

인삼유래 Ginsenoside Rg3에 의한 항-주름 효과

김성우[†] · 정지현 · 조병기

(주)코리아나화장품 피부과학연구소

Anti-wrinkle Effect by Ginsenoside Rg3 Derived from Ginseng

Sung-Woo Kim[†], Ji-Hean Jeong, and Byoung-Kee Jo

Skin Science Research Center, Coreana Cosmetics Co., 204-1 Jeongchon-ri, Seonggeo-eup, Cheonan-si,
Chungnam 330-833, Korea

요약 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 뿌리는 전통적인 항-노화 및 항-주름제로 동양에서 사용되어 왔다. 그러나 인삼의 어떤 성분이 주름 형성을 억제하는데 효과적인지는 아직 밝혀지지 않았다. 최근 인삼의 주요 활성 성분으로 생각되는 ginsenosides가 20 가지 이상 분리되었다. 이들 중 본 연구원들은 인삼에 의한 항-주름의 작용기작을 밝히기 위해 세포간질(extracellular matrix, ECM) 물질대사에 있어 ginsenoside Rg3의 진피에서의 효과를 시험하였다. 본 연구에서, ginsenoside Rg3의 항-주름 효과를 연구하기 위해 진피의 세포간질 구성 성분과 성장 인자를 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 측정법으로 평가하였다. Ginsenoside Rg3은 human dermal fibroblasts 배양에서 type I procollagen과 fibronectin (FN) 생합성을 농도 증가에 비례하여 촉진시키고($p < 0.05$, $n = 3$), 농도에 비례하여 TGF- β 1 수준을 증가($p < 0.05$, $n = 3$)시키는 것으로 밝혀졌다. RT-PCR분석에서 AP-1 전사 인자(transcription factor)의 일부인 c-Jun의 mRNA 수준이 human dermal fibroblasts에서 ginsenoside Rg3에 의해 감소되었다. 이들 결과들은 ginsenoside Rg3이 fibroblasts에서 TGF- β 1과 AP-1의 발현을 변화시킴으로써 type I collagen과 FN 합성을 촉진시킴을 보여준다.

Abstract: The root of *Panax ginseng* C. A. Meyer has been used as a traditional anti-aging and anti-wrinkle agent in the Orient. However, it is still unknown which component of ginseng is effective at suppressing wrinkle formation. Recently at least twenty ginsenosides regarded as the main active ingredients of ginseng have been isolated. Among them, we examined the effect of ginsenoside Rg3 on dermal ECM metabolism to elucidate the mechanism of anti-wrinkle by ginseng. In our study, to investigate the anti-wrinkle effect of the ginsenoside Rg3, ECM component and growth factor in dermis were evaluated by ELISA assay. Ginsenoside Rg3 was found to stimulate type I procollagen and fibronectin (FN) biosynthesis in a dose-dependent manner in normal human fibroblast culture ($p < 0.05$, $n = 3$), and dose-dependently enhance TGF- β 1 level ($p < 0.05$, $n = 3$). In RT-PCR analysis mRNA level of c-Jun, a member of AP-1 transcription factor, was reduced by ginsenoside Rg3 in normal human fibroblast culture. These results indicate that ginsenoside Rg3 stimulates type I collagen and FN synthesis through the changes of TGF- β 1 and AP-1 expression in fibroblasts.

Keywords: ginsenoside Rg3, anti-wrinkle, extracellular matrix, TGF- β 1

1. 서 론

최근의 연구에 의하면 자연- 또는 광-노화된 피부는 matrix-metalloproteinase (MMP) 발현을 촉진하고, pro-collagen 합성을 감소시키는 신호 전달 경로들의 변화와 연결 조직 손상을 포함하는 중요한 분자적 특징들을 공유함이 밝혀졌다[1].

