

丹梔逍遙散이 자외선을 조사한 피부진피세포의 활성 및 유전자발현에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과 교실

임현정, 유동열

ABSTRACT

Effects of *Danchisoyo-san* on UVB-induced Cell Damage and Gene Expression in Dermal Fibroblast

Hyun-Jung Lim, Dong-Youl Yoo
Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine,
Dae-Jeon University

Objectives: This study was performed to elucidate the effects of *Danchisoyo-san* (DS) on cell damage and gene expression in UVB-exposed dermal fibroblast.

Methods: To demonstrate the inhibitory effects of DS on aging of the skin, we used human dermal fibroblast(F6) and UVB light(30 mJ/cm²) was used to damage to dermal fibroblast. We measured the nitrite production, LDH release, and gene expression in UVB-irradiated dermal fibroblast to elucidate the action-mechanism of DS. Also, we evaluated the amount of increased PICP, TIMP-1 in dermal fibroblast.

PICP, TIMP-1 concentration was measured using EIA kit, and gene expression (MMP-1, procollagen, c-fos, c-jun, NF-kB, Bcl-2, Bcl-xL, iNOS) were determined using real-time PCR.

Results:

1. DS inhibited LDH-release, nitrite production in UVB-irradiated dermal fibroblast.
2. DS suppressed the gene expression of MMP-1 in UVB-irradiated dermal fibroblast.
3. DS increased the gene expression of procollagen in UVB-irradiated dermal fibroblast.
4. DS suppressed the gene expression of c-jun, c-fos, NF-kB, iNOS in UVB-irradiated dermal fibroblast.
5. DS increased the gene expression of Bcl-2 in UVB-irradiated dermal fibroblast.
6. DS increased the cell proliferation of dermal fibroblast.

Conclusions: From the results, we concluded DS increases the cell proliferation and collagen synthesis in dermal fibroblast. So we suggest that DS has the anti-wrinkle effects.

Key Words: *Danchisoyo-san*(DS), Dermal fibroblast, UVB, Collagen, Anti-wrinkle effects, MMPs

I. 서 론

태양광선을 구성하는 물질 중 자외선, 특히 자외선B(UVB)는 피부노화의 가장 중요한 요인으로 지구에 도달하는 양은 전체 자외선의 0.5%에 불과하나 단시간 내에 표피와 진피 유두층의 모세혈관까지 침투하여 피부에 강렬한 손상을 일으킨다. UVB 손상에 의한 피부의 가장 큰 특징은 피부가 건조해지고 거칠어지며 굽고 깊은 주름이 나타나는데, 이 주름은 피부를 당겨도 사라지지 않는다^{1,2)}.

피부는 외부로부터 표피, 진피 및 피하지방층으로 구성되어 있는데 이 중 진피는 collagen, elastin, 특별한 형태가 없는 기질과 이를 합성하는 모세포인 fibroblast로 구성되어 피부에 유연성, 탄력성, 장력을 제공하게 되어 주름 생성과 연관이 많다¹⁾.

진피층의 fibroblast는 각종 growth factor 뿐만 아니라 피부 세포들에서 분비되는 cytokine에 의해서 조절되는데^{3,4)}, 이런 신호가 fibroblast 세포막의 수용체를 자극하게 되면 신호가 핵까지 전달되어 collagen 합성명령을 내리게 된다⁵⁾. 반대로 UVB 등에 의해 fibroblast 표면의 growth factors와 cytokine 수용체가 자극을 받게 되면 활성산소(ROS, reactive oxygen species)가 증가하게 되고 증가된 ROS에 의해 collagen 분해 효소인 MMPs (martrix metalloproteinase genes)의 발현이 활성화 된다⁶⁾.

주름생성, 피부 탄력 저하, 색소침착 등의 피부 노화 원인으로는 자외선뿐만 아니라 신체 내부기관의 기능저하, 잘못된 생활습관, 정신적인 스트레스, 음주,

흡연 등을 들 수 있는데²⁾, 최근에는 환경오염에 의한 오존층 파괴로 자외선 조사량의 증가, 산업화에 따른 스트레스, 음주, 흡연율 증가로 인해 대부분의 노화 요인이 증가하고 있어⁷⁾, 피부노화에 대한 사람들의 관심이 증대하고 있다.

이에 따라 피부노화억제 물질에 관한 연구도 활발히 이루어지고 있는데^{6, 8-12)}, 한약재를 이용한 피부노화억제에 대한 연구로는 黑蔴⁵⁾, 인삼열매¹³⁾, 赤松葉¹⁴⁾, 三白草¹⁵⁾, 川芎¹⁶⁾, 麻金과 厚朴¹⁷⁾, 檀子¹⁸⁾, 白芍藥¹⁹⁾, 牡丹皮²⁰⁾ 등의 단미제와 瓊玉膏加味方²¹⁾ 등의 한방복합제제에 대한 연구가 보고된 바 있다.

丹梔逍遙散은 宋代《太平惠民和劑局方》²²⁾에 수록된逍遙散에 牡丹皮, 檀子를 가미하여 明代薛己에 의해 명명된 처방으로²³⁾, 疏肝解鬱, 清熱涼血, 健脾補血하는 효능이 있다^{24,25)}. 또한 실험적 연구를 통하여 항 스트레스 효과²⁵⁾, 항염증 작용²⁶⁾, 항산화 및 신경세포 보호효과²⁷⁾, 멜라닌형성 억제 작용²⁸⁾ 등의 효능이 입증되었으며 檀子¹⁸⁾, 白芍藥¹⁹⁾, 牡丹皮²⁰⁾ 등 피부노화억제 효과가 인정된 약물을 포함하고 있다. 이로 미루어 보아 丹梔逍遙散은 피부노화의 한 증상인 주름 개선에도 효과가 있을 것으로 사료된다.

이에 저자는 丹梔逍遙散의 주름 개선 효과를 확인하고자 인간 피부 진피 세포 주인 F6 dermal fibroblast를 배양하여, UVB로 유발된 손상 F6 세포에서 LDH 유리, nitrite 생성에 미치는 영향을 측정하였으며, 콜라겐 생성과 분해에 관련된 MMP-1, procollagen, 세포 손상과 관련된 c-fos, c-jun, NF-κB, Bcl-2, Bcl-xL, iNOS의 유전자 발현에 미치는 영향을

평가하였다. 또한 丹梔逍遙散의 deram fibroblast, PICP, TIMP-1 생성능을 측정하여 collagen 합성능을 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약물

실험에 사용한 丹梔逍遙散²⁴⁾의 구성약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Danchisoyo-san*

韓藥名	生藥名	用 量 (g)
當歸	Angelicae Gigantis Radix	6
柴胡	Bupleuri Radix	5
白芍藥	Paeoniae Radix Alba	5
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	5
白茯苓	Hoelen	5
牡丹皮	Moutan Radicis Cortex	3
梔子	Gardeniae Fructus	3
甘草	Glycyrrhizae Radix	2
薄荷	Menthae Folium	2
生薑	Zingiberis Rhizoma	2
	TOTAL	38

2) 시료 추출 및 검액 조제

단치소요산 114 g (3첩 분량)을 증류수 1,500 ml에 넣고 열탕추출기에서 3시간 동안 가열 추출한 다음, 여과하여 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하고, freeze dryer로 동결 건조하여 분말 11 g (수득율 9.7%)을 얻었다.

검액은 추출물을 PBS(phosphate buffered saline)에 녹인 후 membrane filter(0.22 μm)로 여과하여 멀균하고 사용 시까지 냉

장 보관하였다. 배양된 세포에 사용하기 직전에 실험농도에 맞도록 DMEM 배지로 조정한 다음 사용하였다.

3) 세포

실험에 사용된 인간 피부 진피 세포주인 F6 dermal fibroblast는 ATCC에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) UVB 조사에 의한 fibroblast상해 측정

(1) UVB 조사 및 약물처리

UVB로부터의 진피상해 억제 실험 연구에 피부 fibroblast인 F6을 사용하였다. 자외선 조사는 UVATEC(Sherman Oaks, CA, USA) 조사기를 이용하였으며, UVB lamp를 사용하여 290~320 nm 파장을 가지는 자외선을 조사하였다. 광량은 IL 1700 radiometer(International Light Inc., MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 자외선을 조사하게 전에 1시간 동안 약물을 농도별로 가하여 미리 배양하였다. 그리고 DMEM 배지를 제거한 다음, PBS로 2번 씻어낸 후 30 mJ/cm²의 UVB를 조사하였다. UVB를 조사한 다음 PBS로 한번 더 씻어낸 후, 약물이 농도별로 함유된 새로운 DMEM 배지를 넣고 일정 시간동안 배양한 후 실험에 사용하였다.

