

홍삼 생약 복합물(KTNG0345)의 피부 주름개선에 관한 작용기전

소승호[#] · 이성계 · 황의일 · 구본석 · 한경호 · 정진호* · 이민정* · 김나미

KT&G 중앙연구원 건강식품연구소, *서울대학교 의과대학 병원
(2008년 1월 23일 접수; 2008년 3월 12일 수리)

Mechanisms of Korean red ginseng and herb extracts(KTNG0345) for anti-wrinkle activity

Seung-Ho So[#], Seong-Kye Lee, Eui-Il Hwang, Bon-Suk Koo,
Gyeong-Ho Han, Min-Jung Lee*, Jin Ho Chung* and Na-Mi Kim

Health Food Research Group, KT&G Central Research Institute, Yuseong, Daejeon 305-805, Korea

*Department of Dermatology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

(Received January 23, 2008; Accepted March 12, 2008)

Abstract : UV irradiation causes skin-aging involving coarse wrinkles, thickening, dyspigmentation, and rough skin surface. These phenomena in complex skin tissue is controlled with receptor of cell surface growth factor and cytokine receptors. The activation of receptors induces multiple downstream signaling pathways including expression of MMPs (matrix metalloproteinases). This study was aimed to elucidate the mechanism for anti-wrinkle activity of Korean red ginseng, *Torilis fructus* and *Corni fructus* mixture (KTNG0345). In this animal study, we have investigated decreasing effects of Korean red ginseng mixture on MMP-3 synthesis through diminishing TNF- α signaling that express MMP-1, -3, and -9. c-Jun and c-fos as a component of transcription factor AP-1 (activator protein-1) were analyzed the expression level using real time PCR and western blotting. c-Jun was decreased dose dependent manner both gene and protein level where as c-fos was not changed. In upstream, JNK and PAK was not changed, but p38 was decreased in down stream. MMP-3, final product in this pathway was significantly decreased in dose dependent manner. These results suggest that Korean red ginseng mixture have a anti-wrinkle activity through TNF- α mediated MMPs expression pathway.

Key words : anti-wrinkle, matrix metalloproteinase-3, AP-1, p38, TNF- α , Korean red ginseng

서 론

피부미용에 대한 관심은 4000년 전의 고대 이집트로 거슬러 올라간다. 맥아 분말가루나 화강암 가루를 얼굴에 발라 미백 화장료로 사용하였고, 꽃과 식물을 향의 원료로 사용하기 시작 했다. 중국의 춘추전국 시대에는 얼굴에 바르는 분과 연지, 입술에 바르는 연지 등을 사용하였고, 유교사상이 강했던 우리나라의 조선시대에도 나무즙과 목탄가루를 이용해 입술, 눈썹에 칠하는 등 아름다워 지고자하는 인간의 욕망은 동서고금을 막론하고 계속되어 왔으며 앞으로도 인류의 역사와 함께 할 것이다. 더욱이 현대에는 과학의 발달, 지식수준의 향상,

다양한 정보, 웰빙에 대한 관심으로 기존의 미용에 대한 개념도 바뀌고 욕망 또한 커지고 있다. 화장품의 성분이 피부에 도달하여 영양분을 공급하는데 한계가 있고, 먹는 식품으로 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 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 하나는 나이가 들어감에 따라 섬유아세포의 작용과 세포수가 감소하여 콜라겐, 엘라스틴 fibrillin 등 세포외 기질 단백질 섬유질의 합성양이 줄어들고 구조가 느슨해져서 탄력이 감소되며 피부세포 내 수분이 손실되고 각질층의 구조가 변한다. 다른 하나는 태양광선의 자외선에 대한 자극이 반복되면서 활성산소종

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

(ROS)을 발생시키고 전염증성 사이토카인의 생성이 촉진되어 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 지질, 단백질, 핵산, 효소 등이 손상되어 노화가 일어난다.⁵⁾

피부결합조직에는 세포외기질 단백질 중 type I 콜라겐이 가장 많이 존재하며, 그 밖에 엘라스틴, fibronectin, integrin, fibrillin, 프로테오글리칸 등이 존재한다. 새롭게 합성된 프로콜라겐은 효소반응을 거쳐 피부세포의 세포의 공간으로 분비되어 삼중나선구조 (triple helix configuration)의 microfibril을 형성하고, microfibril들은 leucine-rich small proteoglycans과 결합하여 fibril을 형성하는데, 이러한 과정을 fibrillogenesis라고 한다. 결과적으로 이렇게 만들어진 fibril들이 모여 콜라겐 섬유를 형성하게 되어 피부의 결합력과 탄력성을 갖게 한다.⁶⁾

산화적 스트레스는 피부가 자외선에 노출되었을 때, 세포가 반응하는 신호전달 체계를 작동시키고 과산화수소 등의 활성산소종의 발생을 증가시키며, 항산화 효소의 발현을 감소시킨다.^{7,8,9,10,11)} 이러한 활성산소종의 증가는 유전자와 단백질의 구조를 변화시켜 세포 내외의 항상성이 파괴되어 피부의 손상을 가져오게 된다.

