

홍삼 생약 복합물(KTNG0345)이 섬유아세포의 Procollagen 생합성과 Matrix metalloproteinase-1(MMP-1) 활성에 미치는 영향

소승호[#] · 이성계 · 황의일 · 구본석 · 한경호 · 김나미

KT&G 중앙연구원 건강식품연구소
(2007년 9월 17일 접수; 2007년 11월 23일 수리)

Effects of Korean red ginseng and herb extracts mixture (KTNG0345) on procollagen biosynthesis and matrix metalloproteinase-1 activity in human dermal fibroblast

Seung-Ho So[#], Seong-Kye Lee, Eui-Il Hwang, Bon-Suk Koo, Gyeong-Ho Han and Na-Mi Kim
Health Food Research Group, KT&G Central Research Institute, Yuseong, Daejeon 305-805, Korea
(Received September 17, 2007; Accepted November 23, 2007)

Abstract : Skin wrinkles are associated with collagen synthesis and matrix metalloproteinase-I (MMP-1) activity. This study was carried out to select optimum ratio of 3 herbs in skin health food for anti-wrinkle. Human dermal fibroblast cell was incubated with experimental samples, which were Korean red ginseng ethanol extracts (ER), Torilis fructus water extracts (WT), Corni fructus water extracts (WC) and their mixtures (WM1, WM3). And then we determined effects on collagen biosynthesis, MMP-1 activity and SOD activity in human dermal fibroblast cell. In control group, collagen biosynthesis was amounted at 474.8 ng/ml and 533.9 ng/ml, 539.3 ng/ml, 514.1 ng/ml in ER, WT and WC respectively. Furthermore, WM3 (KTNG0345) was increased to 561.45 ng/ml. MMP-1 activity of ER, WT, WC, WM1 were determined to 31.9 ng/ml, 32.85 ng/ml, 32.0 ng/ml, 31.3 ng/ml and WM3 (KTNG0345) was decreased to 28.85 ng/ml. In addition, the experimental samples showed a antioxidative activities. From this results, we conclude that Korean red ginseng ethanol extracts, Torilis fructus water extracts, Corni fructus water extracts and their mixtures have a anti-wrinkle effect and WM3 (KTNG0345) may be regarded as an optimum composition for synergic effect producing. The standardized components of KTNG0345, ginsenoside-Rb₁, torilin and loganin were identified at 10.85 mg/g, 0.128 mg/g and 3.92 mg/g respectively.

Key words : human dermal fibroblast, collagen biosynthesis, matrix metalloproteinase-I (MMP-1), SOD activity, Korean red ginseng

서 론

현대인은 평균 수명이 연장되고 well-being 트렌드가 확산됨에 따라 신체적인 건강 뿐 아니라 외모를 아름답게 유지하는데 관심이 고조되어 건강하고 아름답게 삶의 질을 향상시키면서 장수하기를 원하고 있으며, 이의 관심분야로는 크게 다이어트와 피부미용을 꼽을 수 있다. 피부미용은 종전에 피부를 직접 관리하는 화장품에 의존해왔으나, 화장품으로 피부에 영양분을 공급하기에는 한계가 있고, 식품섭취에 의해서

장내 건강을 향상시키고 피부에 영양분을 공급하여 피부미용 증진 효과를 나타낼 수 있다는 인식의 변화가 일어남에 따라 피부미용증진과 피부노화방지에 효과가 있는 식품소재들을 찾아내고 이를 이용한 미용목적의 식품개발이 활발히 진행되고 있다.^{1, 2, 3, 4)}

피부의 노화는 나이의 증가와 자외선 등의 외부요인이 주요 원인이 된다. 나이가 증가되면 섬유아세포의 작용과 세포 수가 감소하여 섬유성분의 합성량이 줄어들고 구조가 느슨해져서 탄력이 감소되며 피부세포 내 수분이 손실되며 각질층의 구조가 변화된다. 한편 자외선과 같은 외부요인은 활성산소종을 발생시켜 여러 가지 신호전달 체계를 활성화시킴으로써 activator protein-1(AP-1)과 nuclear factor κ B(NF- κ B)의 활성화에 의한 염증반응과 작용이 증가되며 피부를 구성하는

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-866-5473; (팩스) 042-861-1949
(E-mail) shso@ktng.com

지질, 단백질, 핵산, 효소 등이 손상되어 노화가 일어난다.⁵⁾ 피부노화 중 주름생성은 나이의 증가와 환경적 요인 외에 근육의 분포와 움직임, 유전적인 요인, estrogen 등의 호르몬에 의해 영향을 받으며, 궁극적으로는 진피 내의 기질 단백질이 결핍되어 주름이 발생된다. 피부의 기질 단백질은 피부에 강도와 장력을 주는 콜라겐이 90% 이상 함유되어 있는데 type I collagen이 대부분이고 type III collagen이 소량 포함되어 있으며 피부에 탄력을 주는 탄력섬유가 3-4%정도 함유되어 있다. 콜라겐은 섬유아세포의 작용에 의해 합성되며 콜라겐 분해효소의 작용에 의해 분해되므로 세포의 기질 단백질의 결핍을 막아서 피부 주름을 예방하기 위해서는 교원질 합성을 증가시키고 교원질 분해효소의 작용을 억제시키는 것이 필요하다.

