

백작약 열수추출물의 피부노화 억제 효과 (II) - 주름형성 억제 효과를 중심으로 -

권미화, 최소영¹, 김영철^{1,*}

국립독성과학원 독성병리과, ¹계명대학교 대학원 공중보건학과

Inhibitory Effects of *Peonia japonica* Water Extract on Skin Aging (II) - Focussed on Inhibitory Effects of Wrinkle Formation -

Mi-Hwa Kwon, So-Young Choi¹ and Young-Chul Kim^{1,*}

Department of Toxicopathology, National Institute of Toxicological Research

¹Department of Public Health, Keimyung University

ABSTRACT

To investigate the inhibitory effects of *Peonia japonica* water extract (PJWE) on skin wrinkle formation, skin wrinkles were induced by both the irradiation of UVB and the application of squalene monohydroperoxide to the backs of hairless mice for 4 weeks. And at the same time experimental materials were applied topically. Wrinkles for the control (C) group were formed as a pattern of deep furrows and thick crests. Whereas wrinkles for the positive control (PC, 0.01% retinoic acid) and experimental (E, PJWE) groups were formed as a pattern of shallow furrows and thin crests, which were similar to that of the normal (N) group. Collagen and elastic fibers in dermis of the PC and E groups were almost intact with a regular arrangement, which were similar to those of the N group. The activity of xanthine oxidase, the free radical generating enzyme, was significantly lower in the E group than the C and PC groups. The activities of superoxide dismutase and catalase, the free radical scavenging enzymes, were much higher in the E group than the C and PC groups and similar to the N group. As for the amount of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) expression, PC and E groups were significantly lower than the C group. Therefore, PJWE could be very effective natural herbal material for the inhibition or improvement of wrinkle formation in hairless mice skin.

Key words : *Peonia japonica*, hairless mice, wrinkles, antioxidant activity, MMP-3

서론

피부노화의 원인은 내인적 요인과 외인적 요인

으로 나눌 수 있는데 그 중 자외선에 의한 노화는 환경에 의해 야기되는 외인적 노화의 대표적인 경우이다. 얼굴노화의 80%는 햇빛의 노출로 인해서라는 연구보고가 제기되면서 (Gilchrest, 1989) 자외선에 의한 피부노화에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다.

적당량의 자외선 조사는 소독, 살균작용, 활성화형

※ To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-53-580-5931, Fax: +82-53-588-5233
E-mail: yckim@kmu.ac.kr

Vitamin D의 생합성, 구루병 예방과 같은 유익한 작용을 하지만, 과량의 자외선은 광노화(photoaging), 색소침착증, 피부암, 백내장 증가, 면역기능저하 등 여러 가지 해로운 작용을 한다. 자외선은 유해한 활성산소를 생성하여, 피부세포에 유전자 돌연변이를 일으킬 뿐만 아니라, 신호 전달 체계나, 세포주기, 또는 암 유발 등에 관련된 유전자들의 발현을 변화시킨다(Cadenas, 1989). 이와 같은 자외선에 의한 피부손상의 주요 작용기전은 피부조직 내에 활성산소를 형성시킴으로써 피부에 정상적으로 존재하고 있는 항산화 물질을 감소시켜 효소적, 비효소적 항산화 방어기구의 불균형으로 인한 산화적 스트레스이다(Darr and Fridovich, 1994). 우리 인체는 자외선 노출에 의해 생성된 활성산소를 생체 내 효소방어 기구의 하나인 SOD (superoxide dismutase)와 CAT (catalase)에 의해 세포에 무해한 물질인 물과 산소로 해독시킴으로써 세포의 지질 과산화물을 억제하여 산화적인 손상을 예방한다(Pence, 1990; Hasegawa, 1992). 광노화된 피부에서는 세포와 세포의 기질의 구성성분들의 변형이 관찰된다. 그 대표적인 현상으로는 탄력섬유(elastic fiber)가 불규칙한 구조를 이루고 축적되며, glycosaminoglycans (GAGs)가 비정상적으로 증가하고 교원섬유(collagen fiber)가 파괴되는 것을 들 수 있다. 교원섬유와 탄력섬유는 피부에 탄성과 힘을 주며 이들이 노화로 약해지면 피부는 쉽게 손상된다. 반복적인 자외선 노출은 피부의 기질급속 단백질분해효소(matrix metalloproteinases, MMPs)를 증가시키며, 증가된 MMPs는 피부의 교원섬유를 분해한다. 이러한 현상의 반복은 피부주름을 형성시키게 되는데(Fisher *et al.*, 2002), 특히 진피에서는 자외선에 의해 MAP kinase 경로를 활성화시켜 activator protein-1(AP-1)의 발현을 유도하고 MMPs의 발현을 증가시켜 주름생성을 촉진한다(So *et al.*, 2008).