자외선에 의한 피부노출에 가장 빨리 반응하는 세포의 반응은 growth factor receptor (EGF-R),^{12,13,14)} tumor necrosis factor (TNF)-receptor,¹⁵⁾ platelet-activating factor (PAF) receptor,¹⁵⁾ insulin receptor,¹⁶⁾ interleukin (IL)-1 receptor,¹⁷⁾ platelet derived growth factor (PDGF) receptor.¹⁸⁾ 등의 수용체들을 활성화시키는 것이다. 이들 수용체의 활성화는 결과적으로 downstream의 신호전달을 매개하는 단백질들을 활성화시켜 MAP (Mitogen-Activated Protein) kinase의 활성까지 전달되며, 일련의 활성화과정은 연속적인 인산화로 이루어진다.¹⁹⁾ MAP kinase 경로에서 가장 많은 영향을 받는 인자는 AP-1이다. AP-1은 Jun과 Fos family 단백질로 이루어진 전사인자로 c-Jun과 c-Fos의 heterodimer 형태로 존재할 때 전사활성이 가장 높다.^{20,21)} 사람의 피부세포가 자외선에 노출되지 않았을 때는 c-Fos와 JunD의 이합체로 존재하나, 자외선이나 여러 성장인자, 사이토카인, 외부 환경적 자극 등에 의하여 c-Jun과 c-Fos 단백질의 발현이 증가하게 되고 c-Jun은 JNK와 p38에 의한 인산화에 의하여 활성화 된다. 또한 c-Jun은 자외선에 의하여 mRNA는 30분, 단백질은 1시간 이내에 발현된다고 알려져 있다.²²⁾ 이렇게 증가한 c-Jun은 최소 24시간 동안 지속되며 c-Fos와 이합체를 형성한다.^{14,20)} AP-1은 세포의 성장과 분화에 관련되는 많은 유전자의 발현을 조절하고 몇몇 MMPs의 발현을 강력히 조절한다. MMP는 zinc 이온을 요하는 endoprotease로 세포외기질 단백질을

분해하는 효소이다. AP-1에 의해 발현이 조절되는 MMP 중 MMP-1은 collagenase 1으로 알려져 있으며, type I과 III collagen을 기질로 하며, MMP-3는 stromelysin 1 이라고도 하며, 기저막의 type IV collagen을 분해하며 zymogen인 proMMP-1을 활성화시킨다. MMP-9은 gelatinase B로 collagenase에 의해 분해된 산물을 더 작게 가수분해한다. 이들 MMPs의 발현증가는 자외선에 의해 유도되며, AP-1의 구성 단백질의 발현증가와 일치하는 연구결과가 보고되었다.²³⁾ 또한 이러한 MMPs의 발현증가는 사람의 피부에 자외선을 조사한 후, 24시간 이내에 collagen의 분해도 증가한다는 결과도 보고되었다.²⁴⁾ 따라서 자외선에 의한 피부 노출은 MAP kinase 경로를 활성화시켜 AP-1의 발현을 유도하고 MMPs의 발현을 증가시켜 세포외기질을 분해하여 주름생성을 촉진시킨다고 할 수 있다.

홍삼에 대한 여러 가지 효능이 알려져 있지만, 피부미용과 관련된 연구로는 ginsenoside F1이 인간 각질세포에서 자외선 조사로 인한 세포 사멸을 감소시킬 뿐 아니라, 자외선으로 촉진되는 세포 자기사멸 (apoptosis)로부터 각질 세포를 보호하는 효과가 있으며²⁵⁾, ginsenoside-Rb2는 *in vitro*에서 피부세포의 증식효과가 있다고 보고되었다²⁶⁾. 또한 compound K는 인간의 각질세포에서 피부 탄력 성분 중의 하나로 알려진 히아루론산 생합성에 관련되는 hyaluronan synthase2(HAS2) 유전자 발현을 증진시키며²⁷⁾, 최근 홍삼과 대두추출물을 hairless mouse에 경구투여 하였을 때 주름 생성을 예방하는 효과가 있다고 보고하였다.²⁸⁾ 또한 홍삼엑기스를 복강 내 투여했을 때, 자외선B를 조사시킨 마우스에서 피부손상을 억제하는 효과가 있었고 피부에 도포했을 때는 그 효과가 보다 뚜렷하였다고 보고하였다.^{29,30)}

중국산 사상자(*torilis fructus*)는 산형과(Umbelliferae)에 속하는 사상자(*Torilis japonica*)의 과실로써 식품공전 상에 식품부원료로 분류되어 있으며, 한의서에 습창, 완선, 음중 종통, 음 등의 피부질환에 유효하다고 기록되어 있다.^{31,32)} 약리작용에 관한 연구로는 진통소염작용³³⁾, 진경작용³⁴⁾, anti-invasive efficacy³⁵⁾ 등이 보고되어 있으며 사상자의 성분으로는 정유성분 stigmasterol, β -sitosterol, cholesterol과 6 α -diol, torilin 등 9종의 sesquiterpenoids가 알려져 있으며³⁶⁾, essential oil³⁷⁾과 hemiterpenoid 화합물 등이 보고되어 있다.³⁸⁾

산수유(*Corni fructus*)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 산수유나무(*Cornus officinalis* SIEB et. zucc)의 과육으로써를 제거하여 사용하며 한의서에는 간과 신을 보호하며, 반열, 온증, 거상충 작용이 있는 것으로 기록되어 있다.^{33,39)} 산수유의 성분으로는 ursolic acid⁴⁰⁾, sallic acid, malic acid와 loganin, mornoniside, sweroside 류의 iridoid 배당체⁴¹⁾, 비

타닌A, tellimagrandin 등의 tannin 류⁴²⁾가 있다. 산수유의 생리활성은 항산화, 항균, 항알러지, 항염증⁴³⁾, 항암, 진정⁴⁰⁾, 진통, 항당뇨 작용⁸⁹⁾이 보고되어 있고, Melanoma 세포의 증식을 억제하여 피부의 색소 침착을 감소시킨다는 보고가 있다⁴⁴⁾. 특히 산수유의 성분 중 ursolic acid는 MMP-9의 억제제로 알려져 있다.⁴⁵⁾

홍삼, 사상자, 산수유 혼합물 (KTNG0345)은 무모 생쥐를 이용한 모사관 분석에서 주름생성을 억제시키고, MMP-13과 MMP-9의 발현을 통계적으로 유의하게 감소시킨다는 결과를 보고하였다.⁴⁶⁾ 또한 human dermal fibroblast를 이용한 시험에서 collagen의 생합성을 촉진하고 MMP-1의 활성을 억제한다고 보고하였다.⁴⁷⁾ 따라서, 본 연구에서는 proMMP-1을 활성화시키는 MMP-3의 발현에 어떤 영향을 미치는지와 MMPs의 발현을 억제시키는 KTNG0345의 작용기작을 알아보기 위하여 신호전달 경로에 관여하는 유전자와 단백질의 발현 정도를 조사하였다.