(2) LDH 유리농 측정

세포를 96well plate를 이용하여 24시간 동안 미리 배양한 후, 1시간 동안 약물을 함유한 배지로 전처리하였다. 세포는 well당 1×10^4 개씩 넣었다. 배양액을 제거한 다음 각 well에 50 μl의 PBS를 넣은 다음, 세포에 UVB 30 mJ/cm²를 조사한 후 PBS를 제거하고 well당 약물

이 포함된 200 μl 의 DMEM 배지를 첨가하였다. 24시간이 경과한 다음 배양액을 취하여 세포 손상의 지표로 LDH (lactate dehydrogenase) 활성을 측정하였다. LDH 활성을 Sigma사의 LDH kit(Sigma S 500)을 이용하여 정량하였으며, ELISA Reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

(3) Nitrite 생성능 측정

위에 기술한 LDH 측정법과 동일한 과정으로 배양한 다음 실험군에서 배지 상층액을 취하였다. NaNO_2 용액의 연속적인 희석액을 만들어 최종농도가 0.05 μM 가 되도록 조절하였다. 먼저 얻은 세포 배양액과 NaNO_2 희석액에 동량의 Greiss reagent solution을 넣고, 15분간 상온에 방치한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 유전자 발현

(1) 총 RNA 분리

배양하고 있는 HaCaT 및 fibroblast 세포에 1 ml TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA에 100 μl phenol과 100 μl chloroform : isoamylalcohol (24 : 1)을 넣고 잘 섞은 후 원심 분리하는 과정을 2번 반복함으로써 상층액을 분리한다. 0.5 ml isopropyl alcohol을 이용하여 RNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하고 자연 건조시킨다. RNAase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase-free DNase를 첨가하고 -70°C에서 저장하였다.

(2) cDNA 제조

대조군 및 시험군에서 각각 분리한 total RNA 액(13 μg RNA 함유)에 oligo dT 1 μl 을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 70°C에서 5분간 incubation하였다.

primer가 annealing 하도록 실온에서 약 10분간 방치한 다음, cyscript buffer, 0.1 M DTT, dUTP nucleotide, dUTP Cydye-labelled nucleotide, Cyscript reverse transcriptase을 첨가한 후, 아주 조심스럽게 혼합하였다. 이 후, 42°C에서 90분간 incubation 한 후, 얼음 상에 방치하였다. 여기에 2.5 M NaOH을 가한 후 37°C에서 15분간 incubation하였으며, 2 M HEPES buffer를 加하여 중화시켰다.

(3) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Oligo (dT)12-18 (Promega, USA), reaction buffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 8.3), 1 mM dNTP (Biotoools, Spain)과 200 unit M-MLV-RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega)를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR은 total volume 15 μl 에 10× PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 pmole의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA 와 1.25 unit의 Taq polymerase(Biotoools, Spain)을 넣어 PCR을 시행하였다.

Procollagen 1a2 (PCol 1a2)의 sense primer는 GTG GTT ACT ACT GGA TTG ACC이었으며, antisense는 TTG CCA GTC TCC TCA TCC AT를 사용하였다. MMP-1의 sense primer는 CGA CTC TAG AAA CAC AAG AGC AAG A, antisense는 AAG GT T AGC TTA CTG TCA CAC GCT T을 사용하였으며, TIMP-1의 sense primer는 ATC CTG TTG CTG TGG CTG ATA G, antisense는 TGC TGG GTG GTA ACT CTT ATT TCA 이었다. COX-2의 sense primer

는 TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA AT, antisense는 AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT을 사용하였으며, iNOS의 sense primer는 CGG TGC TGT ATT TCC TTA CGA GGC GAA GAA GG, antisense는 GGT GCT GTC TGT TAG GAG GTC CAA GTA AAG GGC를 사용하였다. TNF α 의 sense primer는 TGC ACC ACA GTT TAA ACC CA이었으며, antisense는 GAC TCC TTC AGG TGC TCA GG 이었다. NF- κ B2의 sense primer는 TCC ACC TTT AGG TTG CCC TG, antisense는 TCT GCT CTC GTC ATG TCA CC를 사용하였으며, c-Jun의 sense primer는 GGA TCA AGG CGG AGA GGA AG, antisense는 GCG TTA GCA TGA GTT GGC AC 을 사용하였으며, c-Fos의 sense primer는 GGA GAA TCC GAA GGA AAG G, antisense는 GCT TGG GCT CAG GGT CAT TG를 사용하였다. Bcl-2의 sense primer는 ACT CTG CTC AGT TTC GCC CT, antisense는 TTG TGG CTC AGA TAG GCA C를 사용하였으며, Bcl-xL의 sense primer는 ATG TCT CAG AGC AAC CGG, antisense는 TCT TTC CGA CTG AAG AGT G를 사용하였다.

Control로는 GAPDH를 사용하였으며, sense primer은 CAG CCT CGT C CC GTA GAC AAA이었으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. PCR 조건은 94°C 4분, 30 cycles 의 [94°C (30초), 59°C (30초), 72°C (45 초)], 72°C 10분이었다(Perkin Elmer, USA) 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동하였다. 전기영동 결과 나

온 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1(Media Cybernetics. USA) 을 이용하여 구했다.

(4) Real time RT-PCR

우선 시험관에 정량한 RNA 5 μ g, 50 ng/ μ l 의 random hexamer 3 μ l, 10 mM dNTP 1 μ l를 넣고 DEPC H₂O를 가하여 10 μ l의 RNA/primer mixture를 만들었다. 실험용 sample을 65°C에서 5분간 incubation 시킨 후 1분 이상 얼음에 방치하였다. Reaction mixture으로 10배의 RT buffer 2 μ l, 25 mM MgCl₂ 4 μ l, 0.1 M DTT 2 μ l, RNase 1 μ l을 섞어 준비하였다. Procollagen 1 α 2 (PCol 1 α 2)의 sense primer는 GTG GTT ACT ACT GGA TTG ACC이었으며, antisense는 TTG CCA GTC TCC TCA TCC AT를 사용하였다. MMP-1의 sense primer는 CGA CTC TAG AAA CAC AAG AGC AAG A, antisense는 AAG GT T AGC TTA CTG TCA CAC GCT T을 사용하였으며, TIMP-1의 sense primer는 ATC CTG TTG CTG TGG CTG ATA G, antisense는 TGC TGG GTG GTA ACT CTT ATT TCA 이었다. iNOS의 sense primer는 CGG TGC TGT ATT TCC TTA CGA GGC GAA GAA GG, antisense는 GGT GCT GTC TGT TAG GAG GTC CAA GTA AAG GGC를 사용하였다. NF- κ B2의 sense primer는 TCC ACC TTT AGG TTG CCC TG, antisense는 TCT GCT CTC GTC ATG TCA CC를 사용하였으며, c-Jun의 sense primer는 GGA TCA AGG CGG AGA GGA AG, antisense는 GCG TTA GCA TGA GTT GGC AC 을 사용하였으며, c-Fos의 sense primer는 GGA GAA TCC GAA

GGA AAG G, antisense는 GCT TGG GCT CAG GGT CAT TG를 사용하였다. Bcl-2의 sense primer는 ACT CTG CTC AGT TTC GCC CT, antisense는 TTG TGG CTC AGA TAG GCA C를 사용하였으며, Bcl-xL의 sense primer는 ATG TCT CAG AGC AAC CGG, antisense는 TCT TTC CGA CTG AAG AGT G를 사용하였다.

Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAG CCT CGT CCC GTA GAC AAA이었으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다.

Reaction mixture를 RNA/primer mixture에 가하여 섞고 실온에 2분간 방치한 후, Super Script II RT 1 μl (50 units)를 가하고 25°C에서 10분간 incubation 시켰다. 다시 42°C에서 50분간 incubation 시킨 다음, 70°C에서 15분간 가열하여 inactivate 시키고 ice 상에서 식혔다. RNAase 1 μl 를 가하고 다시 37°C에서 20분간 incubation 시킨 다음, 사용 시까지 -20°C에 보관하였다. 각각의 optical tube에 2배의 SYBR Green Mix 12.5 μl , cDNA 0.2 μl , 5 p mol/ μl primer pair mix 1 μl , 11.3 μl H₂O를 넣고, 50°C 2분 1 cycle, 95°C 10 min 1 cycle, 95°C 15sec, 60°C 30sec, 7 2°C 30sec 40 cycles, 72°C 10 min 1 cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 μl 를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정했다. SSG 7,000 software를 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다.

