

## 赤何首烏의 UVB로 자극한 피부 각질세포 보호 작용

대전대학교 한의과대학 한방부인과 교실

이승아, 유동열

### ABSTRACT

#### Protective Effect of Polygonum Multiflorum on Cell Damage in UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes

Seung-Ah Lee, 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 Polygonum multiflorum(PM) on UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes damage.

**Methods:** The protective effects of Polygonum multiflorum(PM) were determined by UVB-irradiated HaCaT assay. We assessed protective effects of Polygonum multiflorum(PM) on LDH release and nitrite production from HaCaT. COX-2, Bcl-2, Bax, TNF $\alpha$ , c-jun, c-fos, NF- $\kappa$ B, iNOS, Bcl-xL gene expression were determined in HaCaT using real-time PCR method.

#### Results:

1. PM inhibited LDH Release in UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.
2. PM inhibited Nitrite Production in UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.
3. PM suppressed the Gene Expression of COX-2 in UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.
4. PM increased the Gene Expression of Bcl-2 in UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.
5. PM didn't increase the Gene Expression of Bax in UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.
6. PM suppressed the Gene Expression of TNF $\alpha$  in UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.
7. PM suppressed the Gene Expression of c-jun in UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.
8. PM suppressed the Gene Expression of c-fos in UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.
9. PM suppressed the Gene Expression of NF- $\kappa$ B in UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.
10. PM suppressed the Gene Expression of i-NOS in UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.
11. PM didn't increase the Gene Expression of Bcl-xL in UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes

**Conclusions:** In conclusion, these results suggest that PM inhibited the cell damage in UVB-irradiated HaCaT.

**Key Words:** Polygonum multiflorum(PM), HaCaT Keratinocytes, LDH, nitrite, COX-2

## I. 서 론

현대인들은 산업화로 인한 환경오염과 과중한 업무스트레스에 시달리고 있다. 그래서 요즘 한창 “웰빙(Well-Being)”이란 단어가 온갖 산업에서 메가 트렌드가 되었다. 정신적·육체적인 건강함을 삶의 최우선 가치로 꼽는 웰빙은 한발 더 나아가 건강한 아름다움을 지향하는 “웰루킹(Well-looking)”으로 새로운 트렌드의 중심이 되고 있으며, 그에 따라 피부나 건강관리, 노화방지, 미용 같은 분야에 관심이 집중되고 있다<sup>1)</sup>. 또한 현대인의 피부는 여가 생활을 중요시하는 가치관의 변화로 인한 야외활동의 증가와, 오존층의 파괴와 같은 지구환경 변화로 인해 더 많은 자외선에 노출되고 있다<sup>2)</sup>.

만성적으로 자외선에 노출되게 되면 피부표면이 거칠어지고 얼룩이 지며 깊은 주름살이 형성되고 피부탄력이 현저하게 감소하고, 표피의 두께는 증가하고 표피세포들은 비정상적으로 변화 된다<sup>3,4)</sup>.

자외선은 그 파장에 따라 UVA, UVB, UVC로 나눌 수 있는데 이 중 UVB는 290-320 nm의 파장으로 주로 표피에 영향을 주어 피부손상을 일으킨다<sup>5)</sup>. 피부표면의 대부분은 각질세포(keratinocyte)로 구성되어 있는데 이 각질세포는 피부에 각질층을 형성하여 피부에 들어오는 세균이나 화학물질의 침투에 대해 방어벽을 이루고 외부 온도변화에 대해서 완충대 역할을 하며 수분조절 효과 및 미생물 증식을 억제 한다<sup>6)</sup>. 이런 각질세포가 UVB에 직접적으로 노출되면 가장 많은 영향을 받게 되는데, 자외선에 노출된 피부에서는 다양한 경로를 통해 활

성산소종(ROS, Reaction Oxygen Species)이 생성되며, 과도하게 생성된 활성 산소는 피부에 산화적 스트레스를 초래하게 되고 궁극적으로 피부노화와 홍반, 부종 등의 피부염증을 유발하고, 심하면 피부암으로 진행 된다<sup>7)</sup>. 산화적 스트레스를 유발하는 활성산소종은 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등이 있는데, 이들은 세포내 산소호흡과정에서 NADPH cytochrome P450 reductase, NADPH oxidase, lipoxygenase 등에 의해 생성되며, 대부분 생체방어 기전에 의해 제거 된다<sup>8,9)</sup>. 그러나, 자외선에 의해 급격히 증가된 활성산소종은 세포조직에 손상을 주어 피부의 면역기능을 억제 시키며, 염증유발, 탄력감소, 기미 등 각종 피부질환과 피부노화를 유발하는 원인이 된다<sup>10)</sup>.

한의학에서는 ‘피부는 五臟六腑의 거울’이라고 하여 피부의 문제를 단순히 피부에서만 생각하는 것이 아니라 피부의 상태는 五臟六腑, 氣, 血과 밀접한 관계가 있다고 생각 한다<sup>1)</sup>.

赤何首烏(Polygonum multiflorum Thunberg)는 蓼科(Polygonaceae)에 속한 多年生蔓草의 塊根으로, 性은 溫 無毒하고, 味는 苦甘澀하며 歸經은 肝, 心, 腎 三經에 入하고, 補肝, 益腎, 養血, 祛風의 효능이 있어 임상에서 肝腎陰虧로 인해 발생하는 각종 질환에 사용되고 있다<sup>11)</sup>.

최근 피부미용과 노화방지에 대한 관심에 따라 한방에서도 단일 약재나 처방을 그와 접목 시키려는 연구가 진행, 발표되고 있는데, 이 등<sup>12)</sup>은 黃芪가 자외선에 의한 세포 손상을 막는 보호효과가 있다고 보고하였으며, 김 등<sup>13)</sup>은 蒲公英

추출물이, 임<sup>14)</sup>은 黃芩이 피부 각질세포 보호효과가 있음을 보고하였고, 송 등<sup>15)</sup>은 적하수오가 멜라닌 생성 억제효과가 있음을 보고하였으나, 인체 피부세포에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

이에 저자는 補肝, 益腎, 養血의 효능이 있는 적하수오 추출물을 이용하여 UVB 조사에 의한 피부각질세포의 상해작용에 미치는 영향에 대해서 평가하고자, 사람의 각질세포인 HaCaT를 자외선 처리하여 LDH 유리, NO 생성을 측정하였으며, COX-2, Bcl-2, Bax, TNF- $\alpha$ , c-jun, c-fos, NF- $\kappa$ B, iNOS, Bcl-xL의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 재 료

#### 1) 약 물

실험에 사용한 적하수오(Polygonum multiflorum THUNB.)는 전북 완주군 소양면에서 구입한 것(12년근)을 정선하여 사용하였다.

#### 2) 세 포

실험에 사용된 인간 피부 각질세포주인 HaCaT keratinocyte(이하 HaCaT 세포로 칭함)는 Dr. Fusenig(German Cancer Research Center, DKFZ, Heidelberg, Germany)로부터 분양 받아 사용하였다.