재료 및 방법

홍삼추출물 제조

한국인삼공사에서 제조한 6년근 홍삼의 잡삼과 중미삼에 대하여 각각 55% 주정을 10배량 가하여 80°C에서 8시간 추출한 다음, 상징액과 침전물을 분리하여 4회 반복 추출하였다. 원심분리 여과(5000rpm, 20분, 실온)한 상징액을 혼합하여 60°C 이하에서 감압 농축하여 수분함량 40%의 엑기스를 제조한 다음 잡삼엑기스와 중미삼 엑기스를 4:1의 비율로 혼합하고 20°Bx로 희석한 용액을 동결건조하여 시료로 사용하였다.

생약재 추출물 제조

사상자는 중국산을 사용하였고, 산수유는 국산으로 시중에서 구입하여 사용하였다. 정제수를 생약재 중량의 6배량 가하고 85°C에서 4시간 동안 추출한 다음 원심분리 여과(5000rpm, 20분, 실온)한 상징액을 감압농축 하여 수분함량 40%의 엑기스를 제조한 다음 엑기스를 20°Bx로 희석하여 동결건조 하였다.

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 Rb₁을, 사상자는 torilin을, 산수유는 loganin으로 설정하였으며 시료 중의 이들 지표 성분 함량은 건강식품 공전³⁰⁾, 김 등³¹⁾의 방법으로 분석하였다. Torilin은 시료 1g에 정제수 50 ml를 가하여 85°C에서 1시간씩 2회 추출하고 농축한 다음, 10% 메탄올 100 ml에 용해하고 헥산 100 ml로 2회 추출한다. 헥산층을 농축한 후 BuOH 100 ml로 2회추출하여 농축한 다음 메탄올 2 ml에 용해하여 HPLC로 분석하였다. HPLC는 HP 1100 Series를 사용하였고, torilin 은 YMC-ODS-A, 250×4.6 mm(ID), 5 μm column, 65%-65%-100%-100% MeOH=0-30-31-40 min, 1.0 ml/min의 조건으로, loganin은 YMC-ODS-AM, 250×4.6 mm(ID), 5 μm column, 20%-30%-100%-100% MeOH = 0-60-71-70 min, 0.8 ml/min의 조건으로 분석하였다.

시험 동물

6주령의 수컷 알비노 무모생쥐 (Skh-1)를 Shizuoka Institute for Laboratory Animals (Kotoh-cho, Japan)으로 부터 구입하여 자유급식과 급수로 1주일 동안 적응기간을 거쳤다. 동물의 사육 온도는 22±2°C, 상대습도는 50±10%, 조명시간은 12시간, 조도는 200-300lux로 하였다.

자외선 처리에 의한 주름 생성 및 시료 투여

자외선 조사장치는 275 nm와 380 nm의 자외선 파장을 내는 TL20W/12RS 램프(Philips, Eindhoven, Netherlands)가 장착된 장치를 이용하였다. 자외선-C 영역인 290 nm이하의 파장을 제거하기 위해 Kodacel filter (TA401/407; Kodak, Rochester, NY)를 이용하였다. 무모생쥐의 등 쪽 피부에 조사한 자외선량을 측정하기 위해 UV meter (model 585100; Waldmann Co., Germany)를 이용하였으며, 조사량은 20cm의 거리에서 0.5 mW/cm²로 하였다. 초기에 최소홍반량 (minimal erythema dose, MED)을 측정하였는데, MED는 24시간 후에 홍반을 나타내기 위해 필요한 최소한의 자외선량을 의미한다. 시험동물은 일주일에 세 번씩 8주 동안 자외선에 노출시켰으며, 1주일에 1 MED (1MED=75 mJ/cm²) 씩 4 MED까지 증가시켜 시험 종료까지 유지하였다. 시험군은 자외선 무처리군, 자외선 처리와 물 투여군, 자외선 처리와 저(300 mg/kg), 중(500 mg/kg), 고(1000 mg/kg) 시료 투여군으로 나누었으며, 각각 7, 9, 9, 9, 10 마리의 동물을 사용하였고 시험 종료 후, 각 군의 시험동물을 희생시켜 피부 조직을 얻었다.

RNA 추출 및 RT-PCR

피부조직으로부터 총 RNA의 추출은 Trizol (Life Techno-

logies, Inc., Rockville, MD)의 제조사에서 제공하는 방법을 이용하여 추출하였다. cDNA 합성은 각 시료에 대하여 1 µg의 RNA를 이용하여 RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) kit (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)로 합성하였다.

실시간 정량 PCR

유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA))을 이용한 실시간 정량 PCR (real time quantitative PCR)을 실시하였고, 기기는 iQ5 multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)을 사용하였다. 모든 유전자의 PCR 산물의 크기는 100bp 내외로 하였고, T_m (melting temperature) 값도 54°C 부근으로 디자인하였다. 각각의 유전자에 대한 PCR primer의 염기서열은 다음과 같다 : GAPDH forward primer 5'-GAG CCA AAC GGG TCA TCA-3', reverse primer 5'-CAT ATT TCT CGT GGT TCA CAC C-3'; c-jun forward primer 5'-GGC TAG ACT GCA GAT GAA CTC C-3', reverse primer 5'-CAG TAA TCA GCT TTC ATC AAA TTA AAA-3'; c-fos forward primer 5'-TTG CTG CTT CCA ACC TCA GT-3', reverse primer 5'-AGC TTC TCA GCC CCT CTC TC-3'; p38 forward primer 5'-TCG GAG CTT CCA TGA TTT CT-3', reverse primer 5'-CTG AAT TCC ATC CCC ATG AT-3'; JNK forward primer 5'-AAC TGT TCC CCG ATG TGC T-3', reverse primer 5'-TCT CTT GCC TGA CTG GCT TT-3'; PAK forward primer 5'-TGA CAA TAT TCT GCT GGG AAT G-3', reverse primer 5'-TGC ACA GAA TCC AAA GTC AGT T-3'; MMP-3 forward primer 5'-TTG TTC TTT GAT GCA GTC AGC-3', reverse primer 5'-GAT TTG CGC CAA AAG TGC-3'. Real-time PCR 반응은 총 20 µl 내에 1/40으로 희석한 cDNA 5 µl와 10 µl의 2X SYBR mix, primer는 각각 10 pmol/µl 0.5 µl씩 첨가하였고, 나머지는 증류수로 채워 주었다.