홍삼 성분 중 ginsenoside F₁은 사람의 각질세포에서 자외선 조사로 인한 세포 사멸을 감소시킬 뿐 아니라 자외선으로 촉진되는 세포 자기사멸(apoptosis)로부터 각질 세포를 보호하는 효과가 있으며⁶⁾ ginsenoside-Rb₂는 *in vitro* 상의 epidermal cell에 대한 증식 효과가 있다고 보고되었다.⁷⁾ 또한 compound K는 인간의 각질세포에서 피부 탄력 성분 중의 하나인 히아루론산 생합성에 관련되는 hyaluronan synthase2 (HAS2) 유전자 발현을 증진시키며,⁸⁾ 홍삼과 대두추출물을 hairless mouse에 경구투여 하였을 때 주름 생성을 예방하는 효과가 있다고 보고되었다.⁹⁾ 또한 norepinephrine을 투여한 실험동물에 인삼을 경구투여 했을 때 피부의 혈류 감소를 개선 효과를 나타내었으며¹⁰⁾ 홍삼엑기스를 복강 내 투여했을 때 자외선B를 조사시킨 마우스에서 피부손상을 억제하는 효과가 있었고 피부에 도포했을 때 보다 그 효과가 뚜렷하였다고 보고되었으며,^{11,12)} 본 연구실에서 홍삼의 주요 성분 중 ginsenoside-Rb₁ 이 fibroblast의 콜라겐 생성과 MMP-1활성을 억제하는 효과가 있음을 보고한 바 있다.¹³⁾

사상자(*Torilis fructus*)는 산형과(Umbelliferae)에 속하는 사상(*Torilis japonica*)의 과실로써 식품공전 상에 식품 부원료로 분류되어 있으며¹⁴⁾ 한의서에 습창, 완선, 음중 종통, 음 등의 피부질환에 유효하다고 기록되어 있다.^{15,16)} 약리작용에 관한 연구로는 진통소염작용,¹⁷⁾ 진경작용,¹⁸⁾ anti-invasive efficacy¹⁹⁾ 등이 보고되어 있다. 사상자의 성분으로는 정유성분인 stigmaterol, β -sitosterol, cholesterol과 6 α -diol, torilin 등 9종의 guaian-type sesquiterpenoids가 알려져 있으며,²⁰⁾ essential oil²¹⁾과 sesquiterpenoid 화합물²²⁾ 등이 보고되어 있다.

산수유(*Corni fructus*)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 산수유나무(*Cornus officinalis* SIEB et. zucc)의 과육으로써를 제거하여 사용하며 한의서에는 간과 신을 보호하며, 반

열, 온증, 거상충 작용이 있는 것으로 기록되어 있다.^{17,23)} 산수유의 성분으로는 ursolic acid,²⁴⁾ sallic acid, malic acid와 loganin, morroniside, sweroside 류의 iridoid 배당,²⁵⁾ 비타민 A, tellimagrandin 등의 tannin 류²⁶⁾가 있다. 산수유의 생리활성은 항산화, 항균, 항알러지, 항염증,²⁷⁾ 항암, 진정,²⁴⁾ 진통, 항당뇨 작용²⁸⁾이 보고되어 있고, melanoma 세포의 증식을 억제하여 피부의 색소 침착을 감소시킨다는 보고가 있다.²⁹⁾

본 연구에서는 피부 주름예방 기능성식품을 개발하기 위하여 홍삼과 사상자, 산수유 추출물의 fibroblast에 대한 procollagen 생합성과 MMP-1 저해 활성, 세포증식, SOD 활성을 조사하였으며, 상승효과를 나타낼 수 있는 혼합 비율을 선정하였다.

재료 및 방법

홍삼추출물 제조

한국인삼공사에서 제조한 6년근 홍삼에 55% 주정을 6배량 가하여 65-68°C에서 24시간 동안 6회 추출하였다. 원심분리 여과(5000rpm, 20분, 실온)한 상정액을 혼합하여 60°C 이하에서 감압 농축하여 수분함량 40%의 엑기스를 제조한 다음 분무 건조하였다.