최근에는 인공적인 약물과는 달리 비교적 부작용이 적은 천연물질에 대한 관심이 증가하고 있어 합성된 화장품보다 천연성분 화장품에 대한 선호도가 높아지고 있으며, 화장품 산업에 있어서 우수한 항산화 효능을 가지고 있는 천연물질을 사용한 노화방지, 자극완화, 주름개선, 미백 등의 연구가 활발하게 진행되고 있다(김경동, 2004). 백작약의 주요 효과로는 항염증, 항스트레스 및 항경련 효과들

이 보고되었다(Park *et al.*, 2003). 현재, 과학적 접근 방법으로 천연 추출물을 사용하여 인체의 질병이나 건강을 다스리는 연구가 많이 시행되고 있으나, 백작약 추출물이 주름형성 억제에 미치는 영향에 대한 과학적 근거가 밝혀진 문헌을 찾아보기 힘들어 그 유효성을 판단하기가 힘든 실정이다.

이에 본 연구는 hairless 마우스에 UVB를 반복적으로 조사하고 squalene monohydroperoxide (Sq-OOH)를 반복 도포하여 피부노화를 유발시키고, 이와 병행하여 백작약 열수추출물을 도포하여 피부의 육안적, 조직학적, 생화학적 분자생물학적 관찰을 통하여 피부노화 억제 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

Hydrogen peroxide는 Junsei 사(Japan)의 제품을, hematoxylin, bovine serum albumin, retinoic acid, polyethylene glycol은 Sigma 사(USA)의 제품을, squalene은 Acros 사(USA)의 제품을 사용하였으며 그 외 일반시약들은 특급품을, 조조바 오일(jojoba oil)은 Desert Whale 사(USA)의 제품을 사용하였다.

실험기기 중 자외선 조사장치는 UVB sunlamp (UVM-225D, Mineralight Lamp UVP, USA)를, 자외선 측정장치는 UV-radiometer (HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하였고 시료추출은 초고속 감압 저온 추출기(COSMOS-660, 경서 기계 산업, 한국)를 사용하였다. Replica 표본관찰은 inverted microscope (Axiovert 200, Carl Zeiss, Germany), 조직 표본관찰은 light microscope (CX41, Olympus, Japan)를 사용하였다.

2. 시료 조제

경북 의성에서 재배한 유기농 백작약 600g을 구입하여 물 6L를 가하여 초고속 감압 저온 추출기로 열수 추출한 후 5L의 양을 얻었다. 5L의 양을 농축 용기에 담아 2L로 농축하였고 파우치 진공포장 후 냉장 보관하여 실험에 사용하였다. 동결건조로 측정된 백작약 열수추출물의 수율(yield)은 5.4%였다. 백작약 열수추출물 10 mL+jojoba oil 1 mL+100% 에탄올 2.5 mL+물 6.5 mL 비율로 혼합

하여 백작약 열수추출물 시료로 사용하였다.

3. 실험동물 및 처치

실험동물은 6주령 SKH-1 hairless mouse (Charles-River, Japan)를 분양받아 1주일간 사육실에서 적응시킨 후 실험 전 기간 동안 사료와 물은 자유로이 공급하였다. 사육실은 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 5\%$, 조명주기 12시간씩 명암을 유지하였다. 실험동물은 실험 4주째 되는 날 에테르로 마취한 후 피부를 적출한 후 일부는 10% 중성 포르말린 용액에 고정하여 조직학적 검사에 사용하였고 나머지는 냉동 보관하여 효소활성 측정 및 유전자 발현분석에 사용하였다.

실험군은 정상군(normal group, N): 아무런 처치를 하지 않은 군, 대조군(control group, C): 자외선 조사+Sq-OOH 도포+saline 도포군, 용매대조군(vehicle control group, VC): 자외선 조사+Sq-OOH 도포+용매(100% 에탄올+jojoba oil+물) 도포군, 양성대조군(positive control group, PC): 자외선 조사+Sq-OOH 도포+0.01% retinoic acid 도포군, 실험군(experimental group, E): 자외선 조사+Sq-OOH 도포+백작약 열수추출물 도포군, 총 5개군으로 나누어 실험하였다.

4. 피부주름 유발 및 시료도포

자외선 조사장치의 광원은 302 nm의 UVB를 방출하는 sunlamp를 사용하였다. 자외선 조사량은 UV-radiometer로 측정하였으며, 마우스를 자외선 조사용 cage에 가둔 후 등 부위에 균등하게 120 mJ/cm^2 의 광량으로 격일 간격으로 1주일에 3회, 4주 동안 조사하였다. 피부거침과 주름형성을 촉진하기 위하여 Sq-OOH를 1일 2회, 주 6일, 4주 동안 매회 $100 \mu\text{L}$ 씩 도포하였다. 광노화 유발과 병행하여 백작약 열수추출물(0.130 g/kg BW/day), 용매, saline은 1일 2회, 주 6일, 4주 동안 매회 $200 \mu\text{L}$ 씩 도포하였다. Retinoic acid는 polyethylene glycol에 0.01%로 희석하여 1일 2회, 주 6일, 4주 동안 매회 $200 \mu\text{L}$ 씩 도포하였다.

5. 피부표면의 형태학적 관찰

4주째 되는 날에 에테르로 가볍게 마취를 하고 디지털 카메라로 사진 촬영을 한 후 replica를 떠서

도립현미경으로 주름의 형태를 관찰하였다.