세포간질(Extracellular matrix, ECM) 분자의 물질대사와

관련된 신호 경로들은 광- 또는 자연-노화에 의해 변화된다. 이들 신호 경로들은 cytokines와 전사 인자(transcription factor)의 조절에 의해 세포간질 구성 성분들과 연관된 다수의 유전자들의 발현에 영향을 준다. 특히, 자연- 또는 광-노화된 피부의 세포간질 성분의 분해 증가는 AP-1과 TGF- β 1 생성의 변화에 기인한다.

TGF- β 1은 세포간질 형성에 가장 큰 영향력을 가지고 있는 것으로 생각되고 있다[2]. TGF- β 1은 fibroblasts를 자극하여 다양한 세포간질 구성성분(Collagen type I 그리고 III, fibronectin (FN), 그리고 proteoglycan)의 생산을 자

[†] 주 저자 (e-mail: kaiserxx@naver.com)

극하고, 그들의 분해효소 생성을 억제하며, 이들 효소에 대한 억제제를 증가시키는 것으로 알려져 있다[2,3].

전사 인자, AP-1은 Jun과 Fos류 단백질로 구성되어 있다[4]. c-Jun과 c-Fos의 이중이합체는 전사 활성을 나타낸다[5]. 인간 피부에서, c-Fos의 수준은 항상 일정하므로 AP-1의 전사 활성은 c-Jun의 발현에 의해 제한된다[6]. 자연- 또는 광-노화된 인간 피부는 비교적 높은 수준의 c-Jun mRNA와 단백질을 생산한다[7,8]. 피부 노화는 증가된 AP-1 활성, MMPs 발현 촉진, 손상된 TGF- β 1 신호전달, collagen 분해 증가, 그리고 collagen 합성 감소에 기인한다[1].

앞선 실험에서 ginsenoside Rg3은 human dermal fibroblasts 배양에서 type I procollagen과 FN 생합성을 증가시켰다. 본 연구자들은 ginsenoside Rg3에 의해 dermal collagen 합성이 증가되는 현상이 TGF- β 1에 의해 유발된 것이라는 가정하에, TGF- β 1 유도과 collagen 물질대사, 그리고 FN 합성간의 상호관계를 ginsenoside Rg3이 첨가된 human dermal fibroblasts에서의 type I procollagen, FN, 그리고 TGF- β 1의 수준을 측정함으로써 연구하였다. 또한, RT-PCR 분석에서 본 연구자들은 ginsenoside Rg3의 처리에 의한 c-Jun 발현의 양상을 평가하였다.

2. 실험 방법

2.1. 시 약

Ginsenoside Rg3은 Biosapogen Technology Co., LTD (Seoul, South Korea)으로부터 제공되어 사용하였다. 그 외의 시약은 모두 특급으로 사용하였으며, 별도의 언급이 없는 것들은 모두 Sigma-Aldrich fine chemicals (St Louis, MI, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 세포배양

신생아 포피조직에서 분리한 human dermal fibroblasts는 BioWhittaker (Walkersville, MD, USA)에서 구입하여 10% 우태아 혈청(Invitrogen life technologies, Carlsbad, CA, USA), 2 mM glutamine (Invitrogen), 그리고 1% Antibiotic-Antimycotic (Invitrogen)이 첨가된 RPMI 1640 (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA)과 5% CO₂, 37°C 조건 하에서 유지하였다. 세포는 passage 3~8만을 사용하였다.

2.3. 세포 생존률

세포 생존률은 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)의 환원에 의한 blue formazan 형성을 이용하여 측정하였다. Human dermal fibroblasts 배양 30 mm dishes에 800 μ L의 MTT (1 mg/mL)

를 첨가하여 1~2 h 배양하였다. 200 μ L의 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate/0.01 M HCl을 첨가하여 반응을 중지시키고 세포로부터 용해된 formazan을 얻어 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. 시료 처리

Human dermal fibroblasts는 100 mm dishes에 complete medium을 사용하여 0.5×10^6 cells/mL로 분주하였다. 배양 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)으로 3회 세척하고 우태아 혈청이 첨가되지 않은 RPMI 1640 배지를 가하였다. Ginsenoside Rg3 또는 TGF- β 1 (Invitrogen)을 최종농도가 각각 10~30 μ g/mL 그리고 10 ng/mL이 되도록 첨가하였다.

