VOL.24 NO.2: 033-051 (2011)

生脈散이 자외선에 의한 피부각질세포의 상해에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과 교실 김은섭, 유동열



Protective Effect of Processed Saengmaek-san(SM) on Cell Damage in UV-exposed HaCaT Cell

Eun-Seop Kim, Dong-Youl Yoo Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

Objectives: This study was performed to assess the protective effect of *Saengmaek-san* (SM) on UVB-induced HaCaT cell damage.

Methods: The protective effects of *Saengmaek-san*(SM) were determined by UVB-induced HaCaT assay. We assessed protective effects of *Saengmaek-san* (SM) on LDH release and nitrite release from HaCaT. And COX-2, Bcl-2, Bax, TNFa, c-jun, c-fos, NF-kB, iNOS, Bcl-xL gene expression were determined in HaCaT using real-time PCR method.

Results:

- 1. SM inhibited LDH-release, nitrite production in UVB-exposed HaCaT.
- 2. SM suppressed the gene expression of COX-2, TNFa in UVB-exposed HaCaT.
- 3. SM increased the gene expression of Bcl-2, Bax, Bcl-xL family protein in UVB-exposed HaCaT.
- 4. SM suppressed the gene expression of c-jun, c-fos, NF-kB in UVB-exposed HaCaT.

Conclusions: The study showed SM inhibited the cell damage in UVB-exposed HaCaT.

Kev Words: Saengmaek-san(SM), Protective effect, Gene expression

교신저자(유동열) : 대전시 서구 둔산2동 1136번지 대전대 둔산한방병원 여성의학과

전화: 042-470-9661 이메일: xhappyharux@naver.com

I. 서 론

피부는 인체를 가장 외부에서 덮고 있는 조직으로 외모를 이루는데 현대에는 미용에 대한 관심이 증가되면서 주목을 받고 있다. 그러나 본래 피부의 가장 중요한 생리적인 기능은 보호 및 장벽기능으로 외계와 직접 접촉하면서 외계의 물리적 및 화학적 변화를 완충시켜 인체내부 환경을 유지하여 몸을 보호하는 생체의 일차적인 방어기능을 담당하는 것이다¹⁾. 특히 각질세포는 각질층을 형성하여 피부에 들어오는 세균이나 혹은 화학물질의 침투에 대하여 효율적인 방어병을 이루고 외계의 온도변화에 대해서도 중요한 완충대 역할을 하고 수분조절을 하며 미생물의 증식을 억제한다²⁾.

최근 오존층의 파괴와 같은 지구환경 변화로 인해 피부는 자외선에 더 많이 노출되고 있으며 이는 인체의 일차 방어 벽인 피부의 건강을 위협하고 있다. Ultraviolet(UV)는 파장에 따라 UVA, UVB, UVC로 나뉘어지며, 이 중 UVB (290-320 nm)는 주로 표피에 영향을 주 어 피부손상을 일으킨다³⁾. 피부표면의 대부분은 각질세포(keratinocyte)로 구성 되어 있어서 UVB에 직접적으로 노출되 어 가장 많은 영향을 받게 된다⁴⁾.

자외선에 노출된 피부에서는 다양한 경로를 통해 활성산소(ROS, Reaction Oxygen Species)가 생성되며, 과도하게 생성된 활성 산소는 피부에 산화적 스트 레스를 초래하게 되고 궁극적으로 피부 노화와 홍반, 부종 등의 피부염증을 유 발하고, 심하면 피부암으로 진행된다^{5,6)}.

또한 UV는 각질세포 내 신호전달계에

영향을 주는데 이로써 이차적으로 멜라 닌세포와 진피세포에 작용하여 각각 모 반을 일으키고 피부노화를 가중시킨다. 각질세포에서 유리되는 TGFβ. PGE₂. α -MSH는 UV에 의해 증가하며, 이들은 멜라닌세포를 활성화시켜 melanin생합성 을 증가시킨다^{7,8)}. 또한, UV에 의해 피부 각질세포로 부터 유리가 증가되는 TNF α, IL-1등은 피부 진피세포인 섬유아세 포(fibroblast)에 작용하여 MMP-1(martrix metalloproteinase-1), TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1), procollagen 등의 생합성을 증가시킬 수 있다^{9,10)}. MMP-1 과 같은 단백질 분해효소는 진피조직의 collagen 분해를 촉진하여 피부노화에 결 정적 역할을 하게 된다¹¹⁾.

生脈散은 元代 李凍原¹²⁾의《內外傷辨感論》에 "夏月宣補者 補天眞元氣 非補熱火 夏食寒者是也. 故以人蔘之甘 補氣麥門冬苦寒 瀉熱補水之源 五味子之酸 清肅燥金,名曰 生脈散. 孫眞人云 五月常服五味子 以補五臟之氣 亦此意也"라고 기재된 이래 暑熱로 인해 元氣와 津液이손상되어 오는 氣短,倦怠,口渴,汗出,咳嗽 등을 치료하는데 활용되어 온 처방이다^{13,14)}. 최근 生脈散은 益氣生津하는 작용이 우수하여 임상에서 폐결핵, 만성기관지염 등의 폐질환에 활용되고 있다¹⁵⁾.

生脈散에 관한 기존의 연구들로는 심혈관계에 미치는 영향¹⁶⁻¹⁸⁾, 면역효과에 미치는 영향¹⁹⁾, 항산화효능과 관련한 보고²⁰⁻²²⁾ 등이 있다.

한의학에서 피부는 肺臟에 歸屬하여 '肺主皮毛'하는데 肺氣가 허약해지면 皮毛가 溫養을 잃어 피부가 초췌해지고 마르게 되며 외사를 막는 능력이 저하되어 병변이 발생하게 된다²³⁾. 生脈散은 肺臟

의 氣陰을 補하는 작용이 뛰어나며 淸熱 生津하는 효능이 우수하여 피부의 상해 와 병변에 효과가 있으리라 사료되어 이 번 연구에 활용하였으며, 生脈散이 자외 선으로 자극된 피부 각질세포를 보호하 고 자외선 조사 시에 피부 광노화에 관 여하는 인자들을 억제할 수 있을 것이라 는 가설을 설정하였다.

이에 저자는 生脈散이 UVB 조사에 의한 피부각질세포의 상해에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 사람의 각질세포인 HaCaT를 자외선 처리하여 LDH 유리와 nitrite 생성에 미치는 영향을 측정하였으며, COX-2, Bcl-2, Bax, TNFa, c-jun, c-fos, NF-kB, iNOS, Bcl-xL의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가한 결과유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 물

실험에 사용한 生脈散의 구성 약물은 대전대학교 둔산한방병원에서 구입한 것 을 정선하여 사용하였다. 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of $Saengmaek-san(SM)^{15)}$

Herb	Scientific name	Weight
name	Scientific flame	(g)
人參	GINSENG RADIX	4
麥門冬	LIRIOPIS TUBER	8
五味子	SCHIZANDRAE FRUCTUS	4
	TOTAL	16

처방 5첩 분량(80g)에 증류수 1,500 ml 를 넣고 열탕 추출기에서 3시간 가열 추출한 후, 여과하여 얻은 여과액을 감압 농축한 다음, freeze dryer로 동결 건조하여 추출분말 약 11.6 g(수득률 14.5%)을 얻었다(이하 SM이라 칭함). 실험 시에는 SM을 Dimethyl sulfoxide(DMSO)를 이용하여 배지에 녹인 후, pore size 0.45 세계의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다.

2) 세 포

실험에 사용된 인간 피부 각질세포주 인 HaCaT keratinocyte는 Dr. Fusenig (German Cancer Research Center, DKFZ, Heidelberg, Germany)로부터 분양 받아 사용하였다.