6. 피부의 조직학적 관찰

1) Van Gieson's 염색 관찰

절취한 피부조직을 실온에서 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정한 후 통상적인 방법으로 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거친 다음 파라핀으로 포매하고 $4 \mu\text{m}$ 두께로 절편을 만들어 Van Gieson 용액으로 감별염색, 탈수, 투명, 봉입 후 진피층 내 교원섬유의 형태 및 양을 광학현미경으로 관찰하였다.

2) Verhoeff's 염색 관찰

절취한 피부조직을 실온에서 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정한 후 통상적인 방법으로 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거친 다음 파라핀으로 포매하고 $4 \mu\text{m}$ 두께로 절편을 만들어 Verhoeff 용액에 염색 후 수세, ferric chloride 2%로 감별 수세 후 sodium thiosulfate에 처리하여 Van Gieson 용액으로 감별염색 후 피부 진피층 내 탄력섬유의 변화, 소실 등을 광학현미경으로 관찰하였다.

7. 항산화능(전자공여능) 측정

백작약 열수추출물에 대한 전자공여능은 Blois (1958)의 방법으로 측정하였다. 동결건조시킨 백작약 열수추출물 분말을 100, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 ethanol에 녹여 조제하고 1 mL를 test tube에 취하였다. 여기에 $4 \times 10^{-4} \text{ M}$ 의 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액 4 mL를 가하여 vortex mixer로 10초간 진탕하고 실온에서 20분 동안 방치한 후에 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물 무 첨가구에는 시료 대신 ethanol 1 mL를 첨가하여 동일하게 실험하고 추출물 첨가구에 대한 흡광도의 감소비율로 전자공여능을 나타내었다. 양성대조군으로 합성 항산화제인 BHT (dibutylated hydroxytoluene)를 동일한 방법으로 실험하여 추출물이 가지는 환원력과 비교하였으며, 다음 식으로 전자공여능(%)을 구하였다.

전자공여능(%)=

$$\left(1 - \frac{\text{추출물 첨가구의 흡광도}}{\text{추출물 무 첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

8. 피부조직의 유해산소 대사효소 활성도

1) 효소시료의 조제

피부조직 중 일정량을 칭량한 후 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 넣고 glass teflon homogenizer를 이용하여 20% (w/v) 마쇄균질액을 만들었다. 이 균질액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 상층액을 10,000×g에서 20분간 원심분리한 후 그 상층액을 효소활성도 측정에 사용하였다.

2) 피부조직의 단백질 함량 측정

피부조직 중 단백질 함량은 Lowry *et al.* (1951)의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준품으로 사용하여 측정하였다.

3) Xanthine oxidase (XO)

피부조직 중 XO의 활성도는 xanthine을 기질로 사용하여 30°C에서 20분간 반응시켜 생성된 요산을 292 nm에서 흡광도를 측정하는 Stripe and Della (1969)의 방법에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 효소액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분간 반응하여 기질인 xanthine으로부터 생성된 uric acid의 양을 nmole로 표시하였다.

4) Superoxide dismutase (SOD)

피부조직 중 SOD의 활성도는 hematoxylin 자동산화의 억제정도를 관찰하는 Martin *et al.* (1987)의 방법에 따라 0.1 mM EDTA가 함유된 50 mM 인산완충액 (pH 7.5)에 10 μM hematoxylin 및 효소액을 가해 25°C에서 반응시켜 생성된 hematein을 560 nm에서 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 활성도 단위는 효소액을 넣지 않은 반응액 중의 hema-toxylin 자동산화를 50% 억제하는 정도를 1 unit로 단백질 1 mg이 1분 동안 반응한 unit로 표시하였다.

5) Catalase (CAT)

피부조직 중 CAT 활성도는 hydrogen peroxide를 기질로 하여 환원되는 정도를 파장 240 nm에서 그 흡광도를 읽고 분자흡광계수 ($E=0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 이용하여 활성을 산출하는 Aebi (1974)의 방법에 준하였다. 활성도 단위는 피부조직 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분 동안 반응하여 감소되는 hydrogen peroxide 양을 nmole로 표시하였다.

9. 피부조직의 유전자 발현량 측정

1) Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)

(1) RNA 추출

Deep freezer에 냉동보관 하였던 피부조직을 액화질소에 담아 이송한 후 얼음으로 저온을 유지시키며 조직 50 mg당 1 mL의 Trizol (Invitrogen, USA)을 첨가하여 조직을 마쇄하고 실온에서 5분간 incubation 시킨 후 chloroform 200 μL를 첨가하여 실온에서 3분간 방치 후 15,000 rpm, 4°C, 10분간 원심분리하였다. 상층액을 취한 후 isopropyl alcohol을 500 μL 첨가한 다음 15,000 rpm, 4°C, 15분간 원심분리 후 상층액은 제거하고 70% ethanol 1 mL을 첨가하여 RNA pellet을 washing하고 15,000 rpm, 4°C, 2분간 원심분리하여 나온 상층액은 제거하고 남은 RNA pellet을 실온에서 건조 후 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 희석하여 260 nm에서 OD값을 측정하여 RNA를 정량하였다. 280 nm에서 OD값을 측정하고 absorbance ratio (A260/A280)가 1.8~2.0 사이인지 확인하였다.