생약재 선정

한의서나 관련자료, 연구 논문 등을 통하여 피부미용 한방소재로 이용된 생약재를 조사하였고, 이중 식용으로 가능한 생약재를 35종 선정하였다. 35종 생약재의 물추출물에 대하여 항산화활성과 collagenase, elastase, tyrosinase의 활성을 조사하였을 때 항산화활성은 산사자, 산수유, 정향 등이 높았고, collagenase와 elastase 저해활성은 사상자, 오가피, 복분자 등에서 높은 것으로 나타났다. 이러한 실험결과에 따라서 사상자와 산수유를 후보 소재로 선정하여 본 연구에 사용하였다.

생약재 추출물 제조

본 연구에 사용한 사상자(중국산)와 산수유(국산)는 2006년 금산 생약시장에서 구입하여 사용하였다. 정제수를 생약재 중량의 6배량 가하고 85°C에서 4시간 동안 추출한 다음 원심분리 여과(5,000xg, 20분, 실온)한 상정액을 감압농축 하여 수분함량 40%의 엑기스를 제조하고 분무 건조하였다.

홍삼과 생약재 혼합물 제조

사상자와 산수유를 2:1의 비율로 혼합하여 상기의 방법으로 수분함량 40%의 엑기스를 제조한 다음 홍삼 Ext와 생약 Ext를 68:232의 비율로 혼합하여 분무 건조한 것을 WM1,

홍삼 Ext와 생약 Ext를 136:164의 비율로 혼합하여 분무 건조한 것을 WM3로 제조하였으며 WM3는 KTNG0345로 명명하였다.

지표성분 함량 조사

지표성분으로 홍삼은 ginsenoside-Rb₁, 사상자는 torilin, 산수유는 loganin을 설정하였으며 시료 중의 이들 지표성분 함량은 유럽약전,³⁰⁾ 김 등³¹⁾의 방법으로 분석하였다. Ginsenoside Rb₁의 분석은 시료 1g에 정제수 100 ml로 용해하여 원심분리(3000×g, 20분)하여 ODS 카트리지를 통과시킨 후 메탄올로 용출하여 5 ml로 정용하고 이를 HPLC로 분석하였다. UV 203 nm에서 검출하였으며, 칼럼은 ODS 250×4.6 mm(ID) 5 μm 칼럼을 사용하였고, 분석 용매의 기울기는 20-32-50-65-90% CH₃CN = 0-10-40-55-70-80 min, 유속은 1.6 ml/min 이었다. Torilin의 분석은 시료 1g에 정제수 50 ml를 가하여 85°C에서 1시간씩 2회 추출하고 농축한 다음, 10% 메탄올 100 ml에 용해하고 hexan 100 ml로 2회 추출, hexan 층을 감압 농축하여 메탄올 2 ml에 용해하여 HPLC로 분석하였다. 칼럼은 YMC-ODS-A(250×4.6 mm(ID), 5 μm) 칼럼을 사용하였으며 용매는 65% MeOH을 이용하고 유속은 1.0 ml/min로 하였다. Loganin의 분석은 시료 1g을 메탄올에 용해하여 HPLC로 분석하였다. 칼럼은 YMC-ODS-AM(250×4.6 mm(ID), 5 μm) column을 사용하였으며 용매는 20%-30% MeOH를 이용하고 유속은 0.8 ml/min로 하였다.

세포 배양

세포는 human dermal fibroblast를 Modern Tissue Technology사(Korea)로 부터 구입하여 사용하였다. 구입한 세포를 DMEM:F12(3:1) 배지에 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하고 trypsinization으로 계대배양 한 후 6-10세대 세포를 실험에 이용하였다.

세포 증식 및 세포 독성 평가

세포 독성은 Loosdrecht의 방법³²⁾을 사용하여 MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide assay를 수행하였다. 세포를 2×10⁴ cells/well 농도로 96-well

plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 1~10 μg/ml의 농도로 첨가하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이렇게 배양된 세포에 MTT 용액 첨가 후 4시간 반응시킨 후, 형성된 fomazan을 녹여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

콜라겐 생합성 정도

세포를 2×10⁶ cells/well 농도로 6-well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 1~10 μg/ml의 농도로 첨가하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 양성대조군으로 사용한 retinoic acid는 0.03 μg/ml의 농도로 첨가하였다. 세포 배양액내 콜라겐 생합성 정도는 procollagen type-I C peptide (PIP) EIA kit(Takara)을 사용하여 프로펩타이드의 양을 측정하였다.³³⁾

MMP-1 저해 활성

세포를 2×10⁶ cells/well 농도로 6-well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 1~10 μg/ml의 농도로 첨가하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이때 MMP-1의 활성을 높이기 위하여 TNF-α를 10 ng/ml의 농도로 첨가하였다. 세포의 배양액을 수거하여 실험에 사용하였으며 Gross B. E. 등³⁴⁾의 방법에 따라 Matrix Metalloproteinase-1 Biotrack activity Assay Kit(Amersham Bioscience)을 이용하여 plate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 통해 계산식을 구하여 세포 배양액 내 콜라게네이즈 활성을 수치화하였다.