3) 피부 진피세포의 활성 측정

(1) F6 세포 배양

Collagen 생성 및 분해 실험 연구에 피

부 fibroblast인 F6를 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS와 penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL Co. USA) 배지를 사용하여 5일간 배양 하였으며 1일 1회 배지를 교환하였다. FBS는 잔존하는 보체성분을 불활성화시키기 위해 실온에서 녹인 후 heat inactivation (56°C water bath에서 30분간 가열)하여 사용하였으며 배지는 0.2 μm membrane filter로 여과 후 사용하였다. Cell에 각 조건 별로 96well plate에는 well 당 100 μl , 24well plate에는 well 당 500 μl 로 medium을 넣어주었다. 세포를 회수할 때는 trypsin-EDTA 1 ml 을 가하여 37°C에서 1분간 반응시킴으로써 부착된 세포를 분리하고 배지 4 ml 을 넣고 원심분리(1,000 rpm, 3분)를 하여 세척한 후 실험에 사용하거나 필요시 액체질소에서 냉동 보관하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂를 사용한 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

(2) Cell proliferation 측정

세포를 2×10^4 cells/ ml 의 농도로 6 well plate에 넣고 6시간 배양하여 plate에 부착한 다음, 분획하여 조제한 검액을 농도별로 첨가하여 3일간 배양하였다. 배양완료 후 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리한 다음, PBS로 희석하여 hematocytometer(Fuchs-Rosenthal, Germany)로 세포수를 계측하였다.

(3) TIMP-1 assay

TIMP-1의 검출을 위해 위 조건에서 24 well plate에 준비한 cell을 배양한 medium을 1 : 10으로 dilution하고 그 중 50 μl 를 사용하여 TIMP-1 immunoassay kit(R&D Systems, Inc.)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한다.

(4) Collagen assay

Collagen은 전신의 결체조직을 구성하는 단백질로서 전구체인 procollagen로서 형성된다. Procollagen은 성숙한 collagen과 여분의 peptide로 구성되어 있는데, 이 peptide는 collagen이 성장하고 있는 collagen fibril로 끼어 들어가기 전에 특이한 protease에 의해 분해한다. 이 분해된 peptide인 PICP(Procollagen Type I C-Peptide)는 세포 밖으로 유리되어 나타나 collagen 합성의 지표가 된다. 우선 96 well plate에 100 μl 의 세포 배양액을 넣고 25°C에서 120분간 incubation 시켰다. Washing 용 buffer로 3번 씻어낸 후 anti-PICP를 100 μl 가하고 다시 22°C에서 45분간 incubation 시켰다. Washing buffer로 3번 다시 씻어 내고 enzyme conjugate 100 μl 를 가한 다음, 22°C에서 45분간 incubation 시켰다. 다시 3번 씻어낸 다음 기질용액 100 μl 를 가하고 22°C에서 30분간 incubation시킨 다음 stop solution 50 μl 를 가하고 405 nm에서 optical density를 구했다.

3. 통계처리

각 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하였다. p<0.05 인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

III. 결 과

1. UVB조사에 의한 fibroblast 상해에 미치는 영향

1) LDH 유리에 미치는 영향

Dermal fibroblast 인 F6 세포에 UVB를 조사한 후 유리되는 LDH를 측정한

결과, 세포로부터 LDH의 유리가 증가하였다. 단치소요산(이하 DS)을 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비해 200, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 LDH의 유리를 유의성 있게($p<0.01$) 억제하였다(Fig. 1).

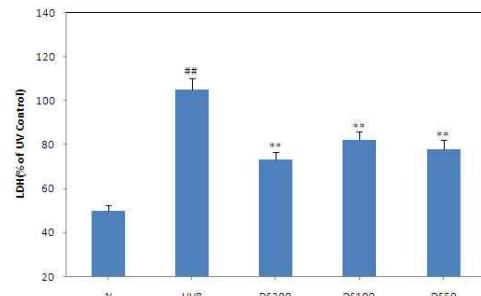


Fig. 1. Effect of *Danchisoyo-san* on the LDH Release of UVB-irradiated Dermal Fibroblasts.

Cells were UVB-irradiated(30 mJ/cm²) and further incubated with *Danchisoyo-san*. The results are expressed as mean \pm SE.

N : Normal(non-treated group)

UVB : UVB(30 mJ/cm²)

DS200 : UVB(30 mJ/cm²) + DS(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

DS100 : UVB(30 mJ/cm²) + DS(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

DS50 : UVB(30 mJ/cm²) + DS(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

##: $p<0.01$ vs N, ** : $P<0.01$ vs UVB

2) Nitrite 생성능에 미치는 영향

F6 세포에 UVB를 조사한 후 생성되는 nitrite를 측정결과, 세포에서 생성되는 nitrite 량이 증가하였다. DS를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비해 200, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 nitrite 생성을 유의성 있게($p<0.05$) 억제하였다(Fig. 2).

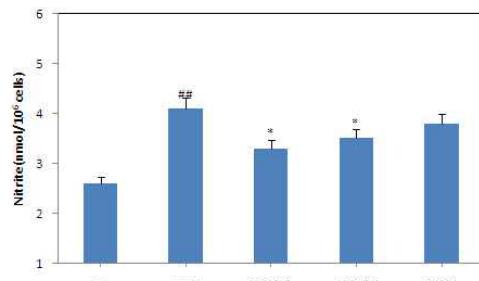


Fig. 2. Effect of *Danchisoyo-san* on the Nitrite Production of UVB-irradiated F6 Dermal Fibroblasts.

Cells were UVB-irradiated(30 mJ/cm^2) and further incubated with *Danchisoyo-san*. The results are expressed as mean \pm SE.

N : Normal(non-treated group)

UVB : UVB(30 mJ/cm^2)

DS200 : UVB(30 mJ/cm^2) + DS($200 \mu\text{g/ml}$)

DS100 : UVB(30 mJ/cm^2) + DS($100 \mu\text{g/ml}$)

DS50 : UVB(30 mJ/cm^2) + DS($50 \mu\text{g/ml}$)

##: $p < 0.01$ vs N, * : $p < 0.05$ vs UVB

2. UVB조사에 의한 fibroblast 유전자 발현에 미치는 영향

1) MMP-1 유전자 발현에 미치는 영향

UVB는 MMP-1의 유전자 발현을 증가시켰으며, DS는 UVB에 의해 증가된 MMP-1의 유전자 발현을 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도($p < 0.01$)와 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 ($p < 0.05$)에서 유의성 있게 억제하였다(Fig. 3).

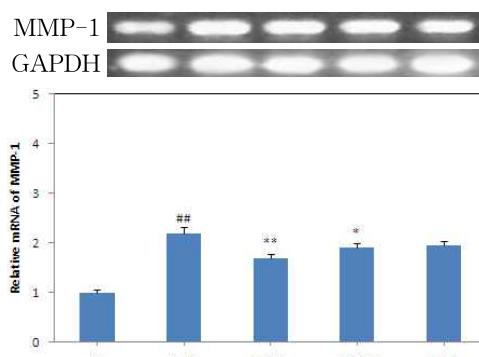


Fig. 3. Effect of *Danchisoyo-san* on the MMP-1 Gene Expression of UVB-irradiated Dermal Fibroblast.

Cells were UVB-irradiated(30 mJ/cm^2) and

further incubated with *Danchisoyo-san*. The results are expressed as mean \pm SE.

N : Normal(non-treated group)

UVB : UVB(30 mJ/cm^2)

DS200 : UVB(30 mJ/cm^2) + DS($200 \mu\text{g/ml}$)

DS100 : UVB(30 mJ/cm^2) + DS($100 \mu\text{g/ml}$)

DS50 : UVB(30 mJ/cm^2) + DS($50 \mu\text{g/ml}$)

##: $p < 0.01$ vs N, ** : $P < 0.01$ vs UVB

* : $P < 0.05$ vs UVB

2) Procollagen 유전자 발현에 미치는 영향

UVB 조사시 procollagen 유전자 발현이 억제되었다. DS는 UVB에 의해 저하된 procollagen 유전자 발현을 200, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의성 있게($p < 0.01$) 증가시켰다(Fig. 4).

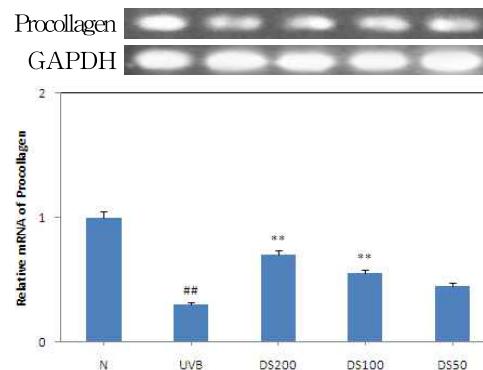


Fig. 4. Effect of DS on the Procollagen Gene Expression of UVB-irradiated Dermal Fibroblast.

Cells were UVB-irradiated(30 mJ/cm^2) and further incubated with DS. The results are expressed as mean \pm SE.

N : Normal(non-treated group)

UVB : UVB(30 mJ/cm^2)

DS200 : UVB(30 mJ/cm^2) + DS($200 \mu\text{g/ml}$)

DS100 : UVB(30 mJ/cm^2) + DS($100 \mu\text{g/ml}$)

DS50 : UVB(30 mJ/cm^2) + DS($50 \mu\text{g/ml}$)

##: $p < 0.01$ vs N, ** : $P < 0.01$ vs UVB

3) c-fos 유전자 발현에 미치는 영향

UVB 조사시 세포에서 생성되는 c-fos의 mRNA의 생성이 증가하였다. DS를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에서

증가한 c-fos 유전자 발현을 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성 있게($p<0.01$) 억제하였다(Fig. 5).

