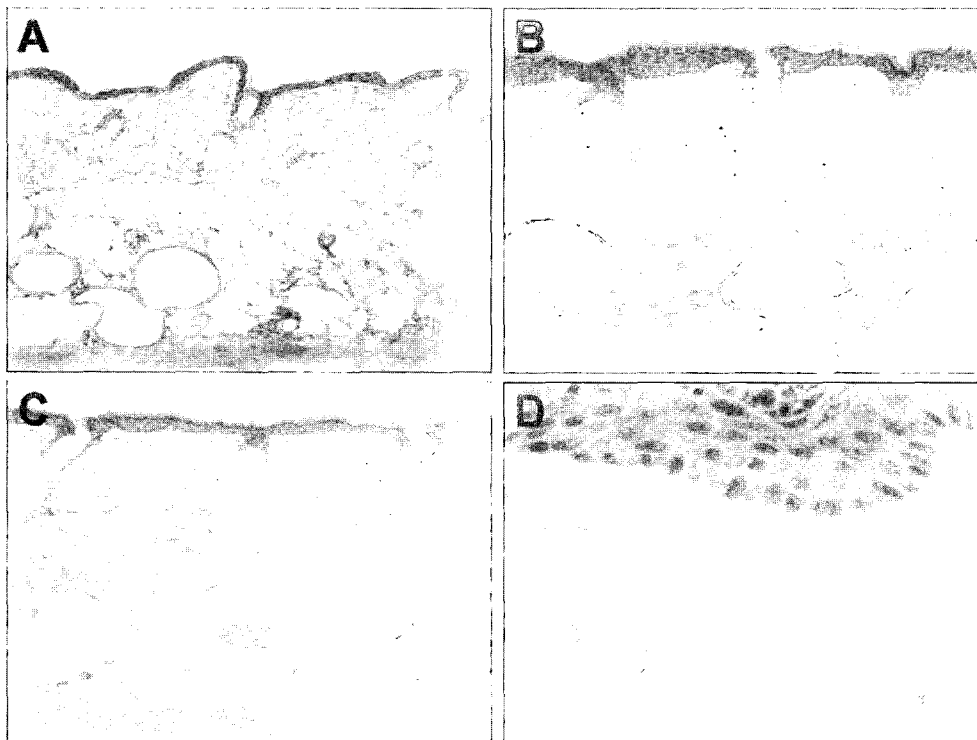


Fig. 5. Histological section of hairless mice dorsal skin exposed to chronic UV irradiation. Hematoxylin & Eosin (H&E) staining. A: Control group. The epidermis consist of two to three cell layers. Original magnification ×80. B: UV control group. The epidermis consist of seven to eight cell layers, Keratinocytes demonstrates varying degrees of cellular atypia. Collagen in uppermost dermis has reduced affinity for stain and collagen bundles were fractured. Sebaceous gland size was increased. Original magnification ×80. C: UV/APB-01 (×10) group. The epidermis consist of four to five layers. Atypia of Keratinocytes were reduced compared to Fig. 5B. Original magnification ×80. D: UV control group. Fractured collagen bundles and atypia of keratinocyte was seen. Original magnification ×400.

피부조직의 병리학적 관찰

H & E stain: UV 조사 대조군에서는 표피 두께가 2~3배 정도 증가되었으며(Table 3), 비조사군의 미세하고 탄력적인 주름에 비해 두껍고 깊은 주름을 형성하고 모낭의 크기도 현저히 증가되어 있었다(Fig. 5). 표피층의 경우 유극세포의 증가, 각질세포의 다형성 등이 관찰되었고, 진피층은 collagen의 감소에 비해 elastic fiber가 다소 증가하는 elastosis가 관찰되었다. APB-01 투여군에서는 표피 두께가 UV 대조군에 비해 줄어드는 양상을 관찰할 수 있었으며, 각질세포의 비정형성이 현저히 감소되었고, 피하 조직에서의 collagen 증가에 의한 elastosis 변화는 관찰되지 않았다.

