

赤松葉이 皮膚의 老化에 미치는 影響

박성규^{1#} · 이종찬¹ · 안수미¹ · 이진영¹ · 김연준¹ · 황재성¹ · 이병곤¹ · 장이섭^{1*}

경희대학교 한의과대학 방제학교실, 1 : (주)태평양 기술연구원 피부과학연구소

Anti-aging Effect on Skin with the needles of red pine, *Pinus densiflora*

Seong Kyu Park[#], Jong Chan Lee¹, Soo Mi Ahn¹, Jin Young Lee¹, Youn Joon Kim¹, Jae Sung Hwang¹, Byeong Gon Lee¹ and Ih Seoup Chang^{1*}

Dept. of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University,
1 : Skin Research Institute, AMOREPACIFIC CORPORATION/R&D CENTER

ABSTRACT

Objectives : We investigated the anti-aging effect on skin with the extract of the needles of red pine, *Pinus densiflora*.

Methods : We measured various effects related to skin such as the anti-oxidant effect, the protection against ultraviolet (UV) irradiation, the inhibition of reactive oxygen species (ROS) generation, the induction of heat shock protein 70 (HSP70), the reduction of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) synthesis and senescent cell.

Results : The results were as follows :

The extract of the needles of red pine (RP) had the potent anti-oxidant effect and the ROS scavenging effect. Also RP preserved the systemic anti-oxidant enzyme system (superoxide dismutase and catalase) from UVB irradiation. RP protected the cell membrane from the damages induced by UVB irradiation. RP induced HSP70, a mediator of resistance to UVB irradiation. RP reduced the synthesis of MMP-2 induced by UVB irradiation. And RP inhibited the amount of senescent-associated (SA) β -galactosidase staining, as a marker of replicative senescence.

Conclusions : The results of our study indicate that the extract of the needles of red pine, *Pinus densiflora*, has anti-aging effects on skin.

Key words : *Pinus densiflora*, red pine, skin, anti-oxidant, ROS, LDH, HSP70, MMP-2, senescent cell6

*교신저자 : 장이섭. 경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1 태평양기술연구원 피부과학연구소
· Tel : 031-280-5800 · E-mail : ischang@amorepacific.com

#제1저자 : 박성규, 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 방제학교실 · Tel : 02-961-0330
· 접수 : 2005년 10월 18일 · 수정 : 2005년 12월 13일 · 채택 : 2005년 12월 20일

서론

최근 인체건강이나 피부미용에 대한 관심이 크게 인식되면서 피부의 노화를 유발시키는 내적 인자뿐만 아니라 자외선 스트레스 등의 외적 인자에 의한 피부 노화 현상을 한방원료를 이용하여 예방 또는 해결하고자 이에 대한 기능성 한방소재의 연구개발이 꾸준히 이루어지고 있다.

松葉은 소나무과 소나무 *Pinus densiflora* Siebold et Zuccarini의 잎을 약용으로 사용하는데 우리나라 각지에서 자생하며, 赤松이라고 불리기도 한다. 松葉은 味苦, 性溫, 無毒하며, 心, 脾經에 歸經하여 風濕瘡, 頑癬, 疔瘡, 大風癩瘡, 歷節風 등의 증상을 치료한다. 우리나라에서 자생하는 소나무의 잎은 각종 한의서와 민간요법에서 간장질환, 비노생식기계질환, 위장질환, 신경계질환, 순환기계질환, 피부질환 등에 효과가 알려져 있으며, 최근 여러 문헌에 松葉 추출물의 방향성, 항균성, 항산화 및 멜라닌 활성억제작용 등에 대한 보고가 있다.^{1,2,3)}

피부의 상태는 한의학적 측면에서 외부 요인에 의한 질병뿐만 아니라, 인체의 각종 내재 요인에 의해 영향을 받게 된다. 한의학의 진단 방법인 望診에서 神, 色, 態의 변화는 주요한 요소로서 관찰되며, 특히 피부와 관련된 色澤의 변화는 五臟의 氣血 盛衰를 표현하는 중요 인자로 인식되어 왔다.⁴⁾ 五臟을 구성하는 肝, 心, 脾, 肺, 腎의 虛實 변화는 靑, 赤, 黃, 白, 黑으로 표현되는五色에 영향을 끼쳐 診斷의 중요 요소로서 활용되고 있다.⁵⁾

피부조직에는 피부세포를 보호하기 위한 다양한 항산화체계와 보호인자, 예를 들어 heat shock protein (HSP), 등을 구축하고 있으나 내인성노화나 광노화에 의해 발생하는 활성감소로 피부세포의 손상이 일어나며, 피부조직을 분해하는 효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)의 생합성이 증가하고, 콜라겐의 생합성이 감소하여 주름살이 생기고 탄력이 감소하여 피부의 노화를 유도하는 것으로 알려져 있다.^{6,7,8)} 따라서, 피부 세포를 보호할 수 있는 항산화 물질, 피부를 구성하는 기질 물질인 콜라겐을 분해하는 MMPs 생합성을 억제할 수 있는 물질, 피부세포의 손상을 막아주는 물질 등이 피부노화를 완화시키는 것으로 밝혀져 있다.