모든 유전자에 대하여 PCR 증폭 단계는 다음과 같고 유전자에 따라 증폭 cycle은 40-50 cycle을 실시하였다. Hot start를 위해 95°C에서 5분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 30초, annealing을 52°C에서 30초, extension을 72°C에서 30초간 반복하며, 각 cycle의 extension 후에 형광 값이 기록되었다. 모든 cycle이 완료된 후, primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve 분석을 실시하였다. mRNA의 상대적인 함량은 자외선 처리와 물 투여군에 대한

상대적인 양으로 나타내었다. 결과의 분석은 Bio-Rad laboratories에서 제공하는 iQ5 Optical System software로 분석하였다.

전기영동 및 Western blotting

피부조직 20-30 mg에 0.1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄가 첨가된 0.2 ml의 T-PER tissue Protein Extraction Reagent (PIERSE)를 첨가하여 homogenization을 실시하였다. 얼음에 30분 동안 방치하고 10,000 Xg에서 10분 동안 원심분리를 하여 상층액을 얻었다. Bradford 방법으로 단백질을 정량하고 SDS-PAGE를 실시하였으며, 5X sample buffer에도 0.1 mM NaF, 1m M Na₃VO₄를 첨가하여 사용하였다. 같은 양의 단백질(10 µg/lane)을 10% 또는 12% Tris-Glycine SDS-PAGE gel에 전기영동 후, PVDF membrane (Bio-Rad)으로 옮겼다. Blocking solution은 5 % skim milk가 포함된 TBS-T (1% Tween-20 in 20 mM TBS, pH 7.6)로 2시간 동안 상온에서 blocking 하고 4°C에서 12시간 동안 primary antibody와 반응시켰다. 1.5시간 동안의 washing 단계는 TBS-T로 15분 간격으로 buffer를 갈아주었다. Secondary antibody는 HRP (horseradish peroxidase)가 접합되어 있는 항체를 이용하였고, 모든 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc.로부터 구입하였으며, ECL system은 PerkinElmer사의 Western lightning Chemiluminescence Reagent Plus와 PIERSE사의 SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate를 사용하였다.

통계처리

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

결과 및 고찰

KTNG0345의 경구투여가 자외선에 의한 주름생성을 억제한다는 것을 동물시험을 통하여 확인하였고, MMP-13과 MMP-9의 발현을 억제시킨다는 것을 확인하였다.⁴⁶⁾ Mouse와 rat는 MMP-1이 존재하지 않고, 대신 sequence homology가 있는 MMP-13이 collagenase 1의 역할을 하기 때문에 MMP-13의 발현수준을 조사하였다.

본 연구는 동물모델에서 피부 조직을 채취하여 MMP-3의 유전자와 단백질 발현정도를 조사하였다. 또한 KTNG0345의 작용기작을 연구하기 위하여 pak, jnk, p38, c-fos, c-jun의 mRNA 발현정도와 p38, p-p38, c-Fos, c-Jun, p-c-Jun의 단백질 발현정도를 조사하였다. 전염증성 사이토카인인 TNF-α

에 의한 영향정도를 알아보기 위해 피부 조직내 TNF- α 의 양을 western blotting을 통하여 조사하였다.

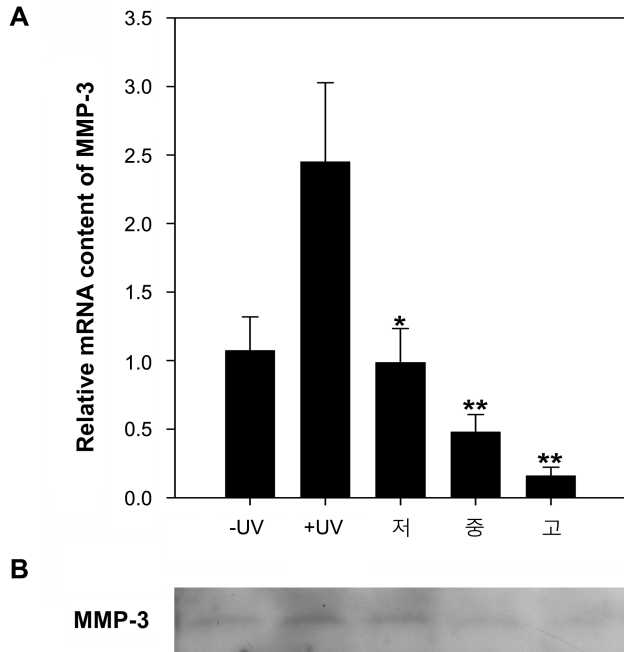


Fig. 1. Effect of KTNG0345 on expression level of MMP-3 in UV-irradiated mouse skin tissue. A. mRNA expression level of MMP-3 in skin tissue. This study was analyzed with real-time PCR method. The average results are presented with standard errors of the mean. Asterisk indicate statistical differences from UVB induced group. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) B. Western blot analysis of expressed PPM-3 protein level. MMP-3 was decreased in dose-dependent manner.