Verhoeff stain: UV 조사 대조군의 경우 dermo-epidermal junction(DEJ) 부위에 collagen 덩어리(collagen bundle)에 의한 미세한 pore(Grenz zone)가 관찰되고 있으며, 표피 부위에 희미하게 보이는 손상된 collagen 부위와 밝게 보이는 신생 collagen층이 관찰되었다(Fig. 6). Grenz zone은 UV/APB-01 저농도군에서도 미약하게 관찰되고 있지만, UV/APB-01 고농도군에서는 대부분이 신생 교원섬유에 의하여 회복 되는 경향을 보였다.

Masson trichrome stain: 교원섬유의 분포를 확인하기 위한 염색 방법으로 사용된 본 염색법에 의해서는 시험물질 처치에 의한 교원섬유의 분포 차이를 확인할 수 없었다(data not shown).

Luna stain: UV 조사에 의한 elastic fiber의 증가를 관찰하기 위해 사용한 본 염색법에 의해 시험물질 처치에 의한 elastic fiber의 차이를 관찰할 수 없었다(data not shown). 이는 hairless mice 자체가 elastic fiber 관찰이 힘든 특성을 지니고 있기 때문으로 보인다.

고 찰

피부노화는 여러 내인성요인과 외인성요인에 기인되어 일어나며, 특히 광에 의한 피부노화를 광노화(photoaging)라고 한다(Kaminer, 1995). 피부노화가 진행되면, 표피, 진피 및 피하지방의 두께가 얇아지고 변이된 elastin이 증가하여 피부탄력이 감소하며 피부는 거칠어진다(Contet-Audonneau 등, 1999). 또한 UV 조사에 의해 collagenase 또는 gelatinase 같은 matrix metalloproteases(MMP) 효소가 증가되어 collagen 분해가 증가되

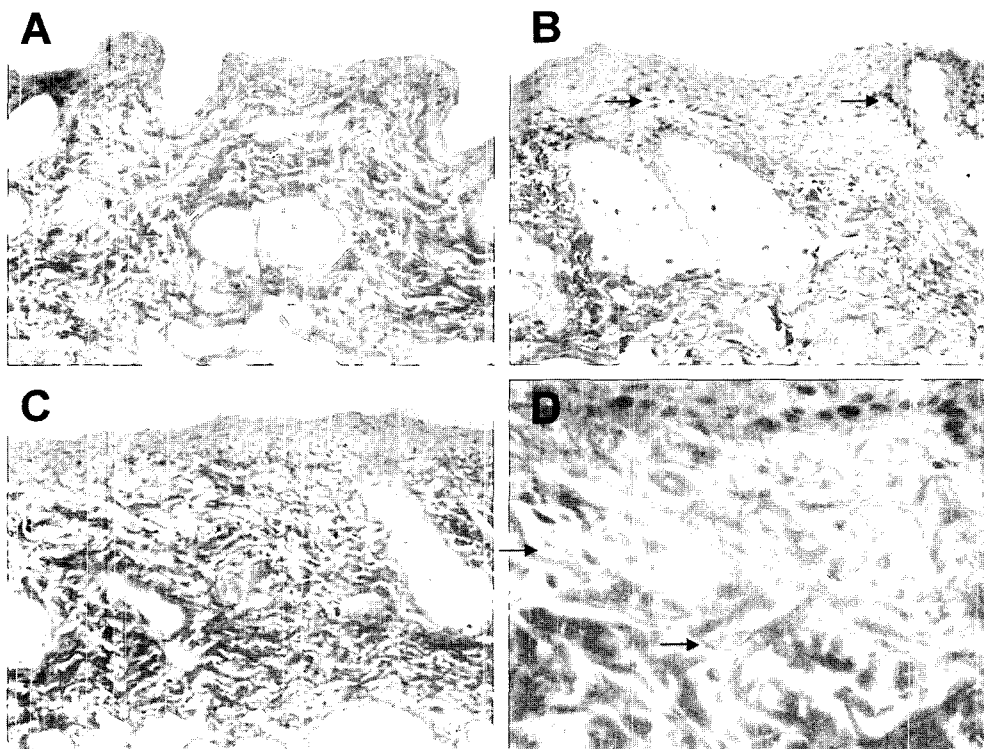


Fig. 6. Histological section of hairless mice dorsal skin exposed to chronic UV irradiation. Verhoeff staining. A: Control group. Original magnification $\times 160$. B: UV control group. Collagen bundle in uppermost dermis was fractured and small pore (arrow) was seen dermo-epidermal junction. Original magnification $\times 160$. C: UV/APB-01 ($\times 10$) group. Collagen bundle in dermis was fracture but not severe to Fig. 6B. Original magnification $\times 160$. D: UV control group. Fragmented collagen fibrils and elastic fibers (arrow) was increase in dermis. Original magnification $\times 400$.