2.5. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

각 실험군의 배양 시간에 따른 세포 배양액의 Procollagen type I C-terminal peptide (PICP), FN 그리고 TGF- β 1의 함유량은 ELISA에 의해 분석되었다. ELISA kit은 PICP ELISA kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), Fibronectin EIA kit (Takara), 그리고 Quantikine™ High Sensitivity ELISA kit for TGF- β 1 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)이 사용되었다.

2.6. RNA 분리

RNA 분석을 위해 세포 내의 total RNA를 human dermal fibroblasts 배양으로부터 추출하였다. RNA 추출과 정제는 Trizol kit (Invitrogen)에 기술된 방법에 의해 수행하였다. RNA의 순도와 무결성은 A₂₆₀ nm/A₂₈₀ nm 비율 측정과 agarose gel 전기영동을 통해 확인하였다. RNA 수득율은 260 nm에서의 흡광도로 측정하였고 사용전까지 -70°C에서 보관하였다.

2.7. Reverse Transcriptase-polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

추출된 total RNA는 RNase-free DNase I (Promega, Madison, WI, USA)으로 37°C에서 1 h 동안 반응하였다. cDNA 합성은 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Progega)를 사용하여 수행하였다. Reverse transcription 반응물은 PCR 증폭에 직접 사용하였다. PCR 산물은 2% agarose gel 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 자외선광하에서 관찰하였다. Band의 강도는 Gel-Pro analyzer (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA)를 이용하여 정량화하였다.

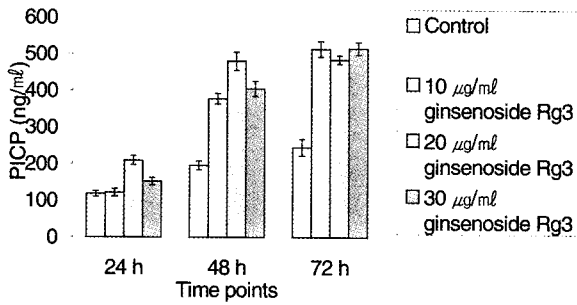


Figure 1. Ginsenoside Rg3 increases PICP levels for normal dermal fibroblasts. Levels of PICP in the media of normal fibroblasts cultured in a serum-free model with or without ginsenoside Rg3 were determined at 24, 48, and 72 h by a specific ELISA. All differences were statistically significant ($p < 0.05$).

2.8. 통계적 분석

자료는 one-side t-tests로 분석하였다. 모든 차이는 $P < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결 과

3.1. 세포 생존율

1, 2, 그리고 3일 시료처리 후 세포로부터 얻어진 formazan을 분석한 결과 ginsenoside Rg3의 첨가에 의한 세포 생존율에 변화가 없었다(data not shown).

3.2. Human Dermal Fibroblasts에서의 Type I Collagen 합성

Ginsenoside Rg3을 human dermal fibroblasts에 첨가하였을 때 PICP의 생산에 커다란 변화가 있었다(Figure 1). 10 µg/mL로 ginsenoside Rg3이 첨가되었을 때, normal fibroblasts에서 생산된 PICP 수준은 24, 48, 그리고 72 h에서 각각 3.3%, 92.9%, 그리고 109.8% 증가하였다. 20 µg/mL로 ginsenoside Rg3이 첨가되었을 때, PICP 수준은 24, 48, 그리고 72 h에서 각각 78%, 144.9%, 그리고 97.6% 증가하였다. 30 µg/mL로 ginsenoside Rg3이 첨가되었을 때, 생산된 PICP 수준은 24, 48, 그리고 72 h에서 각각 28.8%, 106.6%, 그리고 110.6% 증가하였다. 각 군의 표준 편차를 고려할 때, 10 µg/mL과 30 µg/mL로 ginsenoside Rg3이 첨가되었을 때 48 그리고 72 h에서 유사한 증가도를 나타냈다. 그러나, 20 µg/mL로 ginsenoside Rg3이 첨가되었을 때는 48 h에서 10 µg/mL과 30 µg/mL로 첨가때보다 월등히 우수한 효과를 나타냈다.

