

홍차추출물 함유 누드팩의 Hairless 마우스 피부주름 형성 억제효과

김영철, 박은예, 김상남, 유용기, 박미순¹, 이귀영², 이석준³, 장병수^{4,*}

계명대학교 대학원 공중보건학과, ¹서울의과학연구소,
²극동정보대학 뷰티코디네이션과, ³단국대학교 체육대학,
⁴한서대학교 보건학부 피부미용학과

Inhibitory Effects of Nude Pack Containing Black Tea Water Extract on Skin Wrinkle Formation in Hairless Mice

Young-Chul Kim, Eun-Ye Park, Sang-Nam Kim, Yong-Gi Yoo,
Mi-Soon Park¹, Gui-Yeong Lee², Suk-Jun Lee³, Byung-Soo Chang^{4,*}

Department of Public Health, Graduate School, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
¹Seoul Medical Science Institute, Seoul 140-809, Korea

²Department of Beauty Coordination, Keukdong College, Icheon, Gyeonggi 467-900, Korea

³Department of Physical Education, Dankook University, Cheonan, Chungnam 330-714, Korea

⁴Department of Cosmetology, Hanseo University, Seosan, Chungnam 356-706, Korea

(Received June 1, 2011; Revised June 22, 2011; Accepted June 23, 2011)

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of nude pack containing black tea water extract (NPBT) on skin wrinkle formation in hairless mice. Skin wrinkles were induced by UVB irradiation to the backs of hairless mice for 5 weeks. And at the same time, NPBT was applied topically. Wrinkle formation, histological changes, expression of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and protein activities of MMP-2 and MMP-9 were observed or analyzed. Wrinkles for the control group were formed as a pattern of deep furrows and thick crests. Whereas wrinkles for the NPBT treated group were formed as a pattern of shallow furrows and thin crests, and their wrinkle areas were significantly ($p < 0.001$) lower than the control group. Collagen fibers were arranged irregularly and sparse in density and some elastic fibers were degenerated in the control group, while they were almost intact in the NPBT treated group. MMP-3 mRNA expression in the control group was significantly ($p < 0.001$) higher than the normal group, and that of NPBT treated group was significantly ($p < 0.001$) lower than the control group. The NPBT treated group showed remarkably lower protein activities of MMP-2 and MMP-9 than the control group. NPBT could have a considerable inhibitory effect on skin wrinkle formation in hairless mice.

Keywords : Black tea extract, Collagen fiber, Hairless mice, MMP, Wrinkles

본 연구는 지식경제부 지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터에 의한 것입니다.

*Correspondence should be addressed to Dr. Byung-Soo Chang, Department of Cosmetology, Hanseo University, Seosan 356-706, Korea. Ph: (041) 660-1584, Fax: (041) 660-1590, E-mail: bschang@hanseo.ac.kr

서 론

노화는 우리 몸의 모든 구성기관에서 일어나며 피부노화는 나이가 들어감에 따라 피부의 생리적 기능 감소와 구조적 변화를 가져오는 내인성 노화(intrinsic aging)와 장시간 자외선 노출에 의해 임상적 또는 조직학적인 피부 변화가 일어나는 외인성 노화인 광노화(photo aging)로 나눌 수 있다(Seo et al., 2011). 내인성 노화와 광노화는 임상적으로도 많은 차이를 보인다. 내인성 노화인 경우 피부는 미세한 주름이 늘어나며 부드러운 감촉을 보이는데 반해 광노화는 피부에 깊은 주름, 피부이완, 모세혈관 확장, 거칠음 등을 유발시킨다(Seite et al., 2006; Wlaschek et al., 2011).

진피의 하부인 망상층은 교원질(collagen), 탄력소(elastin), 하이알루론산(hyaluronic acid) 등의 물질로 구성되어 있다. 자외선에 의해 손상 받은 피부는 정상적인 교원질과 탄력소의 구조가 파괴된다. 교원질은 섬유상 단백질로 이루어져 있고 매우 강인하고 저항성이 있어 외부의 충격으로부터 건디는 성질이 있으며 젊은 피부와 노화피부간에는 다소 차이가 있다. 피부가 노화되면 교원질의 구조가 변하여 피부 장력을 잃게 되고 교원질을 생성하는 세포인 섬유아세포(fibroblast)의 기능이 감소한다. 탄력소는 교원질과 서로 망상구조를 이루면서 피부의 탄력을 유지하는 역할을 담당하는데, 피부가 노화되면 비정상적인 탄력섬유 덩어리들이 증가하는 탄력섬유증(fibroelastosis)이 나타나 전반적으로 진피가 두꺼워지고 탄력을 상실하게 되어 피부의 처짐 현상이 나타난다(Seite et al., 2006; Park et al., 2009; Wlaschek et al., 2011).

광노화에서 자외선 중 특히 UVB의 피부 노출은 superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical (OH^{\cdot})과 같은 활성산소의 생성을 유도한다. 활성산소종은 교원질을 직접 분해하거나 기질금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP) 억제물질을 불활성화 시키고 MMP 생성을 증가시켜 교원질을 분해한다. 결합조직을 분해시키는 세린 같은 다양한 MMP가 생체내 및 생체의 실험에서 UVA와 UVB 조사에 의해 선량 의존적으로 유도되는 것이 확인 되었다. MMP는 domain에 의해 28개(MMP-1~MMP-28)로 나누어지는데 그 중 MMP-2는 제4와 5형 교원질 및 탄력소를 분해할 수 있고, MMP-3은 제4형 교원질, 프로테오글리칸(proteoglycan), 파이브로넥틴(fibronectin), 라미닌(laminin) 등 기질 단백질을 분해하며(Gary et al., 1997; Karin et al., 2000; Shinji et al., 2003; Steinhoff et al., 2004), 인체에서 노화에 따라 MMP-1, -2, -9, -12의 발현이 증가되는데, 이들의 발현은 광노화된 피부에서 더욱 증가되어 나타난다(Kähäri et al., 1990).