### 2. 방 법

#### 1) 시료 추출 및 검액 조제

건조된 적하수오 분말 100 g에 30% EtOH 2 L를 가하고 수욕상에서 4 시간 이상 환류 추출하여 얻어진 추출물을 여

과한 다음, 감압 농축하고 동결 건조하여 추출분말 약 12 g 을 얻었다. 실험 시에는 적하수오 추출물(이하 PM라 함)을 DMSO를 이용하여 배지에 녹인 후, pore size 0.45  $\mu$ m의 여과지를 통과시킨 후 사용하였다.

#### 2) HaCaT 세포 배양

HaCaT 세포는 앞에서 나온 말한 바와 같이 Dr. Fusenig(German Cancer Research Center, DKFZ, Heidelberg, Germany)로부터 분양 받아 사용하였다. 세포는 DMEM에 10% FBS, 10% penicillin-streptomycin(100 unit/ml, 100  $\mu$ g/ml)이 첨가된 배지로 CO<sub>2</sub> incubator로(37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air) 배양하였다. 세포 분주를 위해서는 0.25% trypsin-EDTA를 사용하였으며, 96 well, 24 well에서는 1 $\times$ 10<sup>5</sup>/well, 6 well에서는 1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml의 세포를 가하여 overnight 배양한 후 실험에 사용하였다.

#### 3) 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 조사하게 전에 1시간 동안 약물을 농도별로 200  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml 가하여 미리 배양하였다. 자외선을 조사하기 위하여 DMEM 배지를 제거한 다음, PBS로 2번 씻어낸 후 UVB 파장의 자외선을 30 mJ/cm<sup>2</sup> 이 되도록 조사하였다. 자외선을 조사한 다음 PBS로 한 번 씻어낸 후, 약물이 농도별로 함유된 새로운 DMEM 배지를 넣고 일정 시간동안 배양한 후 실험에 사용하였다.

#### 4) 피부 각질세포에 미치는 영향 측정

##### (1) LDH 유리능 측정

세포는 앞에서 기술한 바와 같이 96 well plate를 이용하여 24시간 동안 미리 배양한 후, 1시간 동안 약물을 함유한 배지로 전처리를 하였으며, 세포는 well plate당  $1 \times 10^4$ 씩 넣었다. 배양액을 제거한 다음 각 well plate에 50  $\mu$ l의 PBS (phosphate buffered saline)를 넣은 다음, 세포에 UVB를 30 mJ/cm<sup>2</sup>를 조사한 후 PBS를 제거하고 well plate당 약물이 포함된 200  $\mu$ l의 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 상층액을 취하였다. NaNO<sub>2</sub> 용액의 연속적인 희석액을 만들어 최종농도가 0.05  $\mu$ M가 되도록 조절하였다. 먼저 얻은 NaNO<sub>2</sub> 희석액에 동량의 Greiss reagent solution을 넣고, 15분간 상온에 방치한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5) 유전자 발현에 대한 영향

##### (1) 총 RNA 분리

배양하고 있는 HaCaT 세포에 1 ml TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA 용액에 200  $\mu$ l의 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1)을 넣고 강하게 섞은 후 14,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액 500  $\mu$ l을 분리하였다. 0.5 ml

isopropyl alcohol을 여기에 가하여 -20°C에서 하룻밤 RNA를 침전시킨 후 1,400 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상등액을 버리고 70% ethanol로 세척하고 자연 건조시켰다. RNase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase-free DNase를 첨가하고 -70°C에서 저장하였다.

##### (2) cDNA 제조

대조군 및 시험군에서 각각 분리한 total RNA 액 1  $\mu$ l에 (1  $\mu$ l RNA 함유)에 oligo dT (농도 100 pmol) 1  $\mu$ l, RNase free water 3  $\mu$ l을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 65°C에서 10분간 incubation 하였다. primer가 annealing 하도록 4°C에서 약 5분간 방치한 다음, Reverse transcriptase buffer, dNTP (각 2.5 mM), RNase inhibitor, DTT (100 nM), Reverse transcriptase (M-MLV 200 U/ $\mu$ l)을 첨가한 후, 아주 조심스럽게 혼합하였다. 이 후, 42°C에서 90분간 incubation 한 후, 95°C에서 5분간 처리한 후 사용하였다.

##### (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 MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, pH 8.3), 1 mM dNTP (Biotools, 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 25  $\mu$ l에 10 $\times$  PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 pmole의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA와 1.25 unit의 Taq polymerase(Biotools, Spain)을 넣어 PCR을 시행하였다.

Procollagen 1  $\alpha 2$  (PCol 1 $\alpha 2$ )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. COX-2의 sense primer는 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 $\alpha$ 의 sense primer는 TGC ACC ACA GTT TAA ACC CA이었으며, antisense는 GAC TCC TTC AGG TGC TCA GG 이었다. NF- $\kappa$ 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 ACTCTGCTCAGTTTCGCCCT을 사용하였으며, antisense는 TTGTGGCTC AGATAGGCAC이었다. Bax의 sense primer

는 ATGGACGGGTCCGGGGAGCA이었으며, antisense primer는 TGTTACTGTCCAG TTCGTCC를 사용하였다. Bcl-XL의 sense primer는 ATGTCTCAGAGC AACCGG이었으며, antisense는 -TCTTTCGGAC TGAAGAGTG를 사용하였다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA이었으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다

PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C 4분, 30 cycles의 [94 $^{\circ}$ C (20초), 54 $^{\circ}$ C (20초), 72 $^{\circ}$ C (30초)], 72 $^{\circ}$ C 10분이었다. 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동 하였다. 전기영동 결과 얻어진 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer(Perkin Elmer)를 이용하여 분석하였다.

#### (4) RT-PCR

Real time PCR에 사용한 primer는 다음과 같다. Procollagen 1  $\alpha 2$  (PCol 1 $\alpha 2$ )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. COX-2의 sense primer는 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 GGC 를 사용하였다. TNF $\alpha$  의 sense primer는 TGC ACC ACA GTT TAA ACC CA이였으며, antisense는 GAC TCC TTC AGG TGC TCA GG 이었다. NF- $\kappa$ B2 의 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-2 의 sense primer는 ACTCT GCTCAGTTTCGCCCT을 사용하였으며 antisense는 TTGTGGCTCAGATAGGCAC 이었다. Bax의 sense primer는 ATGG ACGGGTCCGGGGAGCA이였으며, antisense primer는 TGTTACTGTCCAG TTCGTCC를 사용하였다. Bcl-XL의 sense primer 는 ATGTCTCAGAGC AACCGG 이였으며, antisense는 -TCTTTCCGAC TGAAGAGTG를 사용하였다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer 는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA이였으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. 각각의 optical tube에 3배의 SyberGreen Mix 2.5  $\mu$ l, 위에서 합성한 cDNA 1  $\mu$ l, 10 pmol/ $\mu$ l primer pair mix 1  $\mu$ l, 각각 2.5 mM의 dNTP 2  $\mu$ l, 10 $\times$ Tag polymerase buffer 2.5  $\mu$ l, Tag Polymerase 0.3  $\mu$ l, 14.7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O를 넣고, 95 $^{\circ}$ C 5분 1 cycle, 95 $^{\circ}$ C 30초, 45 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 60초 40 cycles,

95 $^{\circ}$ C 20분 1 cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5  $\mu$ l 를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정하였으며, SDS 7,000 software를 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다.