3.3. Human Dermal Fibroblasts에서의 FN 합성

Ginsenoside Rg3이 첨가된 human dermal fibroblasts에

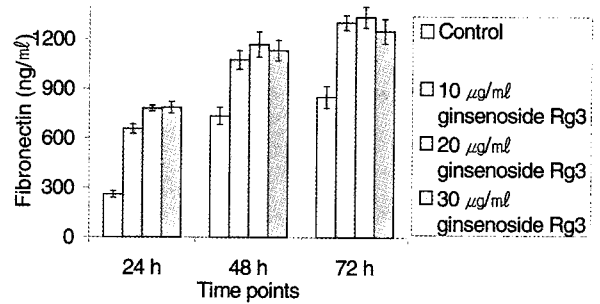


Figure 2. Ginsenoside Rg3 increases fibronectin synthesis in normal dermal fibroblasts. Levels of fibronectin in the media of normal fibroblasts cultured in a serum-free model with or without ginsenoside Rg3 were determined at 24, 48, and 72 h by a specific ELISA. All differences were statistically significant ($p < 0.05$).

서의 FN 생성은 크게 증가하였다(Figure 2). 10 µg/mL, 20 µg/mL, 그리고 30 µg/mL로 ginsenoside Rg3이 첨가되었을 때 모든 시간대에서 FN 합성이 크게 증가하였다($p < 0.05$). Ginsenoside Rg3이 첨가되었을 때, FN 수준은 24, 48, 그리고 72 h에서 10 µg/mL로 첨가경우 각각 253.6%, 301.5%, 그리고 303.9%, 20 µg/mL로 첨가경우 각각 146.1%, 158.8%, 그리고 153.9%, 30 µg/mL로 첨가경우 각각 153.0%, 156.9%, 그리고 147.0% 증가하였다. Ginsenoside Rg3은 24 h 배양에서 48과 72 h 배양보다 더 우수한 효과를 나타냈고, 10 µg/mL보다 20 µg/mL과 30 µg/mL의 농도에서 더 효과적이었다. 각 처리 군의 표준편차를 고려할 때, 20 µg/mL과 30 µg/mL로 ginsenoside Rg3을 24 h 배양하였을 때 FN 수준의 증가율은 유사했다.

3.4. Human Dermal Fibroblasts에서의 TGF-β1 합성

Ginsenoside Rg3을 처리한 human dermal fibroblasts는 TGF-β1 생성을 증가시켰다(Figure 3). 10 µg/mL, 20 µg/mL, 그리고 30 µg/mL로 ginsenoside Rg3을 첨가배양하였을 때 모든 시간대에서 TGF-β1 농도가 증가하였다($P < 0.05$). 각 실험군들은 72 h 배양에서 TGF-β1 생성이 최고치를 나타냈다. 30 µg/mL로 ginsenoside Rg3을 fibroblasts에 처리한 경우 24, 48, 그리고 72 h에서의 TGF-β1 수준(212.6%, 163.2%, 그리고 142.4%)이 10 µg/mL(61.8%, 92.9%, 그리고 99.7%)과 20 µg/mL(138.7%, 140.8%, 그리고 140.3%)의 농도로 처리한 경우보다 더 증가하였다.