최근 피부에 안전한 소재에 대한 복합물의 개발에 관심이 집중되면서 자극이 적은 천연물에 대해 연구가 활발히 진행되고 있다. 수천 년의 역사를 가진 차는 기호성이 우수

할 뿐만 아니라 페놀화합물, 각종 무기질 및 비타민 C 등 유용한 성분을 함유하고 있으며, 이들 물질은 항암 작용, 항비만, 성인병 예방 등의 뛰어난 약리적 특성을 지닌다(Kim et al., 2001). 제조법에 있어 홍차는 채엽, 위조, 유념, 발효, 건조의 과정을 거치며 발효차인 홍차에는 methyxanthin류와 catechin류 외에 theaflavin류가 함유되어 있어 홍차 특유의 색과 기호에 영향을 준다(Obanda et al., 2001, 2004). Theaflavin류는 녹차에 함유된 카테킨과 동일한 산화 방지 효능을 지니고, 카테킨의 theaflavin으로의 전환이 활성산소 제거 능력에 영향을 미치지 않는다고 보고된 바 있다(Leung et al., 2001).

이에 본 연구는 hairless 마우스에 UVB 조사를 반복적으로 실시하여 피부노화를 유발시키고 이와 병행하여 우수한 항산화능으로 인하여 피부주름 형성 억제효과가 기대되는 홍차를 함유한 누드팩을 도포하여 피부주름 형성 억제효과와 노화관련 인자들의 변화양상을 알아보았다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

Hydrogen peroxide는 Junsei사(Japan)의 제품을, hematoxylin, bovine serum albumin, retinoic acid, polyethylene glycol은 Sigma사(USA)의 제품을 사용하였으며 그 외 일반시약들은 특급품을 사용하였다.

실험기기 중 자외선 조사 장치는 UVB sunlamp (UVM-225D, Mineral Lamp UVP, USA)를, 자외선 측정 장치는 UV-radiometer (HD9021, Delta OHM, Italy)를 사용하였다. 시료추출은 초고속 감압 저온 추출기(COSMOS-660, 경서기계산업, 한국)를 사용하였다. 피부의 주름양상 분석은 Visioline (VL650, CK electronic GmbH, Germany)을, 피부조직표본 관찰은 광학현미경(CX41, Olympus, Japan)을 사용하였다.

2. 시료조제

중국 Fujian 지방에서 재배한 홍차 잎 600 g을 구입하여 물 5 L를 가하여 초고속 감압 저온 추출한 후 농축용기에

Table 1. Composition of nude pack powder

Ingredients	%
Glucose	69.98
Calcium sulfate	1.04
Algin	9.84
Silica	5.90
Tetrasodium pyrophosphate	1.37
Black tea powder	1.00 or 2.00
Others	1.87 or 0.87
Total	100

담아 농축하고 동결 건조 장치로 동결 건조시킨 후, 동결 건조한 홍차추출물을 Table 1과 같은 조성으로 누드팩 분말로 혼합하여 해수성분이 함유된 solution (pH 5.5~6.0)에 1:3 비율로 섞어 붓으로 잘 개어 시료로 사용하였다.

3. 실험동물 및 처치

실험동물은 6~7주령의 SKH-1 hairless 마우스(Charles-River, Japan)를 분양받아 1주일간 사육실에서 적응시킨 후 정상군(normal group, N): 아무런 처치를 하지 않은 군, 대조군(control group, C): 자외선 조사+saline 도포군, 양성대조군(positive control group, PC): 자외선 조사+0.01% retinoic acid 도포군, 실험군 1(experimental group 1, E1): 자외선 조사+1% 홍차함유 누드팩 도포군, 실험군 2(experimental group 2, E2): 자외선 조사+2% 홍차함유 누드팩 도포군, 총 5개 군으로 나누어 각 군당 8마리씩 총 40마리를 실험에 사용하였다. 실험 전 기간 동안 사료와 물은 자유롭게 공급하였다. 사육실은 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 5\%$, 조명주기 12시간씩 밤낮을 유지하였다. 동물실험은 실험윤리위원회의 원칙을 준수하고 동물보호법의 3R 및 윤리적인 측면을 고려하면서 수행하였다.

4. 피부주름 유발 및 시료도포

자외선 조사 장치의 광원은 302 nm의 UVB를 방출하는 sunlamp를 사용하였다. 자외선 조사량은 UV-radiometer로 측정하였으며, 마우스를 자외선 조사용 케이지에 가둔 후 등 부위에 격일 간격으로 1주일에 3회, 5주간 [0주: 60 mJ/cm² (1M.E.D), 1주: 2M.E.D, 2~3주: 3M.E.D, 4~5주: 4M.E.D] 조사하였다. 홍차함유 누드팩은 마우스 등 부위에 1%: 185 mg/kg BW/day, 2%: 370 mg/kg BW/day 양으로 1일 2회, 주 6일, 5주 동안 도포하였고, saline은 1일 2회, 매회 200 μL 씩, 주 6일, 5주 동안 도포하였다. Retinoic acid는 polyethylene glycol에 0.01%로 희석하여 1일 2회, 매회 200 μL 씩, 주 6일, 5주 동안 도포하였다.

5. 피부주름의 형태학적 관찰

피부주름 양상 관찰은 실험동물을 5주째 에테르로 가볍게 마취를 하고 디지털 카메라로 사진 촬영을 한 후 스카출라로 등 부위를 실리콘 폴리머(SILFLO, J & S Davis, UK)를 도포하여 균도록 방치하여 모사판을 떼서 Visioline을 사용하여 주름지표를 분석하였다.

6. 피부의 조직학적 관찰

1) Masson's trichrome 염색 관찰

절취한 피부조직을 실온에서 10% 중성 포르말린 용액에

24시간 고정된 후 통상적인 방법으로 수세, 탈수, 투명, 칩투 과정을 거친 다음 paraffin으로 포매하고 4 μm 두께로 절편을 만들어 실온에서 Bouin 용액에 하룻밤 담그고 Masson's trichrome 염색 후 진피층 내 교원섬유(collagen fiber)의 양과 형태를 광학현미경으로 관찰하였다.