한방피부미용에 있어서 가장 큰 특징은 인체를 전체적인 관점에서 보아 피부 노화를 일으키는 원인을 파악하고 전신적인 증상을 개선할 뿐만 아니라 피부

문제를 일으키는 원인을 근본적으로 개선하여 그 재발을 방지하는 근본적인 치료에 역점을 두고 있다. 각종 한의서와 민간요법에서 활용되고 있는 松葉 추출물의 활성을 파악한다면, 한방피부미용에 활용할 수 있는 좋은 한방소재로서의 개발이 가능하며 그 활용도가 높을 것으로 사료된다.

본 실험에서는 피부의 건강 상태를 유지하며 피부 노화를 억제하기 위하여 赤松葉 추출물에 대한 효과를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 赤松葉(the needles of red pine, *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.)은 인천광역시 옹진군 대청면 대청리의 섬, 대청도에서 자생하는 외피가 붉은 소나무 수종인 赤松의 솔잎을 2004년 4월에 채취하여 물로 수세 후 표면의 물기를 제거하고 이를 凍結乾燥한 것을 사용하였다.

2) 시약 및 기기

(1) 시약 : 실험에 사용된 시약으로 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), phosphate buffered saline (PBS), HEPES-buffered control salt solution (HCSS), senescent cell staining kit 등은 Sigma (U.S.A)사 제품을 사용하였으며, trypsin/EDTA, penicillin/streptomycin, Dulbeccos Modification of Eagles medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 등은 Gibco (U.S.A)사 제품을 사용하였고, 2',7'-Dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) 등은 Molecular probes (U.S.A.)사 제품을 사용하였다. LDH 양은 Promega (U.S.A) 사의 cytotox 96 non-radioactive cytotoxicity assay 키트를 사용하였다. Zymogram gelatin gel과 반응 용액, gel 염색시약은 Invitrogen (U.S.A)사 제품을 이용하였다. Western blot에 사용된 1차 항체 중 catalase는 Sigma (U.S.A) 사 제품을, superoxide dismutase (SOD), HSP70 및 actin은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (U.S.A) 제품을 사용하였으며, 2차 항체는 goat anti-mouse HPR conjugate로 Amersham Corp. (U.S.A) 제품을 사용하였다. 기타 일반시약은 특급시약을 사용하였다.

(2) 기기 : 사용된 기기는 ELISA reader (DI biotech, Korea), fluorometer (PerkinElmer, U.S.A), UVB 조사기 (Sankyo Denki, Japan) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 제조

시험에 사용된 赤松葉 추출물은 동결건조된 赤松葉 50g을 정확하게 중량을 측정된 뒤 70% 에탄올로 48시간 동안 常溫冷沈하여 추출하였다. 이후 evaporator를 사용하여 추출에 사용된 시약을 완전히 증발시켜 농축한 후 더 이상의 조작 없이 시료로 사용하였다.

2) DPPH 방법을 이용한 자유라디칼 소거 활성 측정

항산화력을 측정하기 위해 Takao (1994) 등의 방법을 수정하여 사용하였다⁹⁾. 사용된 방법은 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) 방법으로 시험 용액을 에탄올에 농도별로 희석하여 10 μ L씩 96 well plate에 넣고 5mM 에탄올 용액으로 제조된 DPPH를 총 부피를 200 μ L로 하게 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치한 후 520nm ELISA reader로 흡광도를 측정하여 자유라디칼 소거 활성여부를 판정하였다.

3) 자외선 B (UVB)에 의한 세포막손상 보호 측정 실험에 사용한 세포주는 독일 암연구센터의 Dr. Fusenig로부터 분양받은 human keratinocytes HaCaT cell line으로 96 well plate의 각 well에 1X10⁵cell/mL의 cell을 100 μ L씩 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하여 부착하였다. 배양 후 시험시료의 농도가 0.625, 1.25, 2.5, 5 μ g/mL로 포함된 배양액으로 교체하여 3시간동안 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well에 50 μ L의 인산완충염액 (phosphate buffered saline, PBS)을 넣었다. 자외선 B (UVB) 램프를 이용하여 자외선 30mJ/cm²를 조사한 후, PBS를 덜어내고 각 well에 상기 농도의 시험시료가 포함된 세포배양액 200 μ L를 첨가하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양 상층액을 적당량 취하여 세포 손상의 지표 효소인 젖산탈수소화효소 (lactate dehydrogenase, LDH)의 양을 cytotox 96 non-radioactive cytotoxicity assay 키트를 이용하여 측정하였다.

4) 자외선 B (UVB)에 의한 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS) 생성억제 측정

형광측정용 96 well black plate의 각 well에 2.0X10⁵cell/mL의 human keratinocytes HaCaT cell을 100 μ L개로 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 시험시료를 처리하였다. 시험시료의 농도는 0.625, 1.25, 2.5, 5 μ g/mL로 하였다.

시험시료를 넣고 24시간 배양한 후 HCSS로 세척하여 남아있는 배지를 제거하고 HCSS에 20 μ M로 준비된 DCFH-DA를 100 μ L 가하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 20분간 배양하고 다시 HCSS로 세척하였다. 이후 시료 농도별로 처리된 HCSS를 100 μ L 가한 후 자외선 B (30mJ/cm²)를 조사하고 3시간 후의 형광도를 fluorometer (Ex=485 nm, Em=530nm)로 형광 강도를 측정하였다.