항산화 효능 평가

Ukeda 등³⁵⁾의 방법에 따라 SOD assay kit (Dojindo Molecular Technologies, Inc)를 사용하여 시료의 SOD 활성을 측정하였다.

통계처리

측정된 결과 치는 평균±표준편차의 형태로 나타내었고 SPSS/PC+ program을 이용하여 t-test로 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

지표성분함량

홍삼과 사상자, 산수유 및 이들을 복합한 WM1과 WM3

Table 1. Contents of ginsenoside-Rb₁, torilin and loganin in experimental materials.

Unit : mg/g, dry weight basis

Materials	Ginsenoside-Rb ₁	Torilin	Loganin
Red Ginseng Extract(WR)	29.15	-	-
Torilis fructus Extract(WT)	-	0.238	-
Corni fructus Extract(WC)	-	-	7.03
Mixture1(WM1)	5.61	0.164	5.87
Mixture3(WM3 = KTNG0345)	10.85	0.128	3.92

(KTNG0345)의 지표성분으로는 홍삼의 ginsenoside-Rb1, 사상자의 torilin, 산수유의 loganin으로 설정하였으며, 그 함량을 분석한 결과는 Table 1과 같다.

세포증식

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 담황색의 기질로서 생 세포의 미토콘드리아 내의 호흡쇄 효소에 의해 개열하고 암적색의 formazan을 생성한다. 죽은 세포에서는 반응이 일어나지 않으므로 이 formazan의 생성량은 세포생존을 측정에 이용된다.³²⁾ 세포에 시료를 1~10 ug/ml 농도로 처리 시 대조군에 비하여 홍삼은 88~95%, 사상자는 98~100%, 산수유는 95~100%의 증식율을 나타내었고 WM1은 90~92%, WM3는 89~95%의 증식율을 나타내어 처리 농도에서는 시료 간에 큰 차이 없이 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다. 홍삼의 ginsenoside는 자외선에 의한 각질세포 사멸을 감소시키며,⁷⁾ epidermal cell 증식효과가 있다고 보고된 바 있다.⁸⁾

콜라겐 생합성

콜라겐(type I, II, III, IV and V)들은 프로콜라겐이라는 전구물질의 형태로 합성된다. 프로콜라겐은 아미노 말단과 카르복시 말단에 프로펩티드라는 펩티드염기서열을 포함한다. 프로펩티드의 기능은 소포체내에서 프로콜라겐 분자의 folding을 도와줌과 동시에 콜라겐 중합반응이 일어날 때 콜라겐 분자로부터 절단, 분리된다고 알려져 있다. 그래서 분리된 프로펩타이드의 양을 측정함으로써, 세포내에서의 콜라겐 생합성 정도를 파악할 수 있다.^{36,37)} Human dermal fibroblast에 시료 처리하여 배양했을 때 콜라겐 생합성량을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. Retinoic acid를 0.03 ug/ml의 농도로 처리했을 때 콜라겐 생합성량은 568.3 ng/ml 이었다. 세포에 시료를 처리한 농도는 1, 5, 10 ug/ml 였는데 이 중 5 ug/ml 농도에서의 콜라겐 생성량은 홍삼 533.9 ng/ml, 사상자는 539.3 ng/ml, 산수유는 514.1 ng/ml 이었고 WM1은 474.6 ng/ml, WM3는 561.4 ng/ml 의 콜라겐을 생성하여서 홍삼과 생약재를 136:164의 비율로 혼합한 WM3에서 상승효과가 있음을 알 수 있었다. 본 연구실에서는 사포닌 함량이 다른 몇 가지 홍삼 추출물과 ginsenoside-Rb₁과 Rg₁에 대하여 같은 실험을 행하였을 때 사포닌 함량이 높은 시료에서 콜라겐 생합성이 증가하였고 ginsenoside-Rg₁보다는 Rb₁이 그 효과가 더 높았음을 확인한 바 있다.¹³⁾ 또한, 사상자의 경우 torilin과 그 유도체들에 대하여 같은 실험을 했을 때 콜라겐 생합성을 증가시키는 결과를 얻어서 사상자의 torilin에 의한 영향인 것으로 추정된다(한국특허 :출원번호 2006-0108209). 따라서 복합물