2) Verhoeff's 염색 관찰

절취한 피부조직을 실온에서 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정된 후 통상적인 방법으로 수세, 탈수, 투명, 칩투 과정을 거친 다음 paraffin으로 포매하고 4 μm 두께로 절편을 만들어 Verhoeff 용액에 염색 후 수세, ferric chloride 2%로 감별 수세 후 sodium thiosulfate에 처리하여 피부 진피층 내의 탄력섬유(elastic fiber)의 소실 및 퇴행성 변화를 광학현미경으로 관찰하였다.

7. 피부조직의 Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) 유전자 발현량 측정

1) RNA 추출

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

2) cDNA 합성

BioNEER사의 CycleScript RT PreMix (dT20) kit에서 제공하는 protocol에 따라 total RNA 양이 0.1~1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 가 되도록 RNA sample을 넣고 DEPC treated water를 20 μL 까지 채운 후 30°C에서 1분간, 50°C에서 4분간 12 cycle 반응시키고 95°C에서 5분간 가열하여 반응을 종결시켰다.

3) PCR과 전기영동

BioNEER사의 AccuPower™ PCR PreMix kit를 구입하여 사용하였다. Template 2 μL , forward primer와 reverse primer (10 pmole/L, BioNEER, Korea)를 각각 1.4 μL , 멸균된 증류수 15.2 μL 를 섞고 PCR 반응(Bio-RAD, Mycycler™ thermal cycler, USA)을 실시하였다. Internal control로 GAPDH (57°C, 35 cycle), 실험군으로 MMP-3 (60°C, 35 cycle)를 사용하였으

며 사용된 primer의 염기서열은 GAPDH (sense: CCCACTA ACATCAAATGGGG, antisense: ACACA TTGGGGGTAGG AACA, MMP-3 (sense: TAGCAGGTTA TCC TAAAAGCA, antisense: CCA-GCTATTGCTCTTCA AT)와 같다. Tris-acetate ethylenediaminetetra acetic acid (TAE) buffer를 이용하여 1.5% agarose gel에 전기영동 시켜 ethidium bromide에 염색한 후 수세하고 UV를 조사하여 DNA band를 확인하였고 Gel Logic 100 Imaging System (Kodak, USA)을 이용하여 발현량을 수치화하여 통계처리 하였다.

8. Zymography 분석

MMPs의 기질인 gelatin을 SDS-PAGE의 gel에 첨가한 후 reducing 조건에서 전기영동하고 완충용액을 이용하여 재 변성 시킨 후, 염색용액으로 염색시킨 다음 메탄올에 탈색시킨 투명한 band를 관찰하여 MMP-2 및 MMP-9 기질

활성을 측정 하였다.

9. 자료 분석

통계적 분석은 SPSS 14.0 for windows (SPSS Inc., USA)를 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 이용하였고 각 그룹간의 차이 검증은 Duncan's 다중비교 분석을 이용하여 사후분석을 실시하였다. 통계적 유의성 검정은 $\alpha=0.001$ 에서 실시하였다.