5) 자외선 B (UVB)에 의한 SOD, catalase 발현감소 회복 측정

6 well plate에 1X10⁵cell/mL의 human keratinocytes HaCaT cell을 2mL씩 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 시험시료를 처리하였다. 시험시료의 농도는 5 μ g/mL로 하였다. 시험시료를 넣고 24시간 배양한 후 PBS로 세척하여 남아있는 배지를 제거하고, 50 μ L의 PBS를 넣고 자외선 B를 조사한 후 PBS를 덜어내고 시험시료를 처리하여 48시간동안 배양하였다. 48시간 배양 후 세포를 포집하여 세포파쇄액 (Lysis buffer : 250mM NaCl, 25mM Tris-HCl pH7.5, 5mM EDTA pH8.0, 1% NP-40, 0.1M PMSF, 1M DTT, protease inhibitor cocktail, DW)으로 4 $^{\circ}$ C에서 파쇄한 후 BCA용액으로 단백질량을 정량하였다. 동량으로 맞춘 단백질과 sample buffer를 섞어서 sample을 만든 후 sodium dodesyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다.

Western blot analysis를 위해 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후 5% skim milk를 함유한 TBS-T (0.1% Tween 20 in TBS)로 상온에서 1시간 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 TBS-T로 2번 세척하였다. 세척 후 SOD와 catalase 1차 항체 (1 : 2000)를 각각 처리하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight시킨 후 1차 항체에 맞는 2차 항체 (1 : 2000)를 사용하여 상온에서 1시간 반응시켰다. TBS-T로 세척 후 enhanced chemiluminescence (ECL)용액을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에

감광시켜 SOD 및 catalase 단백질의 발현양상을 비교 분석하였다. 단백질이 동량 전이되었음을 확인하기 위해 1차 항체로 actin을 사용하여 상기의 과정을 반복하여 분석하였다.

6) HSP70 생성 촉진을 통한 세포 보호 측정

6 well plate에 1×10^5 cell/mL의 normal human fibroblast을 2mL씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하여 세포를 부착시킨 후 시험시료를 0.25, 0.5, 1 μ g/mL로 처리하였다. 시험시료를 처리하고 24시간동안 배양 후 세포를 포집하여 세포파쇄액으로 4°C에서 파쇄한 후 BCA용액으로 단백질량을 정량하였다. 동량으로 맞춘 단백질과 sample buffer를 섞어서 sample을 만든 후 sodium dodesyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. Western blot analysis를 위해 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후 Ponceus S solution으로 염색하여 동량 전이되었음을 확인하였다. 단백질이 전이된 membrane을 5% skim milk를 함유한 TBS-T (0.1% Tween 20 in TBS)로 상온에서 1시간 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 TBS-T로 2번 세척하였다. 세척 후 HSP70 1차 항체 (1:1000)를 처리하여 4°C에서 overnight시킨 후 1차 항체에 맞는 2차 항체 (1:2000)를 사용하여 상온에서 1시간 반응시켰다. TBS-T로 세척 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액을 적용시킨 다음 암실에서 X-ray film에 감광시켜 HSP70 단백질의 발현양상을 비교 분석하였다.

7) 자외선 B (UVB)에 의한 MMP-2 생합성 억제 측정

6 well plate에 1×10^5 cell/mL의 normal human fibroblast을 2mL씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하여 세포를 부착시킨 후 시험시료를 0.25, 0.5, 1 μ g/mL로 처리하였다. 이후 상기의 방법과 동일하게 UVB 30mJ/cm²을 조사한 후 시험시료를 처리하여 24시간동안 배양하였다. 배양 후 세포 배양액을 수거하여 세포 배양액과 sample buffer를 섞어서 sample을 만든 후 gelatin을 함유한 zymogram gel에 loading 후 전기영동으로 분리하였다. MMP-2 확인을 위해 분리된 단백질을 포함한 zymogram gel을 시약사의 사용법에 준수하여 renaturing buffer (2.7% Triton X-100)로 실온에서

30분간 incubation하고 developing buffer (50mM Tris Base, 40mM 6N HCl, 200mM NaCl, 5mM CaCl₂·2H₂O, Brij 35 0.02%)로 실온에 1시간 incubation 한 후에 새로운 developing buffer 용액으로 갈아서 37°C에서 overnight으로 반응시켰다. 반응이 끝난 gel은 염색하여 그 생합성 정도를 비교하였다. 샘플간 차이가 없음을 확인하기 위해서 세포를 포집하여 세포파쇄액으로 4°C에서 파쇄한 후 nitrocellulose membrane으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후 Ponceus S solution으로 염색하여 동량을 확인하였다.

8) Senescent cell 감소 측정

6 well plate에 1×10^5 cell/mL의 aged human normal fibroblast (doner : 75years-aged, passage : 10)를 2mL씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하여 세포를 부착시킨 후 시험시료를 0.25, 0.5, 1 μ g/mL로 처리하여 48시간동안 배양하였다. 배양 후 세포를 senescent cell staining kit을 이용하여 시약사의 사용법에 준수하여 수행하였다. 세포의 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후에 실온에서 6-7분간 세포를 고정한 후 다시 PBS로 세 번 세척하였다. X-gal이 포함된 염색용액을 넣어주고 CO₂가 들어가서 pH변화가 생기지 않도록 parafilm으로 잘 감싼 후에 37°C에 overnight하였다. 현미경으로 관찰하면서 전체 세포수와 염색된 세포의 수를 세어 비교하였다.