(2) cDNA 합성

BioNEER사의 cycleScript RT PreMix kit에서 제공하는 protocol에 따라 total RNA 양이 0.1~1 μg/μL가 되도록 RNA sample을 넣고 DEPC를 20 μL까지 채운 후 30°C에서 1분간, 50°C에서 4분간 12 cycle 반응시키고 95°C에서 5분간 가열하여 반응을 종결시켰다.

(3) PCR과 전기영동

BioNEER사의 Accupower PCR PreMix kit를 구입하여 사용하였다. Template 2 μL, forward primer와 reverse primer (10 pmole/L, BioNEER, Korea)를 각각 1.4 μL, 멸균된 증류수 15.2 μL를 섞고 PCR 반응 (Bio-RAD, Mycycler™ thermal cycler, USA)을 실시하였다. Primer는 대조군으로 GAPDH (57°C, 35 cycle), 실험군으로 MMP-3 (60°C, 35 cycle)를 사용하였으며 사용된 primer들의 염기서열은 Table 1과 같다. Tris-acetate ethylenediaminetetra acetic acid (TAE) buffer를 이용하여 1.5% agarose gel에 전기영동시켜 ethidium bromide에 염색한 후 수세하고 UV를 조사하여 DNA band를 확인하였고 Gel Logic 100 Imaging System (Kodak, USA)을 이용하여 발현량을 수치화하여 통계처리 하였다.

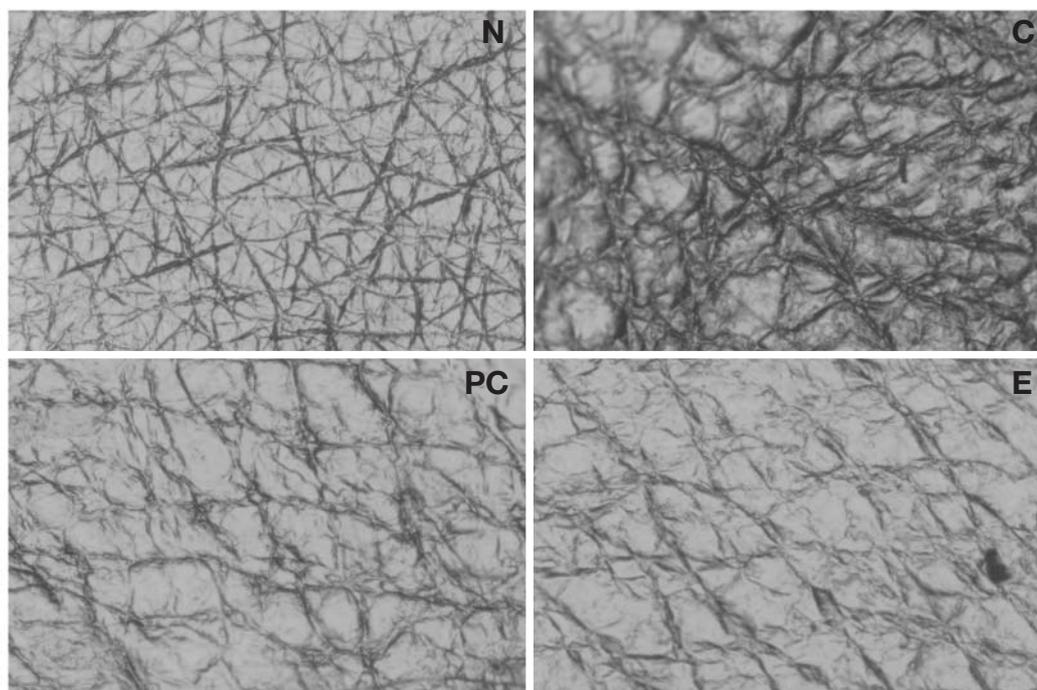
Table 1. Nucleotide sequence of the primers and expected size of PCR products

Items	Primers	Expected size (bp) ³⁾	
GAPDH ¹⁾	Forward (5 → 3)	CCCACTAACATCAAATGGGG	478
	Reverse (5 → 3)	ACACATTGGGGGTAGGAACA	
MMP-3 ²⁾	Forward (5 → 3)	TAGCAGGTTATCCTAAAAGCA	317
	Reverse (5 → 3)	CCAGCTATTGCTCTTCAAT	

¹⁾GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

²⁾MMP-3: Matrix metalloproteinase-3

³⁾bp: basepair

**Fig. 1.** Comparison in skin replica images of SKH-1 hairless mice.

10. 자료 분석

통계적 분석은 SPSS WIN (v14.0)를 이용하여 정상군, 대조군, 용매대조군, 양성대조군, 백작약 열수추출물 도포군 간의 차이를 비교하기 위하여 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)으로 검증하였다. 각 그룹 간의 차이를 검증하기 위하여 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후분석을 실시하였고 p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

1. 피부표면의 형태학적 변화

피부 주름의 형태를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 정상군과 비교할 때 대조군은 주름 능선의 두께가 굵고 간격이 넓으며 주름이 깊게 형성된 반면, retinoic acid를 도포한 양성대조군과 백작약 열수추출물 도포군은 상대적으로 주름 능선의 두께