며 이로 인해 피부의 주름이 생성된다(Varani 등, 2001). 이런 피부노화 현상을 예방하기 위해 노화의 요인을 막아 주거나, 피부내 collagen 생합성을 증가시키는 물질을 찾기 위한 많은 연구들이 진행되고 있다. 최근, 섭취하는 음식과 피부와의 연관성에 대한 관심이 높아지고 있으며, 피부상태와 영양상태는 밀접한 관계가 있다고 보고되었다(Boelsma 등, 2001). 비타민을 비롯한 항산화 성분의 복용이 UV에 의한 피부손상을 억제한다고 알려져 있으며(Stahl 등, 2000; Eberlein-Konig 등, 1998), 녹차 및 허부추출물은 광독성 억제효과를 보인다는 보고도 있다(Katiyar 등, 2000). 최근엔 국가적으로 건강기능식품법을 제정하여 과학적, 객관적으로 기능성 및 유용성이 충분히 인정되는 건강기능식품을 개발하고자 하는 노력도 활발히 이루어지고 있다. 특히 젊게 살고자 하는 소비자의 요구와 일치하여 먹는 화장품이라 불리는 미용기능식품에 대한 관심이 높아지고 있는 추세이다. 본 실험에서도 (주)태평양기술연구원에서 개발 중인 APB-01(AmorePacific Beauty-01)을 암컷 hairless mice에 경구반복투여 하여 UV 광노화에 대한 피부주름개선효과가 있는지 여부를 판단하여, 미용기능식품으로서의 효능을 지니고 있는지 여부를 실험하였다.

시험은 정상군과 UV대조군, UV/APB-01 저용량군(임상사용량의 5배)과 UV/APB-01 고용량군(임상사용량의 10배)을 두고, 경구로 주 5회 시험물질을 반복 투여하였으며, 광노화를 유발하기 위하여 주 3회 UV를 조사를 병행하였다. 농도설정의 이유는, 현재 제시되고 있는 건강기능식품법에 의거하여 인체복용량의 5~10배 용량으로 동물실험을 통해 효능을 평가하는 것이 타당하다는 기준에 따랐다. UV 대조군의 경우 기존의 연구결과에서 처럼(Mononey 등, 1992) 주름증가가 현저하게 관찰되었다. 그러나 APB-01을 투여한 군은 UV대조군에 비해 주름 증가가 현저히 적고, 고용량 투여군의 경우에는 정상군과 유사한 정도의 양호한 피부상태를 보여줬다. 이 결과는 replica의 image analyzer 분석평가에서도, 같은 양상으로 관찰되어 시험물질(APB-01) 투여에 의한 주름개선 효과가 인정되었다. Replica 분석결과 정상군의 주름이 가장 적게 관찰되어야 하지만, UV/APB-01 고용량군이나 UV/APB-01 저용량군에 비해 많은 것처럼 측정되었다. 이는 UV 조사를 받지 않은 피부의 모공 크기가 유지되어 모공에 차 있던 공기가 replica 제작시 음각으로 나타나 분석에 영향을 주었기 때문으로 판단된다.

본 시험에서는 피부관련 동물모델중 가장 광범위하게 사용되는 모델인 hairless mice를 이용한 UV 광노화 모델을 사용하였다(Bisset 등, 1987) 일반적으로 hairless mice에 UV를 조사하면 표피세포의 과증식으로 인해 피

부두께가 두꺼워지고(Marta, 2001), 피부내 collagen이 감소하고 collagenase와 GAGs(glucosaminoglycans)가 증가하며 elastin의 변형이 두드러지는 등의 사람에서 일어나는 광노화 현상과 비슷한 변화를 유발한다(Mononey 등, 1992). 이때 각질세포는 비정형을 보이고, 세포의 극성소실과 멜라닌 생성 증가등의 다양한 형태학적 변화를 초래한다(Gilchrest 등, 1983). 그러므로 본 실험에서도 피부주름의 개선효과를 측정하는데 hairless mice 광노화 모델을 선정하게 되었고, 시험결과 미용기능식품의 효능을 평가하는데 있어서 본 모델의 유용성을 확인할 수 있었다.