결 과

1. 피부주름 양상비교

피부주름을 Visioline으로 분석한 결과 대조군(Fig. 1b)은 정상군(Fig. 1a)과 비교할 때 주름 능선의 두께가 굵고 간격

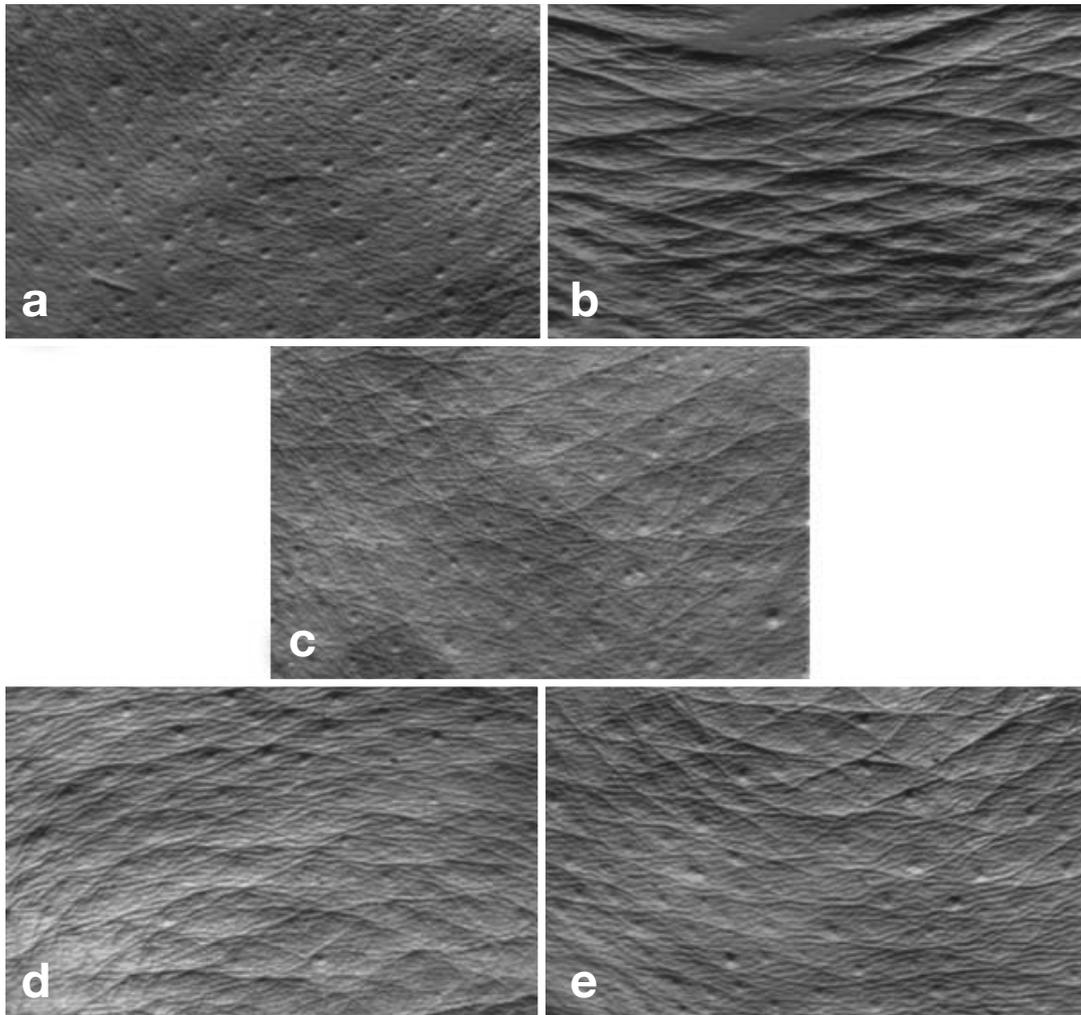


Fig. 1. Comparison in replica images of SHR-1 hairless mice after 5-week application of test compounds. a: no UVB irradiation group. b: UVB irradiation+saline treatment group. c: UVB irradiation+0.01% retinoic acid treatment group. d: UVB irradiation+nude pack (containing 1% black tea) treatment group. e: UVB irradiation+nude pack (containing 2% black tea) treatment group.

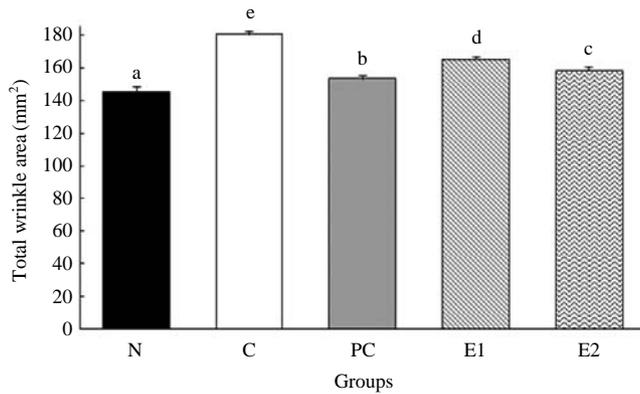


Fig. 2. Comparison in total wrinkle area of SKH-1 hairless mice skin after 5-week application of test compounds. Values are mean \pm SD of 8 mice. N: no UVB irradiation group. Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.001$) by ANOVA and Duncan's multiple range tests.

이 넓으며 주름이 깊게 나타난 반면, 양성대조군(Fig. 1c)과 홍차함유 nude팩 도포군(Fig. 1d, e)은 상대적으로 주름 형성의 두께가 얇고 간격이 좁으며 주름이 얇게 형성되어 있었다(Fig. 1). 주름의 총 넓이는 대조군($180.64 \pm 2.30 \text{ mm}^2$)이 정상군($145.03 \pm 3.74 \text{ mm}^2$)에 비해 25.1% 유의하게 ($p < 0.001$) 넓었으며 양성대조군($153.29 \pm 2.23 \text{ mm}^2$), 1%, 2% 홍차함유 nude팩 도포군(1%: $165.53 \pm 1.93 \text{ mm}^2$, 2%: $158.94 \pm 1.89 \text{ mm}^2$)은 대조군에 비해 각각 15.1%, 8.4%, 12.0% 유의하게 ($p < 0.001$) 좁았다(Fig. 2).