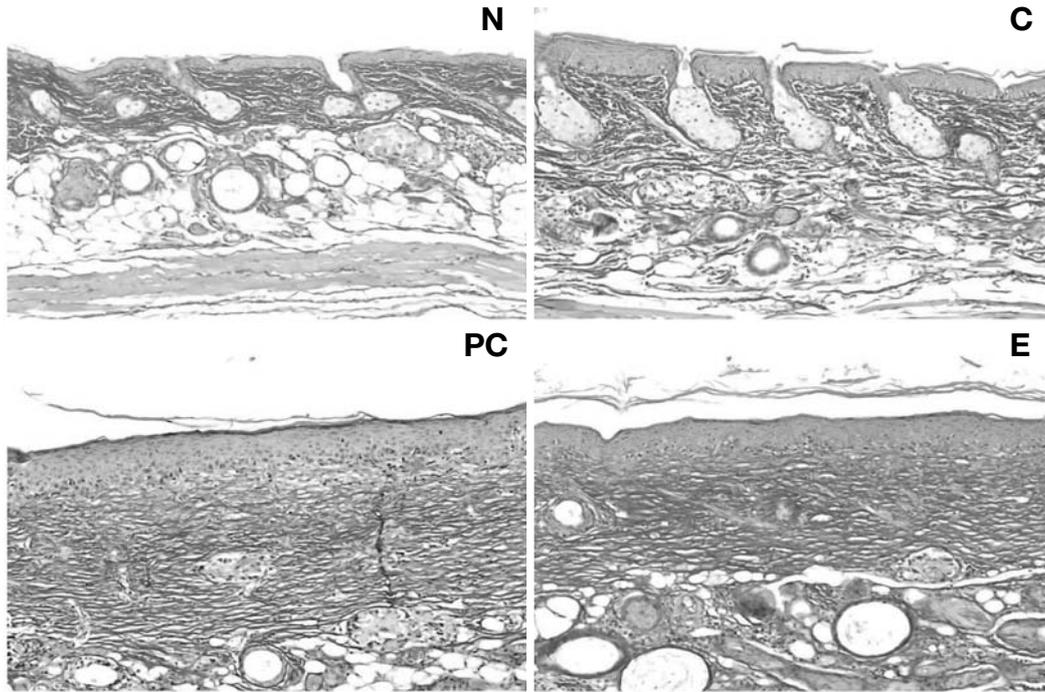


Fig. 2. Histological observation on SKH-1 hairless mice skin. Van Gieson's stain, $\times 100$.

가 얇고 간격이 좁으며 주름이 얇게 형성되어 있어 비교적 정상군에 가까운 양상을 띠고 있었다. Lee *et al.* (2005)도 UVB 조사군과 Sq-OOH 처치군이 비처리군보다 주름 형성이 현저히 증가하였다고 보고한 바 있다.

2. 피부의 조직학적 변화

1) Van Gieson's 염색 관찰

자외선의 노출로 인해 진피층 내의 교원섬유와 탄력섬유의 합성이 감소하여 주름의 원인이 되는 것으로 알려져 있다 (Svobodova *et al.*, 2003). 진피층 내 교원섬유의 양과 형태를 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 정상군은 교원섬유의 밀도가 조밀하고 배열이 규칙적인 반면, 대조군은 교원섬유가 파괴되어 밀도가 엉성하고 양이 많이 줄어들어 있었다. 양성대조군과 백작약 열수추출물 도포군은 정상군에 가까운 양상을 보였다.

2) Verhoeff's 염색 관찰

피부가 과량의 자외선에 노출되면 진피 내 변성

된 탄력섬유의 증가로 인한 탄력섬유증 (elastosis) 이 발생한다 (Kligman *et al.*, 1993). 피부 진피층 내 탄력섬유의 변화, 소실 등을 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. 정상군은 탄력섬유의 형태가 일정하고 배열이 규칙적인 반면, 대조군은 변성되어 엉긴 교원섬유가 군데군데 다량으로 축적되어 있는 elastosis 소견을 보였다. 양성대조군과 백작약 열수추출물 도포군은 대조군에 비해 변성된 탄력섬유의 양이 많이 줄어들음을 확인하였다.

3. 항산화능 비교

1) 시료의 전자공여능

백작약 열수추출물에 대한 전자공여능을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. 양성대조군인 BHT와 같이 백작약 열수추출물은 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하는 농도-의존성 반응을 나타냈다. 백작약 열수추출물은 1,000 ppm에서 약 75%의 높은 전자공여능을 보여 항산화능이 매우 우수한 것으로 확인되었다.