2. 방 법

1) HaCaT 세포 배양

세포는 DMEM에 10% FBS, 10% penicillin-streptomycin(100 unit/元, 100 $\mu g/\pi \ell$)이 첨가된 배지로 CO_2 incubator 로(37%, 5% CO_2 , 95% air) 배양하였다. 세포 분주를 위해서는 0.25% trypsin-EDTA를 사용하였으며, 96 well과 24 well 에서는 1×10^5 개/well, 6 well에서는 1×10^6 개/well의 세포를 가하여 overnight 배양한 후 실험에 사용하였다.

2) 자외선 조사 및 약물처리

자외선 조사는 UVATEC(Sherman Oaks, CA, USA) 조사기를 이용하였으며, UVB lamp를 사용하여 290-320 nm 파장을 가지는 자외선을 조사하였다. 광량은 IL1700 radiometer(International Light Inc., MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 자외선을 조사하기 전에 1시간 동안 약물을 농도 별로 가하여 미리 배양하였다. 자외선을 조사하기 위하여 DMEM 배지를 제거한

다음, PBS로 2번 씻어낸 후 UVB 파장의 자외선을 30 mJ/c㎡이 되도록 조사하였다. 자외선을 조사한 다음 PBS로한번 씻어낸 후, 약물이 농도별로 함유된 새로운 DMEM 배지를 넣고 일정 시간동안 배양한 후 실험에 사용하였다.

3) 피부 각질세포에 미치는 영향 측정 (1) LDH 유리능 측정

세포를 96 well plate를 이용하여 24시간 동안 미리 배양한 후, 1시간 동안 약물을 함유한 배지로 전 처리 하였다. 세포는 well당 1×10⁵개씩 넣었다. 배양액을 제거한 다음 각 well에 50 세의 PBS (phosphate buffered saline)를 넣은 다음, 세포에 UVB를 30 mJ/c㎡를 조사한후 PBS를 제거하고 well당 약물이 포함된 200 세의 DMEM 배지를 첨가하였다. 24시간이 경과한 다음 배양액을 취하여 세포 손상의 지표로 LDH (lactate dehydrogenase) 활성을 측정하였다. LDH 활성은 Sigma사의 LDH kit(Sigma S 500)을 이용하여 정량하였으며, ELISA Reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

(2) Nitrite 생성능 측정

위에 기술한 LDH 측정법과 동일한 과정으로 배양한 다음 실험군에서 배지 상충액을 취하였다. NaNO2 용액의 연속적인 희석액을 만들어 최종농도가 0.05 μ M가 되도록 조절하였다. 먼저 얻은 NaNO2 희석액에 동량의 Greiss reagent solution을 넣고, 15분간 상온에 방치한다음 540 μ M에서 흡광도를 측정하였다.

4) 유전자 발현에 대한 영향 측정

(1) 총 RNA 분리

배양하고 있는 HaCaT 세포에 1 ml TRIzol reagent(Invitrogen, USA)를 처 리하여 총 RNA를 분리하였다. 그리고 분리한 RNA 용액에 200 세의 chloroform: isoamylalcohol (24:1)을 넣고 강하게 섞은 후 14,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액 500 세를 분리하였다. 여기에 0.5 ㎡ isopropyl alcohol을 가하여 영하 20℃에서 하룻밤 동안 RNA를 침전시킨 후 1,400 rpm으로 20분간 원심 분리하였다. 상등액을 버린 후 70% ethanol로 세척하고 자연 건조시킨 다음, RNAase free water에서 RNA를 녹인 후 RNAase-free DNAase를 첨가하고 -70℃에서 저장하였다.

(2) cDNA 제조

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

Oligo (dT)16-18 (Promega, USA), reaction buffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 8.3), 1mM dNTP(Biotools, Spain)과 200 unit M-MLV-RT(Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega)를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행 함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR은 total volume 25세에 10× PCR buffer,

0.2 mM dNTPs, 2 pmole의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA 와 1.25 unit의 Taq polymerase (Biotools, Spain)을 넣어 PCR을 시행하였다.

COX-2의 sense primer는 TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA AT이었으 며, antisense는 AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT를 사용하였고, TNFa의 sense primer는 TGC ACC ACA GTT TAA ACC CA이었으며, antisense 는 GAC TCC TTC AGG TGC TCA GG를 사용하였다. c-Jun의 sense primer 는 GGA TCA AGG CGG AGA GGA AG, antisense

GCG TTA GCA TGA GTT GGC AC를 사용하였으며, c-Fos 의 sense primer는 GGA GAA TCC GAA GGA AAG G, antisense는 GCT TGG GCT CAG GGT CAT TG를 사용하였 다. NF-ĸB2의 sense primer는 TCC ACC TTT AGG TTG CCC TG, antisense는 TCT GCT CTC GTC ATG TCA CC를 사용하였으며, iNOS의 sense primer는 CGG TGC TGT ATT TCC TTA CGA GGC GAA GAA GG, antisense GGT GCT GTC TGT TAG GAG GTC CAA GTA AAG GGC를 사용하였다.

Bcl-2의 sense primer는 5-ACTCTGC TCAGTTTCGCCCT-3', antisense primer 는 5-TTGTGGCTCAGATAGGCAC-3이다.

Bax의 sense primer는 5-ATGGACGG GTCCGGGGAGCA-3', antisense primer 는5-TGTTACTGTCCAGTTCGTCC-3 이다.

Bcl-xL의 sense primer는 5-ATGTCT CAGAGCAACCGG-3', antisense primer 는 5-TCTTTCCGACTGAAGAGTG-3이다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA이었고, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC를 사용하였다.

PCR 조건은 94℃ 4분, 30 cycles의 [94℃ (30초), 59℃ (30초), 72℃ (45초)], 72℃ 10분이었다(Perkin Elmer, USA) 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동 하였다. 전기영동 결과 나온 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1(Media Cybernetics. USA)을 이용하여 구했다.

(4) Real time RT-PCR

Real time PCR에 사용한 primer는 다 음과 같다. COX-2의 sense primer는 TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA AT, antisense는 AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT를 사용하였으며, TNFa의 sense primer는 TGC ACC ACA GTT TAA ACC CA, antisense는 GAC TCC TTC AGG TGC TCA GG 를 사용하였다. c-Jun의 sense primer는 GGA TCA AGG CGG AGA GGA AG, antisense는 GCG TTA GCA TGA GTT GGC AC를 사용하였으며, c-Fos의 sense primer는 GGA GAA TCC GAA GGA AAG G, antisense는 GCT TGG GCT CAG GGT CAT TG를 사용하였다. NF-кB2의 sense primer는 TCC ACC TTT AGG TTG CCC TG, antisense \= TCT GCT CTC GTC ATG TCA CC를 사용하였으며, iNOS의 sense primer는 CGG TGC TGT ATT TCC TTA CGA GGC GAA GAA GG, antisense GGT GCT GTC TGT TAG GAG GTC CAA GTA AAG GGC를 사용하였다.

Bcl-2의 sense primer는 5-ACTCTGC

TCAGTTTCGCCCT-3', antisense primer 는 5-TTGTGGCTCAGATAGGCAC-3이다.

Bax의 sense primer는 5-ATGGACG GGTCCGGGGAGCA-3, antisense primer는 5-TGTTACTGTCCAGTTCGTCC-3이다.

Bcl-xLsense primer는 5-ATGTCTCA GAGCAACCGG-3', antisense primer는 5-TCTTTCCGACTGAAGAGTG-3이다.

Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA이었으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 를 사용하였다. 각각의 optical tube에 3 배의 SyberGreen Mix 2.5 $\mu\ell$, 위에서 합 성한 cDNA 1 $\mu \ell$, 10 pmol/ $\mu \ell$ primer pair mix 1 μ ℓ, 각각 2.5 mM의 dNTP 2 $\mu\ell$, 10× Tag polymerase buffer 2.5 $\mu\ell$, Tag Polymerase 0.3 μ l. 14.7 μ l H₂O를 넣고, 95℃ 5 min 1 cycle, 95℃ 30sec, 4 5°C 30sec, 72°C 60sec 40 cycles, 95°C 20 min 1 cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 μℓ를 사용 하여 3% agarose gel에서 PCR specificity 를 측정했다. SDS 7,000 software를 사용 하여 real time PCR 결과를 분석하였다.

3. 통계 처리

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

Ⅲ. 결 과

1. UVB에 의한 피부 각질세포에 미치 는 영향

1) LDH 유리에 미치는 영향

UVB에 의한 피부 각질 세포 상해를 측정하기 위하여, HaCaT 세포에 UVB를 조사한 후 유리되는 LDH를 측정하였다. 측정 결과, UVB 조사 시에 세포로부터 LDH 의 유리가 증가하였다. 또한, SM을 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비해 LDH의 유리를 억제하여, UVB에 의한 세포 상해를 억제하는 작용을 나타내었다(Fig. 1).

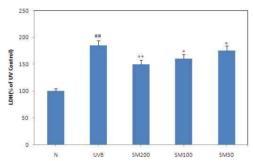


Fig. 1. Effect of SM on the LDH Release of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes. Cells were UVB-irradiated(30 mJ/cm 2) and further incubated with SM. The LDH released in media was measured. The results are expressed as mean \pm SE.

N: normal Control

UVB: UVB(30 mJ/cm²)

 $SM200 : UVB(30 mJ/cm^2) + SM(200 \mu g/\mu \ell)$ $SM100 : UVB(30 mJ/cm^2) + SM(100 \mu g/\mu \ell)$ $SM50 : UVB(30 mJ/cm^2) + SM(50 \mu g/\mu \ell)$ ##: p<0.01 vs N

#: p<0.01 vs N

* : P<0.05 vs UVB, ** : P<0.01 vs UVB

2) Nitrite 생성능에 미치는 영향

피부 각질 세포의 산화적 스트레스를 측정하기 위하여, HaCaT 세포에 UV를 조사한 후 생성되는 nitrite를 측정하였 다. 실험결과, UV 조사시에 세포에서 생 성되는 nitrite 량이 증가하였다. 또한, SM을 처리한 경우, UV로 조사한 대조 군에 비해 nitrite 생성을 억제하여, UV 에 의한 산화적 스트레스를 억제하는 작 용을 나타내었다(Fig. 2).

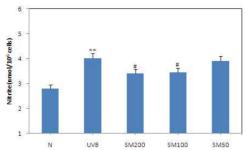


Fig. 2. Effect of SM on the Nitrite Production of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

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

N: normal Control

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

SM200 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(200 μ g/ μ l) SM100 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(100 μ g/ μ l) SM50 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(50 μ g/ μ l) ** : p<0.01 vs N, #: p<0.05 vs UVB

2. UVB에 의한 피부 각질세포의 유전 자 발현에 미치는 영향

1) COX-2 유전자 발현에 미치는 영향 UVB에 의한 피부 각질 세포의 PGE2 생성에 미치는 영향을 측정하기 위하여, PGE2 생성에 관여하는 COX-2의 유전자 발현을 UVB를 조사한 세포로부터 측정하였다. 실험결과, UVB 조사 시에 세포에서 생성되는 COX-2의 mRNA의 생성이 증가하였다. 또한, SM을 200 μg/μ 농도로 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비해 COX-2 유전자 발현을 억제하여, UVB에 의한 PGE2 생성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

2) Bcl-2 유전자 발현에 미치는 영향 UVB에 의한 피부 각질 세포의 세포 사멸에 저항하는 유전자인 Bcl family 생성에 미치는 영향을 측정하기 위하여, Bcl-2 유전자 발현을 측정하였다. 실험결 과, UVB 조사 시에 세포에서 생성되는 Bcl-2의 mRNA의 생성이 감소하였다. 또한, SM을 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비하여 Bcl-2 유전자 발현을 증가시켜, UVB에 의한 세포 사멸에 저항성을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 4).

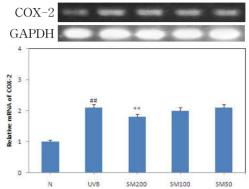


Fig. 3. Effect of SM on the COX-2 Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

N: Normal

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

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

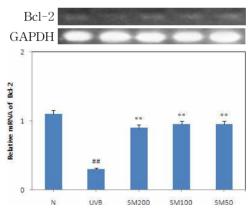


Fig. 4. Effect of SM on the Bcl-2 Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

N: Normal

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

SM200 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(200 μ g/ μ l) SM100 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(100 μ g/ μ l) SM50 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(50 μ g/ μ l) ## : p<0.01 vs N, ** : P<0.01 vs UVB 3) Bax 유전자 발현에 미치는 영향

Bcl family 유전자들은 산화적 스트레스를 비롯한 세포 사멸을 억제하는 작용을 나타내는 antiapoptosis 작용을 나타낸다. 이 중 Bax 유전자는 UVB에 의해정상에 비해 감소하는 것으로 보고되었다. 실험결과, UVB 조사 시에 세포에서생성되는 Bax의 mRNA의 생성이 감소하였다. 또한, SM을 200 μg/μ 농도로처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에비하여 Bax 유전자 발현을 증가시켜, UVB에 의한 세포 사멸에 저항성을 가지는 것으로 나타났다(Fig. 5).

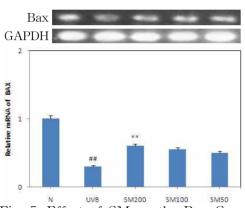


Fig. 5. Effect of SM on the Bax Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

N: Normal

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

SM200 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(200 μ g/ μ l) SM100 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(100 μ g/ μ l) SM50 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(50 μ g/ μ l) #: p<0.01 vs N, ** : P<0.01 vs UVB

4) TNFα 유전자 발현에 미치는 영향 Keratinocyte에서 분비한 IL-1과 TNF α는 fibroblast에 작용하여 MMP-1등 collagen을 분해하는 효소들의 발현을 촉진한다. 실험결과, UVB 조사 시에 세포에서 생성되는 TNFα의 mRNA의 생성이 증가하였다. 또한, SM을 200, 100 μg/

ル 농도로 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비하여 TNFa 유전자 발현을 감소시켜, UVB에 의한 fibroblast 작용을 간접적으로 억제할 수 있을 것으로 나타났다(Fig. 6).

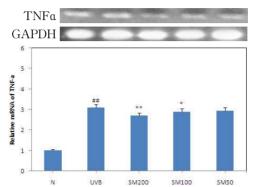


Fig. 6. Effect of SM on the TNFa Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

N: Normal

UVB: UVB(30 mJ/cm²)

5) c-jun 유전자 발현에 미치는 영향 c-jun은 MMP 등의 단백질 발현에 관여하는 신호전달 단백질 전사인자이다. 실험결과, UVB 조사 시에 세포에서 생성되는 c-jun의 mRNA의 생성이 증가하였다. 또한, SM을 처리한 경우, UVB로조사한 대조군에 비하여 c-jun 유전자발현을 감소시켜, UVB에 의한 fibroblast작용을 간접적으로 억제할 수 있을 것으로 나타났다(Fig. 7).