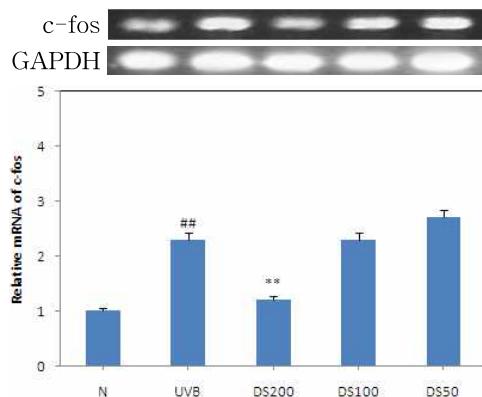


Fig. 5. Effect of DS on the c-fos Gene Expression of UVB-irradiated Dermal Fibroblast.

Cells were UVB-irradiated($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) and further incubated with DS. The results are expressed as mean \pm SE.

N : Normal(non-treated group)

UVB : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$)

DS200 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($200 \mu\text{g}/\text{ml}$)

DS100 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)

DS50 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)

$p<0.01$ vs N, ** : $P<0.01$ vs UVB

4) c-jun 유전자 발현에 미치는 영향
UVB 조사시 세포에서 생성되는 c-jun의 mRNA의 생성이 증가하였다. DS를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에서 증가한 c-jun 유전자 발현을 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성 있게($p<0.01$) 억제하였다(Fig. 6).

5) NF-kB 유전자 발현에 미치는 영향
UVB 조사시 세포에서 생성되는 NF-kB의 mRNA의 생성이 증가하였다. DS를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에서 증가한 NF-kB 유전자 발현을 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성 있게($p<0.01$) 억제하였다(Fig. 7).

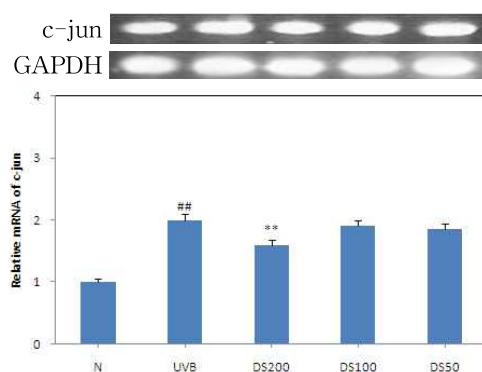


Fig. 6. Effect of DS on the c-jun Gene Expression of UVB-irradiated Dermal Fibroblast.

Cells were UVB-irradiated($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) and further incubated with DS. The results are expressed as mean \pm SE.

N : Normal(non-treated group)

UVB : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$)

DS200 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($200 \mu\text{g}/\text{ml}$)

DS100 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)

DS50 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)

$p<0.01$ vs N, ** : $P<0.01$ vs UVB

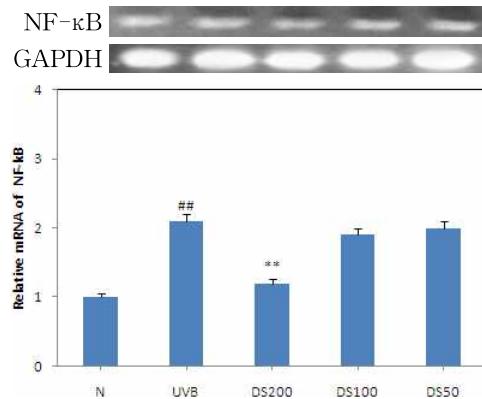


Fig. 7. Effect of DS on the NF-kB Gene Expression of UVB-irradiated F6 Dermal Fibroblasts.

Cells were UVB-irradiated($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) and further incubated with DS. The results are expressed as mean \pm SE.

N : Normal(non-treated group)

UVB : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$)

DS200 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($200 \mu\text{g}/\text{ml}$)

DS100 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)

DS50 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)

$p<0.01$ vs N, ** : $P<0.01$ vs UVB

6) Bcl-2유전자 발현에 미치는 영향

UVB 조사시 세포에서 생성되는 Bcl-2의 mRNA의 생성이 감소하였다. DS를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에서 감소한 Bcl-2 유전자 발현을 200, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성 있게($p<0.05$) 증가시켰다(Fig. 8).

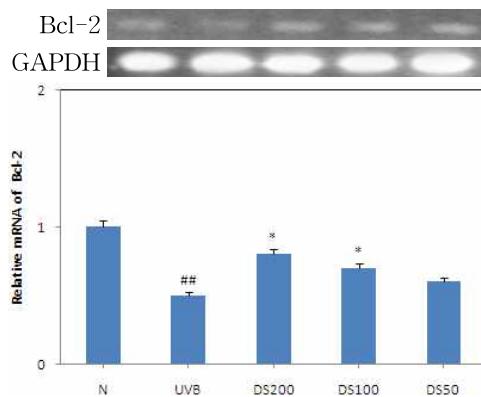


Fig. 8. Effect of DS on the Bcl-2 Gene Expression of UVB-irradiated F6 Dermal Fibroblasts.

Cells were UVB-irradiated($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) and further incubated with DS. The results are expressed as mean \pm SE.

N : Normal(non-treated group)

UVB : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$)

DS200 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($200 \mu\text{g}/\text{ml}$)

DS100 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)

DS50 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)

##: $p<0.01$ vs N, * : $P<0.05$ vs UVB

7) Bcl-xL 유전자 발현에 미치는 영향

UVB 조사시 세포에서 생성되는 Bcl-xL의 mRNA의 생성이 감소하였다. DS를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에서 감소한 Bcl-xL 유전자 발현을 증가시키지 못하였다(Fig. 9).

8) iNOS 유전자 발현에 미치는 영향

UVB 조사시 세포에서 생성되는 iNOS의 mRNA의 생성이 증가하였다. DS를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에서 증가한 iNOS 유전자 발현을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 ($p<0.01$)와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농

도($p<0.05$)에서 유의성 있게 억제하였다 (Fig. 10).

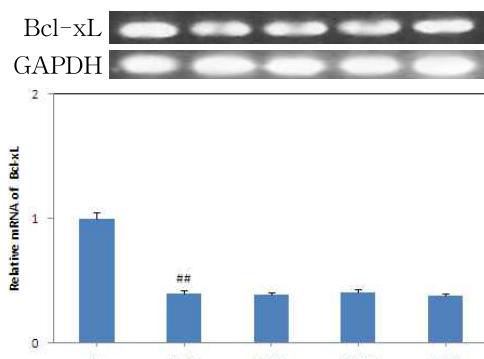


Fig. 9. Effect of DS on the Bcl-xL Gene Expression of UVB-irradiated F6 Dermal Fibroblasts.

Cells were UVB-irradiated($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) and further incubated with DS. The results are expressed as mean \pm SE.

N : Normal(non-treated group)

UVB : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$)

DS200 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($200 \mu\text{g}/\text{ml}$)

DS100 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)

DS50 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)

##: $p<0.01$ vs N, * : $P<0.05$ vs UVB

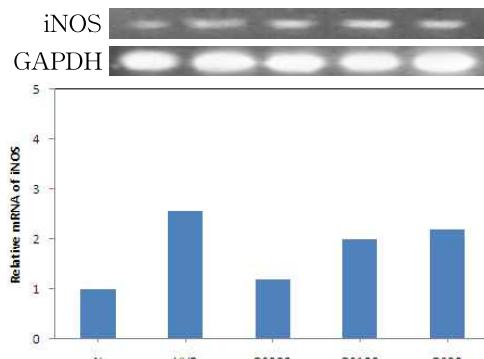


Fig. 10. Effect of DS on the iNOS Gene Expression of UVB-irradiated F6 Dermal Fibroblasts.

Cells were UVB-irradiated($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) and further incubated with DS. The results are expressed as mean \pm SE.

N : Normal(non-treated group)

UVB : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$)

DS200 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($200 \mu\text{g}/\text{ml}$)

DS100 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($100 \mu\text{g}/\text{ml}$)

DS50 : UVB($30 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) + DS($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)

##: $p<0.01$ vs N, ** : $P<0.01$ vs UVB

* : $P<0.05$ vs UVB

3. 피부 진피세포 활성에 미치는 영향

1) 진피세포 분열능에 미치는 영향

진피세포는 콜라겐 합성을 통하여 피부에 탄력을 주고 깊음을 유지하게 한다. 실험결과, DS는 대조군에 비해 dermal fibroblast를 50, 10, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의성 있게($p<0.01$) 증가시켰다(Fig. 11).