### 3. 통계처리

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

## III. 실험성적

### 1. UVB에 의한 피부 각질세포에 미치는 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 조사시에 세포로부터 LDH의 유리가 증가하였다. 또한, PM를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비해 LDH의 유리를 억제하여, UVB에 의한 세포 상해를 억제하는 작용을 나타내었다(Fig. 1).

#### 2) Nitrite 생성에 미치는 영향

UVB에 의한 피부 각질 세포의 산화적 스트레스를 측정하기 위하여, HaCaT 세포에 UVB를 조사한 후 생성되는 nitrite를 측정하였다. 실험결과, UVB 조사시에 세포에서 생성되는 nitrite 양이 증가하였다. 또한, PM를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비해 nitrite 생성을 억제하여, UVB에 의한 산화적 스트레스를 억제하는 작용을 나타내었다(Fig. 2).

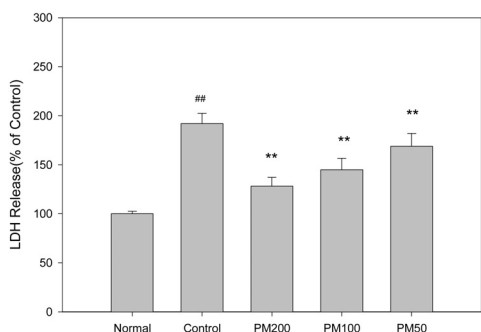


Fig. 1. Effect of PM on the LDH Release of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes. Cells were UVB-irradiated(30 mJ/cm<sup>2</sup>) and further incubated with PM. The LDH released in media was measured. The results are expressed as mean ± SE.

PM : Polygonum multiflorum  
 Normal : non treated group  
 Control : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>)  
 PM200 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(200 μg/ml)  
 PM100 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(100 μg/ml)  
 PM50 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(50 μg/ml)  
<sup>##</sup> : p<0.01 vs Normal  
<sup>\*\*</sup> : P<0.01 vs Control

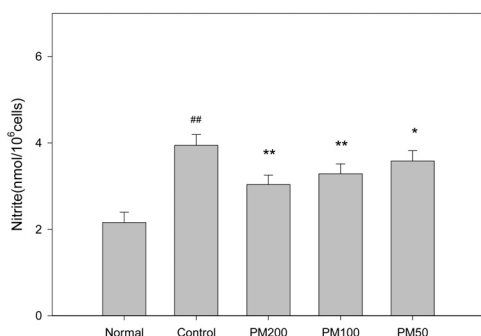


Fig. 2. Effect of PM on the Nitrite Production of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

Cells were UVB-irradiated(30 mJ/cm<sup>2</sup>) and further incubated with PM. The results are expressed as mean ± SE.  
 PM : Polygonum multiflorum  
 Normal : non treated group  
 Control : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>)  
 PM200 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(200 μg/ml)  
 PM100 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(100 μg/ml)  
 PM50 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(50 μg/ml)  
<sup>##</sup> : p<0.01 vs Normal  
<sup>\*\*</sup> : P<0.01 vs Control  
<sup>\*</sup> : P<0.05 vs Control

## 2. UVB에 의한 피부 각질세포의 유전자 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, PM을 200 μg/ml 농도로 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비해 COX-2 유전자 발현을 억제하여, UVB에 의한 PGE2 생성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

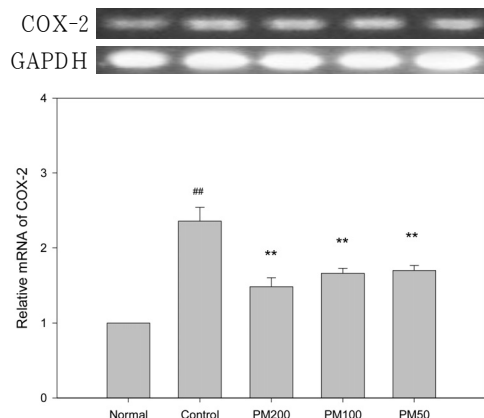


Fig. 3. Effect of PM on the COX-2 Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

PM : Polygonum multiflorum  
 Normal : non treated group  
 Control : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>)  
 PM200 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(200 μg/ml)  
 PM100 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(100 μg/ml)  
 PM50 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(50 μg/ml)  
<sup>##</sup> : p<0.01 vs Normal  
<sup>\*\*</sup> : P<0.01 vs Control

### 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. 실험결과, UVB 조사시에 세포에서 생성되는 Bcl-2의 mRNA의 생성이 약간 감소하였다. 또한, PM을 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에서 감소한 Bcl-2 유전자 발현을 증가시켜, UVB에 의한 세포 사멸에 저항성을 가지는 것으로 나타났다 (Fig. 4).

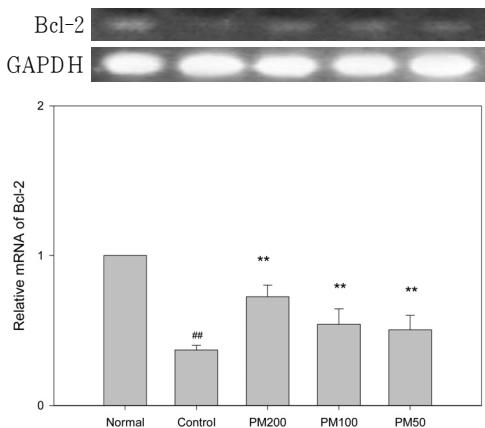


Fig. 4. Effect of PM on the Bcl-2 Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

PM : Polygonum multiflorum  
 Normal : non treated group  
 Control : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>)  
 PM200 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(200 µg/ml)  
 PM100 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(100 µg/ml)  
 PM50 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(50 µg/ml)  
 ## : p<0.01 vs Normal  
 \*\* : P<0.01 vs Control

3) Bax 유전자 발현에 미치는 영향

Bcl family 유전자들은 산화적 스트레스를 비롯한 세포 사멸을 억제하는 작용을 나타내는 antiapoptosis 작용을 나타낸다. 이중 Bax 유전자는 UVB에 의해 정상에 비해 감소하는 것으로 보고되었다. 실험결과, UVB 조사 시에 세포에서 생성되는 Bax의 mRNA의 생성이 감소

하였다. 또한, PM를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비해 Bax 유전자 발현에 영향을 주지 못했다(Fig. 5).

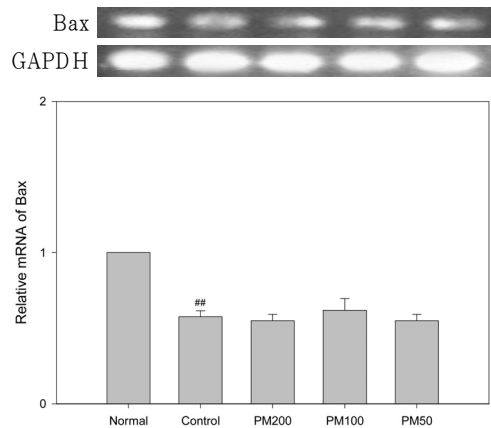


Fig. 5. Effect of PM on the Bax Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

PM : Polygonum multiflorum  
 Normal : non treated group  
 Control : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>)  
 PM200 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(200 µg/ml)  
 PM100 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(100 µg/ml)  
 PM50 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(50 µg/ml)  
 ## : p<0.01 vs Normal

4) TNFα 유전자 발현에 미치는 영향

Keratinocyte에서 분비한 IL-1과 TNFα는 fibroblast에 작용하여 MMP-1등 collagen을 분해하는 효소들의 발현을 촉진한다. 실험결과, UVB 조사 시에 세포에서 생성되는 TNFα의 mRNA의 생성이 증가하였다. 또한, PM를 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에서 증가한 TNFα 유전자 발현을 감소시켜, UVB에 의한 Keratinocyte 작용을 간접적으로 억제할 수 있을 것으로 나타났다(Fig. 6).