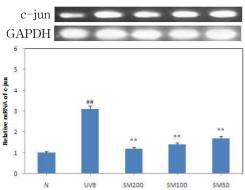


Fig. 7. Effect of SM on the c-jun Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

N: Normal

UVB: UVB(30 mJ/cm²)

SM200 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(200 μ g/ μ ℓ) SM100 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(100 μ g/ μ ℓ) SM50 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(50 μ g/ μ ℓ) ## : p<0.01 vs N, ** : P<0.01 vs UVB

6) c-fos 유전자 발현에 미치는 영향 c-fos는 MMP 등의 단백질 발현에 관여하는 신호전달 단백질 전사인자이다. 실험결과, UVB 조사 시에 세포에서 생성되는 c-fos의 mRNA의 생성이 증가하였다. 또한, SM을 200, 100 $\mu g/\mu \ell$ 농도로처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에비하여 c-fos 유전자 발현을 감소시켜, UVB에 의한 fibroblast 작용을 간접적으로 억제할 수 있을 것으로 나타났다(Fig. 8).

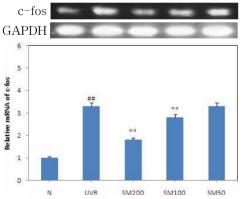


Fig. 8. Effect of SM on the c-fos Gene

Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

N: Normal

UVB: UVB(30 mJ/cm²)

7) NF-kB 유전자 발현에 미치는 영향 NF-kB 는 MMP 등의 단백질 발현에 관여하는 신호전달 단백질 전사인자이다. 실험결과, UVB 조사 시에 세포에서 생성되는 NF-kB의 mRNA의 생성이 증가하였다. 또한, SM을 200, 100 μg/μl 농도로 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비하여 NF-kB 유전자 발현을 감소시켜, UVB에 의한 fibroblast 작용을 간접적으로 억제할 수 있을 것으로 나타났다(Fig. 9).

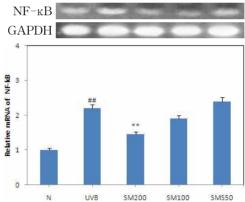


Fig. 9. Effect of SM on the NF-κB Gene Expression of UVb-irradiated HaCaT Keratinocytes.

N: Normal

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

SM200 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(200 μ g/ μ l) SM100 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(100 μ g/ μ l) SM50 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(50 μ g/ μ l) #: p<0.01 vs N, ** : P<0.01 vs UVB

8) iNOS 유전자 발현에 미치는 영향 iNOS는 세포 상해를 유발하는 염증반 응을 유발하는 유전자이다. 실험결과, UVB 조사 시에 세포에서 생성되는 iNOS의 mRNA의 생성이 증가하였다. 또한, SM 을 처리한 경우 모든 농도에서, UVB로 조사한 대조군에 비하여 증가한 iNOS 유 전자 발현을 감소시키지 못하였다(Fig. 10).

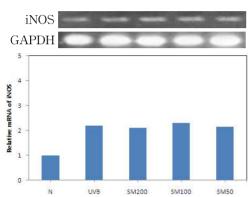


Fig. 10. Effect of SM on the iNOS Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

N: Normal

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

 $SM200 : UVB(30 \text{ mJ/cm}^2) + SM(200 \mu g/\mu \ell)$ $SM100 : UVB(30 \text{ mJ/cm}^2) + SM(100 \mu g/\mu \ell)$ SM50 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(50 μ g/ μ l)

#: p<0.01 vs N

9) Bcl-xL 유전자 발현에 미치는 영향 BcL-xL 는 세포 괴사를 억제하는 단 백질인 Bcl-2 계열의 단백질이다. 실험결 과, UVB 조사 시에 세포에서 생성되는 Bcl-xL의 mRNA의 생성이 감소하였다. 또한, SM을 200, 100 $\mu g/\mu \ell$ 농도로 처리 한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비하 여 Bcl-xL 유전자 발현을 증가시켜, UVB 에 의한 fibroblast 작용을 간접적으로 억 제할 수 있을 것으로 나타났다(Fig. 11).

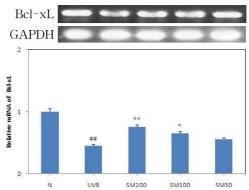


Fig. 11 Effect of SM on the Bcl-x Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

N: Normal

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

 $SM200 : UVB(30 \text{ mJ/cm}^2) + SM(200 \mu g/\mu \ell)$ $SM100 : UVB(30 \text{ mJ/cm}^2) + SM(100 \mu g/\mu \ell)$ SM50 : UVB(30 mJ/cm²) + SM(50 μ g/ μ ℓ) #: p<0.01 vs N, ** : P<0.01 vs UVB

*: p<0.05 vs UVB

IV. 고 찰

피부는 표피, 진피, 피하지방층으로 구 성되어 있으며, 이 중 표피는 각질층, 투 명층, 과립층, 유극층, 기저층으로 이루 어져 있다. 기저층에는 각질세포와 멜라 닌세포가 존재하며 세포분열에 의해 점 차 위쪽으로 이동하게 된다²⁴⁾. 각질세포 는 표피세포의 80%를 차지하는데 표피와 모발 및 조갑의 가장 바깥층의 죽은 세포 를 각질화 시키는 역할을 하며 각질형성 이외에 면역 기능에 관여하는 interleukin 1, α-interferon, prostaglandin 등의 물질 을 생성한다²⁵⁾.

각질층은 단백질이 풍부한 각질세포와 층상구조를 이루는 지방질이 연속적인 층을 이루어 장벽구조(bricks and mortar) 를 형성한다. 이는 표피의 수분증발과 손실을 억제하는 장벽역할을 함으로써 표피의 건조화를 막고 표피에서 생산되

는 각질세포를 통하여 정상적인 생화학적 대사를 할 수 있는 환경을 제공하고 외부로부터의 화학 및 물리적 손상으로부터 피부를 보호하며 세균 및 미생물, 바이러스 등이 피부로 침범하는 것을 방지하는 일차적인 보호기능을 한다. 또한 각질화 과정이나 각질세포에서 천연보습인자(Natural moisturing factor)가 생성되는데 이는 장벽기능을 유지하게 하는 중요한 인자로서 각질층 내에 생화학적반응을 조절하며 수분흡수, 피부표면의긴장 완화, 각질의 정상적인 배출의 기능을 하다^{1,2)}.

자외선은 일차적으로 피부 표면에 존 재하는 각질세포에 작용하여 활성산소의 생성을 자극하며 피부 세포의 사멸을 촉 진한다²⁵⁾. 활성산소는 인체에서 발생하 는 거의 모든 병의 발생과 진행에 관여 하지만 특히 피부세포의 노화, 유전적 변형에는 가장 중요한 병리적 요소로 알 려져 있다²⁶⁾. 활성산소는 피부의 면역기 능을 억제시키고, 염증을 유발하여 탄력 감소, 주름 및 기미, 주근깨 등의 각종 피부질환을 유발하고 결국 피부노화를 가속화시키는 원인이 된다²⁷⁾. 따라서 피 부 노화를 방지하기 위해 생체 내뿐만 아니라 피부에서 활성산소로부터 피부세 포를 보호해 줄 수 있는 물질에 대한 연 구가 활발히 진행되고 있다^{28,29)}. 생체 내 에서는 활성산소의 작용을 억제하여 세 포를 보호하기 위한 방어수단으로 SOD (superoxide dismutase), catalase, GSH-PX (glutathione peroxidase) 등이 활성화되 어 있지만 자외선과 같은 세포독성을 유 발하는 인자에 노출된 세포에서는 급격한 활성산소의 증가가 나타나며, 이와 병행 하여 세포의 사멸이 증가하게 된다³⁰⁻³²⁾.