MMP-3의 발현 정도

MMP-3는 proMMP-1을 활성화 시키는 효소로 주름 생성에 중요한 역할을 담당한다. 자외선을 조사한 시험군에서는 조사하지 않은 군에 비하여 유전자의 발현양이 증가되어 있음을 확인할 수 있고, 시료를 투여한 시험군에서는 농도의존적으로 유전자 (Fig. 1, A)와 단백질(Fig. 1, B) 모두에서 감소하는 경향을 보였다. 특히 중농도와 고농도 투여군에서는 UV를 조사하지 않은 시험군 보다 낮은 발현양상을 나타내었다. 이런 결과는 자외선에 의해 생기는 주름 이외에 나이가 들어감에 따라 생기는 주름에도 효과가 있을 수 있음을 시사한다. 따라서 KTNG0345는 MMP-1, MMP-3, MMP-9의 발현을 감소시켜 세포외기질 단백질의 분해를 감소시키고 결과적으로 주름생성을 억제한다고 할 수 있다.

PAK, JNK, p38의 발현 정도

KTNG0345의 항산화 시험에서 그 활성이 높지 않아 Ras에서 Raf로 이어지는 신호전달 경로는 시험에서 배제하였다. MAPK kinase kinase인 PAK의 유전자 발현양은 시료의 농도에 따라 감소하는 경향은 있으나, 통계적 유의성이 없었다. (Fig. 2, A) MAP kinase인 JNK와 p38의 발현양 조사에서 JNK는 모든 시험군에서 발현양의 변화가 없었고, (Fig. 2, B) p38은 유전자와 단백질 모두에서 농도의존적인 감소를 나타내었다. (Fig. 3) p38의 발현 감소와 인산화 역제는 c-Jun의 활성화로 이어지기 때문에 p-c-Jun의 감소를 예상할 수 있다.

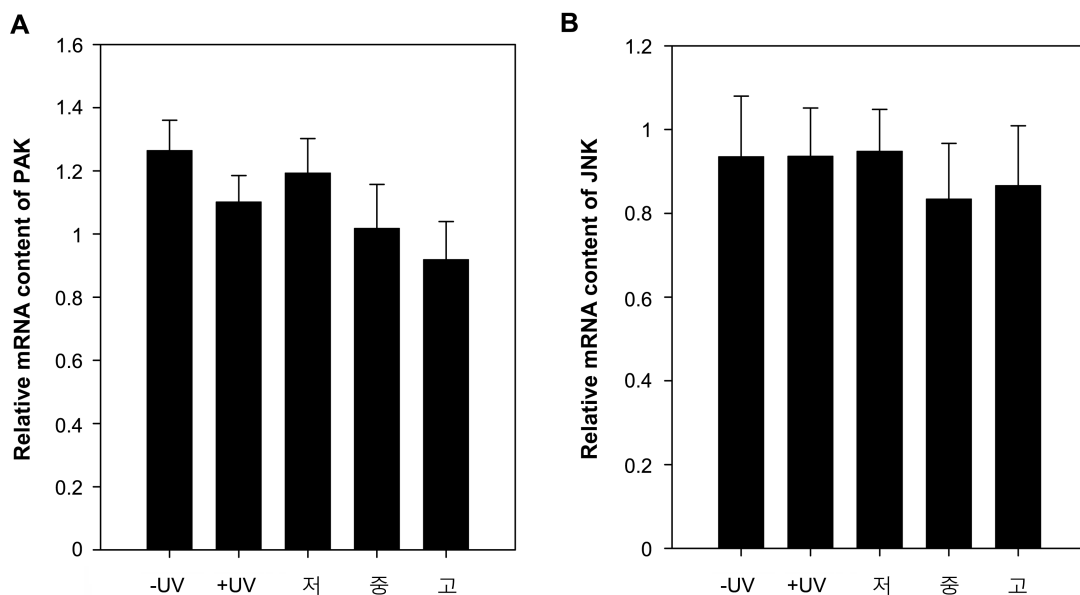


Fig. 2. PAK (MAPK kinase kinase, A) and JNK(MAP kinase, B) mRNA contents were analyzed with real-time PCR method. But the mRNA levels were not changed.

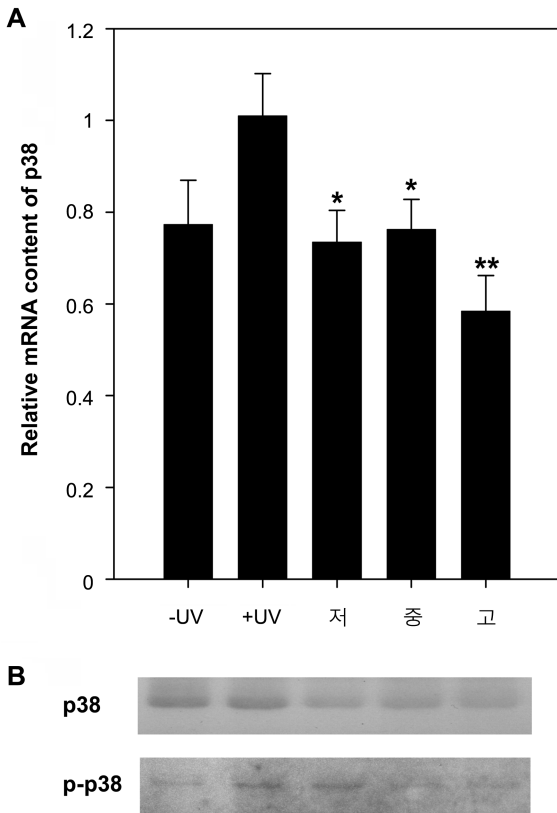


Fig. 3. Effect of KTNG0345 on expression level of p38 (MAP kinase) in UV-irradiated mouse skin tissue. A. mRNA expression level of p38 in skin tissue. This study was analyzed with real-time PCR method. The average results are presented with standard errors of the mean. Asterisk indicate statistical differences from UVB induced group. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) B. Western blot analysis of expressed p38 protein and activated p38. p38 and p-p38 proteins were dose-dependently decreased.

c-Fos와 c-Jun의 발현 정도

피부가 자외선에 노출되었을 때, 주로 존재하는 전사인자 AP-1 이합체의 구성단백질은 c-Fos와 c-Jun이다.²²⁾ 피부조직에서의 c-Fos 발현양은 mRNA와 단백질 모두에서 유의성 있는 변화를 관찰하지 못하였다. (Fig. 4) 반면, c-Jun은 농도의존적으로 감소하는 경향을 보였으며, 고농도군에서는 mRNA 발현이 통계적으로 유의하게 감소하였다. (Fig. 5) 자외선을 조사한 시험군과 조사하지 않은 시험군을 비교해 보면 자외선을 조사한 시험군에서 c-Fos와 c-Jun 모두 발현양이 증가되어 있음을 확인할 수 있다. 그러나 편차가 심하여 통계적 유의성을 보이지 못한 것으로 생각되며, c-Fos 보다 c-Jun의 발현에 더 많은 영향을 미친 것으로 보아 자외선노출 시 빨리 발현되고 오래 지속되는 c-Jun의 발현에 더 특이적으로 작용하는 것으로 보인다.