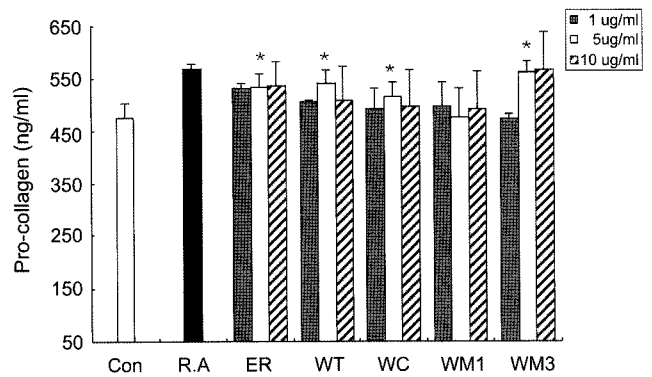


Fig. 1. Procollagen synthesis of red ginseng(ER), Torilis Fructus (WT), Corni Fructus(WC) and mixture(WM1, WM3) in human dermal fibroblast. The paired student's t-test was carried out between control group and sample treated groups. (*P<0.05)

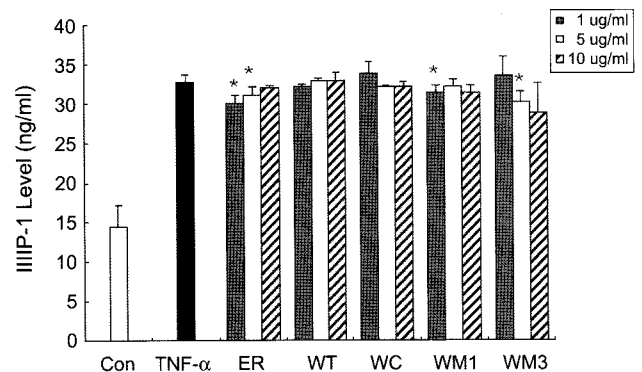


Fig. 2. MMP-1 activities of red ginseng(ER), Torilis Fructus (WT), Corni Fructus(WC) and mixture(WM1, WM3) in human dermal fibroblast. The paired student's t-test was carried out between TNF-α group and sample treated groups. (*P<0.05)

(WM3)은 홍삼의 사포닌과 사상자의 torilin이 세포증식을 도와주고 콜라겐 생합성을 촉진시키는데 상승효과를 나타낸 것으로 생각된다. 복합물(WM3)의 효과는 5 ug/ml의 농도일 때 대조군과 5% 수준에서 통계적 유의성이 인정되었다.

MMP-1 활성 저해 효과

피부 세포의 결합 조직을 구성하는 성분 중 collagen은 피부 건조 중량의 90% 정도를 차지하는 주요 구성 단백질이다. 따라서 collagen의 분해는 결합 조직의 탄력 저하와 주름 생성 등에 직접적인 영향을 미친다. 체내에서 생성되는 수종의 MMPs 가운데 MMP-1은 collagen에 특이적으로 작용하는 protease로서 MMP-1의 활성을 억제하여 collagen의 분해를 감소시키면, 피부 조직의 탄력을 유지하고 주름 생성을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다.³⁸⁾ 시료를 1, 5, 10 ug/ml

의 농도로 첨가하여 세포를 배양하였으며 대조군으로는 TNF- α 를 10 ug/ml로 처리하였다. 10 ug/ml의 농도를 기준으로 할 때 TNF- α 처리구의 MMP-1 활성은 32.8 ng/ml 이었고 홍삼엑기스(ER)는 31.9 ng/ml, 사상자엑기스(WT)는 32.85 ng/ml, 산수유 엑기스(WC)는 32.0 ng/ml로 별다른 차이가 없었다. 홍삼과 생약을 혼합했을 때 WM1은 31.3 ng/ml 이었으며 WM3는 28.85 ng/ml로 대조군의 88%수준으로 감소되어서 홍삼과 생약을 136:164의 비율로 혼합한 WM3(KTNG 0345)에서 MMP-1의 활성을 저해하는 효과가 가장 큰 것을 알 수 있었다. Kim 등¹⁹⁾은 사상자의 torilin성분이 MMP-9의 활성을 억제한다고 보고하였는데, 본 실험에서 사용된 MMP-1은 MMP-9와 유사한 matrix metalloprotein을 분해하는 효소이므로 torilin에 의하여 저해작용을 일으킨 것으로 여겨진다. 복합물 시료의 경우 대조군과 5% 수준에서 통계적 유의성이 인정되었다.