2. 피부의 조직학적 관찰

1) Masson's trichrome 염색 관찰

진피내 교원질의 양과 형태를 관찰한 결과 대조군(Fig. 3b)은 교원섬유가 파괴되어 배열이 불규칙적이고 양도 많이 줄

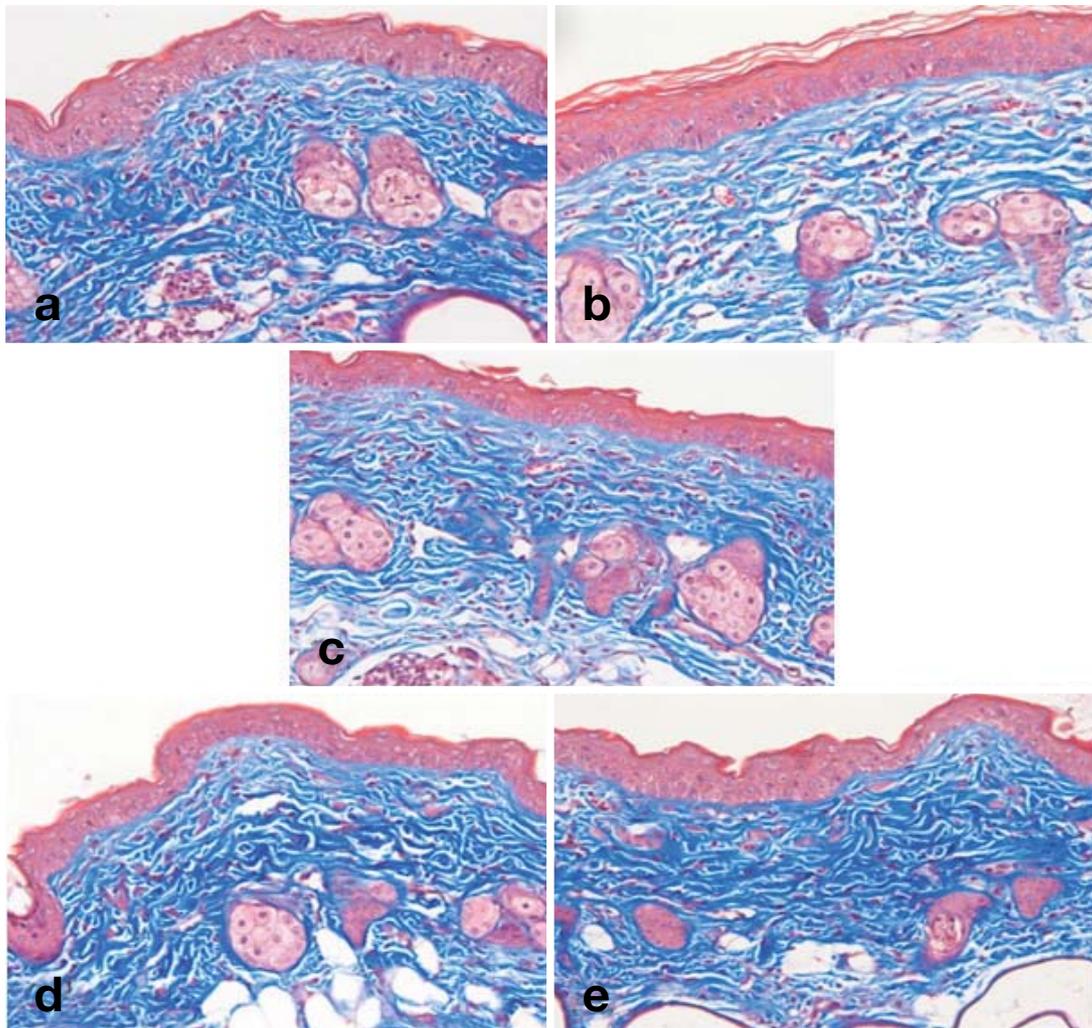


Fig. 3. Histological observation on SKH-1 hairless mouse skin after 5-week application of test compounds. Masson's trichrome stain, $\times 200$. a: no UVB irradiation group. b: UVB irradiation+saline treatment group. c: UVB irradiation+0.01% retinoic acid treatment group. d: UVB irradiation+nude pack (containing 1% black tea) treatment group. e: UVB irradiation+nude pack (containing 2% black tea) treatment group.

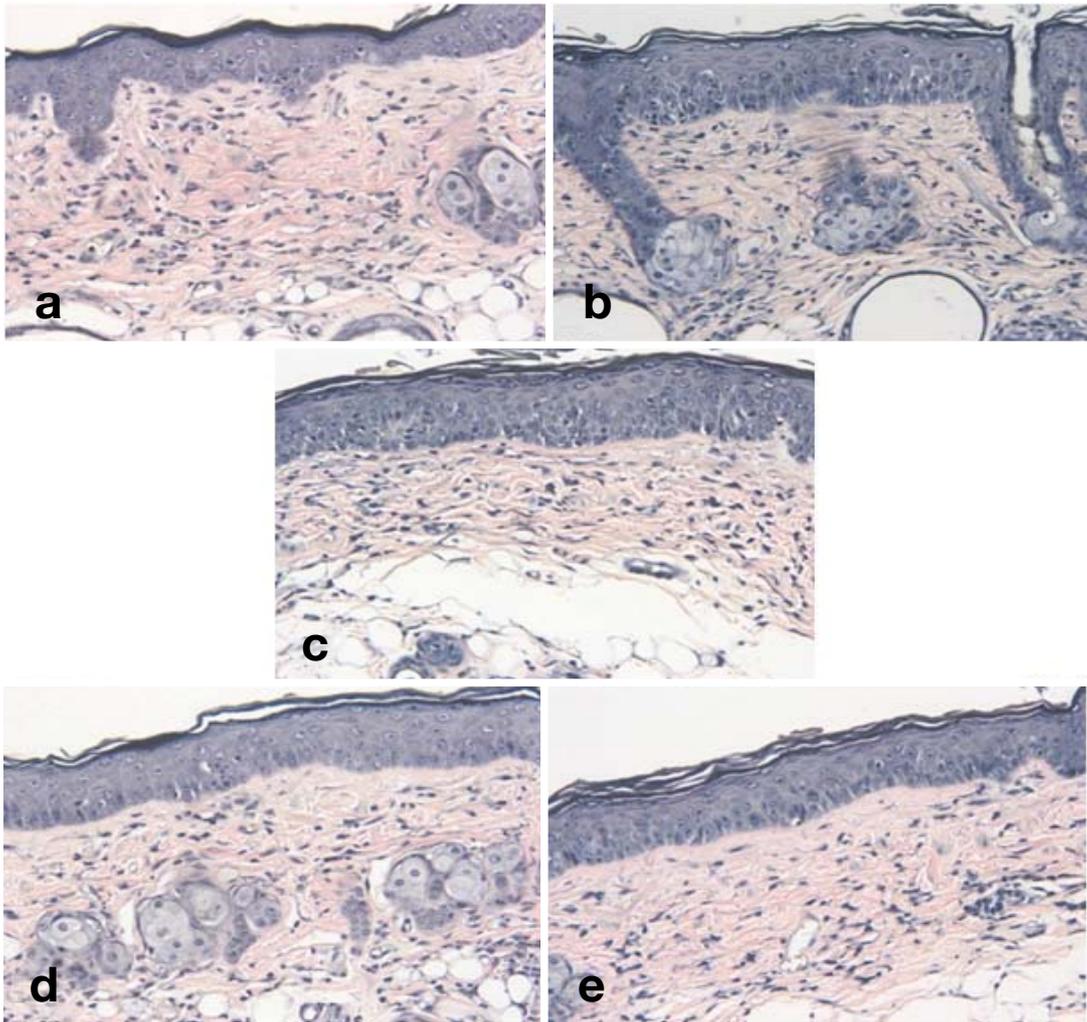


Fig. 4. Histological observation on SKH-1 hairless mouse skin after 5-week application of test compounds. Verhoeff's stain, $\times 200$. a: no UVB irradiation group. b: UVB irradiation+saline treatment group. c: UVB irradiation+0.01% retinoic acid treatment group. d: UVB irradiation+nude pack (containing 1% black tea) treatment group. e: UVB irradiation+nude pack (containing 2% black tea) treatment group.