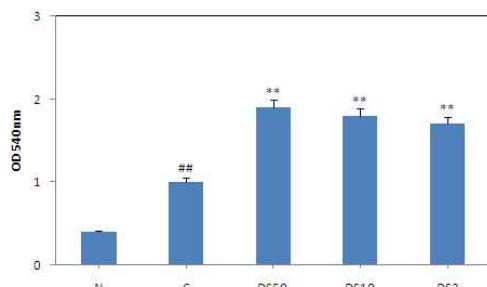


Fig. 11. Effect of DS on the Cell proliferation of Dermal Fibroblast.
N : 0% FBS
C : 5% FBS

DS50 : 5% FBS + DS(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

DS10 : 5% FBS + DS(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

DS2 : 5% FBS + DS(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

: $p<0.01$ vs N

** : $P<0.01$ vs C

2) PICP 생성능에 미치는 영향

PICP(Procollagen Type I C-Peptide)는 collagen 합성의 지표가 된다. 실험 결과, DS는 PICP 생성에 영향을 주지 못하였다(Fig. 12).

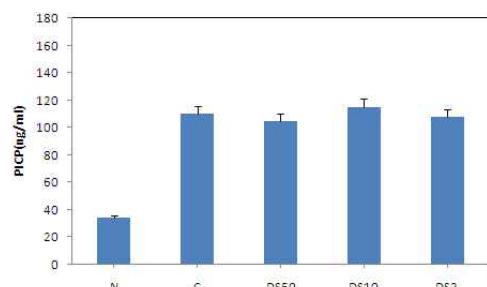


Fig. 12. Effect of DS on the PICP Expression in Dermal Fibroblast.
N : 0% FBS

C : 5% FBS

DS50 : 5% FBS + DS(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

DS10 : 5% FBS + DS(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

DS2 : 5% FBS + DS(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

3) TIMP-1 생성에 미치는 영향

TIMP-1은 진피조직을 분해하는 MMP 류를 억제하여 직접적으로 진피를 보호하는 parameter로 평가할 수 있다. 실험 결과, DS는 TIMP-1 생성에 영향을 주지 못하였다(Fig. 13).

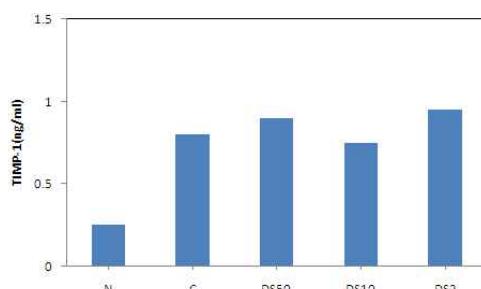


Fig. 13. Effect of DS on the TIMP-1 Expression in Dermal Fibroblast.

N : 0% FBS

C : 5% FBS

DS50 : 5% FBS + DS(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

DS10 : 5% FBS + DS(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

DS2 : 5% FBS + DS(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

IV. 고 칠

피부는 25세를 전후로 하여 노화가 촉진되기 시작한다²⁾. 이러한 피부노화에는 피부의 구조와 생리적 기능이 나이를 먹으면서 쇠퇴하는 내인성 노화(intrinsic aging)와 내인성 노화 현상과 함께 태양 광선 등 누적된 외부적 스트레스에 의한 결과가 합쳐져서 나타나는 외인성 노화(extrinsic aging) 두 종류로 나눌 수 있다^{29,30)}. 그 중에서도 태양광선은 잘 알려진 노화원인들 중의 하나로 UVA, UVB가 일으키는 피부 노화를 광노화(photoaging)

라고도 부른다¹⁰⁾. UVA는 320~400 nm로 자외선 중에서 파장이 가장 긴 광선으로 에너지 강도가 UVB에 비해 1/1000밖에 되지 못하나, 유리를 통과하여 실내나 차안에도 침투하며 연중 광량의 차이가 거의 없이 일정하게 조사된다. UVB는 UVA보다 짧은 280~320 nm의 광선으로 지구에 도달하는 양은 자외선 전체의 0.5%에 불과하지만 에너지가 높아 일광화상, 햇볕 그을림, 광발암 현상에서 UVA보다 1000배 정도 강한 작용을 한다^{2,6)}.

피부 진피층에서는 fibroblast에 의해 collagen, elastin등의 단백질과 여러 가지 뮤코 다당류(mucopolyccharide)가 생산되어 세포외기질(extracellular matrix)을 형성하고 있다³¹⁾. 나이를 먹게 됨에 따라 생기는 내인성 노화(intrinsic aging)는 세포외기질(extracellular matrix)이 산화적 스트레스에 의한 세포의 손상, 유전자의 노화, telomere 단축, apoptosis 장애등에 의해^{6,30)} 손상되고 파괴되어 나타나는 것으로, collagen과 elastin이 탄력성과 신축성을 잃고 소실되어 옅은 주름이 생기며, 뮤코 다당류의 감소로 피부 건조 현상이 나타나게 된다^{1,31)}.

피부에 유연성, 장력 등을 제공하는 collagen은 사람의 체 단백질의 약 30% 이상을 차지하고 있으며^{30,32)}, 특히 진피 조직에서는 건조 중량의 90% 이상을 차지하고 있다. 체내에서는 collagen의 분해와 합성이 반복되는데 나이가 들어감에 따라 합성보다는 분해가 더욱 많아지게 되며 노년기에는 fibroblast에서 제 I 형 collagen mRNA의 발현이 감소되어, 80세에는 20세에 비해 65%정도 collagen 감소하게 된다고 하여 주름 형성과 collagen의 밀접한 관련을 보여주고 있다^{33,34)}.

내인성 노화를 촉진 시키는 원인으로는 신체기관의 질병이나 호르몬의 변화, 스트레스 등의 요인이 있는데²⁾, 특히 스트레스는 미용의 가장 큰 적이라는 말처럼, 자율 신경계, 내분비계, 면역계에 영향을 주어 이들의 조절을 받는 피부에서 피지 밸런스의 이상을 일으키고, 표피의 각질층을 만들어내는 keratinocytes 증식의 활성저하, 천연 유·수분 보호막 기능 저하, 표피에서 면역 활동에 관여하는 langerhans call의 형질 변화로 인한 접촉과민 반응저하와 광면역력 저하, 그리고 melanin 과잉 합성을 유발한다^{2,6)}.

광노화(photoaging)로 인한 피부는 깊고 굵은 주름, 피부 처짐, 혈관확장, 탄력 감소, 수포생성 및 자외선이 노출된 부위에 불규칙한 색소 침착이 발생한다^{6,31)}. 피부가 UVB에 노출되면 피부 표면의 keratinocyte에서 뿐만 아니라 진피조직의 fibroblast에서 superoxide anion, peroxide, singlet oxygen 등을 포함하는 유해한 활성산소(ROS, reactive oxygen species)를 과잉생성 하게 된다. 생성된 ROS는 MAP (mitogen-activated protein) kinase signal의 활성을 유도하며^{6,35,36)}, MAP kinase signal transduction을 통해 AP-1(Activation protein-1)이 활성화되어, collagen 분해 효소인 MMPs의 발현을 촉진한다³⁷⁾. 결국, MMPs의 발현 증가에 의해 collagen의 분해와 합성이 감소되어 주름살이 형성된다⁶⁾.

이에 따라 주름살 생성 등의 피부노화에 대한 연구는 collagen의 양과 collagen을 분해하는 효소인 MMPs의 생합성을 억제하거나 활성을 저해하는 방식 혹은 항산화, 항노화 물질을 이용하여 피부세포를 보호하려는 방식으로 이루어지고 있

다^{38,39)}. 지금까지 연구에 의해 주름을 개선시키며 진피층의 collagen을 증가시킨다고 겸증된 대표적인 성분은 비타민A류가 있으며⁴⁰⁾, retinoic acid의 유도체인 retinol이나 palmitic acid와 같은 다양한 유도체가 널리 사용되고 있다. 그러나 retinoic acid는 임신초기에 과량노출 시 자연유산, 선천성 기형 등을 유발할 수 있고¹⁵⁾, retinol은 산소, 빛, 열에 매우 민감하게 반응하여 변질됨으로써 제품 응용에 제약이 따르며¹⁶⁾, 고함량의 비타민A류 사용은 홍반, 부종과 같은 피부자극 증상이 있는 것으로 보고되고 있다¹⁵⁾.

따라서 효능이 우수하면서 안전성과 안정성이 높은 피부노화 억제제에 대한 연구가 요구되고 있는데, 특히 부작용을 유발할 수 있는 합성물질보다는 세포 독성이 적은 천연물을 발굴하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다^{12-21,41)}.