항산화 활성

피부 노화에 중요한 영향인자는 자외선에 의해 비정상적으로 생성량이 증가하는 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS)과 자유 라디칼(Free radical)이다.³⁹⁾ 활성 산소종은 정상적인 세포내에서도 미토콘드리아와 마이크로솜 등의 세포 소기관의 대사 작용과 프로스타그란딘 생합성 등의 염증 반응에 의해서도 생성되며, 쌓을 이루지 못한 홀 전자를 가지거나 이온성을 띄어 강력한 반응성을 나타냄으로써 세포막 지질에 대한 연쇄적 손상, DNA, 기능 단백질, 미토콘드리아 등의 세포기관을 손상시켜 자체 회복력을 저하시키게 된다. SOD(superoxide dismutase)는 superoxide anion을 H₂O와 O₂로 변화시키는 항산화 효소로 알려져 있으며 xanthine oxidase에 의해 발생한 superoxide anion이 사용된 시료에 의해 제거된 비율을 관찰함으로써 항산화 효능을 평가하게 된다.³⁵⁾ 홍삼, 사상자, 산수유 및 이들 혼합물의 SOD 활성을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 1000 ug/ml의 농도에서 홍삼은 65%, 사상자는 92%, 산수유는 95%의 활성을 나타내었고 WM3는 97%의 활성을 나타내었으며 비타민 C는 10 ug/ml의 농도에서 99%의 활성을 나타내었다. 피부에서 자외선에 의하여 유발되는 반응성 산소종은 섬유아세포의 세포질 신호전달을 교란시키며, 세포전사 인자는 AP-1을 활성화시키게 되고 결국 MMP family와 type 1 procollagen에 작용하여 세포기질이 파괴되고, 콜라겐 생성이 감소되어 피부 노화를 일으키게 된다. 이러한 작용을 감소시킬 수 있는 항산화 물질은 녹차, 비타민, 셀레늄, 플라보노이드, 카로티노이드 등이 알려져 있다. 본 실험에서도 산수유나 사상자에 함유되어 있는 비타민 A와 tannin류²⁹⁾에 의하여 항산화 작용을 나타

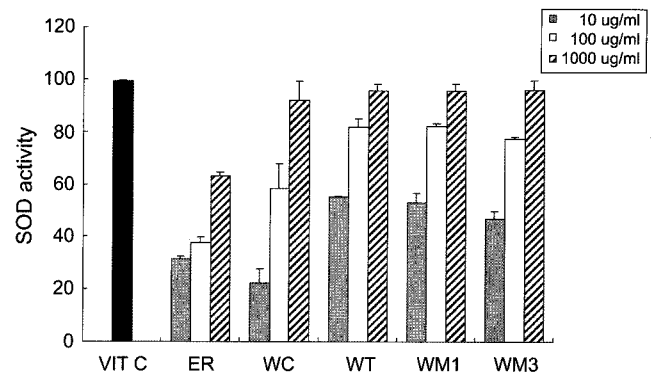


Fig. 3. SOD activities of red ginseng(ER), Torilis Fructus(WT), Corni Fructus(WC) and mixture(WM1, WM3). Vitamin C was added to 10 ug/ml concentration.

낸 것으로 보인다. 홍삼은 자외선에 의한 마우스의 피부손상을 감소시키며 이는 항산화 작용에 의한 것이라 보고되어¹²⁾ 홍삼이 피부세포에 대한 항산화 작용이 있을 것으로 예측된다. 본 실험에서 홍삼의 SOD활성은 65%의 수준이었으며 홍삼에 사상자와 산수유를 혼합한 WM1과 WM3(KTNG0345)에서 활성이 증가하는 결과를 얻었다.

요 약

본 실험은 홍삼, 사상자, 산수유를 이용하여 주름 예방 효과가 있는 건강기능 식품을 개발하기 위한 기초자료로 활용하기 위하여 개별추출물과 이들의 혼합물 WM1, WM3(KTNG0345)에 대하여 사람의 섬유아세포를 이용한 세포증식, 콜라겐 생합성 정도, MMP-1 효소활성, 항산화 활성을 조사하였다. 사용된 시료는 1~10 ug/ml의 농도로 첨가하여 세포를 배양했을 때 83~100%의 세포증식율을 나타내어 세포 독성을 나타내지 않았으며, 콜라겐 생합성 정도는 대조군이 474.8 ng/ml이었고 retinoic acid는 568.3 ng/ml이었으며, 5 ug/ml의 농도를 기준으로 할 때 홍삼은 533.9 ng/ml, 사상자는 539.3 ng/ml, 산수유는 514.1 ng/ml이었다. 홍삼과 생약을 68:232의 비율로 혼합한 WM1은 474.6 ng/ml이었고 홍삼과 생약을 136:164의 비율로 혼합한 WM3는 561.4 ng/ml로 증가하였다. MMP-1활성은 10 ug/ml의 농도에서 홍삼(ER)은 31.9 ng/ml, 사상자(WT)는 32.85 ng/ml, 산수유(WC)는 32.0 ng/ml, WM1은 31.3 ng/ml이었고 WM3(KTNG0345)는 28.85 ng/ml로 대조군의 88% 수준으로 감소하였다. SOD활성에서는 1000 ug/ml의 농도로 처리하였을 때 65~97% 항산화활성을 나타내었다. 이들의 결과를 종합해 보면 홍삼과 사상자, 산수유 및 이들 혼합물은 human dermal fibroblast에 대하여 세포 독성을 나타내지 않으면서 콜라겐 생합성을 촉진하