어 있었다. 반면, 양성대조군(Fig. 3c)과 홍차함유 누드팩 도포군(Fig. 3d, e)은 대조군에 비해 교원섬유의 밀도가 상대적으로 조밀하고 배열이 규칙적으로 나타나 비교적 정상군(Fig. 3a)에 가까운 양상을 보였다. 실험군 간의 비교에서는 2% 홍차함유 누드팩 도포군(Fig. 3e)이 1% 홍차함유 누드팩 도포군(Fig. 3d)에 비해 효과가 양호하게 나타났다(Fig. 3).

2) Verhoeff's 염색 관찰

피부 진피층 내 탄력섬유의 변화, 소실 및 양과 형태를 관찰한 결과 대조군(Fig. 4b)은 변성된 탄력섬유가 군데군데 엉긴 탄력섬유증(fibroelastosis) 소견을 보였다. 반면, 양성대조군(Fig. 4c)과 홍차함유 누드팩 도포군(Fig. 4d, e)은 대조군에 비해 변성된 탄력섬유가 적게 관찰되었다. 실험군 간의 비교에서는 2% 홍차함유 누드팩 도포군(Fig. 4e)이 1% 홍차함유 누드팩 도포군(Fig. 4d)에 비해 효과가 양호하

게 나타났다(Fig. 4).

3. 피부조직의 유전자 발현량 변동

1) Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)

피부조직의 MMP-3 mRNA 발현정도를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 정상군(0.11 ± 0.02)에 비해 대조군(0.87 ± 0.06)은 691.0% 유의하게 ($p < 0.001$) 높았다. 양성대조군(0.27 ± 0.06)과 1%, 2% 홍차함유 누드팩 도포군(1%: 0.36 ± 0.02 , 2%: 0.24 ± 0.05)은 대조군에 비해 각각 69.0%, 58.6%, 72.4% 유의하게 ($p < 0.001$) 낮았다(Fig. 5).

4. 기질금속단백분해효소의 단백질 활성 변동

1) Matrix metalloproteinase-2, -9 (MMP-2, -9)

피부조직에서의 MMP-2와 MMP-9 단백질 활성을 zymog-

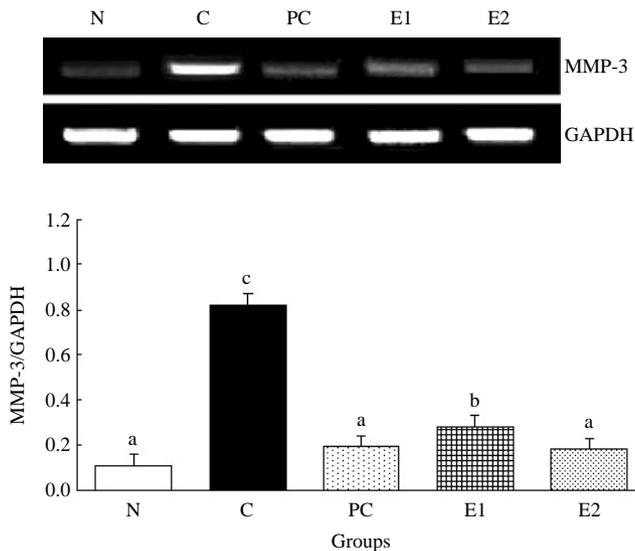


Fig. 5. Comparison in MMP-3 mRNA expression of SKH-1 hairless mice skin after 5-week application of test compounds. Values are mean \pm SD of 5 mice. Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.001$) by ANOVA and Duncan's multiple range tests.

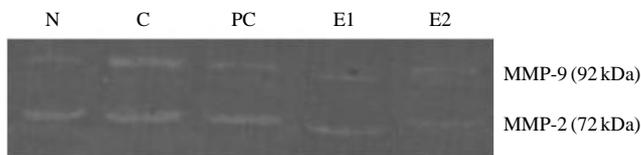


Fig. 6. Comparison in MMP-2 and MMP-9 protein activities of SKH-1 hairless mice skin after 5-week application of test compounds.

raphy를 이용하여 측정된 결과 대조군(C)은 정상군(N)에 비해 현저하게 높았으며, 양성대조군(PC)과 홍차함유 누드팩 도포군(E1, E2)은 대조군에 비해 현저하게 낮게 나타났다(Fig. 6).

고 찰

피부표면을 어떠한 물리적인 자극도 주지 않고 관찰할 수 있는 방법으로 실리콘(silicon)과 에폰수지(Epon resin)를 사용한 모사판 제작 방법이 있다(Rhyu et al., 2010). 이와 같은 방법은 관찰 대상 피부표면에 실리콘을 사용하여 모사판을 만든 후에 이를 다시 에폰수지를 사용해서 양성(positive) 모사판을 제작한 다음 백금 피복하여 주사전자현미경으로 관찰하는 방법으로 인체 피부표면을 세밀하게 관찰할 수 있다. 또한, 피부표면 구조의 의학적 평가나 화장품 등을 사용하였을 때 피부표면의 변화를 정확히 확인할 수 있다(Rhyu et al., 2010).

본 연구에서 hairless 마우스 피부에 실리카를 사용하여

제작된 모사판의 피부주름 양상을 관찰한 결과, 대조군은 주름 능선의 두께가 굵고 간격이 넓으며 주름이 깊게 형성되었고, retinoic acid를 도포한 양성대조군과 홍차함유 누드팩 도포군은 주름 능선의 두께가 얇고 간격이 좁은 양상을 나타냈다. Varani et al. (2001)은 자외선 조사에 의해 증가된 활성산소종(reactive oxygen species)이 각질형성세포(keratinocyte)에 작용하여 염증성 cytokine의 분비를 촉진시켜 진피에 있는 섬유아세포에서 교원질과 탄력소의 생합성 저해 및 분해 촉진을 유발하여 주름형성을 일으키는 것으로 보고하였다. 이를 고려해 볼 때, 홍차함유 누드팩은 자외선으로 조사된 hairless 마우스 표피의 각질형성세포에 긍정적으로 작용함으로써 피부주름 개선 또는 예방에 효과적인 것으로 기대된다.