逍遙散은 宋代《太平惠民和劑局方》²²⁾에 최초로 수록된 처방으로 “治血虛勞倦五心煩熱 肢體疼痛 頭目昏重 心忪煩赤口燥咽乾 發熱盜汗 減食嗜臥 及血熱相搏月水不調 脘腹脹痛 寒熱如瘧. 又治室女血弱陰虛 營衛不和, 痰嗽潮熱 氣滯羸瘦漸成骨蒸”이라 하여²²⁾ 肝鬱血虛, 脾失健運한 제반의 병증을 치료하는데 활용되어 온 처방이다⁴²⁾. 逍遙散 처방에 牡丹皮, 桔子를 가미하여 清熱의 효능을 증가시킨 것이 丹梔逍遙散으로²³⁾, 明代 薛己의 《內科摘要》⁴³⁾에 처음으로 기재되었으며, 일명 八味逍遙散 또는 加味逍遙散이라고도 한다⁴⁴⁾.

丹梔逍遙散의 처방구성을 살펴보면 柴胡는 疏肝解鬱하고, 當歸 白芍藥은 补血 and營하여 養肝하며, 茯苓 白朮 甘草는 健脾和中한다. 生薑 薄荷는 氣血을 調和

하고 疏肝解鬱을 돋고⁴⁵⁾, 牡丹皮 桔子는 清熱涼血한다⁴⁶⁾. 약리학적인 측면에서 살펴보면 柴胡는 清熱, 鎮靜, 鎮痛, 抑菌의 작용이 있고, 當歸는 鎮靜, 鎮痛, 利尿, 子宮興奮, 비타민 E 결핍방지, 抗菌의 효능이 있으며, 白芍藥은 解痙, 鎮痛, 鎮靜, 抑菌의 작용이 있다. 茯苓은 利尿, 鎮靜, 滋養하며, 白朮은 健脾, 止嘔, 止瀉, 利尿, 鎮靜 등의 작용이 있으며, 甘草는 解痙, 解毒, 和胃, 祛痰과 부신피질자극 호르몬양 작용이 있다. 牡丹皮는 鎮靜, 降血壓, 消炎, 抗菌 등의 작용을 가지고, 桔子도 鎮靜, 降血壓, 解熱, 消炎, 抗菌작용을 갖고 있다^{23,42)}.

따라서 본방은 鎮靜, 자율신경기능의 조절, 鎮痙, 鎮痛, 消炎, 소화기능촉진, 月經調整 등의 효과를 갖고 있어²⁴⁾, 현대 임상에서 자율신경실조증, 생년기증후군, 신경성위염, 만성위염, 만성간염, 불임증, 월경불순, 월경전증후군, 과민성 대장증후군, 신경인성 방광 등의 肝氣鬱結, 氣血兩虛의 증후가 나타나는 경우에 활용하고 있다^{43,47)}. 즉 丹梔逍遙散은 血이 부족하고, 七情이 손상되어 나타나는 情志不暢의 제반증상에 활용되고 있는데²⁶⁾, 실험적 연구를 통해서도 항 스트레스 효과²⁵⁾, 항염증작용²⁶⁾, 항산화 및 신경세포 보호효과²⁷⁾, 멜라닌형성 억제 작용²⁸⁾ 등의 효능이 입증되었다. 따라서 丹梔逍遙散은 스트레스²⁾를 해소 시키며, 항염증, 항산화 효과를 통해^{26,27)} 주름살 개선에도 효과가 있을 것으로 사료된다.

이에 저자는 단치소요산(DS)의 주름 개선 효과를 실험적으로 확인하고자, dermal fibroblast 인 F6를 배양하여, DS가 UVB로 유발된 손상 F6 세포에서 LDH 유리, nitrite 생성에 미치는 영향을 측정하여

피부 보호 효과를 평가하였으며, collagen 생성 분해와 관련된 MMP-1, procollagen과 세포 손상과 관련된 c-fos, c-jun, NF- κ B, Bcl-2, Bcl-xL, iNOS의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 또한 DS의 dermal fibroblast의 직접적인 증식능과 PICP, TIMP-1 생성능을 측정하여 collagen 합성능을 알아보았다.

UVB에 의한 피부진피의 세포 상해에 대한 DS의 영향을 평가하고자, 인간 피부 진피 세포주인 F6에 UVB를 조사한 후 유리되는 LDH를 측정하였다. LDH(lactate dehydrogenase)는 세포 내막에 존재하므로 세포가 파괴되어야 세포 밖으로 유출될 수 있어 세포의 상해여부를 측정하는 유력한 기준이 된다⁴⁸⁾. 측정 결과, UVB 조사시에 세포로부터 LDH의 유리가 증가하였다. 이는 UVB에 의한 ROS 생성이 증가되고, ROS 물질들이 단백질, 지방, 핵산 등 생체 구성물질의 변성을 유발한 결과 세포막이 파괴되는 것을 의미한다⁴⁸⁾. DS를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비해 200, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 LDH의 유리를 유의성 있게 ($p<0.01$) 억제하였다(Fig. 1).

다음으로 UVB에 의한 피부 진피 세포의 산화적 스트레스를 측정하기 위하여, F6 세포에 UVB를 조사한 후 생성되는 nitrite를 측정하였다. 생체 내에서 NO(Nitric oxide)는 L-arginine가 nitric oxide synthase(NOS)의 작용으로 인해 산화되어 생성되는 것으로, 생성된 과량의 NO는 그 자체로도 유전자 및 단백질에 독성을 나타내지만 ROS의 하나인 superoxide anion(O_2^-)과 반응해 맹독성을 가진 peroxynitrite(ONOO⁻)를 생성하므로 더욱 강력한 독성물질로 변화한다^{49,50)}. NO

는 반응성이 매우 크고 불안정한 자유기 이므로 NO자체의 농도를 측정할 수 없어⁵¹⁾, NO의 안정된 대사산물인 nitrite를 측정하여 대조군과 비교해 보았다. 실험 결과, UVB 조사시 F6 세포에서 생성되는 nitrite 량이 증가하였고, DS를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비해 200, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 nitrite 생성을 유의성 있게 ($p<0.05$) 억제하였다(Fig. 2).

Collagen은 α -chain이 3종 나선을 형성하는 3개의 당단백질로 α -chain에 따라 20종 이상의 collagen이 있으나 사람의 피부에는 I, III, IV, V, VI, VII형 collagen이 분포하고 있으며, 진피층에는 제 I형 collagen이 80~85%, 제 III형 collagen이 10~15%, IV, V, VI, VII형 collagen이 5%정도 차지하고 있다. Fibroblast의 조면 내형질세망에서 TGF- β 1, IGF-1, IL-1, IL-4, EGF, TNF- α 등 여러 가지 cytokine의 영향을 받아 collagen의 전구물질인 procollagen이 생성되는데⁵²⁾, procollagen 형태로 합성 된 후 세포 밖으로 배출되어 pN collagen(전구체 중 carboxy terminal propeptide가 잘려나간 형태), pC collagen(전구체 중 amino terminal propeptide가 잘려나간 형태)등의 중간 산물을 거쳐 collagen을 완성하게 된다⁵³⁾.

Collagen의 합성을 증가시키는 cytokine으로는 TGF- β , IGF-1, endothelin-1, IL-1, IL-4 가 알려져 있고 이들은 fibroblast에서 MMP-1의 작용을 억제하는 TIMP-1 발현을 촉진하여 collagen 분해를 억제한다. 반대로 TNF- α , PGE₂, IFN γ , IL-1 β , IL-10, IL-17 등은 fibroblast에서 MMP-1을 발현시켜 collagen의 분해를 유발한다⁴⁸⁾.

세포외 기질(extracellular matrix)과 기저막(basement membrane)을 분해하는

MMPs(martrix metalloproteinase genes)는 여러 효소의 집합체로 구조와 기질 특이성에 따라 collagenase, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane type -MMPs, other MMPs로 분류된다. 피부노화와 가장 관련이 깊은 MMP는 collagenase로 MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18로 나누어진다⁵⁴⁾. 이들은 주름살의 원인이 되는 진피조직의 파괴를 유발하는데, 특히 피부의 기질 단백질을 substrate로 이용한다고 알려진 MMP-1이 피부 노화의 주원인으로 알려져 있다⁶⁾.

그러므로 collagen 합성을 증가시키는 주름 개선제는 MMP-1의 활성을 억제하는 것이 필수적이다. 따라서 DS의 주름 개선 효능을 확인하기 위해서 MMP-1유전자 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험결과, UVB는 MMP-1의 유전자 발현을 증가시켰으며, DS는 UVB에 의해 증가된 MMP-1의 유전자 발현을 200 µg/ml의 농도 ($p<0.01$)와 100 µg/ml의 농도 ($p<0.05$)에서 유의성 있게 억제하였다 (Fig. 3).

Collagen은 dermal fibroblast 세포에서 procollagen 형태로 합성된 후 collagen으로 완성되므로⁵³⁾, collagen의 합성능을 세포 수준에서 측정할 때 procollagen을 parameter로 사용할 수 있다. 실험 결과, F6세포에 UVB 조사시 procollagen 유전자 발현이 억제되었고, DS는 UVB에 의해 저하된 procollagen 유전자 발현을 200, 100 µg/ml의 농도에서 유의성 있게 ($p<0.01$) 증가시켰다(Fig. 4).