과도한 자외선 조사는 각질세포에서 IL-6, IL-8, IL-10과 같은 다양한 염증매 개 사이토카인들을 발현시켜 직간접적으 로 피부의 염증반응에 관여하고 있다³³⁾. 자외선을 흡수한 각질세포는 histamine, serotonin, interleukin, prostaglandin, neuropeptide 등을 분비하여 혈관을 확 장시키고 혈관벽의 투과성을 증가시켜 염증세포를 혈관에서 표피와 진피로 방 출시켜서 홍반 및 부종을 유발하고 일광 화상을 초래한다. 각질세포에서 유리되 는 신경전달물질은 자외선에 의해 증가 하며, 이들은 멜라노좀의 크기와 숫자 증가, tvrosinase의 활성화, 멜라닌세포의 숫자증가와 가지돌기(dendrite)의 발달 및 멜라노좀의 이동을 일으켜 각질세포 전 층에 멜라닌이 증가하게 된다. 이와 같은 과정에서 피부는 자외선으로 인한 지연색소침착이 일어나 색이 검게 변하 게 된다. 자외선에 의해 피부 각질세포 로 부터 유리가 증가되는 TNF-a, IL-1 등은 섬유아세포에서 collagen 합성을 억 제하여 피부두께를 얇게 하고 주름살을 생성하여 피부노화를 일으킨다¹¹⁾. 또한 자외선 조사 시에 각질세포에서는 TNF-a. IL-10, urocanic acid 및 CGRP(calcitonin gene-related peptide) 등이 관여하여 면 역기능에 이상이 오고 면역감시기능이 저하되어 피부암이 생기게 된다¹⁾.

자외선에 의한 피부손상을 방지하지 위하여 현재 가장 일반적으로 사용하는 것이 일광차단제이다. 1978년에는 FDA 에서는 일광차단제를 화장품이 아닌 피 부의 구조와 기능을 보호하는 약제로 분 류하였다. 일광차단제는 자외선을 흡수, 반사 및 산란시키므로 홍반 유발 및 DNA 손상을 방지하고 진피 결합조직 손상을

감소시켜 광노화와 피부암 유발 방지에 기여한다. 일광차단제에는 태양광선을 반사시키거나 산란시키는 제제로 제조한 물리적 일광차단제와 자외선을 흡수하여 피부를 통과하는 자외선 양을 줄이는 화 학적 일광차단제가 있다. 일광차단제의 효능은 일광차단지수(Sun Protection Factor :SPF)로 표시되는데 일반적으로 SPF 15이상의 일광차단제를 쓰면 무난하고 광노출이 심한 경우는 SPF 30정도가 추 천된다. 그러나 일광차단제는 예방적 차 원에서 활용할 수 있으며 자체로 피부 손상을 회복시키는 기능은 없기 때문에 자외선으로 인한 피부손상을 치료하는 데는 한계가 있다. 이외에도 항염증제. retinoid acid, adapalene, tazarotene 등이 활용되고 있으나 피부 건조, 각질층의 손 상 등의 부작용이 동반되어 자외선으로 인한 피부손상에 사용할 수 있는 치료제 의 연구와 개발이 필요한 실정이다¹⁾.

한의학적으로 皮毛는 피부, 한선 등의 조직을 포괄하는 體表가 되는데 肺가 宣 發한 衛氣와 津液의 溫養과 潤澤에 의지 하여 인체의 外邪가 침입하는 것을 막는 제일의 보호막이다. 肺主皮毛의 설명은 일찍이《素問·陰陽應象大倫》에서 언급하 고 있으며《素問·六節臟象論》에서는 "其 華在毛, 其充在皮."라고 하였고《素問・五 臟生成論》에서 말하기를 "肺者合皮也. 其 榮毛也."라고 하였고 《素問·衛論》에서 "肺 主身之皮毛."《靈樞・本藏篇》에서 "衛氣 者 所以溫分肉 充皮膚 肥腠理 可開闔者 也"라고 하였다²³⁾. 肺는 가장 높은 위치 에 존재하므로 天과 잘 통하고 인체의 가장 外部에 있는 皮毛를 主하며 肺의 宣發작용에 의해 衛氣와 津液이 전신에 輸布되어 肌肉 및 皮毛를 溫潤시키고 또 衛氣의 작용에 의해 汗出의 조절과 피부의 潤澤 및 외적인 病邪에 대해 방어 작용을 한다. 衛氣는 반드시 폐기의 작용에 의해 이루어지는데 병리적으로 肺氣가 부족하면 皮毛의 衛外기능이 발휘되지 못해 感冒 등과 같은 외감질환과 각종 피부병과 같은 皮毛에 이상증상이 나타나며 玄府에서의 진액조절 즉 땀의 배출기능, 수액조절이 이루어지지 않아 여러 가지 피부질환이 발생한다³⁴⁾.

《外科哲玄·日晒瘡》에"日晒瘡,三伏 炎天, 勤苦之人, 勞于工作, 不惜生命, 受 酷日爆晒, 先痛後破而成瘡者, 非血氣所生 也." 라고 기재되어 있는데 이는 여름철 에 日光曝晒에 의해 발생하는 피부질환 을 설명한 것으로 여러 문헌에서 赤疹. 夏日沸爛瘡,沸瘡,沸爛瘡,沸子,風毒腫 등의 다양한 병명으로 자외선에 의한 피 부반응과 유사한 내용이 기록되어 있다. 日晒瘡은 腠理가 不密하여 衛表를 固密 하지 못하는 상황에서 무더운 여름철에 실외에서 일을 하여 陽熱毒邪가 體表에 침입하여 肌膚에 蘊鬱되어 氣血이 沸騰 하여 발생한다고 보았다. 淸熱祛暑, 解毒 消腫하는 치법으로 치료하였는데 淸暑 湯, 五味消毒飲, 凉血地黃湯合黃連解毒湯 등을 활용하였다²⁾.

生脈散은 元代 李凍原¹²⁾의《內外傷辨感論》에 처음 기재되었으며 手太陰藥으로 여름철에 汗出過多하여 津液이 耗傷하여 일어나는 症을 치료하는 처방으로 暑熱로 元氣가 傷하고 혹은 久咳로 肺虚하여 氣血兩虚의 症이 발생할 때 본방을 활용하여 養心補肺하고 益氣生津시킨다고 하였다. 方 중에 人蔘은 甘溫(歸經-脾, 肺, 心)하여 補肺益氣하고 生津하며, 麥門冬은 甘寒(歸經-肺, 胃, 心)하여 養

陰淸熱하고 止汗하며 潤肺滋水하고 淸心 瀉熱하며, 五味子는 酸溫(歸經-肺, 心, 腎)하여 斂肺止汗하고 生津하는 효능이 있다. 임상에서는 일사병, 열사병, 심근 염, 만성기관지염, 폐기종 등에 활용하고 있다³⁵⁾.

生脈散에 관한 실험적 연구로 김¹⁶⁾은 혈압상승, 심박동수 저하 및 심근수축력 증강의 효능이 있다고 보고하였으며, 김¹⁷⁾은 운동력향상과 면역회복의 효능을 나타내는 것으로 보고하였다. 이 밖에도 신¹⁸⁾의 심혈관계 및 국소 뇌혈류량에 미치는 영향, 손¹⁹⁾의 생쥐의 면역반응에 미치는 영향에 관한 연구가 있으며, Ichikaw²⁰⁾나 Wang²¹⁾은 生脈散의 항산화 효과에 대해 실험적으로 입증하였고, 김²³⁾은 방사선 손상에 대한 보호효과에 대하여 보고하였다.