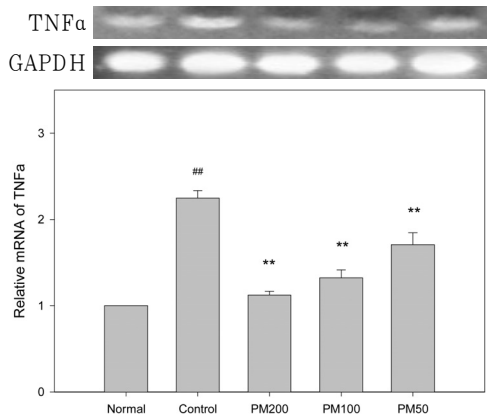


Fig. 6. Effect of PM on the TNFα Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

PM : Polygonum multiflorum  
 Normal : non treated group  
 Control : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>)  
 PM200 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(200 ug/ml)  
 PM100 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(100 ug/ml)  
 PM50 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(50 ug/ml)  
<sup>#</sup> : p<0.01 vs Normal  
<sup>\*\*</sup> : P<0.01 vs Control

5) c-jun 유전자 발현에 미치는 영향  
 c-jun은 MMP 등의 단백질 발현에 관여하는 신호전달 단백질 전사인자이다. 실험결과, UVB 조사시에 세포에서 생성되는 c-jun의 mRNA의 생성이 증가하였다. 또한, PM(200 μg/ml)을 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에서 증가한 c-jun 유전자 발현을 감소시켜, UVB에 의한 Keratinocyte 작용을 간접적으로 억제할 수 있을 것으로 나타났다(Fig. 7).

6) c-fos 유전자 발현에 미치는 영향  
 c-fos는 MMP 등의 단백질 발현에 관여하는 신호전달 단백질 전사인자이다. 실험결과, UVB 조사시에 세포에서 생성되는 c-fos의 mRNA의 생성이 증가하였다. 또한, PM을 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에서 증가한 c-fos 유전자 발현을 감소시켜, UVB에 의한 Fibroblast 작용을 간접적으로 억제할 수 있을 것으

로 나타났다(Fig. 8).

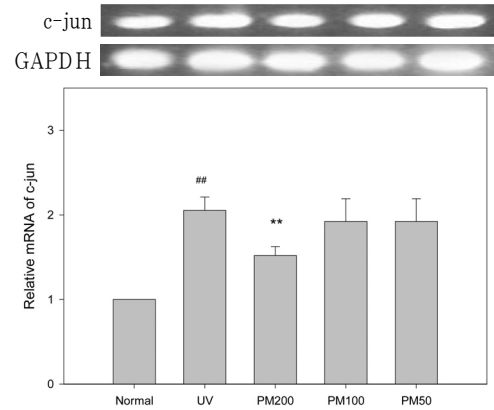


Fig. 7. Effect of PM on the c-jun Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

PM : Polygonum multiflorum  
 Normal : non treated group  
 Control : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>)  
 PM200 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(200 μg/ml)  
 PM100 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(100 μg/ml)  
 PM50 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(50 μg/ml)  
<sup>#</sup> : p<0.01 vs Normal  
<sup>\*\*</sup> : P<0.01 vs Control

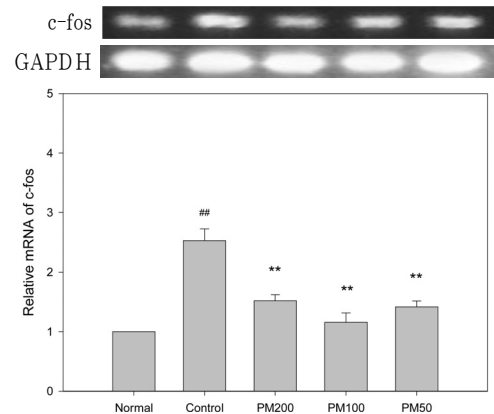


Fig. 8. Effect of PM on the c-fos Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

PM : Polygonum multiflorum  
 Normal : non treated group  
 Control : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>)  
 PM200 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(200 μg/ml)  
 PM100 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(100 μg/ml)  
 PM50 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(50 μg/ml)  
<sup>#</sup> : p<0.01 vs Normal  
<sup>\*\*</sup> : P<0.01 vs Control

7) NF- $\kappa$ B 유전자 발현에 미치는 영향  
 NF- $\kappa$ B 는 MMP 등의 단백질 발현에 관여하는 신호전달 단백질 전사인자이다. 실험결과, UVB 조사 시에 세포에서 생성되는 NF- $\kappa$ B의 mRNA의 생성이 증가하였다. 또한, PM을 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에서 증가한 NF- $\kappa$ B 유전자 발현을 감소시켜, UVB에 의한 keratinocyte 작용을 간접적으로 억제할 수 있을 것으로 나타났다(Fig. 9).

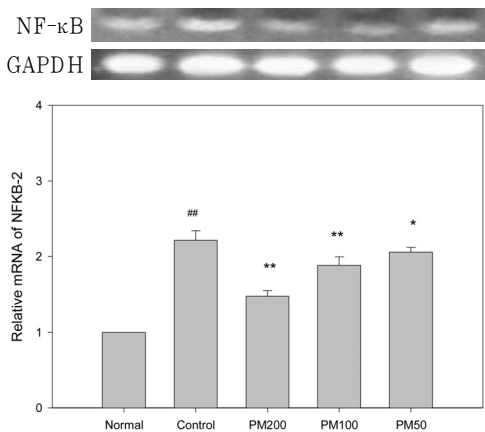


Fig. 9. Effect of PM on the NF- $\kappa$ B Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

PM : Polygonum multiflorum  
 Normal : non treated group  
 Control : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>)  
 PM200 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(200  $\mu$ g/ml)  
 PM100 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(100  $\mu$ g/ml)  
 PM50 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(50  $\mu$ g/ml)  
 ## : p<0.01 vs Normal  
 \*\* : P<0.01 vs Control  
 \* : P<0.05 vs Control

8) iNOS 유전자 발현에 미치는 영향  
 iNOS는 세포 상해를 유발하는 염증반응을 유발하는 유전자이다. 실험결과, UVB 조사 시에 세포에서 생성되는 iNOS의 mRNA의 생성이 증가하였다. 또한, PM을 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군

에서 증가한 iNOS 유전자 발현을 감소시켜, UVB에 의한 keratinocyte 작용을 간접적으로 억제할 수 있을 것으로 나타났다(Fig. 10).