광노화에서 AP-1과 NF-κB는 중요한 transcription factor로 작용한다⁶⁾.

UVB에 의해서 자극된 TNF-α, PGE₂, IFNγ, IL-1β, IL-10, IL-17 등이 fibroblast

표면에 존재하는 수용체를 통해 세포내로 신호가 전달되면, MAPK(mitogen activated protein kinase)를 통해 NF-κB, c-fos, c-jun이 인산화되어 AP-1을 활성화시킨다⁵⁵⁾. 활성화된 AP-1은 MMPs의 발현을 촉진하고, 진피 fibroblast의 collagen 유전자 발현을 방해한다³⁷⁾. 또한 NF-κB는 호중구를 활성화 시키고 호중구 collagenase (MMP-8)를 자외선 노출 부위에서 발현시킨다⁶⁾. 따라서 AP-1을 구성하는 주 단백질인 c-fos와 c-jun⁵⁶⁾, 그리고 NF-κB을 억제하면 MMP-1의 발현과 cell death를 억제할 수 있을 것으로 보여 DS의 c-fos, c-jun, NF-κB의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험결과, UVB 조사시 세포에서 생성되는 c-fos, c-jun, NF-κB의 mRNA의 생성이 증가하였다. 또한, DS를 처리한 경우, UVB 조사 대조군에서 증가한 각각의 c-fos, c-jun, NF-κB 유전자 발현을 200 µg/ml의 농도에서 유의성 있게($p<0.01$) 억제하였다(Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7).

Apoptosis는 유전적으로 조절되는 계획된 세포사로, 외부의 물리적 자극에 의해 수동적으로 죽음을 맞이하는 necrosis와는 달리 개체의 항상성을 유지하기 위해 일어나는 정상적인 세포자연사 과정이다. 그러나 apoptosis가 촉진될 경우, 생체 내 여러 기관의 생리적 기능을 퇴화 시킬 뿐만 아니라 노화를 가속화 시키게 된다. Apoptosis의 촉진은 자외선이나 약물, ROS에 영향을 받으며, 특히 ROS의 과잉생성은 apoptosis 조절인자인 Bcl-2계 단백의 비율을 파괴함으로써 apoptosis를 가속화 시키게 된다⁵⁷⁾.

Bcl-2계 단백 중 Bax는 ROS 과잉생성 시 증가되어 mitochondria내에 존재하는

cytochrome C를 세포질내로 유리시켜 caspase-3의 활성을 유도하고 apoptosis를 유발시킨다. 반면에 Bcl-2는 칼슘의 항상성 유지, 항산화 효소계의 강화 등을 통해 apoptosis를 억제하는 단백질로서 이들의 발현 비율에 따라 세포의 생사가 결정된다⁵⁷⁻⁵⁹⁾. 그러므로 피부노화 억제를 위해서는 apoptosis를 억제하는 Bcl-2계 단백질인 Bcl-2, Bcl-xL의⁶⁰⁾ 활성을 촉진 하는 것이 중요하다. 실험 결과, UVB 조사시에 세포에서 생성되는 Bcl-2, Bcl-xL의 mRNA의 생성이 감소하였고, DS를 처리한 경우, UVB로 인해 감소한 Bcl-2의 유전자 발현을 200, 100 µg/ml의 농도에서 유의성 있게 ($p<0.05$) 증가시켰으나(Fig. 8), Bcl-xL 유전자 발현은 증가시키지 못하였다(Fig. 9).

NO를 생성하는 NOS는 일종의 산화 효소로서 혈관내피세포성 eNOS(endothelial NOS), 신경세포성 nNOS(neuronal NOS) 및 유도성 iNOS(inducible NOS)의 세 가지 아형으로 존재하는데, 피부세포 중 keratinocyte는 주로 nNOS과 iNOS를 가지고 있으며, fibroblast 는 iNOS와 eNOS가 주로 존재하여 작용한다⁴⁸⁾. 이 중 eNOS 와 nNOS는 지속적으로 분비되어 생체에서 항상성과 관련해 중요한 역할을 담당하는 반면, iNOS는 염증성 cytokine이나 lipopolysaccharides(LPS) 등에 반응하여 분비되며 생성된 iNOS는 과량의 NO를 생성해 혈관 수축, 염증반응 및 apoptosis에 작용하는 것으로 알려져 있다^{50,51)}. 따라서 iNOS를 억제하면 apoptosis 및 염증반응이 저하되어 주름 생성이 억제될 것으로 사료된다. 실험결과, UVB 조사시 세포에서 생성되는 iNOS의 mRNA의 생성이 증가하였고, DS를 처리한 경우,

UVB 조사로 증가한 iNOS 유전자 발현을 200 µg/ml의 농도 ($p<0.01$)와 100 µg/ml의 농도 ($p<0.05$)에서 유의성 있게 억제하였다(Fig. 10).

진피세포는 직접적으로 collagen, elastin 등을 합성하여 피부에 탄력을 주고 깊음을 유지하게 한다³¹⁾. 따라서 UVB조사에 의한 상해 회복이 아닌, 직접적 주름 생성 방지를 위해서는 진피조직의 진피세포를 활성화시키는 것은 중요한 일이다. 실험 결과, DS는 대조군에 비해 deram fibroblast를 50, 10, 2 µg/ml의 농도에서 유의성 있게($p<0.01$) 증가시켰다(Fig. 11).

Collagen의 전구체인 procollagen은 성숙한 collagen과 여분의 peptide로 구성되어 있는데, 이 peptide는 collagen이 성장하고 있는 collagen fibril로 끼어 들어 가기 전에 특이한 protease에 의해 분해된다⁴⁸⁾. 이 분해된 peptide 중 deram fibroblast가 가장 많이 생산하는 제 I 형 procollagen의 분해산물인 PICP (Procollagen Type I C-Peptide)는 진피 collagen 합성의 지표가 된다⁶¹⁾. 실험 결과, DS는 PICP 생성에 영향을 주지 못하였다(Fig. 12).

28 kD glycoprotein인 TIMP-1 (tissue inhibitor of martrix metalloproteinase-1)은 활성화된 MMP-1과 1 : 1 복합체를 이루어 MMP의 활성을 억제한다⁵⁶⁾. 따라서 TIMP-1은 진피조직을 분해하는 MMP 류를 억제하여 직접적으로 진피를 보호하는 parameter로 평가할 수 있다. 실험 결과, DS는 TIMP-1 생성에 영향을 주지 못하였다(Fig. 13).

이상의 결과 DS는 UVB로 자극된 F6의 손상으로 인한 LDH 유리 및 nitrite 생성을 억제하였고, UVB 자극 F6에서 증가된 MMP-1의 유전자 발현 정도를

억제하였으며, UVB에 의해 감소한 procollagen 유전자 발현을 증가시켰다. 또한 DS는 UVB로 자극된 진피세포에서 c-fos, c-jun, NF- κ B, iNOS의 유전자 발현을 감소시켰고, apoptosis를 억제하는 Bcl-2 유전자 발현을 증가시켜 세포 사멸을 억제하는 것으로 판단되었다. 또한 DS는 deram fibroblast에서 직접적으로 세포를 증식시켰으나 PICP, TIMP-1 생성은 증가시키지 못하였다.

따라서, 단치소요산은 UVB조사로 인해 유발될 수 있는 collagen의 생성 및 분해에 관련된 인자들을 조절하여 주름 억제효과가 있는 것으로 판단되므로 향후 임상에서 피부노화억제제로써 활용 가능할 것으로 사료된다.

V. 결 론

주름 억제 물질 개발의 일환으로, 단치소요산이 UVB에 의해 손상된 피부진 피세포에 미치는 영향과 collagen 합성능을 평가하고자, UVB로 유발된 손상 F6 세포에서 LDH 유리, nitrite 생성에 미치는 영향을 측정하였으며, 콜라겐 생성과 분해에 관련된 MMP-1, procollagen, 세포 손상과 관련된 c-fos, c-jun, NF- κ B, Bcl-2, Bcl-xL, iNOS의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 또한 단치소요산의 deram fibroblast, PICP, TIMP-1 생성능을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DS는 LDH의 유리와 nitrite 생성을 억제하였다.
2. DS는 MMP-1 유전자 발현을 억제하

였다.

3. DS는 procollagen 유전자 발현을 증가시켰다.
4. DS는 c-fos, c-jun, NF- κ B, iNOS 유전자 발현을 감소시켰다.
5. DS는 Bcl-2 유전자 발현을 증가시켰다.
6. DS는 Bcl-xL 유전자 발현을 증가시키지 못하였다.
7. DS는 deram fibroblast를 증가시켰다.
8. DS는 PICP, TIMP-1 생성을 직접적으로 증가시키지는 못하였다.