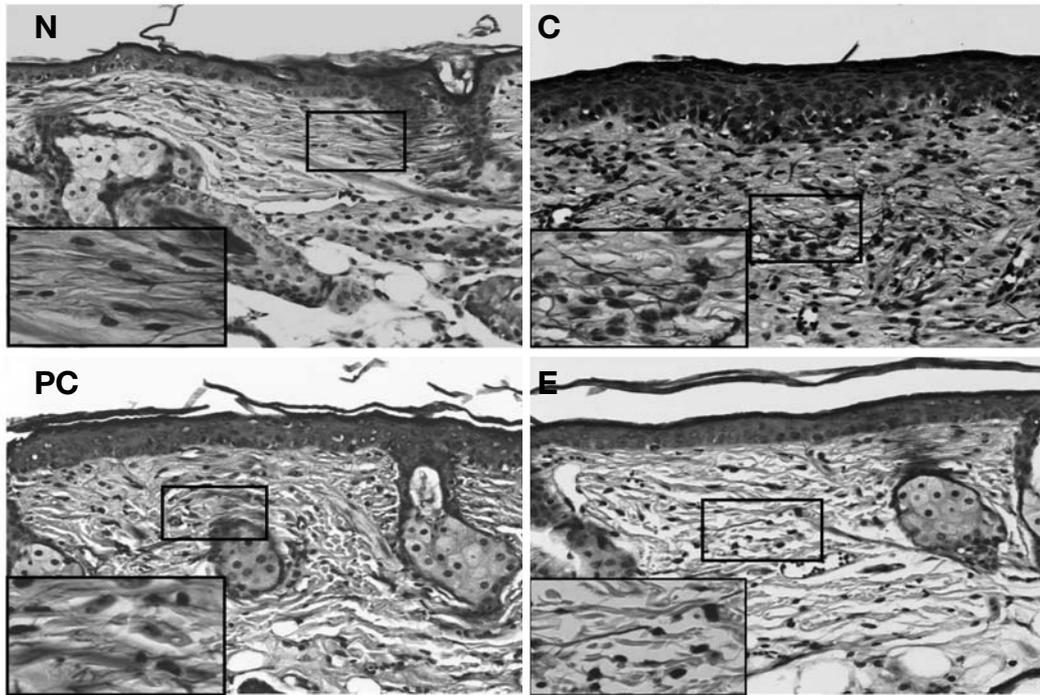


Fig. 3. Histological observation on SKH-1 hairless mice skin. Verhoff's stain, $\times 200$ & $\times 400$. Squared portion in the lower corner of each picture represents the magnification ($\times 400$) of designated small squared portion ($\times 200$) in the picture.

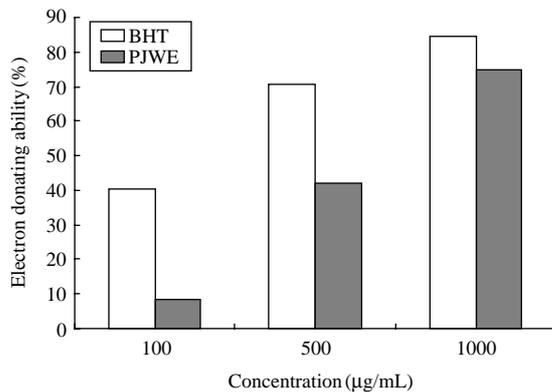


Fig. 4. Electron donating abilities of *Peonia japonica* water extract. BHT: Dibutylated hydroxytoluene; PJWE: *Peonia japonica* water extract; Values are means of 3 replicates.

2) 피부조직의 유해산소 대사효소 활성변동
 인체의 표피층은 다른 조직보다 뛰어난 항산화 능력을 가지고 있어 미생물, allergen 등의 외부 침입으로부터 방어하는 역할을 하며 이러한 항산화 능

의 감소는 피부노화의 원인으로 제시되어져 왔다. UVB 조사와 Sq-OOH 도포는 활성산소를 생성하여 항산화 방어기구에 불균형을 초래하여 피부노화를 일으킨다(Chiba *et al.*, 2003). XO는 생체조직에 존재하면서 세포상해와 관련한 유해산소 생성계 효소로 알려져 있으며 이 효소에 의해 생성된 superoxide anion radical ($O_2^- \cdot$)은 세포상해의 직접적인 원인으로 작용하는 세포의 지질과산화물을 일으키는 것으로 알려져 있다. 자외선이나 Sq-OOH 도포에 의해 생성된 $O_2^- \cdot$ 을 생체방어기구의 하나인 SOD가 H_2O_2 로 전환시키면 CAT는 H_2O_2 를 세포에 무해한 물질인 물과 산소로 분해시킴으로써 세포의 지질과산화물을 억제하여 산화적인 손상을 예방한다(Hasegawa, 1992). 적출한 피부조직에서 유해산소 대사효소 활성변동을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 유해산소를 생성하는 효소인 XO는 정상군에 비해 대조군은 유의하게 높았다. 백작약 추출물 도포군은 정상군과 유의한 차이가 없었으며 대조군, 용매대조군, 양성대조군에 비해 유의하게 낮

Table 2. Comparison in skin xanthine oxidase, superoxide dismutase and catalase activities of SKH-1 hairless mice

Group	Normal		Control		Experimental
	N	C	VC	PC	E
XO ¹⁾	1.93 ± 0.34 ^{ab}	3.01 ± 0.47 ^c	2.11 ± 0.36 ^b	2.36 ± 0.22 ^b	1.40 ± 0.48 ^a
SOD ²⁾	11.60 ± 3.32 ^a	7.79 ± 2.23 ^a	8.26 ± 1.75 ^a	8.84 ± 3.68 ^a	9.39 ± 0.74 ^a
CAT ³⁾	5.88 ± 6.25 ^a	2.99 ± 0.59 ^a	3.36 ± 2.15 ^a	3.43 ± 2.59 ^a	5.44 ± 3.66 ^a