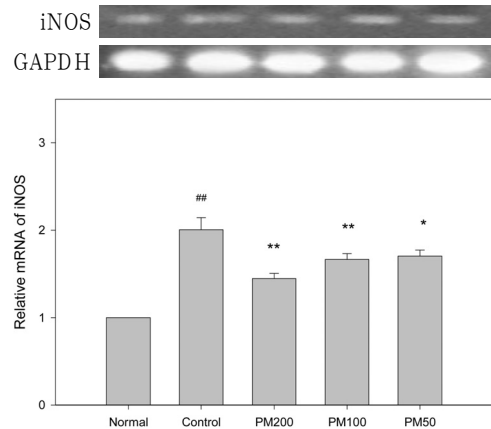


Fig. 10. Effect of PM on the iNOS Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

PM : Polygonum multiflorum  
 Normal : non treated group  
 Control : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>)  
 PM200 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(200  $\mu$ g/ml)  
 PM100 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(100  $\mu$ g/ml)  
 PM50 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(50  $\mu$ g/ml)  
 ## : p<0.01 vs Normal  
 \*\* : P<0.01 vs Control  
 \* : P<0.05 vs Control

9) Bcl-xL 유전자 발현에 미치는 영향  
 Bcl-xL 는 세포 피사를 억제하는 단백질인 Bcl-2 계열의 단백질이다. 실험결과, UVB 조사시에 세포에서 생성되는 Bcl-xL의 mRNA의 생성이 증가하였다. 또한, PM을 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에서 감소한 Bcl-xL 유전자 발현에 영향을 주지 못했다(Fig. 11).

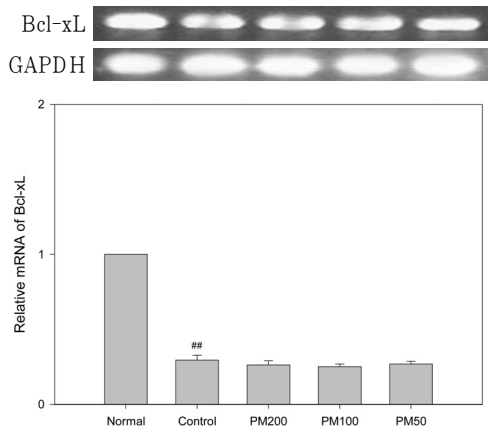


Fig. 11. Effect of PM on the Bcl-xL Gene Expression of UVB-irradiated HaCaT Keratinocytes.

PM : Polygonum multiflorum

Normal : non treated group

Control : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>)

PM200 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(200 μg/ml)

PM100 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(100 μg/ml)

PM50 : UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>) + PM(50 μg/ml)

## : p<0.01 vs Normal

#### IV. 고 찰

요즘 “웰빙(Well-Being)”이란 단어가 온갖 산업에서 메가 트렌드가 되고 있다. 이는 현대인들이 산업화로 인한 환경오염과 과중한 업무스트레스에 시달리고 있기 때문인데 정신적·육체적인 건강함을 삶의 최우선 가치로 꼽는 “웰빙”문화로 인해 스스로에 대한 관심이 증가하고 여가시간이 늘어나 야외활동이 많아졌고 이에 건강한 아름다움을 지향하는 “웰루킹(Well-looking)”이 새로운 트렌드의 중심이 되어 피부나 건강관리, 노화방지, 미용 같은 분야에 관심이 집중되고 있다<sup>1)</sup>.

자외선에 피부가 노출되면 산화적 스트레스를 유발하고, 이로 인해 피부세포 사멸과정이 진행되어 피부노화가 촉진된

다고 알려져 있다. 자외선은 일차적으로 피부 표면에 존재하는 각질세포에 작용하여 활성산소의 생성을 자극하며 피부세포의 사멸을 촉진한다. 자외선은 다양한 세포자극물질을 유리시켜 멜라닌 생성 기전을 자극하여 피부를 보호하는 작용을 하기도 하고, 노출이 과도할 경우에는 피부의 병적현상을 유발하기도 한다. 진피까지 침투한 자외선은 collagen의 파괴를 촉진하거나 섬유아세포에서 collagen 합성을 억제하여 피부두께를 얇게 하여 주름살을 생성시킨다<sup>16)</sup>. 이러한 자외선의 피부에 대한 상해 작용은 keratinocyte, dermal fibroblast, melanocyte에 직접적으로 작용하여 나타날 수 있다. 그러나 UV에 대한 피부 보호 작용과 병리적 세포반응에 이들 세포들이 사이토카인을 분비하여 상호 조절하기도 한다<sup>17-19)</sup>.

피부가 자외선에 노출되면 피부 표면의 각질세포에서 활성산소종(ROS, reaction oxygen species)이 생성된다. 활성산소종에는 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등이 있는데, 세포에 독성을 유발하는 화학물질에 의해 생성되거나 면역세포에서 외부로 부터 침입한 항원물질에 의해 생성된다. 이들은 정상적인 세포내 산소호흡과정에서도 발생하는데, 여기에는 NADPH cytochrome P450 reductase, NADPH oxidase, lipoxxygenase 등이 관여 한다<sup>9,10)</sup>. 생체내에서는 이들의 작용을 억제하여 세포를 보호하기 위한 방어수단으로 SOD(superoxide dismutase), catalase, GSH-PX(glutathione peroxidase) 등이 활성화되어 있다<sup>21-23)</sup>. 그러나 자외선과 같은 세포독성을 유발하는 인자에 노출된 세포에서는 급격한 활성산소종의

증가가 나타나며, 이와 병행하여 세포의 사멸이 증가하게 된다.

이외에도 자외선은 세포내 신호전달체인 MAPK(mitogen activated protein kinase), PKC(protein kinase C)의 활성화와 AP-1, NF-kB등의 전사인자(transcription factors) 활성화를 통해 세포의 단백질 발현에 영향을 준다<sup>11)</sup>. Keratinocyte에서 유리되는 TGFβ, PGE2, α-MSH는 UV에 의해 증가하며, 이들은 melanocyte를 활성화시켜 melanin 생합성을 증가 시킨다<sup>12,17)</sup>. 또한, 자외선에 의해 피부 각질세포로부터 유리가 증가되는 TNFα, IL-1등은 피부 진피세포인 섬유아세포(Fibroblast)에 작용하여 MMP-1(matrix metalloproteinase-1), TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1), procollagen 등의 생합성을 증가시킬 수 있다<sup>18,19)</sup>. 이러한, MMP-1과 같은 단백질 분해효소는 진피조직의 collagen 분해를 촉진하며, collagen 합성은 비정상적으로 억제하여 피부노화에 결정적 역할을 하게 된다<sup>16)</sup>.

한의학에서는 앞에서 말한 바와 같이 '피부는 五臟六腑의 거울'이라고 하여 피부의 문제를 단순히 피부에서만 생각하는 것이 아니라 피부의 상태는 五臟六腑, 氣, 血과 밀접한 관계가 있다고 생각한다<sup>1)</sup>. 그리고 피부노화는 腎臟과 肺의 기능이 저하되어 인체에 호르몬과 혈액을 공급하는 滋陰과 이를 전신에 나누는 宣發기능이 약해져서 피부의 영양부족으로 인해 생긴다고 보았다<sup>1)</sup>. 피부가 흡수하는 영양분의 근원은 주로 혈액의 흐름이며 체내 혈액순환의 3분의 1 정도를 모두 피부가 흡수 한다<sup>24)</sup>.