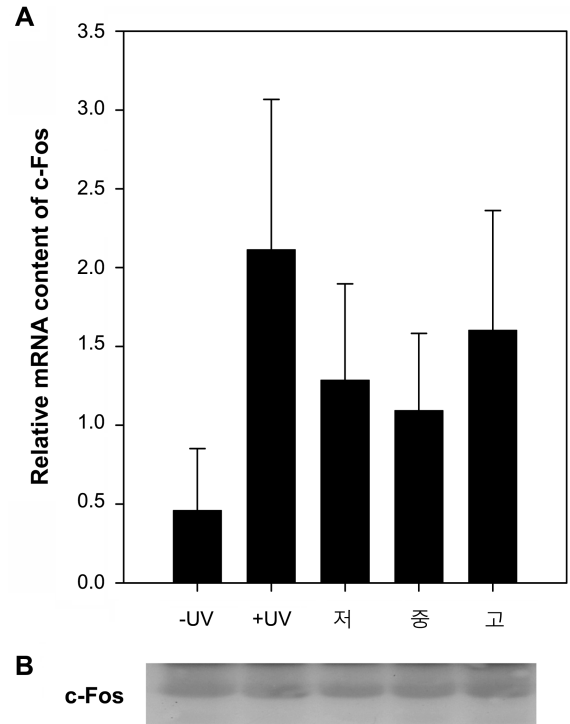


Fig. 4. Effect of KTNG0345 on expression level of c-Fos in UV-irradiated mouse skin tissue. A. mRNA level of c-fos in skin tissue. This study was analyzed with real-time PCR method. The average results are presented with standard errors of the mean. mRNA level was decreased in 0.1%, 0.25% but statistical differences were not observed. B. Western blot analysis of expressed c-Fos protein. c-Fos was not changed.

피부 조직에 존재하는 TNF-α의 양

자외선이 조사된 피부조직에서 전염증성 사이토카인의 양은 중요한 의미를 지닌다. 세포실험에서 UV-A와 UV-B를 조사하였을 때, TNF-α의 양이 급격하게 증가된다는 보고가 있다.⁴⁸⁾ 이렇게 증가한 TNF-α는 수용체를 활성화시키고 downstream의 인산화효소들을 연쇄적으로 활성화시킴으로써 결국, MMPs의 발현을 증가시켜 주름생성을 유도하게 된다. 따라서 자외선에 의한 전염증성 사이토카인의 발현을 억제하거나 피부조직으로의 유입이 억제되면 주름생성을 감소시킬 수 있다고 생각된다. 본 연구에서는 마우스의 피부조직으로부터 TNF-α의 양을 western blotting으로 측정한 결과 농도 의존적으로 감소되어 있음을 확인할 수 있었다. (Fig. 6)

따라서, KTNG0345는 신호전달체계에 관여하는 단백질의 발현양과 활성화를 억제할 뿐만 아니라, 조직의 TNF-α 양을 감소시킴으로써 주름생성을 억제한다고 판단된다. KTNG0345의 주름생성억제 작용 메커니즘을 모식도 Fig. 7에 나타내었다.

KTNG0345는 항염증 작용을 통하여 자외선에 의해 피부로 유입되는 TNF-α의 양을 감고시키고, p-38과 c-Jun의 발현과

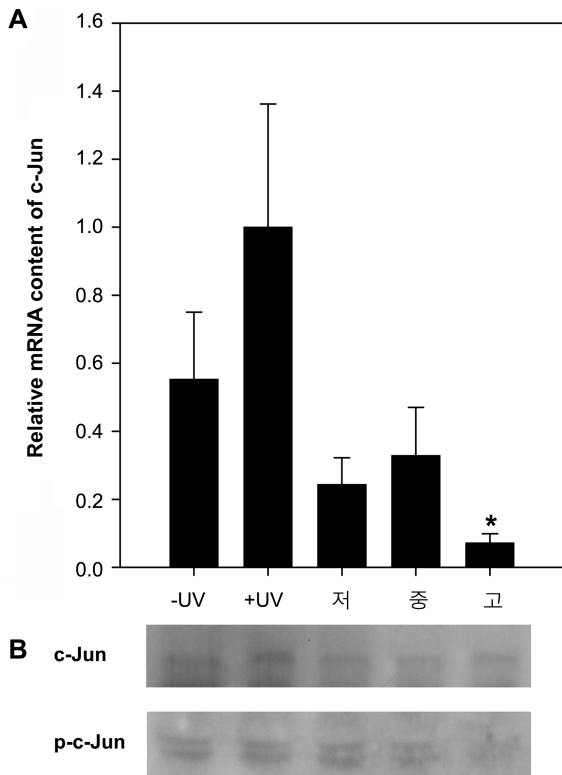


Fig. 5. Effect of KTNG0345 on expression level of c-Jun in UV-irradiated mouse skin tissue. A. mRNA expression level of c-jun in skin tissue. This study was analyzed with real-time PCR method. The average results are presented with standard errors of the mean. Asterisk indicate statistical differences from UVB induced group. (* p<0.05) B. Western blot analysis of expressed c-jun protein and activated c-jun. c-jun and p-c-jun proteins were dose-dependently decreased.