Values are means ± SD of 5 mice

¹⁾Unit: nmole uric acid formed/mg protein/min

²⁾Unit: U (50% inhibition of autoxidation of hematoxylin)/mg protein/min

³⁾Unit: nmole H₂O₂ reduced/mg protein/min

N: No treatment group

C: UVB irradiation+Squalene-OOH+Saline application group

VC: UVB irradiation+Squalene-OOH+Jojoba oil+100% ethanol+Water application group

PC: UVB irradiation+Squalene-OOH+Retinoic acid application group

E: UVB irradiation+Squalene-OOH+*Peonia japonica* extracts application group

Values with different superscripts in the same row are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test

았다. 유해산소를 제거하는 효소인 SOD와 CAT는 대조군, 용매대조군, 양성대조군은 정상군에 비해 감소하였고, 백작약 열수추출물 도포군은 정상군과 비슷한 수치를 나타내었다. 이와 같은 결과는 백작약 열수추출물이 활성산소의 생성을 줄이고 생성된 활성산소의 제거를 촉진시키는 효과가 있음을 의미한다.

4. 피부조직의 유전자 발현량 변동

1) Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)

MMP는 교원섬유를 분해하는 효소로서 현재까지 25종이 알려져 있으며 교원섬유와 함께 대표적인 피부 노화 지표로 사용되고 있다. 자외선으로 유도된 MMPs는 교원섬유를 감소시키고 탄력섬유를 변성시켜 피부 주름을 유발한다 (Kim *et al.*, 2005). 사람의 피부에 자외선이 노출되면, 24시간 이내에 MMPs의 발현이 증가되고 이는 교원섬유의 분해를 높인다는 연구보고가 있다 (Fanger *et al.*, 1997). 그 중 MMP-3는 stromelysin 1이라고도 불리며 gelatin, proteoglycan, laminin, fibronectin과 type III, IV collagen을 포함한 다양한 세포외 기질의 분해를 담당한다 (MacNaul *et al.*, 1990). 또한 proMMP-1을 활성화시키는 효소로 주름 생성에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서 피부조직의 MMP-3 발현량을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 정상군에 비해 대조군과 용매대조군은 유의하게 높았고, 양성대조군과 백작약 열수추출물 도포군은 대조군과 용매대조군에 비해 유의하게 낮았다. 이를 통해 백

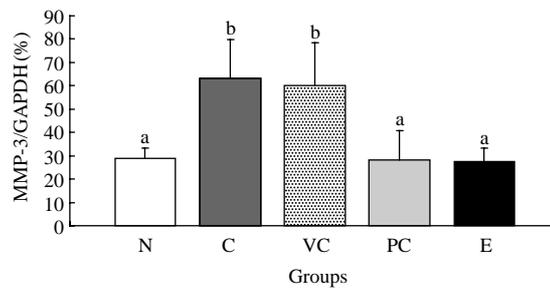


Fig. 5. Comparison of MMP-3 mRNA expression in hairless mice skin. Values are means ± SD of 5 mice. Values with different superscripts in the same row are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.

작약 열수추출물이 자외선에 의해 생성된 MMP의 발현을 억제시키는 효과가 있음을 확인하였으며 이와 같은 결과는 육안적, 조직학적 결과를 뒷받침해 준다.

결론

피부 주름의 양상을 비교하기 위하여 replica를 떠서 도립현미경으로 관찰한 결과 UVB 조사와 Sq-OOH를 도포한 대조군은 깊이가 깊고 선이 굵은 주름이 형성되었고 retinoic acid를 도포한 양성대조군과 백작약 열수추출물을 도포한 실험군은 주름의 선이 얇고 깊이가 얇게 나타났다. 조직학적

소견에서, 대조군은 피부 진피층 내 교원섬유가 파괴되어 밀도가 영성하고 배열이 불규칙적이고 양도 많이 줄어있는 반면, 양성대조군과 백작약 열수추출물 도포군은 대조군에 비해 교원섬유의 밀도가 조밀하고 배열도 규칙적으로 나타났다. 또한, 대조군은 다량의 변성되어 엉긴 탄력섬유가 군데군데 축적되어 있었고 양성대조군과 백작약 열수추출물 도포군은 대조군에 비해 변성되어 엉긴 탄력섬유의 양이 줄어들었다. 이와 같은 조직학적 소견은 육안적인 주름양상의 차이를 뒷받침해 주는 결과로써 백작약 열수추출물이 피부주름 억제/개선에 효과적임을 확인할 수 있었다.