9) 통계처리

실험적은 평균치±표준편차 (Mean ± SEM)로 나타내었으며, 대조군과 실험군과의 평균의 차이를 검정할 때에는 one-way ANOVA로 검정하여 P값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다

결 과

1. DPPH 라디칼 소거에 미치는 영향

赤松葉 추출물의 항산화 활성을 평가하기 위해 DPPH 방법을 이용한 자유라디칼 소거능 시험을 진행하였다. 그림에서 보는 바와 같이 赤松葉 추출물은 약 100-300 μ g/mL의 농도에서 DPPH라디칼 소거 활성을 나타내었으며 50%의 라디칼 소거활성을 나타내

는 농도 (IC₅₀)는 161µg/mL이었다. 양성 대조군으로 사용된 vitamin C의 IC₅₀은 약 15µg/mL이었다 (Fig. 1).

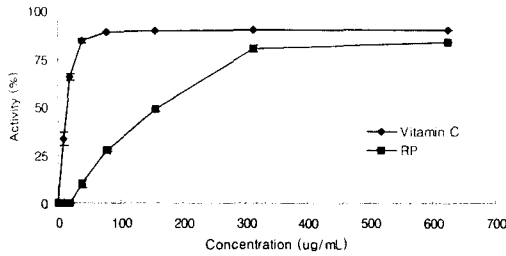


Fig. 1. DPPH radical-scavenging activity of vitamin C and the needles of red pine (RP). Each value is the mean ± SEM of 4 experiments and DPPH radical scavenging activity (%) = [(A_B-A_T)/A_B] X 100, A_B - absorbance of blank sample, A_T - absorbance of tested solution.

2. 자외선 B (UVB)에 의한 세포막 손상 보호효과

자외선에 의한 세포막 손상에 대한 보호효과를 시험하기 위해 세포막 손상지표인 젖산탈수화효소 (LDH)의 활성을 측정된 결과, HaCaT keratinocyte에 UVB 30mJ/cm²를 조사하면 24시간 후 LDH의 활성이 약 2배 (216.4%)정도 증가하였다. 赤松葉 추출물을 0.625, 1.25, 2.5, 5µg/mL의 농도별로 처리하고, UVB를 조사한 군에서는 UVB 조사에 의한 LDH의 세포 배양 배지에서의 활성증가가 농도 의존적으로 감소하는 결과를 보였으며, 통계적으로도 유의한 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 2). 특히 5µg/mL의 적송 추출물을 처리한 경우 UVB를 조사하지 않은 대조군 수준으로 LDH를 억제함을 관찰할 수 있었다(108.2% of control).

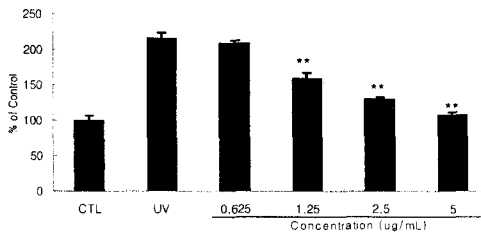


Fig. 2. Effects of the needles of red pine (RP) on LDH productions. Each value is the mean ± SEM of 6 experiments. Significantly different from control (**: p<0.01). CTL : non-treated Control, UV : UVB 30mJ/cm².

3. 자외선 B (UVB)에 의한 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS) 생성억제 효과

UVB 조사 3시간 경과 후 자외선을 조사하지 않은 대조군에 비해 UVB 30mJ/cm²를 조사한 군에서 세포 내 활성산소종이 182.1% 증가하는 현상을 보였다. 이러한 증가는 赤松葉 추출물을 0.625, 1.25, 2.5, 5µg/mL의 농도별로 처리한 경우 농도 의존적으로 활성산소종 생성이 억제되는 현상을 관찰할 수 있었으며, 통계적으로도 유의한 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 3).

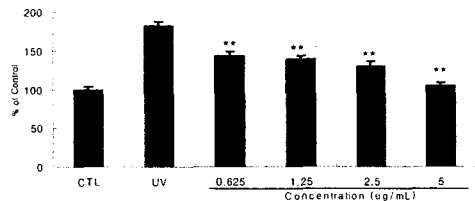


Fig. 3. Effects of the needles of red pine (RP) on DCF oxidation in HaCaT keratinocytes. Each value is the mean ± SEM of 6 experiments. Significantly different from control (**: p<0.01). CTL : non-treated Control, UV : UVB 30mJ/cm².

4. 자외선 B (UVB)에 의한 SOD, catalase 발현감소 회복 효과

HaCaT 세포에 UVB 30mJ/cm²를 조사하고 48시간 뒤 SOD, catalase의 단백질 발현을 관찰한 결과 SOD와 catalase의 발현이 현저히 감소함을 알 수 있었고 (Fig. 4), 赤松葉 추출물 5µg/mL을 처리했을 때 자외선에 의한 항산화 효소 발현 감소를 효과적으로 억제시킴을 관찰할 수 있었다.