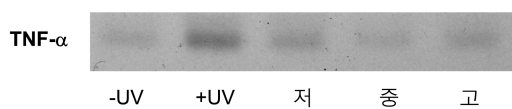


Fig. 6. Western blot analysis of TNF-α content in mouse skin tissue. TNF-α was significantly increased in UVB-induced group where as KTNG0345 administrated groups were observed diminishing contents.

활성화를 억제하여 MMPs의 발현 감소를 가져와 주름생성을 감소시킨다고 판단된다.

요 약

본 실험은 홍삼 혼합물 (KTNG0345)을 이용한 주름 예방 및 개선효과가 있는 건강기능 식품을 개발하기 위한 기초자료로 활용하기 위하여 시료를 경구투여한 무모생쥐의 피부조직으로부터 MMP3의 발현양상과 작용 메커니즘을 연구하였다.

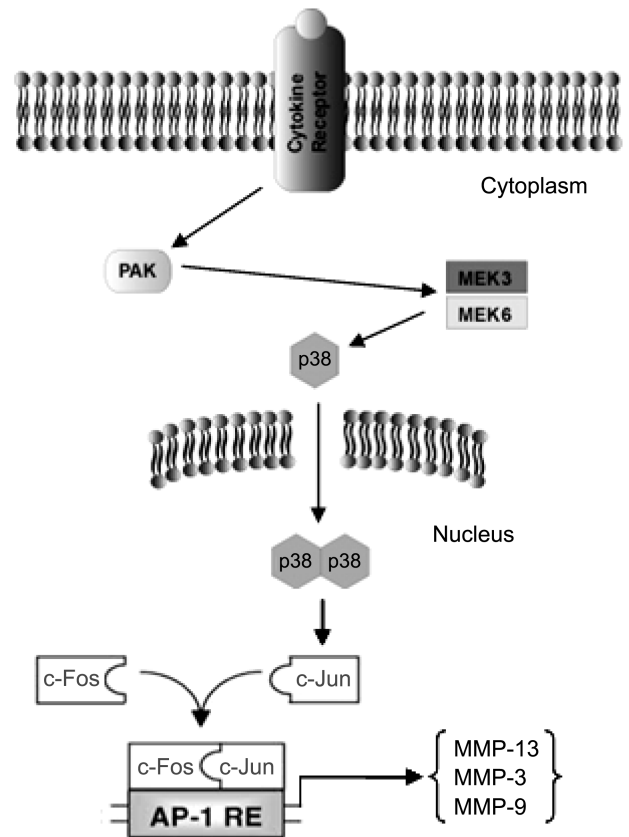


Fig. 7. Schematic diagram of anti-wrinkle mechanism of KTNG0345 in UVB-irradiated mouse model.