피부노화와 관련된 피부변화 관찰에 있어서는 collagen, elastic fiber, glycosaminoglycan 등을 조직병리학적으로 관찰하는데, 면역염색법에 의한 type-1 pN collagen 염색법이 많이 사용된다(Kligman 등, 1996). 본 시험에서는 H&E(Hematoxylin & Eosin) stain을 통해 일반적인 관찰을 실시하고, 특수 염색법인 Verhoeff stain(Elastic fiber 및 collagen을 감별), Masson-tri-chrome stain(Collagen을 감별), Luna stain(Elastic fiber 검출) 등을 실시하여, UV 조사에 의한 표피 및 진피, 피하지방층에서의 손상을 효과적으로 관찰할 수 있는지 여부를 검토하였다. 관찰결과, H&E stain에서 UV 조사에 의한 표피 두께 증가와 깊은 주름 형성을 관찰할 수 있었으며, 유극세포의 증가, 각질세포의 다형성 등도 관찰되었고, 진피층은 collagen의 감소에 비해 변형된 elastic fiber가 다소 증가하는 elastosis가 관찰되었다. Elastosis는 UV 조사에 의한 전형적인 병변이라 보고되어져 있다(Kligman, 1996). Verhoeff stain에서는 UV 조사에 의해 dermo-epidermal junction(DEJ) 부위에 교원질 덩어리(collagen bundle)에 의한 미세한 pore가 관찰되었는데, 이는 Grenz zone이라 알려져 있다(Marta, 2001; Montagna와 Carlisle, 1979). 이 증상들은 시험물질을 처치함으로써 감소하는 경향을 보여, H&E stain을 통한 일반적인 관찰과 Verhoeff stain에 의한 elastic fiber 및 collagen 관찰은 광노화의 개선을 판단할수 있는 유용한 염색법이 될 수 있다고 생각된다. 하지만 Masson-tri-chrome stain과 Luna stain은 투여에 의한 군간 차이를 나타내 주지 못했다. 이러한 조직병리학적 관찰은 임상관찰등과 병행되어 적절히 활용되어져야 된다고 판단된다.

이상의 실험 결과를 종합해 볼 때, 암컷 hairless mice에 APB-01의 경구반복투여시 UV 조사로 유도된 광노화 억제 및 피부주름개선효과가 확인되었으며, Hairless mice를 이용한 본 시험모델은 건강기능식품의 피부미용과 관련된 효능을 검증하는 유용한 시험법이라고 판단된다.