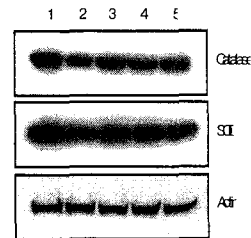


Fig. 4. Effect of the needles of red pine (RP) on catalase and SOD protein expression in HaCaT keratinocyte by Western immunoblot. (Lane 1) non-treated Control, (Lane 2) UVB

30mJ/cm², (Lane 3) UVB + RP 5µg/mL, (Lane 4) UVB + RP 1µg/mL, (Lane 5) RP only 5µg/mL

5. HSP70 단백질 생성 촉진에 미치는 영향

赤松葉 추출물의 세포보호효과를 평가하기 위해 normal human fibroblast에 赤松葉 추출물을 처리하고 24시간 후에 HSP70 단백질 생성 촉진 시험을 진행하였다. 그 결과 赤松葉 추출물을 1µg/mL 처리시 HSP70 단백질 생성이 많이 유도되었으며, 농도 의존적으로 HSP70 단백질 생성이 유도됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

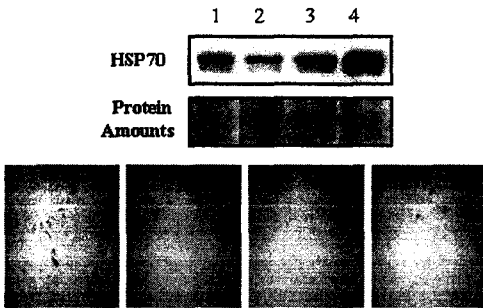


Fig. 5. Effects of the needles of red pine (RP) on HSP70 synthesis. (Lane 1) non-treated Control, (Lane 2) RP 0.25µg/mL, (Lane 3) RP 0.5µg/mL, (Lane 4) RP 1µg/mL.

6. 자외선 B (UVB)에 의한 MMP-2 생합성 억제 효능

자외선에 의한 ECM손상 억제에 대한 효과를 시험하기 위해 赤松葉 추출물을 24시간동안 전처리를 한 후에 UVB 30mJ/cm²를 세포에 조사하여 MMP-2 생합성 증가를 유발하고, 다시 赤松葉 추출물을 24시간 처리하였다. 그 결과 赤松葉 추출물을 1µg/mL 처리시 통계적으로 유의적인 MMP-2 생합성이 억제되었다. 또한 처리 농도에 의존적으로 억제되고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 6).

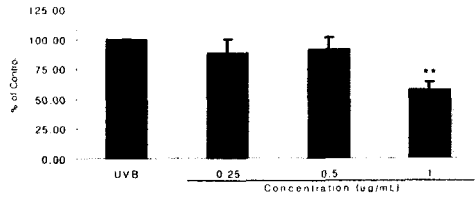
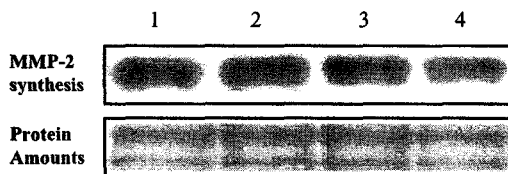


Fig. 6. The effects of the needles of red pine (RP) on the synthesis of MMP-2. Significantly different from control (* : p<0.01). Each value is the mean ± SEM of 4 experiments. (Lane 1) UVB 30mJ/cm², (Lane 2) UVB 30mJ/cm² + RP 0.25µg/mL, (Lane 3) UVB 30mJ/cm² + RP 0.5µg/mL, (Lane 4) UVB 30mJ/cm² + RP 1µg/mL.

7. Senescent cell 감소 효능

赤松葉 추출물의 senescent cell에 대한 효과를 보기 위해서 76세의 나이든 자원자로부터 얻은 normal human fibroblast를 이용하여 replicative senescence로 들어가는 초기 상태인 passage 10인 상태에서 赤松葉 추출물을 48시간 처리하였다. 전체 세포수에 대하여 X-gal염색이 된 세포 수를 비율로 나누어 비교한 결과 赤松葉 추출물을 처리하였을 때 사진에서 X-gal염색이 된 세포 수의 비율이 감소되었으며, 0.25µg/mL와 0.5µg/mL 처리시에는 통계적 유의차를 보였다 (Fig. 7).

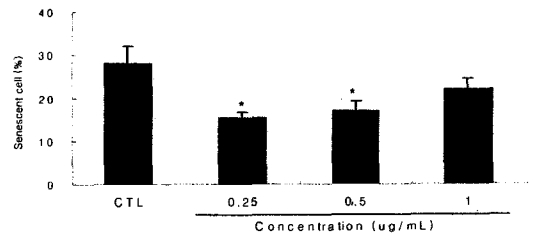


Fig. 7. The effects of the needles of red pine (RP) on the amount of senescent cell. Data represent the mean ± SEM of 4 experiments. * Significantly different from control (* : p<0.05). Pic. 1 : non-treated Control, Pic. 2 : RP 0.25µg/mL, Pic. 3 : RP 0.5µg/mL, Pic. 4 : RP 1µg/mL, (Scale bar : 200 µm, 100X final magnification), CTL : non-treated Control. (Scale bar : 200 µm, 100X final magnification).

고찰

松葉의 성미는 《名醫別錄》에서 맛은 쓰고 성질은 따뜻하다고 하였으며, 또한 《日華子本草》에서는

성질이 따뜻하고 독이 없다고 하였다. 《本草再新》에서 松葉은 心, 脾經에 들어간다고 하였다. 松葉의 약효와 주치는 여러 문헌에 보고되어 있으며, 이를 살펴보면 《名醫別錄》에서는 풍습창을 다스리고 모발을 나게 하며 오장을 안정시킨다고 하고, 《日華子本草》에서는 화상, 동상, 풍습창에 온습포하여 치료한다고 하였으며, 《本草綱目》에서는 風痛脚痺를 제거하고 싹벌레를 죽이며, 수종, 가려움을 제거하며 상처를 아물게 하고 疔瘡를 씻으며 음을 치료한다고 하였다. 또한 《會約醫鏡》에서는 溫疫의 기를 물리친다고 하였다. 《千金方》에서는 松葉酒를 脚弱十二風, 痺不能行的 치료에 사용한다고 하였으며, 또한 歷節風의 치료, 증풍에 의한 구안와사, 잇몸의 동통, 허가 뻣뻣한 증세의 치료하는데 효과가 있다고 하였다. 《外科正宗》에는 풍습성 頑癬의 치료와 大風癩瘡, 歷節風의 치료에 사용한다고 하였다¹⁰⁾.