MMP3의 발현정도는 농도 의존적으로 현저한 감소를 나타내었으며, 유전자와 단백질 모두에서 동일한 양상을 보였다. PAK는 변화가 없었지만, p38, p-p38 그리고 c-Jun, p-c-Jun을 통계적으로 유의하게 감소시켰으므로 MMPs의 발현 감소를 가져온 것으로 보인다. 뿐만 아니라 자외선에 의한 TNF-α의 생성 또는 유입을 억제함으로써 TNF-α receptor에 의해 매개되는 신호전달 경로를 둔화시켜 MMPs의 발현을 감소시킨 것으로 보인다. 이렇게 KTNG0345는 복합적인 활성으로 작용하여 주름생성 억제 활성을 보이는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. 이숙경 : 피부미용과 영양. 도서출판 정담 (2000).
2. 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).
3. Miller, C.C., Tang, W., Ziboh, V.A., 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).
4. Tanno, O., Ota, Y., Kitamura, N., Katsube Tand 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).
 5. Kang, S., Cho, S., Chung, J.H., Hammerberg, C., Fisher, G.J., 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).
 6. Bateman, J.F., Lamand, S.R. and Ramshaw, J.A.M. : Collagen superfamily. *Extracellular Matrix*, Harwood, New York, **2**, 22-67 (1996).
 7. Masaki, H., Atsumi, T. and Sakurai, H. : Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **206**, 474-479 (1995).
 8. Barber, L.A., Spandau, D.F., Rathman, S.C., Murphy, R.C., Johnson, C.A., Kelley, S.W., Hurwitz, S.A. and Travers, J.B. : Expression of the platelet- activating receptor results in enhanced ultraviolet B radiation-induced apoptosis in a human epidermal cell line. *J. Biol. Chem.*, **273**, 18891-18897 (1998).
 9. Brenneisen, P., Wenk, J., Klotz, L.O., Wlaschek, M., Briviba, K., Krieg, T., Sies, H. and Scharffetter-Kochanek, K. : Central role of ferrous/ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5279-5287 (1998).
 10. Yasui, H. and Sakurai, H. : Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **269**, 131-136 (2000).
 11. Yamamoto, Y. : Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *J. Dermatol. Sci.*, **27**, S1-S4 (2001).
 12. Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P. and Rahmsdorf, H.J. : Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response. *Cell*, **78**, 963-972 (1994).
 13. Warmuth, I., Harth, Y., Matsui, M.S., Wang, N. and DeLeo, V.A. : Ultraviolet radiation induces phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.*, **54**, 374-376 (1994).
 14. Fisher, G.J. and Voorhees, J.J. : 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. Invest. Dermatol.*, **3**, 61-68 (1998).
 15. Dy, L.C., Pei, Y. and Travers, J.B. : Augmentation of ultraviolet B radiation- induced tumor necrosis factor production by the epidermal platelet- activating factor receptor. *J. Biol. Chem.*, **274**, 26917-26921 (1999).
 16. Coffey, P.J., Burgering, B.M.T., Peppelenbosch, M.P., Bos, J.L. and Kruijer, W. : UV activation of receptor tyrosine kinase activity. *Oncogene*, **11**, 561-569 (1995).
 17. Rosette, C. and Karin, M. : Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science*, **274**, 1194-1197 (1996).
 18. Knebel, A., Rahmsdorf, H.J., Ullrich, A. and Herrlich, P. : Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.*, **15**, 5314-5325 (1996).
 19. Pawson, T. and Scott, J.D. : Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, **278**, 2075-2080 (1997).
 20. Angel, P. and Karin, M. : The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell- proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1072**, 129-157 (1991).
 21. Chen, C.-C., Mo, F.-E. and Lau, L.F. : The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **276**, 47329-47337 (2001).
 22. Fisher, G.J., Talwar, H.S., Lin, J.Y., Lin, P.P., McPhillips, F., Wang, Z.Q., Li, X.-Y., Wan, Y.S., Kang, S. and Voorhees, J.J. : 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**, 1432-1440 (1998).
 23. Fisher, G.J., Datta, S., Talwar, H.S., Wang, Z.Q., Varani, J., Kang, S. and Voorhees, J.J. : Molecular basis of sun-induced premature ageing and retinoid antagonism. *Nature*, **379**, 335-339 (1996).
 24. Fanger, G.R., Johnson, N.L. and Johnson, G.L. : MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *EMBO J.*, **16**, 4961-4972 (1997).
 25. Lee, E.H., Cho, S.Y., Kim, S.J., Shin, E.S., Chang, H.K., 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).
 26. Choi, S. : Epidermis proliferative effect of the Panax ginseng ginsenoside Rb2. *Arch. Pharm. Res.*, **25**, 71-76 (2002).
 27. 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. and Biophysical Research Communications*, **316**, 348-355 (2004).
28. Lee, J.H., Lee, B.S., Yang, M.S., Byun BS, 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).
 29. 약용인삼, 공립출판주식회사, Japan, 268-271 (2000).
 30. Lee, H.J., Kim, S.R., Kin, 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**, 194-198 (2006).
 31. 약초의 성분과 이용, 일월서각, 535 (1999).
 32. 정보습, 신민교: 도해 향약(생약)대사전, 영림사, 416 (1990).
 33. Lee, E.B., Kim, S.H., Kim, T.H. : Anti-inflammatory activities of *Torilis japonica* fruit. *Kor. J. Pharm.*, **29**, 384-390 (1998).
 34. Itokawa, H., Minashi, S., Watanabe, K., Natsumoto, H. and Hamanaka, T. : Studies on the constituents of crude drugs having inhibitory activity against constriction of the ileum caused by histamine of barium chloride. *Shoyakugaku Zasshi*, **37**, 223-228 (1983).
 35. Choi, W.Y., Chun, H.J., Lee, J.H. and Seung, H.B. : Effects of methanol extract from *Cornis fructus* on melanogenesis. *Kor. J. Pharmacogn.*, **34**, 70-74 (2003).
 36. Kitajima, J., Suzuki, N. and Tanaka, Y. : Guaiiana- type sesquiterpenoid glycosides from *Torilis japonica*. *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1743-1741 (1998).
 37. Fujita, S. : Miscellaneous contributions to the essential oils of plant from various territories. II. On the components of essential oils of *Torilis japonica* (Houtt.) DC. *Yakugaku Zasshi*, **110**, 771-775 (1990).
 38. Kitajima, J., Suzuki, N., Ishikawa, T. and Tanaka, Y. : New hemiterpenoid pentol and monoterpenoid glycoside of *Torilis japonica* fruit and consideration of the origin of apiose. *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1583-1586 (1998).
 39. 박종희 외: 상용약용식물도감, 신일상사, 196 (2000).
 40. Kim, B.H., Park, K.W., Kim, J.Y., Jeong, I.Y., Yang, G.H., Cho, Y.S., Yee, S.T., Seo, K.I. : Purification and characterization of anticarcinogenic compound from *Corni fructus*. *Korean J. Food Sci.*, **36**, 1001-1007 (2004).
 41. Kim, Y.H. : Isolation of constituents from the fruits of *Cornus officinalis Siebold*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **14**, 287-292 (1999).
 42. Guilian, T., Zhang, T., Yang, F., 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).
 43. Lee, E.B., Choi, B.C., Cho, T.S. : Pharmacological studies on ether fraction of *Corni Fructus*. *Yakhak Hoeji.*, **29**, 1-10 (1985).
 44. Choi, W.Y., Chun, H.J., Lee, J.H. and Seung, H.B. : Effects of methanol extract from *Cornis fructus* on melanogenesis. *Kor. J. Pharmacogn.*, **34**, 70-74 (2003).
 45. Hee-Jae Cha, Moon-Taek Park, Hae-Young Chung, Nam Deuk Kim, Hiroshi Sato, Motoharu Seiki and Kyu-Won Kim. : Ursolic acid-induced down-regulation of MMP-9 gene is mediated through the nuclear translocation of glucocorticoid receptor in HT1080 human brosarcoma cells. *Oncogene*, **16**, 771-778 (1998).
 46. Min Jung Lee, Chong Hyun Won, Se Rah Lee, Ji Sook Kim, Inn Gyung Oh, Euuil Hwang, Nami Kim, Byeong Choel Kang and Jin Ho Chung. : Oral administration of Red Ginseng Extracts reduces UV-induced skin wrinkle formation in Hairless Mice. *J. Ginseng Res.*
 47. Seung-Ho So, Seong-Kye Lee, Eui-Il Hwang, Bon-Suk Koo, Gyeong-Ho Han and Na-Mi Kim.: Effects of Korean red ginseng and herb extracts mixture(KTNG0345) on procollagen biosynthesis and matrix metalloproteinase -1 activity in human dermal fibroblast cell. *J. Ginseng Res.*, **31**(4), 196-202 (2007).
 48. Beata Skiba, Bronwyn Neill, Terrence J. Piva.: Gene expression profiles of TNF- α , TACE, furin, IL-1b and matrilysin in UVA and UVB-irradiated HaCat cells. *Photodermatol Photomed*, **21**, 173-182 (2005).