

호장근(*Reynoutria elliptica*) 발효 추출물의 UVB에 의한 피부 광노화 억제효과

임애경¹ · 정유정² · 김길수³ · 김용해⁴ ·곽정훈⁴ · 홍주현⁵ · 김학운⁶ · 김대익^{1*}

¹(재)대구테크노파크 바이오산업지원센터, ²인제대학교 식품생명과학부

³경북대학교 수의과대학, ⁴신화제약연구소(주)

⁵대구가톨릭대학교 외식식품산업학부, ⁶계명대학교 환경대학

Skin UVB Photo Aging Effect from Extract of Fermented *Reynoutria elliptica*

Ae-Kyung Lim¹, Yu-Jung Jung², Kil-Soo Kim³, Yong-Hae Kim⁴, Jung-Hoon Kwak⁴,
Joo-Heon Hong⁵, Hak Yoon Kim⁶, and Dae-Ik Kim^{1*}

¹Daegu Technopark Bio Industry Center, Daegu 704-801, Korea

²Food Science Institute and School of Food Life Science, Inje University, Gyeongnam 621-749, Korea

³College of Veterinare Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

⁴Shinhwa Pharam Research Institute, Gyeongbuk 780-921, Korea

⁵Dept. of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

⁶Dept. of Environmental Studies, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

To evaluate the skin aging inhibition effect of fermented *Reynoutria elliptica*, skin aging model was produced by the irradiation of UVB to hairless mice for 5 weeks. The skin erythema index for the positive control (PC), not fermented *Reynoutria elliptica* extract (NFR), and fermented *Reynoutria elliptica* extract (FR-500, 1000, 2000) groups were lower than that of the control group. However, both lipid and water capacity for the PC and FR groups were higher than those of the control group. Collagen fibers in dermis of the FR groups were almost intact with a regular arrangement which were similar to the normal (NO) group. Also, relatively much less number of mast cells and inflammatory cells were found in FR groups. The skin TBARS contents and XO activity in the FR group were significantly lower than the control group. The activities of GSH, SOD and CAT for the FR groups were significant higher than the control group. Therefore, fermented *Reynoutria elliptica* extract can be practically useful for the prevention or improvement of skin aging in terms of health promotion and beauty for the people.

Key words: *Reynoutria elliptica*, skin aging, hairless mouse, antioxidant activity

서 론

최근 전 세계적으로 건강이나 피부 미용에 대한 관심이 증대되면서 노화에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(1). 특히 야외활동으로 인하여 피부가 태양광선에 그대로 노출되면 자외선에 의해 피부노화가 진행되면서 색소침착과 같은 피부손상을 받게 된다(2). 이러한 태양광선에 의한 노화를 광노화(photoaging)라고 하며, 특히 UVB와 같은 자외선은 피부조직 내 활성 산소를 형성시켜, 피부에 존재하는 항산화 물질을 감소시킴으로써 산화적 스트레스를 유발시키는 것으로 알려져 있다(3). 또한, 이러한 과정에서 생성된 활성 산소종(free radical)들은 멜라닌 생성을 촉진하고 교원 섬유와 탄력섬유의 합성을 감소시켜 주름을 생성시키는 것으로 알려져 있으며, 각질층의 수분 함량을 감소시켜 DNA

조직에 손상을 야기하며, 체내의 단백질, 지방, 세포막, 핵산 등을 산화시켜 피부 노화를 더욱더 촉진시키는 것으로 보고 되고 있다(4).

이에 피부노화와 관련한 다양한 기능성 소재탐색이 진행되고 있는데, 특히 천연 식물자원을 이용한 안전성과 효과가 뛰어난 항산화제를 개발하고자 하는 연구가 시도되고 있다.

호장근은 마디풀 속과에 속하는 다년생초로서 한국과 같은 동아시아에서 자생하며, 전통적으로 민간에서는 요도염, 이뇨, 방광염 등의 치료약으로 이용해 왔다. 한국에 분포되어 있는 호장류에는 호장, 왕호장 및 등근잎호장 등 3종류가 있으며, 시중에 판매되는 호장근의 대부분은 직생성근경형인 왕호장의 근경으로 보고되었다(5,6). 호장류의 생리 화학적 성분에 관한 연구로는 일본산 호장과 왕호장의 잎에서 anthraquinone류인 emodin, physcion, chrysophanol과 fla-

*Corresponding author. E-mail: crs3814@hanmail.net
Phone: 82-53-602-1891, Fax: 82-53-602-1898

vonoid류인 quercitrin, isoquercitrin, reynoutrin을 그리고 어린 순에서 malic acid, tartaric acid, citric acid를 분리하였으며, 일본산 호장의 뿌리에서 anthraquinon류와 stilbene류인 resveratrol과 그 배당체인 piceid가 분리 보고되었다(5-8). 하지만 호장근을 대상으로 항산화 활성, 특히 UVB를 조사한 후 항산화 효소계에서 발효시킨 호장근의 역할에 대한 연구는 많이 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 hairless mouse에 UVB를 반복적으로 조사하여 피부노화를 유발하고 이를 대상으로 호장근 발효 추출물의 항노화 기능을 살펴보았으며, 발효 호장근의 피부노화예방 및 기능성 화장품 원료로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출물의 조제