松葉의 약리작용에 관한 실험으로는 솔잎첨가 식이가 정상 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향, 항균성, 항변이원성, 항산화능, 그리고 항고혈압효과에 관한 연구가 보고되었으나¹³⁾, 아직은 피부노화에 관한 효능에 대한 체계적인 연구가 부족한 실정이다.

본 연구의 시료로 사용한 赤松葉은 대청도에서 자생하는 赤松의 잎만을 선별하여 시험에 사용하였으며, 피부 노화를 예방 또는 개선해 주는 활성을 알아보기 위한 여러 가지 시험을 수행한 결과 우수한 효과가 있음이 증명되었고, 각각의 시험방법을 중심으로 효과를 정리하면 다음과 같다.

노화와 자유라디칼(free radical)의 관계는 많은 연구를 통해 잘 알려진 사실인데, 자유라디칼은 정상적인 대사과정에서 발생하여 생체구성 성분들을 산화적으로 손상시키고 이러한 손상들이 축적되어 결국 노화와 죽음에 이르게 된다는 사실이 알려져 있다. 정상적인 대사과정에서 생성된 자유라디칼들은 생체 내에 존재하는 superoxide dismutase 또는 catalase와 같은 항산화 효소, glutathione, ascorbic acid(vitamin C), α -tocopherol(vitamin E) 또는 ubiquinone과 같은 항산화 방어인자 등에 의하여 제거되고 있으나, 완벽히 제거되지 않고 있다. 제거되지 않은 자유라디칼은 세포 및 조직에 다량 축적되어 세포 내 DNA 및 단백질 손상을 야기하며, 다운증후군, 알츠하이머 등의 유전 질환을 야기할 뿐 아니라 세포 및 조직을 파괴시킴으로써 노화를 진행시킨다¹¹⁾. 피부는 대기 중에 노출되어 있기 때문에 내인성노화(intrinsic aging) 뿐만 아니라 일광 및 자외선에 의해 발생하는 광노화(photoaging)가 많이 진행된다. 이러한 일광 및 자외

선은 피부에 직접 닿을 경우 자유라디칼을 많이 발생시키며, 이러한 자유라디칼에 의해 피부의 항산화 방어체계는 손상을 받게 되어 주름이 증가되고, 피부가 이완되는 등 피부노화가 가속화 된다^{6,7)}. DPPH 방법은 비교적 안정한 자유라디칼로 존재하는 DPPH 자유라디칼의 소거 작용을 확인하는 과정에서 일차적으로 항산화효능을 확인하는 방법이다⁹⁾. 赤松葉 추출물의 항산화 활성을 평가하기 위해 DPPH 자유라디칼 소거능 시험을 진행한 결과 강력한 항산화제로 알려진 vitamin C 보다는 50%의 자유라디칼 소거활성을 나타내는 농도 (IC₅₀)가 높게 나오기는 하였으나, 赤松葉 추출물 역시 우수한 자유라디칼 소거활성이 있음이 확인되었다.

세포 배양액에서 LDH의 활성이 자외선 조사에 의해 증가하였다는 것은 세포막 손상으로 세포 안에 존재하는 LDH가 세포 밖으로 유리되어 나왔다는 것을 의미한다. 특히 5 μ g/mL의 적출 추출물을 처리한 경우 UVB를 조사하지 않은 대조군 수준으로 LDH를 억제함을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 赤松葉 추출물은 UVB조사에 의한 HaCaT 세포의 세포막 손상을 효과적으로 억제한다고 판단할 수 있다. 이러한 결과 역시 UVB 조사 후 급격하게 증가되는 활성산소종을 효과적으로 차단시킬 수 있는 항산화효능에 기인하는 것으로 사료되어, 자외선을 조사했을 때의 세포내 활성산소종의 변화를 관찰할 수 있는 DCFH-DA를 이용한 항산화능 평가를 실시하였다. 자외선 조사 3시간 경과 후 결과에서 赤松葉 추출물을 농도별로 처리한 경우 농도 의존적으로 활성산소종 생성이 억제되는 현상을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 赤松葉 추출물은 자외선 조사에 의한 세포내 활성산소종의 생성을 억제하는 효능이 우수하다고 판단할 수 있었다.

세포내 항산화시스템의 중요한 효소로 알려진 SOD와 catalase의 발현을 관찰한 결과 HaCaT 세포에 UVB를 조사한 후 48시간 뒤 SOD, catalase의 단백질 발현이 현저히 감소함을 알 수 있었고, 赤松葉 추출물 5 μ g/mL을 처리했을 때 자외선에 의한 항산화 효소 발현 감소를 효과적으로 억제함을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때 赤松葉 추출물은 그 자체로 항산화 효능을 가질 뿐 아니라 내부 또는 외부에서 유발되는 산화적 스트레스에 대하여 세포내에 보유하고 있는 항산화 효소시스템 손상에 대한 보호효과가 우수하여 궁극적으로 피부세포를 보호하는 기능을 나타내는 것으로 판단할 수 있다^{12,13,14)}.