최근 피부미용에 대한 관심의 변화에 따라 한의학에서도 여러 약물들의 피부

각질에 대한 항산화 효과 및 피부각질세포 보호효과에 대한 연구가 발표되고 있는데 김 등<sup>12)</sup>은 蒲公英 추출물을 이용하여 항산화 효과 및 피부각질세포 보호효과에 대한 연구를 하였고, 이 등<sup>13)</sup>은 黃芪를 사용하여 자외선에 대한 세포손상 보호효과를 연구하였고, 임<sup>14)</sup>은 黃芩을 사용하여 피부각질세포에 대한 항산화 효과를 연구하였다.

赤何首烏(Polygonum multiflorum Thunberg)는 蓼科(Polygonaceae)에 속한 多年生蔓草의 塊根으로, 性은 溫 無毒하고, 味는 苦甘澀하며 歸經은 肝, 心, 腎 三經에 入하고, 藥理성분으로는 根과 根莖에 oxymethylantraquinone류가 함유되어 있고, 주로 chrysophanol과 emodin, rhein등으로 이루어져있다. 적하수오는 補肝, 益腎, 養血, 祛風의 효능이 있어 鬢髮早白, 血虛頭暈 등 임상에서 여러 肝腎陰虧 질환에 두루 사용되고 있는데<sup>15)</sup>, 이런 작용을 가진 약물에는 적하수오 외에도 當歸, 熟地黃 등이 있다. 當歸와 何首烏는 비슷하게 肝의 血分에 작용을 하지만 當歸는 辛溫性으로 따뜻하게 돌리면서 血分の 風寒에 작용을 하지만 何首烏는 苦味로 熱을 치면서 澀하기 때문에 血分の 風熱에 작용을 한다. 熟地黃과 何首烏는 둘 다 肝腎에 入하지만 熟地黃은 腎을 補하는 쪽이 강하고 何首烏는 肝을 補하는 쪽이 강하다는 차이가 있다<sup>25)</sup>. 이에 저자는 하수오의 이런 補肝, 益腎, 養血 효능이 피부 각질 세포의 손상을 보호하는 효과가 있을 것으로 생각되어 실험에 착수 하였다.

본 연구에서는 UVB에 의한 각질세포의 세포사멸에 대한 적하수오의 영향을 평가하고자 각질세포의 세포사멸을 측정

하였다. 이를 위하여 사람의 각질세포인 HaCaT를 자외선 처리하여 LDH 유리, NO 생성을 측정하였으며, COX-2, Bcl-2, Bax, TNF- $\alpha$ , c-jun, c-fos, NF- $\kappa$ B, iNOS, Bcl-xL의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하였다. LDH(lactate dehydrogenase)는 세포 내막에 존재하므로 세포가 파괴되어야 세포 밖으로 유출될 수 있어 세포의 상해여부를 측정하는 유력한 기준이 된다. 실험결과, UVB는 배양된 인간 각질세포인 HaCaT 세포의 상해를 증가시켜 LDH의 유리를 증가시켰다. 이는 UVB에 의한 ROS 생성이 증가되고, ROS 물질들이 단백질, 지방, 핵산 등 생체 구성물질의 변성을 유발한 결과 세포막이 파괴되는 것을 의미한다. 본 연구에서 적하수오 추출물은 UVB에 의해 유리가 증가된 LDH 활성을 억제하였다(Fig. 1). 그러므로 PM는 UVB에 의한 세포 손상을 억제할 수 있을 것으로 판단할 수 있다.

Nitrite는 ROS의 일종으로 NO synthesis 과정을 통해 형성된다. UVB에 의한 피부 각질 세포의 산화적 스트레스를 측정하기 위하여, HaCaT 세포에 UVB를 조사한 후 생성되는 nitrite를 측정하였다. 실험결과, UVB 조사시에 세포에서 생성되는 nitrite 양이 증가하였다. 또한, PM을 처리한 경우, UVB로 조사한 대조군에 비해 nitrite 생성을 억제하여, UVB에 의한 산화적 스트레스를 억제하는 작용을 나타내었다(Fig. 2).

NO를 생성하는 효소인 NOS는 각각의 생성되는 위치에 따라 신경계의 nNOS(neuronal NO synthase), 혈관내피세포의 eNOS(endothelial NOS), 대식세포등에서 발현하는 유도성 iNOS(inducible

NOS) 등이 존재 한다<sup>26,27</sup>. eNOS에 의해 생성된 eNO는 혈관 내피세포의 확장 및 PGI2 생성을 촉진하여 혈액순환을 향상시킨다. 반면에 iNOS에 의해 생성되는 iNO는 혈관을 수축시키며 염증반응을 유발할 수 있다. 이 염증반응은 세포에 상해를 유발하며 염증관련 인자들의 신호전달과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 실험결과, UVB는 HaCaT 세포의 iNOS 유전자 발현을 증가시켜 염증반응을 증가시키는 것으로 나타났으며, PM은 이를 억제하여 유도성 NO로 유발되는 염증 반응을 억제할 수 있을 것으로 판단되었다(Fig. 10).

세포는 다양한 인자들-산화성 스트레스, hypoxic stress, UVB등-에 의해 apoptosis가 유발된다. UVB와 같은 외부 스트레스로 인한 각질세포의 활성화는 ROS(reactive oxygen species)에 의해 중개되어 나타나는 MAPK 계통의 신호전달계 단백질 일종인 p38 $\alpha$ / $\beta$ 와 JNK의 활성화를 통해 apoptosis를 유발한다<sup>28</sup>. 이와 함께 ROS에 의해 파괴되어 나오는 cytochrome c와 lysosomal protein에 의해 caspase-8, caspase-3 등이 활성화되어 apoptosis를 유발하기도 한다. 이들의 작용과는 반대로 성장인자 수용체(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 활성화를 통해<sup>29</sup> 세포괴사에 저항하는 Bcl-2와 결합하는 Bad 단백을 인산화하여 Bcl-2와 유리시킴으로써 Bcl-2이 세포괴사를 억제할 수 있도록 한다. Bcl-2

계 단백질은 apoptosis를 조절하는 단백질로 알려져 있으며, Bcl-2와 그와 유사한 Bcl-xL, Bax등으로 구성되어 있다<sup>30)</sup>. HaCaT cell에서 Bcl-2의 과잉발현은 Fas에 의해 증개되는 UVB노출에 의한 keratinocyte의 apoptosis를 억제한다고 보고되었다<sup>31)</sup>. 이들은 주로 mitochondria의 outer membrane에 존재하며 ion channel을 형성한다. Bcl-2계 단백질은 apoptosis를 유발하는 자극에 의한 swelling이나 cytochrome c 유리 등과 같은 mitochondria 파괴를 억제하여 이들에 의해 유도되는 caspase의 활성을 억제한다. 이들의 활성은 MAPK(mitogen activated protein kinase) 계열의 p38 $\alpha$ 이나  $\beta$ 의 활성을 통하여 나타나게 되는데 이들의 작용은 Bax의 분자구조를 변화시켜 작용을 억제하고 Bcl-2가 apoptosis 저해작용을 하도록 유도한다. 기존의 연구에서 UVB의 조사는 세포내에서 Bcl-2 계열의 단백질인 Bcl-xL 및 Bax의 발현을 억제하는 것으로 보고되었다<sup>32)</sup>. 본 연구에서 나타난 결과, UVB를 조사한 HaCaT 세포에서 Bcl-2와 Bcl-xL, Bax의 유전자 발현이 억제되어 기존의 논문 및 선행 연구 결과들과의 상관성이 인정되었다. 적하수오를 처리한 경우에는 UVB에 의해 억제된 Bcl-2 단백질 발현은 증가시켰지만, UVB에 의해 억제된 Bcl-xL 및 Bax 단백질 발현은 적하수오가 회복시키지 않았다(Fig. 4, Fig. 5, Fig. 11). 이 작용은 적하수오가 UVB에 의해 증가하는 apoptosis를 억제하는 기능과 촉진하는 역할을 동시에 할 가능성을 시사한다. 그러나, Fig.1 및 Fig.2에서 나타난 UVB에 의한 LDH 유리증가를 억제하고, nitrite와 같은 ROS의 생성증가를 억제하는 것은 Bcl-2 계

열 단백질 발현이 우세하여 각질세포 상해에 보호작용을 나타내는 것으로 판단할 수 있다(Fig. 1, Fig. 2).