호장근은 대구 약업사에서 구매하여 분쇄기(FM-680T, Hanil, Changwon, Korea)에 넣고 잘 분쇄한 후, 균사배양이 적당한 수분을 첨가하여 121°C, 1.5기압의 조건에서 20분간 멸균하였다. 신화제약(주)에서 직접 분리하여 보관중인 *Phellinus linteus* SHP 22001 균사체를 Potato dextrose broth(PDB)에서 5일간 배양한 다음 5%(v/w) 농도로 접종하고 27°C에서 20일 동안 고체배양 하였다. *P. linteus* SHP 22001 균사로 배양된 호장근에 일정 수분을 첨가하여 다시 121°C, 1.5기압의 조건에서 20분간 멸균한 후, 막걸리에서 분리한 *Saccharomyces cerevisiae* SHP 31001를 5%(v/w) 농도로 접종하고 34°C에서 5일 동안 고체 발효시켜 시료 제조에 사용하였다. 발효된 호장근 50 g에 95% 에탄올 500 mL을 첨가한 다음, 75°C에서 10시간 동안 3회 반복 추출하였다. 에탄올 추출액을 여과지(Toyo filter No.1)로 여과하고 감압농축(Eyela N-1000)한 후 동결 건조한 분말을 동물실험을 위한 발효 호장근 시료로 사용하였다. 호장근 50 g에 95% 에탄올 500 mL을 첨가한 다음, 75°C에서 10시간 동안 3회 반복 추출하고 이것의 건조분말을 얻어 10 mg/mL의 농도로 제조하여 발효시키지 않은 호장근 시료로 사용하였다.

시약 및 기기

실험에 사용된 모든 분석용 시약은 Sigma Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며, 용매는 특급으로 사용하

였다. 자외선 조사장치의 광원은 302 nm의 UVB를 0.6 mW/cm²의 강도로 방출하는 UVB sunlamp(UVM-225D, Delta OHM, Padova, Italy)를 사용하였다.

실험동물 및 실험군

실험동물은 6~7주령(22~28 g)의 암컷 hairless mouse (Orient Bio, Tokyo, Japan)를 분양받아 1주일간 사육실에서 적응시킨 후 사용하였으며, 실험 전 기간 동안 사료와 물은 자유로이 공급하였다. 사육실은 온도 22±1°C, 상대습도 50±5%, 조명주기 12시간씩 명암을 유지하였다. 실험군은 Table 1과 같이 7군으로 나누었으며, 각 군당 5마리씩 총 35마리를 실험에 사용하였다.

피부노화 유발 및 시료도포

자외선 조사량은 UV-radiometer(UVB LP9021, Delta OHM, Padua, Italy)로 측정하였으며, 마우스를 자외선 조사용 cage에 가둔 후 등 부위에 균등하게 60 mJ/cm²의 광량을 1 Minimum Erythema Dose(MED)로 하여 1주일 간격으로 1 MED씩 증가시켰으며, 격일 간격으로 1주일에 3회, 5주 동안 조사하였다. 5주간의 광노화 유발 후 에탄올, 프로필렌 글리콜, 증류수를 각각 30:50:20의 비율로 혼합한 용액을 기본 로션으로 하여 이 용액에 ascorbic acid 1,000 ppm, 호장근 발효 추출물 500, 1,000, 2,000 ppm의 농도로 각각 혼합하여 제조한 후 시료로서 5주간 1일 1회 200 µL씩 도포하였다.

피부 홍반도, 유분 및 수분함량 측정

홍반도는 측정은 Mexameter(MX18, CK electronic GmbH, Koin, Germany)를 이용하였고, 유분함량은 Sebumeter(SM825, CK electronic GmbH), 수분함량은 Corneometer(CM825, CK electronic GmbH)를 사용하여 비침습적 방법으로 도포 5주째 되는 날 측정하였다.

피부조직의 형태학적 관찰

실험 시작 후 5주째 되는 날 각 실험군을 대상으로 에테르로 가볍게 마취를 하고, 주름정도를 객관적으로 평가하기 위하여 실험동물 배부에 실리콘폴리머(SILFLO impression material, Flexico, Tokyo, Japan)를 이용하여 피부주형(replica)을 떠서 skin visometer(SV600, CK electronic GmbH)로 주름의 형태를 관찰하였다.