HSP70 단백질은 스트레스에 반응하여 유도되는

단백질로 여러 스트레스에 대항하여 세포와 개체를 보호하고 세포사를 막기도 하는 것으로 알려져 있다. 또한 미리 과발현 되어있는 HSP70 단백질은 세포를 스트레스나 각종 독성으로부터 보호하는 것으로 잘 알려져 있다^{15,16,17}. 赤松葉 추출물의 세포보호효과를 평가하기 위해 normal human fibroblast에 赤松葉 추출물을 처리하고 24시간 후에 HSP70 단백질 생성 촉진 시험을 진행한 결과 赤松葉 추출물을 1 μ g/mL 처리 시 HSP70 단백질 생성이 많이 유도되었으며, 처리 농도에 의존적으로 HSP70 단백질 생성이 유도됨을 알 수 있었다. 따라서 赤松葉 추출물은 HSP70 단백질을 일정수준 이상으로 발현시켜서, 이후에 주어지는 스트레스에 대하여 세포 보호 효과를 보일 수 있을 것으로 판단할 수 있다.

여성의 피부 노화가 급격히 진행되는 시점은 폐경기를 전후하여 여성호르몬 분비가 급감되는 시점이다. 대표적인 피부노화 증상인 주름의 발생 기전에 대하여는 비교적 많은 연구가 진행되었으며, 광노화된 피부에서의 교원질 결핍상태가 주름의 원인이라는 가설이 제시된 바 있다. 배양한 피부세포 및 인체 피부에 자외선을 조사할 경우 각종 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현이 증가되며, 증가된 MMPs가 피부를 구성하고 있는 교원질을 분해하게 된다. 오랜 세월 자외선에 노출된 피부에서는 MMPs에 의해 교원질이 분해되어 교원질의 양이 점점 감소하게 되고, 결국에는 교원질이 결핍되어 피부 주름을 형성하게 된다는 가설이 가장 인정받고 있다. 따라서 최근 들어 이러한 노화된 세포의 노화정도를 평가하는 방법으로 피부의 주름을 예방하거나 완화하기 위해서는 노화된 피부의 결핍된 교원질 양을 증가시키는 것이 한가지 방법일 수 있다. 피부에서 교원질 양을 증가시키는 방법으로는 섬유아세포에서의 교원질 합성을 증가시키거나 교원질 분해 효소인 MMPs 발현을 억제하면 가능할 것이다¹⁸. 자외선에 의한 ECM손상 억제에 대한 赤松葉 추출물의 효과를 시험하기 위해 赤松葉 추출물을 24시간동안 전처리한 후에 UVB를 세포에 조사하여 MMP-2 생합성 증가를 유발하고, 다시 赤松葉 추출물을 24시간 처리한 결과 赤松葉 추출물을 1 μ g/mL 처리시 MMP-2 생합성이 억제되었으며 처리 농도에 의존적으로 억제되고 있음을 알 수 있다. 이 결과는 赤松葉 추출물은 자외선에 따른 세포의 MMP-2 생합성 촉진과 ECM손상을 억제하여 피부노화 증상인 주름 발생을 차단해 줄 수 있을 것이라 사료된다.

정상적인 체세포는 영구하게 분열하지 못한다. 따

라서 일정한 세포분열이 가능한 lifespan을 가지고 있는데 최종적으로 세포분열이 중지되는 것을 replicative senescence라고 한다. Senescent cell의 경우 G1 세포주기에 잠혀있으면서 생리적 자극에 따라서 S 세포 주기로 넘어가지 못하기 때문에 성장도 멈추게 된다. 나이는 자원자로부터 얻은 세포가 젊은 자원자로부터 얻은 세포보다 적은 population doubling 후에 senescent 상태가 되기 때문에 노화에 영향을 줄 것으로 여겨지고 있다. Senescent human fibroblast는 β -galactosidase를 발현하기 때문에 DNA 합성 측정과 달리 쉽게 파란 침전물을 생성하는 X-Gal로 검출이 가능하다. 이 β -galactosidase는 pH에 민감하여 pH6 activity를 갖기 때문에 pH6에서 조직학적으로 염색이 가능하다^{19,20}. 赤松葉 추출물의 senescent cell에 대한 효과를 보기 위해서 76세의 나이는 자원자로부터 얻은 normal human fibroblast를 이용하여 replicative senescence로 들어가는 초기 상태인 passage 10인 상태에서 赤松葉 추출물을 48시간 처리하였다. 전체 세포수에 대하여 X-gal염색이 된 세포 수를 비율로 나누어 비교한 결과 赤松葉 추출물을 처리하였을 때 X-gal염색이 된 세포 수의 비율이 감소되었으며, 이러한 결과로 볼 때 赤松葉 추출물은 replicative senescence를 억제하는 효과가 있을 것으로 보인다.

본 연구 결과를 종합 고찰하면 赤松葉 추출물은 우수한 항산화력을 바탕으로 자외선 조사에 따른 광노화를 억제하는 효능이 있음을 알 수 있었으며, 세포에서 과도한 내인성 또는 외인성 스트레스에 저항하기 위한 조절물질을 분비시켜 차후 발생할 수 있는 세포손상을 미연에 방지할 수 있는 효과를 나타낼 수 있음을 확인할 수 있었고, 또한 피부의 항노화 지표인 MMPs 활성억제와 senescent cell 생성을 억제시켜주어 궁극적으로 피부의 항노화 효능을 나타낼 수 있는 우수한 기능성 한방소재임을 알 수 있었다.