이와는 별도로 피부각질세포의 표면에 존재하는 TNF(tumor necrosis factor) DR(death receptor)라고 불리는 수용체에 작용하는 경우 CD95/Fas receptor와 TNF-R1(receptor1), TRAILER(TNF related apoptosis inducing ligand)등의 수용체가 관여한다<sup>30)</sup>. 이들의 작용에는 caspase-8에 의한 apoptosis와 caspase-2가 작용하는 apoptosis 과정을 활성화하며, TRAF2, MEKK, JNK를 거쳐 AP-1이 활성화되어 apoptosis를 촉진한다. 이런 과정에 존재하는 TRAF2는 IKK를 활성화시켜 유리되어 나오는 NF- $\kappa$ B는 핵내의 전사를 통해 apoptosis를 억제하는 역할을 한다.

COX-2는 UV에 의한 염증반응에 관여하는 PGE2(prostaglandin E2)의 생합성을 촉진하는 효소로 UV에 의해 COX-2 발현 증가는 피부염증반응과 함께 피부암의 발생 증가와 관련이 있다고 알려져 있다. 이러한 작용은 세포내 신호전달계인 MAPKs(mitogen, activated protein kinases)의 활성화가 필요한데 여기에는 ROS 의존적인 신호전달과정으로 알려져 있다. UVB에 의해 HaCaT cell 표면의 EGFR/erbB1R 수용체가 활성화되면 pp60src 활성화를 거쳐 ERK/p38/PI3K 신호전달과정이 활성화되고 연속적으로 COX-2의 활성 및 유전자 발현이 증가한다. COX-2 발현은 대부분 TPA에 의해 나타나는 PKC의 활성화와 JNK(c-jun NH2-terminal kinase)의 활성화에 의해서 나타나지만, HaCaT 세포의 경우 JNK를 억제하여도 COX-2의 발현을 억제에

의해서는 억제되지 않는다는 보고가 있었다<sup>33)</sup>. UV에 의해 각질세포가 상해를 받는 것과는 별도로 keratinocyte는 UV에 의해 TGF $\beta$ ,  $\alpha$ -MSH와 같은 cytokine과 COX-2의 생성물인 PGE2를 유리하게 된다. PGE2는 melanocyte 표면 수용체를 자극하며 AP-1, ERK, PKC등 일련의 신호전달과정을 통해 발현되는 TRP-2, TRP-1, tyrosinase 등의 효소작용으로 melanin 생성을 촉진한다<sup>34)</sup>. 이 melanin은 피부의 색소 침착을 유발하지만 항산화 작용을 증강시켜 피부세포를 자외선으로부터 보호하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 UVB 조사에 의해 HaCaT cell에서 COX-2 유전자 발현이 현저히 증가되는 것을 관찰하였다. 이것은 UVB에 의해 iNOS 발현이 증가하고, nitrite 생성이 증가하는 것과 함께 염증반응을 증폭시킬 것으로 판단된다. 실험결과, PM은 UVB에 의해 증가하는 COX-2 발현을 억제하여 염증반응을 억제할 것으로 나타났다(Fig. 3).

UVB와 같은 외부 환경적 인자로 인한 피부 각질세포 손상은 피부세포들 사이의 신호전달에 중요한 역할을 하는 TGF- $\beta$  (transforming growth factor), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor), PGE2(prostaglandin E2),  $\alpha$ -MSH(melanocyte stimulating hormone), GSF(granulocyte stimulating factor), IL-1(interleukin-1), IL-6, IL-8, IL-10 등의 분비를 증가시킨다<sup>12,19)</sup>. 이중 TNF $\alpha$ , IL-1등은 피부 진피세포인 섬유아세포(Fibroblast)에 작용하여 MMP-1(matrix metalloproteinase-1), TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1), procollagen 등의 생합성을 증가시킬 수 있다<sup>18,19)</sup>. 그러나, 장시간 UVB를 조사하

는 경우 procollagen의 합성과 TIMP-1의 발현이 억제되어 collagen의 진피조직의 합성이 감소한다. 이와는 별도로 MMP-1은 진피조직의 성분인 collagen을 분해하여 피부의 탄력을 저하시켜 피부노화를 촉진하게 된다<sup>16)</sup>. 실험결과, UVB는 피부각질세포에서 TNF $\alpha$  유전자 발현을 현저히 증가시켰으며, PM은 UVB에 의해 증가된 TNF $\alpha$  유전자 발현을 현저히 억제하였다(Fig. 6). 이러한 적하수오의 효능은, TNF $\alpha$ 의 발현을 억제하여 collagen분해를 담당하는 MMP-1의 작용을 저하시킴으로서 UVB에 의해서 피부의 탄력이 감소하는 것을 막을 수 있을 것으로 판단되었으며 구체적인 내용을 규명하기 위한 향후 심도 있는 연구가 필요할 것으로 생각 된다.

각질세포와 진피조직의 섬유아세포의 단백질의 발현에는 PKC(protein kinase C)의 활성화와 AP-1, NF- $\kappa$ B등의 전사인자(transcription factors) 활성화를 필요로 한다. Keratinocyte에서 유리되는 TGF $\beta$ , PGE2,  $\alpha$ -MSH는 UVB에 의해 증가하며, 이들은 melanocyte를 활성화시켜 melanin 생합성을 증가시킨다. 또한, UVB에 의해 피부 각질세포로부터 유리가 증가되는 TNF $\alpha$ , IL-1등은 피부 진피세포인 섬유아세포(Fibroblast)에 작용하여 MMP-1(matrix metalloproteinase-1), TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1), procollagen 등의 생합성을 증가시킬 수 있다<sup>18,19)</sup>. Collagen은 전신의 결합조직을 구성하는 단백질로서 전구체인 procollagen로서 형성된다. Procollagen은 성숙한 collagen과 여분의 peptide로 구성되어 있는데, 이 peptide는 collagen이 성장하고 있는 collagen fibril로 끼어 들어가기

전에 특이한 protease인 MMP들에 의해 분해한다. 대표적으로 MMP-1은 진피조직의 주성분인 type I collagen 분해를 촉진한다. 또한 UVB는 collagen 합성을 비정상적으로 억제하여 피부노화에 결정적 역할을 하게 된다. 이러한 결과는 MMP등의 단백질 발현에 관여하는 신호전달 단백질인 PKC(protein kinase C), AP-1과 전사인자인 c-fos, c-jun, NF-κB 등의 활성화와 관련이 있다<sup>35)</sup>. 선행 연구에서 NF-κB를 불활성화시키면 염증을 유발하는 iNOS 와 COX-2의 발현이 억제된다고 알려져 있으며, UVB를 조사한 keratinocyte에서 c-jun과 NF-κB의 발현이 증가된다고 보고하였다<sup>36)</sup>. 본 연구 실험결과에서 UVB를 조사한 keratinocyte에서 NF-κB의 발현이 증가하는 것을 확인했으며, PM은 이를 억제하였다(Fig. 9). 이와 함께 UVB에 의해 발현이 증가된 c-jun, c-fos 의 발현도 PM이 억제하였다(Fig. 7, Fig. 8).