Table 1. Experimental design of animals

(n=5/group)

Groups	Experimental group
NO	Normal control
CO	UV+base lotion (BL) ¹⁾ treated group
PC	UV+BL containing 1,000 ppm of ascorbic acid treated group
NFR	UV+BL containing 1,000 ppm of <i>Reynoutria elliptica</i> extract
FR-500	UV+BL containing 500 ppm of fermented <i>Reynoutria elliptica</i> extract
FR-1000	UV+BL containing 1,000 ppm of fermented <i>Reynoutria elliptica</i> extract
FR-2000	UV+BL containing 2,000 ppm of fermented <i>Reynoutria elliptica</i> extract

¹⁾Base lotion: ethanol (30)+propylene glycol (50)+distilled water (20).

피부조직의 조직병리학적 관찰

5주간의 실험물질 도포 후 조직병리학적 검사를 위한 피부조직은 각 실험군에서 2두씩을 선발하여 배부 조직을 채취하여, 생리식염수로 세척하고 Neutral buffered formaldehyde(NBF)에 24시간 고정하였다. 고정된 조직은 피부전층을 포함하는 절편을 취하여 탈수시킨 후 paraffin 블록에 포매하여, 조직절편기(RM2125, Leica, Wetzlar, Germany)로 4 μm 의 두께로 절단한 다음 polylysine으로 coating된 slide에 붙였다. 조직절편은 xylene을 이용하여 paraffin을 제거하고 alcohol과 증류수로 10분간 흡수시켜 증류수로 세척한 후, 피부조직의 변화양상을 관찰하기 위하여 Hematoxylin-Eosin 염색을 실시하고 진피 내 세포괴사(apoptosis)의 양을 관찰하기 위하여 TUNEL 염색을 실시하였다.

Glutathione(GSH) 함량 측정

환원형 GSH 함량은 Ellman의 방법에 따라 측정하였다(9). 조직 마쇄균질액 일정량에 4% sulfosalicylic acid 0.5 mL를 넣고 원심분리한 후, 상층액 일정량을 0.1 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 함유 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 8.0)에 넣고 반응시켜 생성된 *p*-nitrophenol을 측정하였다. 환원형 GSH 함량은 단백질 mg당 μmole 로 나타내었다.

Thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) 함량 측정

지질과산화(TBARS) 함량은 Ohkawa 등(10)의 방법에 따라 측정하였다. 효소 시료 속의 과산화지질을 산성조건 하에서 2-thiobarbituric acid 용액과 가열 반응시켜 생긴 TBARS 함량을 532 nm에서 측정하였다. TBARS 함량은 단백질 mg당 nmole로 표시하였다.

Xanthine oxidase(XO) 효소 활성 측정

피부 조직 중 XO의 활성도는 xanthine을 기질로 사용하여 30°C에서 20분간 반응 시켜 생성된 요산을 292 nm에서 흡광도를 측정하는 Stripe와 Della(11)의 방법에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 효소액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분 동안 반응하여 기질인 xanthine으로부터 생성된 uric acid의 양을 nmole로 표시하였다.

Superoxide dismutase(SOD) 함량 측정

SOD의 활성도는 hematoxylin 자동산화의 억제정도를 관찰하는 Martin 등(12)의 방법에 따라 0.1 mM EDTA가 함유된 50 mM 인산 완충액(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 hematoxylin 자동산화를 50% 억제하는 정도를 1 unit로 하여 단백질 1 mg이 1분 동안 반응한 unit로 표시하였다.

Catalase(CAT) 활성 측정

CAT 활성도는 hydrogen peroxide를 기질로 하여 환원되는 정도를 240 nm에서 흡광도를 읽고 분자흡광계수($E=0.04 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 활성을 산출하는 Aebi(13)의 방법에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 피부조직 중에 함유된 단백질 1 mg이 1분 동안 반응하여 감소되는 hydrogen peroxide의 양을 nmole로 표시하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었으며, 각 그룹 및 평균간 통계적 유의성은 SPSS 10.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 one-way ANOVA 분석 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

피부 홍반도 변화 및 유수분 함량 변화

태양광선에 따른 UVB 조사로 인하여 여러 가지 피부 손상 중 염증반응의 결과로 피부의 혈관이 확장되어 피부는 홍반을 일으킨다(14). Table 2에서 각 그룹당 피부의 홍반도의 변화를 측정하여 피부의 손상정도를 살펴보았다. 대조군인 CO군이 정상 NO군에 비해 홍반도가 실험 전 기간 동안 유의하게 높은 것으로 나타났다. 하지만 PC군, NFR군 및 FR군에서 대조군에 비해 홍반도가 낮은 경향을 보였다. 특히 호장근 발효 추출물을 처리한 실험군에서 농도 의존적으로 홍반도가 감소하였으며, FR-500, FR-1000 및 FR-2000 군에서 각각 89.4, 84.9, 그리고 84.4%의 뛰어난 홍반도 감소 효과를 보였다. 이로서 대조군에 비하여 호장근 추출물 도포군에서 염증반응으로 일어나는 혈관확장현상의 피부홍반을 줄여주는 것으로 사료되며 특히 발효하지 않은 호장근보다 발효된 호장근 추출물에서 강한 항염작용이 있는 것으로 생각된다.