결론

피부 노화에 대한 赤松葉의 효능을 규명하기 위하여, *in vitro*에서 자유라디칼 소거 활성, 자외선 조사에 의한 세포막 손상 보호, 자외선 조사에 의한 활성산소종 생성억제, 자외선 조사에 의한 SOD, catalase 발현감소 회복, HSP70 생성 촉진을 통한 세포 보호, 자외선 조사에 의한 MMP-2 생합성 억제 및 senescent cell 감소 등을 측정하여 다음과 같은 결론

을 얻었다.

1. DPPH 라디칼 소거 활성에 대하여 赤松葉은 100-300µg/mL의 농도에서 DPPH 라디칼 소거 활성이 증가하였으며, 50%의 라디칼 소거활성을 나타내는 농도 (IC₅₀)는 161µg/mL이었다.
2. 赤松葉은 자외선 B 조사에 의한 LDH의 활성을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 5µg/mL의 농도에서 최대 억제 효과를 나타내었다.
3. 赤松葉은 자외선 B에 의한 활성산소종 (ROS)의 생성에 대하여 농도 의존적으로 ROS 생성 억제효과를 나타내었다.
4. HaCaT 세포에서 자외선 B에 의한 SOD, catalase의 발현에 대하여 赤松葉은 5µg/mL의 농도에서 효과적인 억제 효과를 나타내었다
5. 赤松葉은 세포를 보호하는 작용을 나타내는 HSP70 단백질의 생성을 농도 의존적으로 증가시켰다.
6. 赤松葉은 농도 의존적으로 MMP-2의 생합성을 억제하였으며, 1µg/mL의 농도에서 유의성있는 억제효과를 나타내었다.
7. 赤松葉은 senescent cell에 대하여 0.25µg/mL와 0.5 µg/mL의 농도에서 유의한 억제 효과를 나타내었다.

이상의 결과 赤松葉은 자유라디칼 소거 활성 및 자외선 조사에 의하여 유도된 세포막 손상, 활성산소종, SOD, catalase, HSP70, MMP-2 및 senescent cell 등에 대하여 유의성 있는 개선 작용을 통하여 우수한 피부 노화 억제 작용이 있음을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. 강운환, 박용곤, 오상룡, 문광덕. 솔잎과 쑥 추출물의 기능성 검토. Korean J Food Sci Technol. 1995 ; 27(6) : 978-984.
2. 성기친. 천연 솔잎추출물의 특성 및 분석. J of Korean Oil Chemists' Soc. 2004 ; 21(4) : 320-326.
3. Jung MJ, Chung HY, Choi JH, Choi JS. Antioxidant principles from the needles of red pine, *Pinus densiflora*. Phytother Res. 2003 ; 17(9) : 1064-1068.
4. 宋兆友. 皮膚病中藥外用制劑. 北京 : 人民衛生出版社. 2000 : 5-6.
5. 原安徽中醫學院 編. 中醫臨床手冊. 서울 : 成輔社. 1983 : 4-5.
6. Gilchrest BA. Skin aging and photoaging : an overview. J Am Acad Dermatol. 1989 ; 21 : 610-613.
7. Bernstein EF, Chen YQ, Tamai K, Shepley KJ, Resnik KS, Zhang H, Tuan R, Mauviel A, Uitto J. Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. J Invest Dermatol. 1994 ; 103(2) : 182-186.
8. Franz T, Ingela KM, Berrin B, Peter N, Robert MK. 72-kD Heat shock protein is a mediator of resistance to ultraviolet B light. J Invest Dermatol. 1995 ; 105 : 160-162.
9. Takao TF, Kitatani N, Watanabe A, Yagiand K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. Biosci . Biotech Biochem. 1994 ; 58(10) : 1780-1783.
10. 國家中醫藥管理局中華本草編委會. 中華本草. 北京 : 上海科學技術出版社. 1999 ; 2 : 293-296.
11. Martínez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. Biochimie. 1995 ; 77(3) : 147-161.
12. Ye SYM, Weijia L, Shaowu L, Zhihua J, Kun Z, Keyan Z, Feng L, Ganglin Y, Guimin L, Junqiu L, Jiacong S. Protection of epidermal cells against UVB injury by the antioxidant selenium-containing single-chain Fv catalytic antibody. Arch Biochem Biophys. 2003 ; 412(1) : 90-94.
13. Epstein JH. Photocarcinogenesis, skin cancer, and aging. J Am Acad Dermatol. 1983 ; 9 : 487-502.
14. Moan J, Dahlback A. The relationship between skin cancers, solar radiation and ozone depletion. Br J Cancer. 1992 ; 65 : 916-921.
15. Jantschitsch C, Trautinger F. Heat shock and UVB-induced DNA damage and mutagenesis

- in skin. *Photochem Photobiol Sci.* 2003 ; 2(9) : 899-903.
16. Calini V, Urani C, Camatini M. Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicol In Vitro.* 2003 ; 17(5-6) : 561-566.
17. Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Luger TA, Jaattela M, Schwarz T. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J Clin Invest.* 1995 ; 95(3) : 926-933.
18. Oh JH, Chung AS, Steinbrenner H, Sies H, Brenneisen P. Thioredoxin secreted upon ultraviolet A irradiation modulates activities of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human dermal fibroblasts. *Arch Biochem Biophys.* 2004 ; 423(1) : 218-226.
19. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 ; 92(20) : 9363-9367.
20. Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ. Is β -galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res.* 2000 ; 257(1) : 162-171.