3.5. c-Jun 발현에 미치는 ginsenoside Rg3의 효과

Ginsenoside Rg3에 노출된 human dermal fibroblasts에서의 c-Jun mRNA의 발현 양상을 RT-PCR 방법으로 측정하였다. 30 µg/mL로 ginsenoside Rg3을 첨가 배양하였고

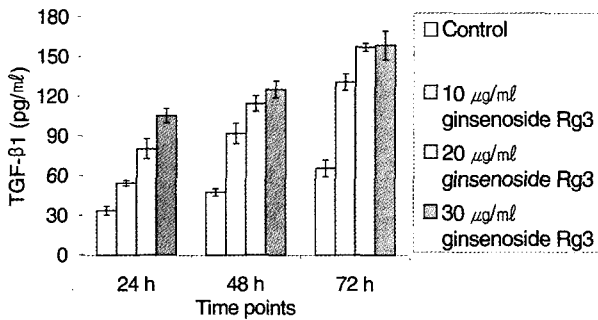


Figure 3. Ginsenoside Rg3 induces TGF- β 1 expression in normal dermal fibroblasts. Quantity of TGF- β 1 in the media of normal fibroblasts cultured in a serum-free model with or without ginsenoside Rg3 were determined at 24, 48, and 72 h by a specific ELISA. All differences were statistically significant ($p < 0.05$).

human dermal fibroblasts는 6, 12, 그리고 24 h 배양 후 RNA를 분리하였다. RT-PCR은 total RNA를 사용하여 수행하였고 그 결과는 agarose gel electrophoresis에서 분석하였다. Figure 4에 나타난 바와 같이, c-Jun mRNA는 6 h 내에 감소하기 시작하여, 24 h까지 점차적으로 감소하였으며, 24 h 이후에는 c-Jun mRNA 수준이 변화하지 않았다 (data not shown).

4. 고 찰

상기 결과들은 ginsenoside Rg3이 인간 피부 ECM의 형성과 분해에 어떻게 작용하는지를 보여주었다. Ginsenoside Rg3은 skin fibroblasts에서 TGF- β 1을 증가시키는 활성화제로서 작용하였고 상기 growth factor가 증가하면 ECM 유지에 관여하는 다양한 유전자들의 발현을 조절하는 하위 신호 전달 경로들이 활성화 된다[9,10]. Skin fibroblasts에서 TGF- β 1에 의해 영향을 받는 EMC 성분들의 조절과 관계된 유전자들에는 type I, III, 그리고 IV collagens, 다양한 MMPs, fibronectin, laminin, 그리고 proteoglycans 등이 있다. 이들 matrix 단백질 등과 효소들은 온전한 ECM network을 유지하는데 매우 중요하다.

또다른 중요한 인자인 dermal matrix 요소들을 조절하는 AP-1 또한 skin fibroblasts에서 ginsenoside Rg3에 의해 영향을 받았다. 전사 인자인 AP-1은 Jun과 Fos류 단백질로 구성되어 있다[11]. c-Jun의 전사는 skin fibroblasts에 ginsenoside Rg3이 첨가됨으로서 억제되었다. 인간 피부에서 c-Fos는 일정한 수준으로 발현되고[8], 따라서 소량 생성된 c-Jun은 AP-1의 전사 활성을 떨어뜨린다. AP-1에 의해 다양한 MMPs의 전사는 증가되고 여러 collagens의 발현은 감소된다. 따라서, ginsenoside Rg3에 의해 영향 받