UVB에 피부가 유출되면 superoxide anion과 singlet oxygen과 같은 활성산소를 유발하여 피부의 진피조직을 손

Table 2. Changes in erythema index, moisture capacity and moisture evaporation index at 5 weeks after various treatments on UVB-induced skin aging

Groups	Erythema ¹⁾	Lipid capacity	Moisture capacity
NO	223.40 \pm 6.93 ^a	19.25 \pm 0.48 ^b	55.61 \pm 3.00 ^{ab}
CO	259.56 \pm 5.22 ^b	9.00 \pm 1.73 ^a	47.61 \pm 1.67 ^a
PC	236.24 \pm 4.54 ^a	16.40 \pm 5.68 ^b	54.68 \pm 1.62 ^{ab}
NFR	233.07 \pm 5.38 ^a	17.67 \pm 0.33 ^b	53.63 \pm 2.02 ^{ab}
FR-500	232.18 \pm 5.19 ^a	16.30 \pm 2.66 ^b	52.15 \pm 4.05 ^{ab}
FR-1000	220.32 \pm 10.23 ^a	21.75 \pm 0.72 ^b	55.13 \pm 1.07 ^{ab}
FR-2000	219.09 \pm 11.68 ^a	22.80 \pm 2.24 ^b	57.39 \pm 2.95 ^b

The values are mean \pm SD of 5 mouse. ^{a,b}Values within a column with different superscript letters are significantly different each other groups at $p < 0.05$.

¹⁾Unit: AU (Arbitrary Unit).

상시키고, 그 결과로 피부장벽을 붕괴하여 피부의 유분과 수분의 밸런스가 불균형하게 바뀌므로써 피부의 손상을 초래한다(15). 본 실험에서는 호장근 발효 추출물이 피부 유수분 함량의 변화에 미치는 영향을 측정하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다. UVB만 조사한 대조군에 비해 호장근 발효 추출물을 처리한 실험군인 FR-500, 1000, 2000에서 유수분의 함량이 농도 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 특히 ascorbic acid 및 호장근 추출물을 1,000 ppm의 농도로 처리한 PC군과 NFR군에 비하여 호장근 발효 추출물 1000 ppm의 농도로 처리한 FR-1000군에서 유분함량 21.75 ± 0.72 , 수분함량 55.13 ± 1.07 로 대조군에 비하여 각각 140%, 15% 이상 증가하였다. 이와 같은 결과를 보았을 때, 호장근 발효 추출물이 발효하지 않은 추출물에 비하여 유효한 생리 활성 성분을 많이 함유하고 있음을 알 수 있고, 대조군에 비하여 상대적으로 피부장벽의 손상정도가 적음을 유추할 수 있다. 레드 와인은 전 세계적으로 잘 알려진 대표적인 발효주이며, 항산화 활성이 뛰어나 건강음료로 각광받고 있다. 레드 와인의 대표적인 항산화 활성 성분은 resveratrol이며 UVA에 대한 항산화 활성이 있음이 보고되었다(16,17). 따라서 본 결과에서도 호장근에 함유되어 있는 resveratrol이 발효 과정 중 생성량이 늘어나 발효 추출물에서 효과가 있음을 사료하는 바이다.

피부조직의 형태학적 변화

UVB에 의해 collagenase 또는 gelatinase 같은 matrix metalloprotease(MMP) 효소가 증가되어 collagen 분해가 증가되어 피부는 주름이 생성되고, 피부 처짐, 표피의 두께 증가, 피부탄력성의 소실, 색소 침착 등을 일으켜 전반적인 피부 노화가 야기된다(18). 호장근 발효 추출물이 피부 주름에 미치는 영향은 Fig. 1에서 실험동물의 배부 주형(reflica)을 skin visometer를 통하여 살펴보았다. 정상군에 비해 UVB 조사군인 CO에서는 기존의 연구결과에서처럼(19) 깊이가 깊고 선이 굵은 주름이 형성되었다. 하지만 PC군, NFR군 그리고 호장근 발효 추출물을 각 농도별로 처리한 FR군에서는 현저하게 주름의 선이 얇고 깊이가 얕게 나타났고, 특히 FR-1000군에서는 NO군과 유사한 결과를 확인할 수

있었다. 이와 같은 결과는 호장근 발효 추출물 도포가 피부 노화의 대표적인 징후인 주름개선 및 예방에 효과적이라 예상된다.