참고문헌

- Altman, D.G. (1993): Comparing groups-categorical data: Practical statistics for Medical Research, Chapman & Hall, London, 229-276.
- Bisset, D.L., Hannon, D.P. and Orr, T.V. (1987): An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.*, **46**, 367-378.
- Boelsma, E., Hendriks, H. and Roza, L. (2001): Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.*, **73**, 853-864.
- Contet-Audonneau, J.L., Jeanmaire, C. and Paulty, G. (1999): A histological study of human wrinkle structures: comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas. *Br. J. Dermatol.*, **140**, 1038-1047.
- Epstein, J.H. (1983): Photocarcinogenesis, skin cancer, and aging. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **9**, 487-502.
- Eberlein-Konig, B., Placzek, M. and Przybilla, B. (1998): Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and d-alpha-tocopherol (vitamin E). *J. Am. Acad. Dermatol.*, **38**, 45-48.
- Fuchs, J., Huflejt, M.E., Rothfuss, L.M., Wilson, D.S., Carcamo, G. and Packer, L. (1989): Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation. *J. Invest. Dermatol.*, **93**, 769-773.
- Gilchrest, B., Szabo, G., Flynn, E. and RM G. (1983): Chronologic and actinically induced aging in human face skin. *J. Invest. Dermatol.*, **80**(8), 1S-85S.
- Hiroaki, M., Ichiro, K., Tomomi, S. and Toshio, I. (2001): Prevention of the photodamage in the hairless mouse dorsal skin by kojic acid as an iron chelator. *Eur. J. Pharmacol.*, **411**, 169-74.
- Kambayashi, H., Yamashita, M., Odake, Y., Takada, K., Funasaka, Y. and Ichihashi, M. (2001): Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse. *J. Dermatol. Sci.*, **27**, S19-S25.
- Kaminer, M.S. (1995): Magnitude of the problem. In: Gilchrest BA, eds. Photodamage. Blackwell Science, Inc., 1-15.
- Katiyar, S.K. and Ahmad, N. (2000): Green Tea and Skin. *Arch. Dermatol.*, **36**, 989-994.
- Kim, S.Y., Ahn, D.K., Park, S.K., Lee, J.Y., Kim, W.G., Sim, Y.C. and Lee, S.J. (2002): Protective effects of jaummidan (Ciyinmei-dan) against skin photoaging in hairless mouse model and UVB-induced damage in human fibroblasts. *J. Korean Oriental Med.*, **23**, 43-53.
- Kligman, A.M. (1969): Early destructive effect of sunlight on human skin. *J. Am. Med. Assoc.*, **210**, 2377-2380.
- Kligman, L.H. (1996): The hairless mouse model for photoaging. *Clinics in Dermatology*, **14**, 183-195.
- Kligman, L.H., Akin, F.H. and Kligman, A.M. (1982): Prevention of ultraviolet damage to the dermis of hairless mice by sunscreens. *J. Invest. Dermatol.*, **78**, 181-189.
- Kligman, L.H., Sapadin, A.N. and Schwartz, E. (1996): Peeling agents and irritants, unlike tretinoin, do not stimulate collagen synthesis in the photoaged hairless mouse. *Arch. Dermatol. Res.*, **288**, 615-620.
- Marta, J.P. (2001): Aging of the skin. *The biology of the skin. Parthenon publishing.* 209-218.
- Moan, J. and Dahlback, A. (1992): The relationship between skin cancers, solar radiation and ozone depletion. *Br. J. Cancer*, **65**, 916-21.
- Moloney, S.J., Edmonds, S.H., Giddens, L.D. and Learn, D.B. (1992): The hairless mouse model of photoaging: evaluation of the relationship between dermal elastin, collagen, skin thickness and wrinkles. *Photochem. Photobiol.*, **56**, 505-511.
- Montagna, W. and Carlisle, K. (1979): Structural changes in aging human skin. *J. Invest. Dermatol.*, **73**, 47-53.
- Nishimori, Y., Edwards, C., Pearse, A., Matsumoto, K., Kawai, M. and Marks, R. (2001): Degenerative alterations of dermal collagen fiber bundles in photodamaged human skin and UV-irradiated hairless mouse skin: possible effect on decreasing skin mechanical properties and appearance of wrinkles. *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 1458-1463.
- Record, I.R., Dreosti, I.E., Konstantinopoulos, M. and Buckley, R.A. (1991): The influence of topical and systemic vitamin E on ultraviolet light-induced skin damage in hairless mice. *Nutr. Cancer*, **16**, 219-225.
- Stahl, W., Heinrich, U., Jungmann, H., Sies, H. and Tronnier, H. (2000): Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**, 795-798.
- Scharffetter-Kochanek, K., Brenneisen, P. and Wenk, J. (2000): Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp. Gerontol.* **35**, 307-316.
- Taylor, C.R., Stern, R.S., Leyden, J.J. and Gilchrest, B.A. (1990): Photoaging/photodamage and photoprotection. *Arch. Dermatol.*, **22**, 1-15.
- Uitto, J., Fazio, M.J. and Olsen, D.R. (1989): Molecular mechanism of cutaneous aging. Age-associated connective tissue alterations in the dermis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**, 614-622.
- Varani, J., Spearman, D., Perone, P., Fligiel, S.E., Datta, S.C., Wang, Z.Q., Shao, Y., Kang, S., Fishcer, G.J. and Voorhees, J.J. (2001): Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am. J. Pathol.*, **158**, 931-942.
- Werninghaus, K., Meydani, M., Bhawan, J., Margolis, R., Blumberg, J.B. and Gilchrest, B.A. (1994): Evaluation of the photoprotective effect of oral vitamin E supplementation. *Arch. Dermatol.*, **10**, 1257-1261.