투 고 일 : 2011년 4월 30일

심 사 일 : 2011년 5월 9일

심사완료일 : 2011년 5월 11일

참고문헌

1. 정종영, 김미연. 아틀라스 피부관리학. 서울:도서출판 엠디월드. 2006:21-2.
2. 이윤경, 김주덕. 자외선 노출이 피부 노화에 미치는 영향. 한국미용학회지. 2007;13(2):841-50.
3. Hirobe T. Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. Pigment Cell Res. 2005;18(1):2-12.
4. McKay IA, Leigh IM. Epidermal cytokines and their roles in cutaneous wound healing. Br J Dermatol. 1991; 124(6):513-8.
5. 황선복. 흑삼추출물의 피부노화 개선 효과에 관한 연구. 중부대학교대학원. 2009.

6. 죄현경. 인체 피부세포를 이용한 라비지아 추출물의 항노화효능에 관한 연구. 동국대학교대학원. 2009.
 7. Fisher GJ et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. Arch Dermatol. 2002;138(11):1460-70.
 8. 양은순, 홍란희, 강상모. 제니스테인에 의한 노화된 피부세포 활성화와 콜라겐 생성 효과. 한국미생물·생명공학회지. 2007;35(4):316-24.
 9. 어진용. Coenzyme Qn유도체들의 합성과 피부노화에 관한 생리활성. 순천향대학교대학원. 2005.
 10. 김설미, 김은화. 안면 피부관리와 항산화 비타민 섭취의 피부건강 상태 변화. 대한피부미용학회지. 2009;7(4):111-25.
 11. 김영철 등. Hairless 마우스에서 제란 늄 오일의 피부노화 억제 효과. 한국미용학회지. 2008;14(2):495-503.
 12. 정찬복. 천연물을 이용한 피부 항노화 소재개발에 관한 연구. 경남대학교대학원. 2009.
 13. 염명훈 등. 인삼열매의 피부노화 억제 효과. 생약학회지. 2010;41(1):26-30.
 14. 박성규 등. 赤松葉이 피부의 노화에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2005;20(4):1-10.
 15. 강성례, 민경진, 김영철. 三白草 열수 추출물의 피부주름 억제효과. 한국미용학회지. 2009;15(4):1389-98.
 16. 김수은. Hairless 마우스에서 川芎추출물의 피부노화 억제 효과. 계명대학교대학원. 2008.
 17. 장세현. 울금과 후박의 피부노화 억제 효과. 서울대학교대학원. 2010.
 18. 형순희, 민경진, 김영철. Hairless 마우스에서 梔子 열수추출물의 피부 주름형성 억제효과. 대한피부미용학회지. 2009;7(2):123-36.
 19. 권미화, 민경진, 김영철. 白芍藥 열수 추출물의 피부노화 억제 효과. 환경독성학회지. 2009;24(2):159-67.
 20. 김경진. 당뇨환자의 콜라겐 감소 및 인간 피부 섬유아세포의 MMP-1 생성에 대한 牡丹皮의 항피부노화 효과. 경원대학교대학원. 2007.
 21. 최재환 등. 경옥고 가미방 효모 발효물이 피부 노화에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2010;22(4):219-25.
 22. 陳師文 外. 太平惠民和劑局方(제 743 편). 서울:녹강출판사. 1989:653.
 23. 김재영, 유동열. 丹梔逍遙散에 관한 문헌적 고찰. 대전대학교한의학연구소 논문집. 1999;7(2):531-51.
 24. 윤용갑. 동의방제와 처방해설. 서울: 의성당. 1998:411.
 25. 심문기 등. 丹梔逍遙散의 항 스트레스효과에 대한 실험적 연구. 대한한방내과학회지. 1998;19(2):278-99.
 26. 한지완, 한성임, 고성규. 丹梔逍遙散이 염증상태의 면역세포에 미치는 영향. 동의병리학회지. 2002;16(5):914-20.
 27. 이성한. 加味逍遙散의 항산화효과 및 신경세포 보호효과. 경희대학교대학원. 2009.
 28. 최규웅. 丹梔逍遙散의 melanin생합성 억제효과. 경원대학교대학원. 2008.
 29. 한광호. 노화 및 광노화된 인체피부에서 TGF- β /SMAD 신호전달계의 변화. 서울대학교대학원. 2003.
 30. 노석선. 원색피부과학. 서울:아이비씨기획. 2006:28, 37.
-

31. 강상모, 전영선. 콜라겐 섭취가 안면 피부 주름에 미치는 영향. 대한피부 미용학회지. 2009;7(2):79-94.
32. Xuanri C, Hideyuki K, Koretarō T. Characterization of molecular species of collagen in scallop mantle. Food chemistry. 2006;102:1187-91.
33. Balin AK, Pratt LA. Physiological consequences of human skin aging. Cutis. 1989;43:431-6.
34. Fisher GJ et al, Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. New Eng. J. Med. 1997;337:1419-28.
35. Ritte L, Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. Ageing Res Rev. 2002;1(4):705-20.
36. Cimino F. Protective effects of a red orange extract on UVB-induced damage in human keratinocytes. Biofactors. 2007;30(2):129-38.
37. Fisher GJ. Mechanism of photoaging and chronological skin aging. Archives of Dermatology. 2002;138(11):1462-70.
38. Gilchrest BA. Skin Aging and photoaging. J Am Acad Dermatol. 1989;21:610-3.
39. Bernstein EF et al. Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. J Invest Dermatol. 1994;103(2):182-6.
40. 김은선, 김상우, 손종구. 피부노화 방지제. 서울:한국과학기술정보연구원. 2002:85.
41. 양지혜. 천연물/한약재에서의 항 노화와 세포 재생 효과를 갖는 고기능 성 노화방지제의 개발. 경희대학교대학원. 2008.
42. 손태구. 逍遙散 加味逍遙散 및 그 구성약물군이 acetaminophen으로 유도된 白鼠의 간독성에 미치는 영향. 동국대학교대학원. 2001.
43. 薛己. 內科摘要. 江蘇:江蘇科學技術出版社. 1985:77.
44. 이귀희. 丹梔逍遙散加味方으로 호전된 쟁년기 여성의 치협 1례. 대전대학교한의학연구소. 2008;17(2):161-6.
45. 한의과대학방제학교수. 方劑學. 서울: 영림사. 1999:157-9.
46. 전국한의과대학본초학교수. 本草學. 서울:영림사. 2000:168, 194.
47. 신재용. 方藥合編解說. 서울:성보사. 1991:194.
48. 송규춘. 선삼이 피부진피세포 활성화 자외선에 의한 손상억제 및 유전자 발현에 미치는 영향. 경원대학교대학원. 2010.
49. 지병철, 문신용. Nitric Oxide가 인간 황체화 과립막세포의 apoptosis에 미치는 영향. 대한산부회지. 2002;45(5):766-73.
50. Carla Biondi et al. Interactions between the nitric oxide and prostaglandin E₂ biosynthetic pathways in human amnion-like WISH cells, Journal of Reproductive Immunology. 2003;60(1):35-52.
51. 신형직. 알코올 의존 환자에서 혈청 nitrite 농도와 임상적, 생화학적 상태와의 관련성. 한림대학교대학원. 1999.
52. 정명아, 송인영. 전기자극이 진피의 제1형 콜라겐 mRNA와 TGF-β1 mRNA 발현에 미치는 영향. 한국미용학회지. 2008;14(3):992-1005.
53. Seo JY. Skin Aging from Phenotype

- to Mechanism, Korean Journal of Investigative Dermatology. 2001;8(4):187-94.
54. Lauer-Fields JL, Juska D, Fields GB. Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. Biopolymers. 2002;66(1):19-32.
55. Kim S et al. Basal and UV-induced MMP-1 expression are inhibited by p53 in human dermal fibroblasts. Exp Dermatol. 2008;17(11):939-45.
56. 김지은. 인체피부 섬유아세포에서 열 자극에 의해 유도되는 type I procollagen, MMP-1과 TIMP-1 발현에 대한 녹차추출물(epigallocatechin-3-gallate)의 효과. 고려대학교 생명환경과학대학원. 2004.
57. 채창훈. 규칙적인 운동과 DL- α -Lipoic acid 특여가 노화 유도 쥐 심장의 Bax, Bcl-2 mRNA와 apoptosis에 미치는 효과. 한국체육학회지. 2007;46(5):643-54.
58. Funayama E et al. Keratinocytes promote proliferation and inhibit apoptosis of the underlying fibroblasts: an important role in the pathogenesis of keloid. J. Invest Dermatol. 2003;121(6):1326-31.
59. Teofoli P et al. Expression of Bcl-2, p53, c-jun and c-fos protooncogenes in keloids and hypertrophic scars. J. Dermatol. Sci. 1999;22(1):31-7.
60. Kim YG et al. Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice. Eur J. Pharmacol. 2009;602(1):148-56.
61. 서기석 등. Asiaticoside의 입술 주름 개선 효과. 고신대학교의과대학학술지. 2007;22(1):220-31.