고 MMP-1의 활성을 억제하였으며 홍삼과 생약 엑기스를 136:164의 비율로 혼합했을 때 그 효과가 증진되었다. WM3 (KTNG0345)는 지표성분으로서 ginsenoside-Rb₁, torilin, loganin을 각각 10.85 mg/g, 0.128 mg/g, 3.92 mg/g 함유하였다.

인용문헌

- Boelsma, E. and Hendriks. H. Roza. : Nutrition skin care : health effects of micronutrients and fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 853-864 (2001).
- Chung, S., Kong, S., Seong, K. and Cho, Y.H. : γ -Linolenic acid in borage oil reverses epidermal hyperproliferation in guinea pigs. *J. Nutr.* **132**, 3090-3097 (2002).
- Miller, C.C., Tang, W., Ziboh, V.A. and Fletcher, M.P. : Dietary supplementation with ethyl ester concentrates of fish oil(n-3) and borage oil(n-6) poly unsaturated fatty acid induces epidermal generation of local putative anti-inflammatory metabolites. *J. Invest. Dermatol.* **96**, 98-103 (1991).
- Tanno, O., Ota, Y., Kitamura, N., Katsube, T. and Inoue, S. : Nicotinamide increases biosynthesis of ceramides as well as other stratum corneum lipids to improve the epidermal permeability barrier. *Br. J. Derm.* **143**, 524-531 (2000).
- Kang, S., Cho, S., Chung, J.H., Hammerberg, C., Fisher, G.J. and Voorhees, J.J. : Inflammation and extracellular Matrix Degradation Mediated by activated transcription factors nuclear factor-kB and activator protein-1 in Inflammatory acne lesions in vivo. *Am. J. Pathol.* **166**, 1691-1699 (2005).
- Lee, E.H., Cho, S.Y., Kim, S.J., Shin, E.S., Chang, H.K. and Lee, T.R. : Ginsenoside F1 protects human HaCaT keratinocytes from ultraviolet-B induced apoptosis by maintaining constant levels of Bcl-2. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 607-613 (2003).
- Choi, S. : Epidermis proliferative effect of the Panax ginseng ginsenoside Rb₂. *Arch. Pharm. Res.* **25**, 71-76 (2002) .
- Kim, S.J., Kang, B.Y., Cho, S.Y., Sung, D.S., Chang, H.K., Yeom, M.H., Kim, D.H., Sim, Y.C. and Lee, Y.S. : Compound K induces expression of hyaluronan synthetase 2 gene in transformed human keratinocytes and increases hyaluronan in hairless mouse skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 348-355 (2004).
- Lee, J.H., Lee, B.S., Yang, M.S., Byun, B.S., Kim, W.G., Kim, B.H. and Lee, S.J. : Prevention of Photoaging and Wrinkle Formation in Hairless Mice Dorsal Skin by AP3-03. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 986-996 (2005).
- Namjo, K.J. : Yakyouningsam 2000. pp.268-271, Gonglip-chulpan co. Tokyo, Japan (2000).
- Lee, H.J., Kim, S.R., Kim, J.S., Moon, C.J., Bae, C.S., Jang, J.S., Jo, S.K. and Kim, S.H. : The Effect of Red Ginseng on Ultraviolet B-induced Skin Damages in Mouse. *J. Ginseng Res.* **30**, 188-193 (2006).
- Lee, H.J., Kim, S.R., Kim, J.S., Moon, C.J., Kim, J.C., Bae, C.S., Jang, J.S., Jo, S.K. and Kim, S.H. : The Effect of Red Ginseng on Ultraviolet B-induced Skin Damages in Mouse. *J. Ginseng Res.* **30**, 194-198 (2006).
- Kim, N.M., Koo, B.S., Lee, S.K., Hwang, E.L., So, S.H. and Do, J.H. : Effect of Korean red ginseng on collagen biosynthesis and MMP-1 activity in human dermal fibroblast. *J. Ginseng Res.* **31**, 86-92 (2007).
- KFDA : Sikpoomgongeon. pp.29, KFDA, Seoul, Korea. (2002).
- Shin, J.H. banghakhappyenhaesel. p.542, sengbosa, Seoul, Korea (2002).
- Jeng, B.S. and Shin, M.K. : Dohaehyanyaksajeon. p.416, Yeonglimsa, Seoul, Korea (1990).
- Lee, E.B., Kim, S.H. and Kim, T.H. : Anti-inflammatory activities of Torilis japonica fruit. *Kor. J. Pharm.* **29**, 384-390 (1998).
- Itokawa, H., Minashi, S., Watanabe, K., Natsumoto, H., and Hamanaka, T. : Studies on the constituents of crude drugs having inhibitory activity against contraction of the ileum caused by histamine of barium chloride. *Shoyakugaku Zasshi* **37**, 223-228 (1983).
- Kim, M.S., Baek, J.H., Park, M.T., Sohn, T.K., Kim, S.E., Lee, J.J. and Kim, K.W. : Anti-invasive activity of torilin, a sesquiterpene compound isolated from Torilis japonica. *Oncol. Rep.* **8**, 459-461 (2003).
- Kitajima, J., Suzuki, N. and Tanaka, Y. : Guaian-type sesquiterpenoid glycosides from Torilis japonica. *Chem. Pharm. Bull.* **46**, 1743-1741 (1998).
- Fujita, S. : Miscellaneous contributions to the essential oils of plant from various territories. II. On the components of essential oils of Torilis japonica (Houtt.) *Yakugaku Zasshi.* **110**, 771-775 (1990).
- Kitajima, J., Suzuki, N., Satoh, M. and Watanabe M. : Sesquiterpenoids of Torilis japonica fruit. **59**, 811-815 (2002).
- Park, J.H. : Sangyongvakyongsikmooldogam, pp.196, Shin-ilsangsa, Seoul, Korea (2000).
- Kim, B.H., Park, K.W., Kim, J.Y., Jeong, I.Y., Yang, G.H., Cho, Y.S., Yee, S.T. and Seo K.I. : Purification and characterization of anticarcinogenic compound from *Corni fructus*. *Korean J. Food Sci.* **36**, 1001-1007 (2004).
- Kim, Y.H. : Isolation of constituents from the fruits of *Cornus officinalis Siebold*. **14**, 287-292 (2000).
- Guilian, T., Zhang, T., Yang, F. and Ito, Y. : Separation of gallic acid from *Cornus Officinalis Sieb. et Zucc* by high speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A.* **886**, 309-312 (2000).