피부조직의 조직병리학적 변화

자외선에 노출되면 피부의 초기 반응으로 염증이 생기는데, 이로 인해 생체 내 면역 방어계 역할을 하는 호중구가 염증부위에 제일 먼저 이주하고 염증성 세포의 침윤이 일어나게 된다. 또한 만성적인 자외선 노출에서는 표피의 과립층과 각질층을 증가시켜 표피층의 비후와 함께 진피 내 변성된 탄력섬유의 증가로 인한 탄력섬유증이 발생하게 된다(20). UVB에 의한 표피의 조직학적 변화로 일광화상 세포존재, 과각화증, 이상각화증이 나타나며, 진피에서는 혈관 내피세포의 종창, 혈관주위 부종, 유두부종, 염증세포 침윤 등의 현상이 나타난다(15). 본 실험에서는 조직병리학적 관찰을 위해 실험동물의 일부에 H&E 염색하여 관찰을 시행하여 그 결과를 Fig. 2에, TUNEL 염색하여 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. H&E 염색에서는 UV조사에 의한 표피두께 증가와 깊은 주름 형성을 관찰할 수 있었다. 또한 광학현미경으로 표피의 화농상태와 진피의 염증상태를 각각 살펴본 결과, CO군에서는 피부 각질세포의 손상과 함께 진피조직의 급성염증 반응이 일어나고 표피에서는 화농상태가 심하게 관찰되었다. 하지만 PC, NFR, 그리고 FR군에서는 표피 각질층의 지방층과 진피층 내 콜라겐 섬유 배열이 규칙적이며 많은 양이 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 FR의 경우 호장근 발효 추출물의 농도가 증가함에 따라 표피 및 진피의 손상이 완화됨이 확인되어 호장근 발효 추출물의 도포 시 표피 및 진피의 화농과 염증에 상당한 치료 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

진피 및 피하 층 내 mast cell의 분포상태와 탈과립 정도 및 sun burn cell(SBC)의 관찰을 위해 시행한 TUNEL 염색의 결과는 Fig. 3에 나타내었다. NO군은 mast cell이 적게 관찰되었고 탈과립이 거의 없는 반면, CO군에서는 mast cell이 현저하게 많이 관찰되었으며, sun burn cell(SBC)의 발현 및 탈과립 정도도 심하게 나타났다. 그러나 FR군에서는 대조군에 비해 mast cell 수가 적게 관찰되었으며 탈과립 정도

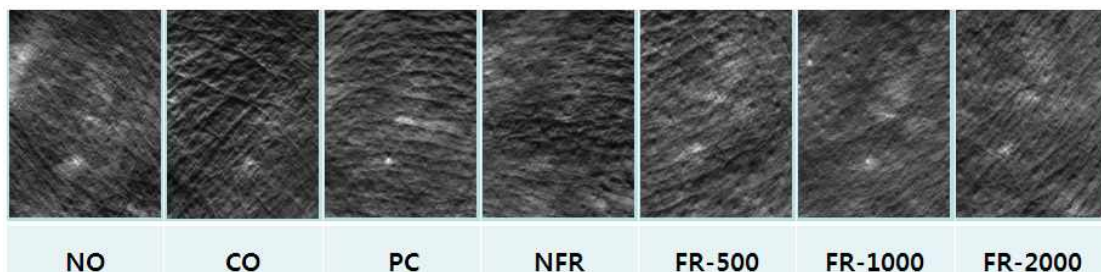


Fig. 1. Comparison of replica image of hairless mouse after 5 weeks—skin aging. (NO) Normal, (CO) UVB+base lotion treated group, (PC) Positive control (UVB+ascorbic acid 1000 ppm treated group), (NFR) UVB+*Reynoutria elliptica* 1,000 ppm, (FR-500) UVB+Fermentation *Reynoutria elliptica* 500 ppm, (FR-1000) UVB+Fermentation *Reynoutria elliptica* 1000 ppm and (FR-2000) UVB+Fermentation *Reynoutria elliptica* 2000 ppm.

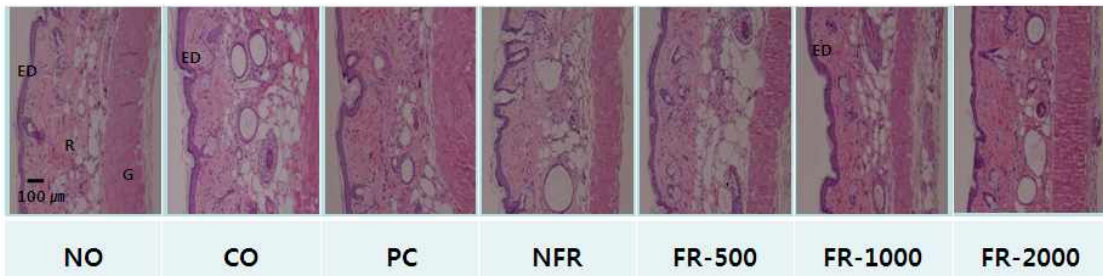


Fig. 2. Histological appearance of hairless mouse. (NO) Normal, (CO) UV+base lotion treated group, (PC) Positive control (UV+ascorbic acid 1000 ppm treated group), (NFR) UV+*Reynoutria elliptica* 1,000 ppm, (FR-500) UV+Fermentation *Reynoutria elliptica* 500 ppm, (FR-1000) UV+Fermentation *Reynoutria elliptica* 1000 ppm and (FR-2000) UV+Fermentation *Reynoutria elliptica* 2000 ppm. The skin samples were stained with hematoxylin-eosin; Original magnification (Eon), ×100. Scale bars, 100 μm. ED, epidermis; HF, hair follicle; R, reticular layer; G, granulation tissue; F, fatty tissue.