한의학적으로 피부는 肺臟에 歸屬하여 '肺主皮毛'하는데 肺氣가 허약해지면 皮毛가 溫養을 잃어 피부가 초췌해지고 마르게 되고 외사를 막는 능력이 저하되어 병변이 발생하게 된다. 生脈散은 肺臟의氣陰을 補하는 작용이 뛰어나며 淸熱生津하는 효능이 우수하여 피부의 상해와 병변에 효과가 있으리라 사료되어 이번연구에 활용하였으며, 生脈散이 자외선으로 자극된 피부 각질세포를 보호하고 자외선 조사 시에 피부 광노화에 관여하는 인자들을 억제할 수 있을 것이라는 가설을 설정하였다.

본 연구에서는 UVB에 의한 각질세포의 세포사멸에 대한 SM의 영향을 평가하고자 각질세포의 세포상해를 측정하였다. LDH(lactate dehydrogenase)는 세포내막에 존재하므로 세포가 파괴되어야세포 밖으로 유출될 수 있어 세포의 상

해여부를 측정하는 유력한 기준이 된다. 실험결과, UVB는 배양된 인간 각질세포 인 HaCaT 세포의 상해를 증가시켜 LDH의 유리를 증가시켰다(Fig. 1). 이는 UVB에 의한 ROS 생성이 증가되고, ROS 물질들이 단백질, 지방, 핵산 등 생체 구성물질의 변성을 유발한 결과 세포 막이 파괴되는 것을 의미한다. 본 연구에서 생맥산은 UVB에 의해 유리가 증가된 LDH 활성을 억제하였다(Fig. 1). 따라서, SM은 UVB에 의한 세포 손상을 억제할 수 있을 것으로 판단되었다.

피부 각질 세포의 산화적 스트레스를 측정하기 위하여, HaCaT 세포에 UVB를 조사한 후 생성되는 nitrite를 측정하였다. 실험결과, UVB 조사 시에 세포에서 생성되는 nitrite량이 증가하였다. 또한, SM을 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비해 nitrite 생성을 억제하였다(Fig. 2). 따라서, SM은 UVB에 의한산화적 스트레스를 억제할 수 있을 것으로 판단되었다.

Nitrite는 ROS의 일종으로 NO synthesis 과정을 통해 형성된다. NO를 생성하는 효소인 NOS는 각각의 생성되는 위치에 따라신경계의 nNOS(neuronal NO synthase), 혈관내피세포의 eNOS(endothelial NOS), 대식세포 등에서 발현하는 유도성 iNOS (inducible NOS) 등이 존재한다^{36,37)}. eNOS에 의해 생성된 eNO는 혈관 내피세포의확장 및 PGI₂ 생성을 촉진하여 혈액순환을 향상시킨다. 반면에 iNOS에 의해생성되는 iNO는 혈관을 수축시키며 염증반응을 유발할 수 있다. 이 염증반응은 세포에 상해를 유발하며 염증관련 인자들의 신호전달과정에 관여하는 것으로알려져 있다. 실험결과, UVB는 HaCaT

세포의 iNOS 유전자 발현을 증가시켜 염증반응을 증가시키는 것으로 나타났으 며, SM은 모든 농도에서 이를 억제하지 못하였다. 이로 보아 SM이 유도성 NO 로 유발되는 염증 반응을 억제하지 못하 는 것으로 판단되었다(Fig. 10).

세포는 다양한 인자들- 산화성 스트레 스, hypoxic stress, UV등에 의해 apoptosis 가 유발된다. UV와 같은 외부 스트레스로 인한 각질세포의 활성화는 ROS(reactive oxygen specis)에 의해 중개되어 나타나 는 MAPK 계통의 신호전달계 단백질 일종인 p38α/β와 JNK의 활성화를 통해 apoptosis를 유발한다³⁸⁾. 이와 함께 ROS 에 의해 파괴되어 나오는 cytochrome c와 lysosomal protein에 의해 caspase-8, caspase-3등이 활성화되어 apoptosis를 유 발하기도 한다. 이들의 작용과는 반대로 성장인자 수용체들(growth factor receptor) 인 IGF-1R(insulin- like growth factor receptor), KGFR(keratinocyte growth factor receptor), EGFR/erbB1R (epidermal growth factor receptor)등은 PI3K, Akt, ERK1/2(extracellular signal- regulated kinase) 등과 같은 protein kinase의 활성 화를 통해³⁹⁾ 세포괴사에 저항하는 Bcl-2 와 결합하는 Bad 단백을 인산화하여 Bcl-2와 유리시킴으로써 Bcl-2이 세포괴 사를 억제할 수 있도록 한다. Bcl-2족 단백 질은 apoptosis를 조절하는 단백질로 알 려져 있으며, Bcl-2와 그와 유사한 Bcl-xL, Bax등으로 구성되어 있다⁴⁰⁾. HaCaT cell 에서 Bcl-2의 과잉발현은 Fas에 의해 중 개되는 UV노출에 의한 keratinocyte의 apoptosis를 억제한다고 보고되었다⁴¹⁾. 이 들은 주로 mitochondria의 outer membrane 에 존재하며 ion channel을 형성한다. Bcl-2

계 단백질은 apoptosis를 유발하는 자극 에 의한 swelling이나 cytochrome c 유리 등과 같은 mitochondria 파괴를 억제하 며 이들에 의해 유도되는 caspase의 활 성을 억제한다. 이들의 활성은 MAPK (mitogen activated protein kinase) 계열 의 p38a이나 β의 활성을 통하여 나타나 게 되는데 이들의 작용은 Bax의 분자구 조를 변화시켜 작용을 억제하고 Bcl-2가 apoptosis 저해작용을 하도록 유도한다. 기존의 연구에서 UV의 조사는 세포내에 서 Bcl-2 계열의 단백질인 Bcl-xL 및 Bax의 발현을 억제하는 것으로 보고되 었다⁴²⁾. 본 연구에서 UVB를 조사한 HaCaT 세포에서 Bcl-xL과 Bax2의 발 현이 억제되어 기존의 논문 및 선행 연 구 결과들과의 상관성이 인정되었다. 즉, SM을 처리한 경우에 UVB에 의해 억제 된 Bcl-xL 및 Bax 단백질 발현을 SM이 회복시키는 것으로 나타났다(Fig. 5, Fig. 11). 이 작용은 SM이 UVB에 의해 증가 하는 apoptosis를 억제하는 기능과 촉진 하는 역할을 동시에 할 가능성을 시사한 다. 그러나 UVB에 의한 LDH 유리증가 를 억제하고, nitrite와 같은 ROS의 생성 증가를 억제하는 것은 Bcl-2 계열 단백 질 발현이 우세하여 각질세포 상해에 보 호작용을 나타내는 것으로 판단되었다 (Fig. 1, Fig. 2).

이와는 별도로 피부각질세포의 표면에 존재하는 TNF(tumor necrosis factor) DR(death receptor)라고 불리는 수용체 에 작용하는 경우 CD95/Fas receptor와 TNF-R1(receptor1), TRAILER(TNF related apoptosis inducing ligand)등의 수용체가 관여한다⁴⁽⁰⁾. 이들의 작용에는 caspase-8 에 의한 apoptosis와 caspase-2가 작용하 는 apoptosis 과정을 활성화하며, TRAF₂, MEKK, JNK를 거쳐 AP-1이 활성화되어 apoptosis를 촉진한다. 이런 과정에 존재하는 TRAF₂는 IKK를 활성화시켜 유리되어 나오는 NF-kB는 핵내의 전사를 통해 apoptosis를 억제하는 역할을 한다.