피부조직의 현미경 관찰 결과, 대조군은 진피층내 교원섬유의 배열이 불규칙하고 양이 많이 줄어들었으며 변성된 탄력섬유가 군데군데 엉겨 있는 탄력섬유증이 관찰되었고, 양성대조군과 홍차함유 누드팩 도포군은 대조군에 비해 상대적으로 교원섬유의 배열이 규칙적이고 밀도가 조밀하며 변성된 탄력섬유의 양이 줄어들었다. 본 연구자는 hairless 마우스에 UVB 조사로 피부노화를 유발시키고 이와 병행하여 제라늄 오일을 도포한 실험에서 제라늄 오일이 교원섬유와 탄력섬유에 긍정적으로 작용하는 것으로 보고한 바 있다(Kim et al., 2008). 피부에 UVB가 조사되면 표피가 비후되고 정상적인 교원질의 구조가 파괴되면서 교원질의 무질서한 배열과 함께 탄력섬유증이 발생하며 글리코사미노글리칸(glycose aminoglycan)이 증가하게 된다(Kligman, 1996).

또한, 교원섬유 다발의 배열은 나이가 들수록 성글고 무질서해지며, 개개의 교원섬유는 두껍고 거칠어지는 양상을 보인다(Han et al., 1998). Han et al. (1998)은 노화가 진행된 피부조직에서 유두진피에 위치한 미세한 탄력섬유가 피부의 기저막대로 수직으로 향하는 소견이 점차 소실되면서 전체적으로 그 수와 직경이 감소하고 미세한 탄력섬유가 오그라들어 말단부가 표피 직하부까지 도달하지 못하는 것을 보고하였으며, 배양된 피부 섬유아세포 및 사람 피부에 자외선을 조사하면 탄력섬유의 발현이 감소된다는 연구보고도 있다(Boyd, 1991).

탄력섬유는 피부를 비롯한 여러 장기에 탄력성을 유지하는 기능을 하는데(Indik et al., 2007), 광노화의 가장 특징적인 조직학적 소견은 진피내에 비정상적인 탄력섬유양 물질(elastotic material)이 축적됨으로써 결과적으로 피부의 탄력성을 감소시킨다. 이러한 조직학적 관찰 결과를 통하여, 홍차함유 누드팩은 교원섬유뿐만 아니라 탄력섬유에도 긍정적인 작용을 하여 피부노화 현상의 하나인 주름을 개선시키는 것으로 해석된다.

피부조직의 MMP-3 유전자 발현 및 MMP-2, -9 활성 분

석결과, 양성대조군과 홍차함유 누드팩 도포군은 긍정적인 효과를 보이는 것으로 나타났다. 본 연구자는 hairless 마우스에 UVB 조사로 피부노화를 유발시키고 이와 병행하여 치자 열수추출물을 870 mg/kg BW/day 양으로 도포한 실험에서 치자 열수추출물이 MMP-3 유전자 발현을 53.7% 억제시켰음을 보고한 바 있다(Hyung et al., 2009). 본 연구에서 도포한 홍차량이 1%: 185 mg/kg BW/day, 2%: 370 mg/kg BW/day임을 감안할 때 홍차함유 누드팩은 MMP-3 유전자 발현 억제에 양호하게 작용하는 것으로 해석된다. MMP는 진피의 교원섬유와 그 외 세포외 기질단백질을 분해하는 역할을 하며 손상된 진피의 불완전한 수복은 세포외 기질을 기능적, 구조적으로 취약하게 하고 결과적으로 주름을 형성시킨다(Svobodova et al., 2003).

피부가 과량의 자외선에 노출되면 MMP-1, -3, -9 유전자 전사가 촉진되며(Fisher et al., 1996), MMP-1이 교원섬유의 중간을 절단하면 MMP-3, MMP-9는 절단된 교원섬유를 세분해서 절단하는 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다(MacNaul et al., 1990). 한편, MMP-3는 stromelysin 1이라고도 불리며, 기저막의 type IV 교원질을 분해하며 zymogen인 proMMP-1을 활성화시키는 역할을 담당하는 것으로도 알려져 있다(Fisher et al., 1996). 세포기질 단백질을 분해하는 효소는 serine proteinase, cysteine proteinase, matrix metalloprotease (MMP) 등이 있고, MMP 계열 중 두 종류의 type IV collagenase인 MMP-2 (72 kDa)와 MMP-9 (92 kDa)은 기저막의 주요성분인 type IV collagen gelatin과 fibronectin을 분해하는 것으로도 알려져 있다(Herron et al., 1986; Adler & Brenner, 1990).