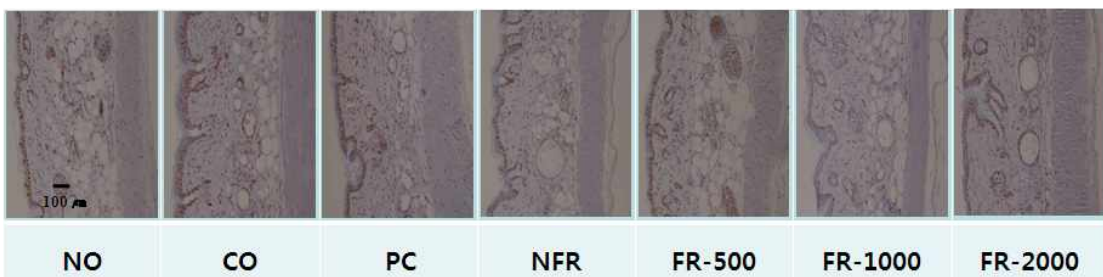


Fig. 3. Histological appearance of hairless mouse after 5 weeks. (NO) Normal, (CO) UV+base lotion treated group, (PC) Positive control (UV+ascorbic acid 1000 ppm treated group), (NFR) UV+*Reynoutria elliptica* 1,000 ppm, (FR-500) UV+Fermentation *Reynoutria elliptica* 500 ppm, (FR-1000) UV+Fermentation *Reynoutria elliptica* 1000 ppm and (FR-2000) UV+Fermentation *Reynoutria elliptica* 2000 ppm. The skin samples were stained TUNEL (apoptosis); Original magnification, ×100. Scale bars, 100 μm.

도 약하게 확인되었다. 자외선에 노출되면 피부의 초기 반응으로 염증이 생기는데 이로 인해 진피층과 피하층 내 mast cell이 증가하고, 염증이 심할 경우 mast cell의 탈과립과 함께 히스타민이 방출되어 소양증을 동반하는데(14,15), 호장근 발효 추출물을 처리한 실험군에서 전반적으로 피부의 염증을 억제시킴을 확인할 수 있었다.

GSH 및 TBARS 함량 변화

UVB에 의해 생성된 활성산소는 체내 조직에 축적되어 조직을 산화시킴으로써 산화적 스트레스가 형성되고 그 결과 조직 중 지질의 산화를 야기하여 지질과산화물이 생성된다. 지질과산화물의 축적은 생체 내에서 다양한 질병을 야기함과 동시에 노화를 촉진시켜 상당한 문제로 야기되고 있다(21). 활성산소에 의한 지질의 생성과 세포 손상에 있어 GSH와 TBARS 수치는 상당한 영향을 미친다. 따라서 Table 3에서는 호장근 추출물이 GSH와 TBARS 함량에 미치는 영향을 살펴보았다. GSH를 살펴보면 FR-500, FR-1000, FR-2000군에서 각각 CO군에 비하여 115.2, 124.2 그리고 128.8%로 뛰어난 GSH증가 효과를 나타내었다. 또한 지질과산화물 함량을 나타내는 TBARS의 함량에서도 FR-500, FR-1000 및 FR-2000군에서 각각 대조군에 비하여 81.5, 76.5 그리고 75.4% 감소하여 농도 의존적으로 TBARS 함량을 낮추는 것을 확인할 수 있었다. 레드 와인의 주성분인 resveratrol은 쥐의 간에서부터 뛰어난 GSH 활성을 가진다

Table 3. Skin glutathione and thiobarbituric acid reactive substance levels at 5 weeks after various treatments on UVB-induced skin aging in hairless mouse

Groups	GSH content ¹⁾	TBARS content ¹⁾
NO	0.88±0.04 ^d	18.60±0.89 ^a
CO	0.66±0.02 ^a	25.81±1.06 ^b
PC	0.82±0.04 ^{bcd}	20.47±0.84 ^a
NFR	0.75±0.03 ^{ab}	21.48±0.40 ^a
FR-500	0.76±0.02 ^{bc}	21.03±0.89 ^a
FR-1000	0.82±0.02 ^{bcd}	19.75±0.88 ^a
FR-2000	0.85±0.02 ^{cd}	19.47±0.61 ^a

The values are mean±SD of 5 mouse. ^{a-d}Values within a column with different superscript letters are significantly different each other groups at p<0.05.

¹⁾Unit: μmole/mg protein.

(22). 이상과 같은 결과를 토대로 발효시킨 호장근이 생체 내 항산화 효소인 GSH는 증가시키면서 지질과산화물을 줄이는 역할을 함을 확인할 수 있었다.