27. Lee, E.B., Choi, B.C. and Cho, T.S. : Pharmacological studies on ether fraction of Corni Fructus. *Yakhak Hoeji*. **29**, 1-10 (1985).
28. Yamahara, J., Mibu, H., Sawada, T., Fujimura, H. and Takino, S. : Antidiabetic principles of *Corni fructus* experimental diabetes induced by streptozotocin. *Yakugaku Zasshi* **101**, 86-90 (1981).
29. Choi, W.Y., Chun, H.J., Lee, J.H. and Seung, H.B. : Effects of methanol extract from *Cornis fructus* on melanogenesis, *Korean. J. Pharmacogn.* **34**, 70-74 (2003).
30. Council of Europea : European Pharmacopoeia. 4th Ed. Ginseng. p.1244-1245, Council of Europea, Paris, France (2001).
31. Kim, Y.J. : Preparation of standard material of medicinal herb(II), p.62-65, KFDA, Seoul, Korea (2002).
32. Loosdrecht, A.A., Nennie, E., Ossenkoppele, G.J., Beelen, R.H. and Langenhuijsen M.M. : Cell mediated cytotoxicity against U937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *J. Immunol Method*, **141**, 15-22 (1991).
33. Taubman, M.B., Goldberg, B. and Sherr, C. : Radioimmunoassay for human procollagen. *Science*, **186**, 11150-11157 (1974).
34. Gross, B. and Lapiere, C. : Collagenolytic activity in amphibian tissue a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 1197-1204 (1962).
35. Ukeda, H., Maeda, S., Ishii, T. and Sawamura M. : Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-1- (phenylamino)-carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal Biochem.* **5**, 206 (1997).
36. Parfitt, A.M., Simon, L.S., Villanueva, A.R. and Krane, S.M. : Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation Rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J. Bone Miner Res.* **2**, 427-436 (1987).
37. Talwar, H. S., Griffith CGM and Fisher, G. J. : Reduced type I type III procollagens in photodamaged adult human skin. *J. Inves. Dermatol.* **105**, 285-290 (1995).
38. Nagase, H. and Woessner, J.F. : Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 21491-21494 (1999).
39. Matsumura, Y. and Ananthaswamy, H. N. : Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **195**, 298-308 (2004).