백작약 열수추출물의 *in vitro*에서 항산화능을 측정된 결과 양성대조군인 BHT와 같이 백작약 열수추출물은 농도-의존성 반응을 보였으며, 1,000 ppm에서 약 75%의 높은 전자공여능을 보여 항산화능이 매우 우수한 것으로 확인되었다. *In vivo*에서의 항산화 능을 알아보기 위해서 유해산소 대사효소 활성변동을 측정된 결과, 대조군의 경우 정상군에 비해 XO 활성의 유의한 증가와 함께 SOD와 CAT 활성의 감소를 나타내 UVB 조사와 Sq-OOH 도포로 인해 활성산소의 생성을 높게 하고 이들 생성된 활성산소를 제거하기 위해 해독계 효소가 많이 사용됨으로써 항산화 방어기구의 불균형을 가져와 산화스트레스가 심함을 알 수 있었다. 반면, 백작약 열수추출물 도포군은 대조군에 비해 XO 활성은 유의하게 낮았고 SOD와 CAT 활성은 현저하게 높게 나타나 우수한 항산화 효과가 있음을 확인하였다. 이와 같은 결과는 조직학적 관찰에서 백작약 열수추출물 도포군이 대조군에 비해 피부 손상을 적게 초래한 일련의 결과와 부합한다.

피부조직의 MMP-3 발현량을 측정된 결과 정상군에 비해 대조군과 용매대조군은 유의하게 높은 반면, 양성대조군과 백작약 열수추출물 도포군은 대조군과 용매대조군에 비해 유의하게 낮았다. 이를 통해 백작약 열수추출물이 자외선에 의해 생성된 MMP의 발현을 억제시키는 효과가 있음을 확인하였으며 이와 같은 결과는 육안적, 조직학적 소견을 뒷받침해 준다.

본 연구에서 육안적인 피부 주름 양상과 피부노화 관련지표들을 분석한 결과를 종합해 보면, 백작약 열수추출물은 피부주름 개선에 있어서 효능이 검증된 retinoic acid와 비슷한 수준으로 피부노화

억제/개선 효과가 있는 것으로 확인되었다. 따라서 백작약 열수추출물은 피부노화 억제/개선 물질로서의 이용가능성이 높을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 김경동. 한방 천연식물의 항산화 및 자외선 흡수에 관한 연구, 한국미용학회지 2004; 10(2): 145-153.
- Aebi H. Catalase. In: methods of enzymatic analysis (Bergmeyer HU, ed.), Academic Press, New York 1974.
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 1958; 181: 1199-1200.
- Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. Ann Rev Biochem 1989; 58: 79-110.
- Chiba K, Kawakami K, Sone T and Onoue M. Characteristics of skin wrinkling and dermal changes induced by repeated application of squalene monohydroperoxide to hairless mouse skin, Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 2003; 16(4): 242-251.
- Darr D and Fridovich I. Free radicals in cutaneous biology, J Invest Dermatol 1994; 102(5): 671-675.
- Fanger GR, Johnson NL and Johnson GL. MEK kinase are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42, EMBO J 1997; 16(16): 4961-4972.
- Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S and Voorhees JJ. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging, Arch Dermatol 2002; 138(11): 1462-1470.
- Gilchrest BA. Skin aging and photoaging. An overview, J Am Acad Dermatol 1989; 21(3): 510-513.
- Hasegawa T. Changes in lipid peroxide levels and activity of reactive oxygen scavenging enzymes in skin, serum and liver following UVB irradiation in mice, Life Sci 1992; 50(24): 1893-1903.
- Kim HH, Lee MJ, Lee SR, Kim KH, Cho KH, Eun HC and Chung JH. Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice, Mechanism of Ageing and Development 2005; 126(11): 1170-1177.
- Kligman LH, Crosby MJ and Higley H. The UVB-irradiated hairless mouse as a model for the evaluation of injectable collagen implants, J Dermatol Treat 1993; 4(1): 27-31.
- Lee JH, Lee BS, Yang MS, Byun BS, Kim WG, Kim BH and Lee SJ. Prevention of photoaging and wrinkle formation in hairless mice dorsal skin by APB-03, Kor J Food Sci Technol 2005; 37(6): 989-996.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Pro-

- tein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem* 1951; 193(1): 265-275.
- MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ and Hutchinson NI. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblast. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression, *J Biol Chem* 1990; 265(28): 17238-17245.
- Martin JP, Dailey M and Sugarman E. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation, *Arch Biochem Biophys* 1987; 225(2): 329-336.
- Park HR, Jung UJ, Jeoung IY, Yee ST and Jo SK. Inhibition of tumor growth through macrophage activation by polysaccharide fraction from *Peonia japonica*, *J Kor Soc Food Sci Nutr* 2003; 32(1): 149-154.
- Pence BC. Effects of single-dose ultraviolet radiation on skin superoxide dismutase, catalase, and xanthine oxidase in hairless mice, *J Invest Dermatol* 1990; 95(2): 213-216.
- So SH, Lee SK, Hwang EI, Koo BS, Han GH, Lee MJ, Chung JH and Kim NM. Mechanisms of Korean red ginseng and herb extracts (KTNG0345) for anti-wrinkle activity, *J Ginseng Res* 2008; 32(1): 39-47.
- Stirpe F and Della CE. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) oxidase (type O), *J Biol Chem* 1969; 244(14): 3855-3863.
- Svobodova A, Psotova J and Walterrova D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced damage, *A Rev Biomed* 2003; 147(2): 137-145.