XO, CAT 및 SOD 활성 변화

XO는 생체조직에 존재하면서 세포상해와 관련한 유해산소 생성계 효소로 알려져 있으며 이 효소에 의해 생성된 superoxide anion radical은 세포상해의 직접적인 원인으로 작용한다고 알려져 있다(23,24). Table 4에서 hairless 피부조직의 XO 활성도는 호장근 추출물 도포군에서 대조군에 비해 6~22%가량 유의하게(p<0.05) 감소하였다. 특히 호장근 발효 추출물 도포군인 FR군에서 큰 감소효과를 보였고 농도

Table 4. Skin catalase activities at 5 weeks after various treatments on UVB-induced skin aging in hairless mouse

Groups	XO activity ¹⁾	SOD activity ²⁾	CAT activity ³⁾
NO	0.90±0.05 ^a	12.87±1.03 ^d	38.21±1.68 ^c
CO	1.31±0.09 ^c	8.53±0.39 ^a	25.98±1.71 ^a
PC	1.01±0.04 ^{ab}	10.11±0.48 ^{abc}	32.94±2.43 ^{bc}
NFR	1.24±0.03 ^c	9.16±0.26 ^{abc}	30.59±2.95 ^{ab}
FR-500	1.18±0.09 ^{bc}	9.76±0.50 ^{bcd}	28.54±0.87 ^{ab}
FR-1000	1.13±0.03 ^{bc}	10.98±0.61 ^{cd}	33.06±2.09 ^{bc}
FR-2000	1.02±0.04 ^{ab}	11.76±0.84 ^{ab}	35.14±2.88 ^{bc}

The values are mean±SD of 5 mouse. ^{a-d}Values within a column with different superscript letters are significantly different each other groups at p<0.05.

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

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

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

의존적으로 고농도 도포군에서 더욱 큰 감소효과를 보였다. 이와 같은 결과는 발효 호장근이 활성산소 생성계효소인 XO의 활성도를 낮춤으로써 oxygen free radical의 생성량을 적게 하는 역할을 하는 것으로 사료된다.

산화적 스트레스는 생체대사 과정 중에 oxygen free radical을 생성하여 세포에 상해를 주며, 특히 세포막의 다가불포화 지방산에 작용하여 지질과산화물을 끊임없이 생성하고 이로 인해 세포의 기능 손상을 초래한다(25). 이러한 oxygen free radical 중 세포내 호흡 부산물로서 생성되는 superoxide anion radical은 SOD에 의해 hydrogen peroxide(H₂O₂)로 전환되며 이것은 다시 CAT 및 GPX에 의해 서 물로 전환되어 해독화 된다(26).

Hairless 피부조직의 SOD, CAT 효소활성은 대조군에 비해 PC, NFR 그리고 모든 FR군에서 뛰어난 활성을 보였다. 특히 FR(500, 1000, 2000)군에서 SOD 활성은 대조군에 비하여 14.4~37.9% 증가하여 뛰어난 활성을 보였고, CAT 활성도 FR(500, 1000, 2000)군에서 각각 대조군에 비하여 9.9~35.3%의 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이는 호장근 도포군에서 대조군에 비해 oxygen free radical을 체내에서의 빠른 제거를 위한 것으로 보인다. 호장근은 여러 가지 생리활성 물질을 함유하고 있으며 그중 resveratrol은 레드 와인의 항산화 활성 주성분으로 잘 알려져 있다. 이상과 같은 결과를 토대로 발효 호장근의 경우 resveratrol에 의하여 뛰어난 항산화 활성을 보여 결과적으로 UVB에 의한 피부 광노화 억제 효과를 보인다고 생각되어진다.

요 약

호장근 발효 추출물을 대상으로 피부노화 억제활성을 살펴보고자 발효 전후의 호장근 추출물을 대상으로 피부 홍반도, 유수분 함량, 형태학·조직병리학적 검사, GSH, TBARS 그리고 XO, SOD, CAT 등의 항산화 효소활성을 측정하였다. 피부 홍반도에 있어서는 대조군에 비해 호장근 발효 추

출물 처리군에서 뛰어난 홍반 감소 효과를 확인할 수 있었으며, 유수분 함량에 있어서도 FR-1000군이 유분함량은 21.75±0.72, 수분함량은 55.13±1.07로 CO군에 비해 유의하게 높은 함량을 보였다. 또한 형태학적으로는 FR을 처리한 실험군에서 피부의 주름이 현저하게 감소되었으며, 조직병리학적 검사에서도 표피 및 진피의 화농과 염증의 치료에 상당한 효과가 있음을 확인하였다. 또한 호장근 발효 추출물의 농도가 증가할수록 GSH는 증가하고 TBARS와 XO의 활성은 감소하였으며, 항산화 효소인 SOD, CAT 활성은 농도 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들을 종합하여 볼 때 UVB 조사로 노화가 유발된 hairless mouse에서 호장근 발효 추출물의 도포가 노화된 피부에 염증반응을 약화시키며 유수분 함량을 증가시켜 피부장벽의 손상을 방지하며, 항산화 효소 및 resveratrol과 같은 항산화 물질을 증가시켜 항노화 기능을 가지는 것으로 판단된다. 이로써 호장근 발효 추출물은 피부노화 예방 및 기능성 화장품 원료로서의 사용 가능성을 제시하는 바이다.