참 고 문 헌

- Adler RR, Brenner CA: Expression of extracellular matrix-degrading metalloproteinase and metalloproteinases inhibitor is developmentally regulated during endoderm differentiation of embryonal carcinoma cells. *Development* 110 : 221-230, 1990.
- Boyd CD: Mammalian tropoelastin: multiple domains of the protein define an evolutionary divergent amino acid sequence. *Matrix* 11 : 235-241, 1991.
- Fisher GJ, Datta S, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S: Molecular basis of sun-induced premature ageing and retinoid antagonism. *Nature* 379 : 335-339, 1996.
- Gary JF, Zengquan W, Subhash CD, James V, Kang SW, Voorhees JJ: Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *New Engl J Med* 337 : 1419-1428, 1997.
- Han KH, Cho KH, Noh DY, Eun HC, Youn JI: Histological changes in the skin with innate ageing. *Kor J Dermatol* 36(6) : 971-980, 1998. (Korean)
- Herron GS, Werb Z, Dwyer K, Banda MJ: Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells I: production of procollagenase and prostromelysin exceeds expression of proteolytic activity. *J Biol Chem* 261 : 2810-2813, 1986.
- Hyung SH, Min KJ, Kim YC: Inhibitory effects of Gardeniae fructus water extract on skin wrinkle formation in hairless mice. *K J Aesth Soc* 7(2) : 123-136, 2009. (Korean)
- Indik X, Yeh H, Orstein-Goldstein N: Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA. *Proc Nat Acad Sci USA* 84 : 5680-5684, 1987.
- Kähäri VM, Fazio MJ, Chen YQ, Bashir MM, Rosenbloom J, Uitto J: Deletion analyses of 5'-flanking region of the human elastin gene. Delineation of functional promoter and regulatory cis-elements. *J Biol Chem* 265 : 9485-9490, 1990.
- Karin SK, Peter B, Jutta W, Gernot H, Weijian M, Lale K: Photoaging of the skin form phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol* 35 : 307-316, 2000.
- Kim MH, Kim MC, Park JS, Kim JW, Lee JO: The antioxidative effects of the water-soluble extracts of plants used as tea materials. *Kor J Food Sci Technol* 33(1) : 12-18, 2001. (Korean)
- Kim YC, Min KJ, Choi OS: The effects of Geranium oil on the inhibition of skin aging in hairless mice (II). *J Kor Soc Cosmetol* 14(2) : 504-513, 2008. (Korean)
- Kligman LH: The hairless mouse model for photoaging. *Clin Exp Dermatol* 14 : 183-195, 1996.
- Leung LK, Su Y, Chen R, Zhang Z, Huang Y, Chen ZY: Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *J Nutr* 131 : 2248-2251, 2001.
- MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI: Discoordinate expression of stromelysin collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts: synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression. *J Biol Chem* 265(28) : 17238-17245, 1990.
- Obanda PM, Owuor P, Magoka R: Changes in the chemical and sensory quality parameters of black tea due to variations of fermentation time and temperature. *J Agri Food Chem* 75 : 395-404, 2001.
- Obanda PM, Owuor P, Magoka R, Kavoi MM: Changes in thearubigin fractions and theaflavin levels due to variations in processing conditions and their influence on black tea liquor brightness and total colour. *J Agri Food Chem* 85 : 163-173, 2004.
- Park SK, Hong SK, Kim HJ, Kim BY, Kim TG, Kang JS: Cosmetic effect of Angelica gigas Nakai root extracts. *Kor J Chem Engineer* 47(5) : 553-557, 2009. (Korean)
- Rhyu YS, Chung YJ, Uhm CS: Scanning electron microscopic observation of human skin replica. *Korean J Microscopy* 40(4) : 267-270, 2010. (Korean)
- Seite S, Zucchi H, Septier D, Igondjo-Tchen S, Senni K, Godeau G: Elastin change during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20(8) : 980-987, 2006.

- Seo JY, Jo KH, En HC, Jung JH: Skin aging from phenotype to mechanisms. *Kor J Invest Dermatol* 8(4) : 187-194, 2001.
- Shinji I, Yukiko M, Satoshi A, Keiko T, Kouji K, Makoto T: Possible involvement of gelatinase in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. *J Invest Dermatol* 120 : 1-7, 2003.
- Steinhoff M, Griffiths CEM, Church MK, Luger TA: Inflammation. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, ed, *Rook's Textbook of Dermatology*, pp. 154-165, Blackwell Science, Oxford, 2004.
- Svobodova A, Psotova J, Walterova D: Natural phenolica in the prevention of UV-induced skin damage. *Biom Papers* 147(2) : 137-145, 2003.
- Varani J, Spearman D, Perone P, Fligiel SE, Datta SC, Wang ZQ: Inhibition of type 1 procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am J Pathol* 158 : 931-942, 2001.
- Wlaschek M, Tancheva-poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z: Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. *Clin Exp Dermatol* 26 : 592-599, 2001.

< 국문 초록 >

홍차함유 누드팩의 피부주름 형성 억제효과를 알아보기 위해

SKH-1 hairless 마우스 등 부위에 UVB를 5주간 조사하여 주름을 유발시키고 이와 병행하여 홍차함유 누드팩을 도포한 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다. (1) 육안적인 피부주름 양상 비교에서, 대조군은 정상군에 비해 주름 능선의 두께가 굵고 간격이 넓으며 주름이 깊게 형성된 반면, retinoic acid를 도포한 양성대조군과 홍차함유 누드팩 도포군은 대조군에 비해 상대적으로 주름 능선의 두께가 얇고 간격이 좁은 양상을 띠었으며 주름 총 넓이 수치가 유의하게 ($p < 0.001$) 낮았다. (2) 피부의 조직학적 관찰에서, 대조군은 정상군에 비해 진피층내 교원섬유의 배열이 불규칙하고 양이 많이 줄어들었으며 변성된 탄력섬유가 군데군데 엉겨 있는 탄력섬유증이 관찰된 반면, 양성대조군과 홍차함유 누드팩 도포군은 대조군에 비해 상대적으로 교원섬유의 배열이 규칙적이고 밀도가 조밀하며 변성된 탄력섬유의 양이 줄어들었다. (3) 피부조직의 MMP-3 mRNA 발현량 측정 결과, 정상군에 비해 대조군은 유의하게 ($p < 0.001$) 높았으며 양성대조군과 홍차함유 누드팩 도포군은 대조군에 비해 유의하게 ($p < 0.001$) 낮았다. MMP-2와 MMP-9 단백질 활성 측정 결과, 대조군은 정상군에 비해 현저하게 높은 반면, 양성대조군과 홍차함유 누드팩 도포군은 대조군보다 현저하게 낮게 나타났다. 본 연구를 통하여, 홍차함유 누드팩 도포군은 hairless 마우스에서 세포외 기질단백질의 분해 억제와 피부주름 형성 억제효과를 보였음을 확인하였다.