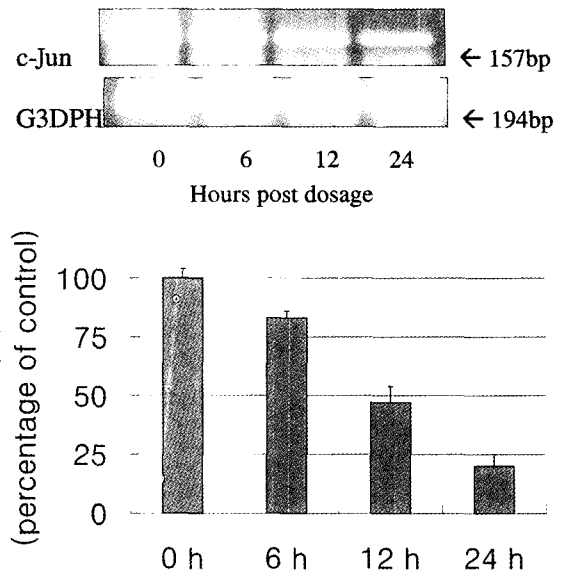


Figure 4. Ginsenoside Rg3 suppresses c-Jun expression in normal human fibroblasts. Levels of c-Jun mRNA in skin fibroblasts with ginsenoside Rg3 were determined at 0, 6, 12, and 24 h by RT-PCR analysis. The figure shows a representative blot. The data shown (mean \pm SD) is from two independent experiments ($n=4$) expressed as a percentage of zero hour (100%) after correcting for loading using G3DPH mRNA levels.

은 인간 피부는 AP-1 전사인자의 감소를 통해 ECM의 분해의 감소와 ECM 합성의 증가를 일으키게 된다.

인삼은 동양에서 오랜 기간 동안 항-노화제로서 사용되어 왔다. 그럼에도 불구하고, 인삼의 효능에 대한 연구가 비교적 적고, 실제 효과를 나타내게 하는 활성 성분들이 아직 인삼으로부터 분리되지 않았다. 본 연구원들은 인삼의 어떤 성분이 항-주름 활성을 가지는지를 연구하였고, 결국, ginsenoside Rg3이 항-주름 효과를 나타내게 하는 강한 활성물질 중 하나임을 밝혀냈다. Ginsenoside Rg3은 skin fibroblasts에서 collagen과 fibronectin과 같은 ECM의 주요 성분의 합성을 증가시키고 TGF- β 1과 AP-1의 발현을 조절하는 인삼에 극소량 함유되어 있는 성분이다.

상기 growth hormone과 전사 인자는 ECM 유지에 중요한 역할을 한다. Ginsenoside Rg3에 의한 이들의 조절은 ECM 대사가 비정상적인 경우 matrix의 합성을 유발하고 분해를 억제하는 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 ginsenoside Rg3은 내부 또는 외부 인자에 의해 야기되는 주름의 방지와 치유에 탁월한 효과를 나타내는 화장품 원료로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. L. Rittie and G. J. Fisher, UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Ageing Res Rev*, **1**(4), 705 (2002).
2. J. Massague, The transforming growth factor-beta family, *Annu Rev Cell Biol*, **6**, 597 (1990).
3. D. Oda, A. M. Gown, J. S. Vande Berg, and R. Stern, Instability of the myofibroblast phenotype in culture, *Exp Mol Pathol*, **52**(2), 221 (1990).
4. P. Angel and M. Karin, The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation, *Biochim Biophys Acta*, **1072**(2-3), 129 (1991).
5. W. Chen, A. H. Borchers, Z. Dong, M. B. Powell, and G. T. Bowden, UVB irradiation-induced activator protein-1 activation correlates with increased c-fos gene expression in a human keratinocyte cell line, *J. Biol Chem*, **273**(48), 32176 (1998).
6. G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, P. Lin, F. McPhillips, Z. Wang, X. Li, Y. Wan, S. Kang, and J. J. Voorhees, Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo, *J. Clin Invest*, **101**(6), 1432 (1998).
7. G. J. Fisher and J. J. Voorhees, Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo, *J. Investig Dermatol Symp Proc*, **3**(1), 61 (1998).
8. J. H. Chung, S. Kang, J. Varani, J. Lin, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, Decreased extracellular-signal-regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin in vivo, *J. Invest Dermatol*, **115**(2), 177 (2000).
9. G. Liao and L. M. Chan, Regulation of extracellular matrix RNA levels in cultured smooth muscle cells. Relationship to cellular quiescence, *J. Biol Chem*, **264**(17), 10315 (1989).
10. T. A. Mustoe, G. F. Pierce, A. Thomason, P. Gramates, M. B. Sporn, and T. F. Deuel, Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta, *Science*, **237**(4820), 1333 (1987).
11. M. Karin, Z. Liu, and E. Zandi, AP-1 function and regulation, *Curr Opin Cell Biol*, **9**(2), 240 (1997).