감사의 글

본 연구는 한국산업단지공단(현장맞춤형기술개발사업)의 연구비 지원에 의해 이루어진 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

문 헌

- Kim EJ, Ahn SY, Nam GW, Lee HK, Moon SJ, Kim YM, Oh MS, Kim NS. 2006. The anti-aging effect of the cosmetic products containing the needles of red pine on human skin. *Kor J Herbology* 21: 25-31.
- Kim YC, Min KJ, Sin JS, Gang SR, Kim PS. 2008. The effects of geranium oil on the inhibition of skin aging in hairless mice (I). *J Kor Soc Cosm* 14: 495-503.
- Darr D, Fridovich I. 1994. Free radical in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 102: 671-675.
- Hanawalt PC, Cooper PK, Ganesan AK, Smith CA. 1979. DNA repair in bacteria and mammalian cells. *Ann Rev Biochem* 48: 783-836.
- Lee TK, Kim JH, So JN. 2003. Emodin from *Polygonum cuspidatum* showed angiogenesis inhibiting activity in vitro. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46: 50-54.
- Lee IS, Im HG, Lee SG. 2003. Growth inhibition of *Helicobacter pylori* by *Reynoutria elliptica* Migo. *Korean J Food Sci Technol* 35: 1182-1187.
- Chi HJ, Choi JR, Yu SC. 1982. Pharmacognostical studies on "Ho-Jang" (III). Phytochemical study of the rhizome of *Polygonum ellipticum* Migo. *Korean J Phytochem* 13: 145-152.
- Park YS, Rho YS, Kim SK. 1984. Studies on antibacterial activity of several herb medicinal *Tars-Reynoutria* radix, *Sanguisorbae* radix and *Albizziae* cortex. *Bull Pharm Sci* 12: 61-66.
- Ellman GL. 1959. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yake K. 1979. Assay for lipid per-

- oxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
11. Stripe F, Della CE. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (typeD) oxidase (type O). *J Biol Chem* 244: 3855-3863.
 12. Martin JP, Dailey M, Sugarman E. 1987. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch Biochem Biophys* 255: 329-336.
 13. Abei H. 1974. Catalase. In *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer, HU ed. Academic press, New York, USA. Vol 2, p 673.
 14. Soter NA. 1990. Acute effects of ultraviolet irradiation the skin. *Dermatol* 9: 11-15.
 15. Chiba K, Kawakami K, Sone T, Onoue M. 2003. Characteristics of skin wrinkling and dermal changes induced by repeated application of squalene monohydroperoxide to hairless mouse skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 16: 242-251.
 16. Sheu SJ, Wu TT. 2009. Resveratrol protects against ultraviolet A-mediated inhibition of the phagocytic function of human retinal pigment epithelial cells via large-conductance calcium-activated potassium channels. *Kaohsiung J Med Sci* 25: 381-388.
 17. Ray PS, Maulik G, Cordis GA, Bertelli AAE, Bertelli A, Das DK. 1999. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 27: 160-169.
 18. Kligman LH, Akin FH, Kligman AM. 1982. Prevention of ultraviolet damage to the dermis of hairless mice by sunscreens. *J Invest Dermatol* 78: 181-189.
 19. Mononey SJ, Edmonds SH, Giddens LD, Leaeen DB. 1992. The hairless mouse model of photoaging: evaluation of the relationship between dermal elastin, collagen, skin thickness and wrinkles. *Photochem Photobiol* 56: 505-511.
 20. Kligman LH, Crosby MJ, Higley H. 1993. The UVB-irradiated hairless mouse as a model for the evaluation of injectable collagen implant. *J Dermatol Treat* 1: 27-31.
 21. Yang ES, Hong RH, Kang SM. 2007. The effects of genistein on the proliferation and type I pN collagen synthesis in aged normal human fibroblasts. *Kor J Microbiol Biotechnol* 35: 316-324.
 22. Gedik E, Girgin S, Ozturk H, Obay BD, Ozturk H, Buyukbayram H. 2008. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 14: 7101-7106.
 23. Im M. 1985. Effects of superoxide dismutase and allopurinol in survival of acute island skin flaps. *Ann Surgery* 201: 357-359.
 24. Manson PN. 1983. The role of oxygen free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. *Ann Surgery* 198: 87-90.
 25. Morel DW, Chisolm GM. 1989. Antioxidative treatment of diabetic rats inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. *J Lipid Res* 30: 1827-1834.
 26. Deisseroth A, Dounce AL. 1970. Catalase physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiol Rev* 50: 3-24.

(2009년 10월 30일 접수; 2010년 1월 22일 채택)