COX-2는 UV에 의한 염증반응에 관 여하는 PGE₂(prostaglandin E₂)의 생합 성을 촉진하는 효소로 UV에 의해 COX-2 발현 증가는 피부염증반응과 함께 피부 암의 발생 증가와 관련이 있다고 알려져 있다. 이러한 작용은 세포내 신호전달계 인 MAPKs(mitogen, activated protein kinases)의 활성화화가 필요한데 여기에 는 ROS 의존적인 신호전달과정으로 알 려져 있다. UVB에 의해 HaCaT cell 표 면의 EGFR/erbB1R 수용체가 활성화되 면 pp60src 활성화를 거쳐 ERK/p38/ PI3K 신호전달과정이 활성화되고 연속 적으로 COX-2의 활성 및 유전자 발현이 증가한다. COX-2 발현은 대부분 TPA에 의해 나타나는 PKC의 활성화와 JNK (c-jun NH2-terminal kinase)의 활성화 에 의해서 나타나지만, HaCaT 세포의 경우 INK를 억제하여도 COX-2의 발현 을 억제에 의해서는 억제되지 않는다는 보고가 있다⁴³⁾. UV에 의해 각질세포가 상해를 받는 것과는 별도로 keratinocyte 는 UV에 의해 TGFβ, α-MSH와 같은 cytokine과 COX-2의 생성물인 PGE2를 유리하게 된다. PGE2는 melanocyte 표 면 수용체를 자극하며 AP-1, ERK, PKC 등 일련의 신호전달과정을 통해 발현되 는 TRP-2, TRP-1, tyrosinase 등의 효소 작용으로 melanin 생성을 촉진한다⁴⁴⁾. 이 melanin은 피부의 색소 침착을 유발 하지만 항산화 작용을 증강시켜 피부세

포를 자외선으로 부터 보호하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 UVB 조사에 의해 HaCaT cell에서 COX-2 유전 자 발현이 현저히 증가되는 것을 관찰하였다. 이것은 UVB에 의해 iNOS 발현이증가하고, nitrite 생성이 증가하는 것과함께 염증반응을 증폭시킬 것으로 판단된다. 실험결과, SM은 UVB에 의해 증가하는 COX-2 발현을 억제하여 염증반응을 억제할 것으로 나타났다(Fig. 3).

UV와 같은 외부 환경적 인자로 인한 피부 각질세포 손상은 피부세포들 사이의 신호전달에 중요한 역할을 하는 TGF-β (transforming growth factor), TNF-a (tumor necrosis factor), PGE2 (prostaglandin E2), α-MSH(melanocyte stimulating hormone), GSF(granulocyte stimulating factor), IL-1(interleukin-1), IL-6, IL-8, IL-10 등의 분비를 증가시킨다⁸⁻¹⁰⁾. 이중 TNFa, IL-1등은 피부 진피세포인 섬유 아세포(fibroblast)에 작용하여 MMP-1, TIMP-1, procollagen 등의 생합성을 증가 시킬 수 있다¹¹⁾. 그러나, 장시간 UV를 조 사하는 경우 procollagen의 합성과 TIMP-1 의 발현이 억제되어 collagen의 진피조직의 합성이 감소한다. 이와는 별도로 MMP-1 은 진피조직의 성분인 collagen을 분해하 여 피부의 탄력을 저하시켜 피부노화를 촉진하게 된다¹¹⁾. 실험결과, UVB는 피 부각질세포에서 TNFα 유전자 발현을 현저히 증가시켰으며, SM은 UVB에 의 해 증가된 TNFa 유전자 발현을 현저히 억제하였다(Fig. 6). 이러한 SM의 효능 은 UVB에 의해서 감소하는 피부의 탄력 을 회복할 수 있을 것으로 판단되었다.

각질세포와 진피조직의 섬유아세포의 단백질의 발현에는 PKC(protein kinase C)의 활성화와 AP-1, NF-kB등의 전사 인자(transcription factors) 활성화를 필 요로 한다. Keratinocyte에서 유리되는 TGFβ, PGE₂, α-MSH는 UV에 의해 증 가하며, 이들은 melanocyte를 활성화시 켜 melanin 생합성을 증가시킨다. 또한. UV에 의해 피부 각질세포로 부터 유리 가 증가되는 TNFa, IL-1등은 피부 진피 세포인 섬유아세포(fibroblast)에 작용하 역 MMP-1(martrix metalloproteinase-1), TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1), procollagen 등의 생합성을 증가시킬 수 있다^{11,12)}. Collagen은 전신의 결체조직을 구성하는 단백질로서 전구체인 procollagen 로서 형성된다. Procollagen은 성숙한 collagen 과 여분의 peptide로 구성되어 있는데, 이 peptide는 collagen이 성장하고 있는 collagen fibril로 끼어 들어가기 전에 특 이한 protease인 MMP들에 의해 분해한 다. 대표적으로 MMP-1은 진피조직의 주성분인 type I collagen 분해를 촉진한 다. 또한 UV는 collagen 합성을 비정상 적으로 억제하여 피부노화에 결정적 역할 을 하게 된다. 이러한 결과는 MMP등의 단백질 발현에 관여하는 신호전달 단백 질인 PKC(protein kinase C), AP-1와 전 사인자인 c-fos, c-jun, NF-kB등의 활성화 와 관련이 있다⁴⁵⁾. 선행 연구에서 NF-kB 를 불활성화시키면 염증을 유발하는 iNOS 와 COX-2의 발현이 억제된다고 알려져 있으며, UV를 조사한 keratinocyte에서 c-jun과 NF-kB의 발현이 증가된다고 보 고하였다⁴⁶⁾. 본 연구 실험결과에서 UVB 를 조사한 keratinocyte에서 NF-kB의 발 현이 증가하는 것을 확인했으며, SM은 이를 억제하였다(Fig. 9). 이와함께 UVB 에 의해 발현이 증가된 c-jun, c-fos 의

발현도 SM이 억제하였다.

이상의 결과, SM은 UVB에 의한 피부 각질세포의 상해를 억제하였으며, 이는 UVB에 의해서 증가하는 apoptosis 관련 인자와 이들의 발현을 조절하는 단백질 의 발현을 억제하여 나타난 결과로 판단 되며, 향후 기능성 화장품의 재료로 응 용될 수 있으리라고 사료된다.

V. 결 론

生脈散이 UVB 조사에 의한 피부각질 세포의 상해에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 사람의 각질세포인 HaCaT를 자외선 처리하여 LDH 유리와 nitrite 생성에 미치는 영향을 측정하였으며, COX-2, Bcl-2, Bax, TNFa, c-jun, c-fos, NF-kB, iNOS, Bcl-xL의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1. 生脈散은 UVB로 자극된 피부각질세 포주인 HaCaT의 상해로 인한 LDH 유리와 nitrite의 생성을 억제하였다.
- 2. 生脈散은 UVB로 자극된 진피세포에 서 MMP-1을 증가시킬 수 있는 COX-2, TNFa의 발현을 감소시켰다.
- 3. 生脈散은 UVB로 자극된 HaCaT 세 포에서 anti-apoptosis 작용을 나타내 는 Bcl-2, Bax, Bcl-xL 단백질 유전자 발현을 증가시켰다.
- 4. 生脈散은 UVB로 자극된 HaCaT 세 포에서 단백질 발현을 조절하는 전사 인자인 c-jun, c-fos, NF-kB 발현 증 가를 억제하였다.
- 5. 生脈散은 UVB에 의한 ROS 생성 관

련인자인 iNOS 발현에 영향을 미치지 않았다.

이상의 결과, 生脈散은 직접적으로 UVB로 자극된 피부 각질세포를 보호하 는 작용이 있으며, UVB 조사 시에 피부 광노화에 관여하는 인자들을 억제할 수 있는 것으로 판단된다.

□ 투 고 일 : 2011년 4월 30일□ 심 사 일 : 2011년 5월 9일

□ 심사완료일 : 2011년 5월 11일

참고문헌

- 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 피 부과학 제5판. 서울:여문각. 2008:12-8, 131-6.
- 2. 노석선. 피부과학. 서울:아이비씨기획. 2006:11, 31, 90, 607.
- 3. Fisher GJ et al. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. N Engl J med. 1997;337:1419-28.
- Yamamoto Y. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging.
 J Dermatol Sci. 2001;27:S1-S4.
- 5. Sung Mok Beak, Yong Soo Lee, Jung-Ae Kim. NADPH oxidase and cyclooxygenase mediate the ultraviolet B-induced generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor-kB in HaCaT human keratinocytes. J Biochem. 2004;86:425-9.
- 6. Masaki H. Atsumi T. Sakurai H. Detection of hydrogen peroxide and

- hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. Biochem Biophys Res Commun. 1995; 206:474-9
- 7. Karin M. Liu ZG, Zandi E. AP-1 function and regulation. Curr Opin Cell Biol. 1997;9:240-6.
- 8. Barber LA et al. Expression of the platelet-activating receptor results in enhanced ultraviolet B radiation-induced apoptosis in a human epidermal cell line. J Biol chem 1998;273:18891-7.
- 9. Lee KS et al. Melatonin reduces ultraviolet-B induced cell damages and polyamine levels in human skin fibroblasts in culture. Exp Mol Med. 2003;35(4):263-8.
- Cha HJ et al. Anti-invasive activity of ursolic acid correlates with the reduced expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in HT1080 human fibrosarcoma cells. Cancer Res. 1996;56:2281-4.
- 11. Brenneisen P et al. 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. 1998; 273, 5279-87.
- 12. 이동원. 동원십종의서. 서울:대성문화 사. 1983:90-1.
- 13. 허준. 동의보감. 서울:남산당. 1999:410.
- 14. 신재용. 방약합편해설. 서울:성보사.1991:27-8.
- 15. 한의과대학 방제학교실. 방제학. 서울

- :영립사. 1999:283-4.
- 16. 김세길. 생맥산이 백서의 심혈관계에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1986.
- 17. 김석. 생맥산투여가 흰쥐 근육 glycogen 함량 및 산소활성에 미치는 영향에 대한 조직학적 연구. 대한한의학회지.1990;11(1):156-64.
- 18. 신대철. 생맥산이 심혈관계 및 국소 뇌혈류량에 미치는 영향. 대한내과학 회지. 1999;20(1):153-66.
- 19. 손정희. 생맥산가감방이 생쥐의 면역 반응에 미치는 영향. 대한한방부인과 학회지. 2003;16(3):162-73.
- 20. Ickkawa H. Rold of component herbs in antioxidant activity of shengmai san a traditional chinese medicine formula preventing cerebral oxidative damage in rat. Am J Chin Med, 2003;31(4):509–21.
- 21. Wand L. Prevention of oxidative injury in PC12 cells by a traditional chinese medicine Shengmai San, as a model of an antioxidant-based composite formula. Biol Pharm Bull. 2003;26(3):1000-4.
- 22. 김현경. 생맥산의 방사선 보호효과 -생쥐 소낭세포 재생과 Apoptosis에 미 치는 영향. 대한한방내과학회지. 2006; 27(2):316-26.
- 23. 王氷 注. 黄帝内經素問. 서울:大成出版社. 1986:21, 101, 212, 274, 340, 768.
- 24. 이향우, 김주연, 이연희. 피부과학. 서 울:광문각. 2003:23.
- 25. 이지해 외. Hairless mice에서의 대두 홍삼 혼합 분말(APB-03)의 경구 반복 투여 시 피부 주름 생성 예방 효과. 한국식품과학회지. 2005;37(6):989-96.

- 26. Sander CS et al. Phothoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. J Invest Dermatol. 2002;618–5.
- 27. Ozeki Y, Davies E, Takeda J. Structure and expression of chalcone synthesis gene in carrot suspension cultured cells regulated by 2.4-D. Plant Cell Physiology. 1993;34(7):1029-37.
- 28. 김형우 등. 포공영 추출물의 항산화 효과 및 피부 각질세포 보호효과. 대 한본초학회지. 2009;24(3):103-8.
- 29. 이진영 등. 황기의 자외선에 의한 세포 손상을 막는 보호효과. 생약학회지. 2008;39(4):300-4.
- 30. Sun W et al. Catalase activity of chloroperoxidase and its interaction with peroxidase activity. Biochem Cell Biol. 1994;72(7-8):321-31.
- 31. Lardinois OM. Rouxhet PG. Peroxidatic degradation of azide by catalase and irreversible enzyme inactivation. Biochim Biophys Acta. 1996;1298(2):180-90.
- 32. Lardinois OM. Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide. Free Radic Res. 1995;22(3):251-74.
- 33. 조재외. HaCaT 각질형성세포에서 자외선 B에 의하여 유도되는 염증성 사이토카인에 대한 Curcumin의 항염 증 효과. 대한피부과학회지. 2009;47(2):121-6.
- 34. 중도일. 피부과의 한방치료. 서울:일 중사. 1991:40.
- 35. 본초학교수 공편저. 본초학 서울:영 림사. 2003:532, 589, 623.
- 36. Song Xiu-zu, BI Zhi-gang, XU Ai-e.

- Green tea polyphenol epigallocatechin –3–gallate inhibits the expression of nitric oxide synthase and generation of nitric oxide induced by ultraviolet B in HaCaT cells. Chin Med J. 2006; 119:282–7.
- 37. Weller R. Nitric oxide a key mediator in cutaneous physiology. Clin Exp Dermatol. 2003;28:511–4.
- 38. Jae-We Cho et al. Curcumin inhibits the expression of COX-2 in UVB-irradiated human keratinocytes(HaCaT) by inhibiting activation of AP-1: p38 MAP kinase and JNK as potential upstream targets. Experimental and Molecular Med. 2005;37(3):186-92.
- 39. An Van Laethem, Marjan garmyn, Patrizia Agostinis. Starting and propagating apoptotic signals in UVB irradiated keratinocytes. Photochemical & Photobiological Sci. 2009;8:299–308.
- 40. Marcheko ND et al. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. J Bio Chem. 2000;275(16):202-12.
- 41. JE Chipuk et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial

- membrane permeabilization and apoptosis. Science. 2004;303:1010-4.
- 42. V Chaturvedi et al. Resistance to UV-induced apoptosis in human keratinocytes during accelerated senescence is associated with functional inactivation of p53. J. Cell Physiol. 2004;198:100-9.
- 43. Yong Cui et al. Involvement of ErK and p38 MAP kinase in AAPH-induced COX-2 expression in HaCaT cells. Chem and Phys of Lipids. 2004;129:43-52.
- 44. Choi AMK. et al. Alternations in the molecular response to DNA damage during cellular aging of cultured fibroblasts: reduced AP-1 activation and collagenase gene expression. J Cell Physiol. 1995;164:65-73.
- 45. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. Biochim Biophys Acta. 1991;1072:129-57.
- 46. Fisher GJ et al. c-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. J Cret Itvest. 2000; 106:663-70.