이상의 결과, PM은 UVB에 의한 피부 각질세포의 상해를 억제하였으며, 이는 UVB에 의해서 증가하는 apoptosis 관련 인자와 이들의 발현을 조절하는 단백질의 발현을 억제하여 나타난 결과로 판단할 수 있다.

## V. 결 론

적하수오의 추출물을 이용하여 UVB 조사에 의해 유발된 피부각질세포의 상해에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 사람의 각질세포인 HaCaT를 자외선 처리하여 LDH 유리와 Nitrite 생성에 미치는 영향을 측정하였으며, COX-2, Bcl-2,

Bax, TNF-α, c-jun, c-fos, NF-κB, iNOS, Bcl-xL 의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 적하수오 추출물(PM)은 UVB로 자극된 피부각질세포주인 HaCaT의 손상으로 인한 LDH 유리를 억제하였다.
2. 적하수오 추출물(PM)은 UVB로 자극된 피부각질세포주인 HaCaT의 손상으로 인한 NO의 생성을 억제하였다.
3. 적하수오 추출물(PM)은 UVB로 자극된 피부각질세포주인 HaCaT의 COX-2 유전자 발현을 억제 하였다.
4. 적하수오 추출물(PM)은 UVB로 자극된 피부각질세포주인 HaCaT의 Bcl-2 유전자 발현을 증가 시켰다.
5. 적하수오 추출물(PM)은 UVB로 자극된 피부각질세포주인 HaCaT의 Bax 유전자 발현에 영향을 주지 못했다.
6. 적하수오 추출물(PM)은 UVB로 자극된 피부각질세포주인 HaCaT의 TNFα 유전자 발현을 억제 하였다.
7. 적하수오 추출물(PM)은 UVB로 자극된 피부각질세포주인 HaCaT의 c-jun 유전자 발현을 억제 하였다.
8. 적하수오 추출물(PM)은 UVB로 자극된 피부각질세포주인 HaCaT의 c-fos 유전자 발현을 억제 하였다.
9. 적하수오 추출물(PM)은 UVB로 자극된 피부각질세포주인 HaCaT의 NF-κB 유전자 발현을 억제 하였다.
10. 적하수오 추출물(PM)은 UVB로 자극된 피부각질세포주인 HaCaT의 i-NOS 유전자 발현을 억제 하였다.
11. 적하수오 추출물(PM)은 UVB로 자극된 피부각질세포주인 HaCaT의 Bcl-xL 유전자 발현에 영향을 주지 못했다.



이상의 결과, 적하수오는 직접적으로 UVB로 자극된 피부 각질세포를 보호하는 작용이 있으며, UVB 조사시에 피부 광노화에 관여하는 인자들을 억제할 수 있는 것으로 판단된다.

- 투 고 일 : 2011년 10월 28일
- 심 사 일 : 2011년 11월 01일
- 게재확정일 : 2011년 11월 07일

## 참고문헌

1. 김남연 등. 최신 한방미용학개론. 서울:청구문화사. 2007:171, 178.
2. 정종영, 김미연. 아틀라스 피부관리학. 서울:엠디월드. 2006:15, 16.
3. Kari P, Tapio P and Jansen CT. Ultra-Violet B radiation induces changes in the distribution and release arachidonic acid, dihomo- $\gamma$ -linolenic acid, and eicosapentaenoic acid in human keratinocyte culture. *J Invest Dermatol.* 1987;88:611-4.
4. Wiel AG et al Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the UV and Visible Wavelength. *Photochem photobiol.* 1984;40:485-94.
5. 노석선. 피부과학. 서울:아이비씨기획. 2006:11, 31, 90, 607.
6. Fisher GJ et al. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J med.* 1997;337:1419-28.
7. Yamamoto Y. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *J Dermatol Sci.* 2001;27:S1-4.
8. 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- $\kappa$ B in HaCaT human keratinocytes. *J Biochem.* 2004;86:425-9.
9. 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.
10. 이윤경, 김주덕. 자외선 노출이 피부 노화에 미치는 영향. *한국미용학회지.* 2007;13(2):841-50.
11. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. *本草學*, 서울:영림사. 2000:583-4.
12. 이진영 등. 황기의 자외선에 의한 세포 손상을 막는 보호효과. *생약학회지.* 2008;39(4):300-4.
13. 김형우 등. 포공영 추출물의 항산화 효과 및 피부 각질세포 보호효과. *대한본초학회지.* 2009;24(3):103-8.
14. 임치혜. 황금의 인간유래 피부각질 세포에 대한 항산화효과. *동신대학교대학원학위논문.* 2009.
15. 송중석, 유동열. 赤何首烏의 멜라닌 생성억제와 작용기전에 관한 연구. *대한한방부인과학회지.* 2008;21(2):59-75.
16. 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.
17. Karin M Liu ZG Zandi E. AP-1

- function and regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:240-6.
18. 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.
  19. Lee KS et al. Melatonin reduces ultraviolet-B induced cell damages and polyamine levels in human skin fibroblasts in culture. *Exp Mol Med* Aug 31. 2003;35(4):263-8.
  20. 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.
  21. Sun W et al. Catalase activity of chloroperoxidase and its interaction with peroxidase activity. *Biochem Cell Bio.* 1994;72(7-8):321-31.
  22. Lardinois OM Rouxhet PG. Peroxidatic degradation of azide by catalase and irreversible enzyme inactivation. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1298(2):180-90.
  23. Lardinois OM. Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide. *Free Radic Res.* 1995;22(3):251-74.
  24. 신광호. 한방피부관리요법. 서울:건강한 삶. 2003:19.
  25. 이상철. 吾堂 本草講論. 서울:의성당. 2010:134-5.
  26. 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.
  27. Weller R. Nitric oxide a key mediator in cutaneous physiology. *Clin Exp Dermatol.* 2003;28:511-4.
  28. 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.
  29. AV Laethem Marjan G Patrizia A. Starting and propagating apoptotic signals in UV-B irradiated keratinocytes. *Photochemical & Photobiological Sci.* 2009;8:299-308.
  30. ND Marcheko A Zaika UM Moll. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem.* 2011;275:16202-12.
  31. JE Chipuk T Kuwana L Bouchier-Hayes NM Droin. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science.* 2004;303:1010-4.
  32. V Chaturvedi et al. Resistance to UV-induced apoptosis in human keratinocytes during accelerated

- science is associated with functional inactivation of p53. *J Cell Physiol.* 2004;198:100-9.
33. 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.
34. Choi AMK et al. Holbrook NJ. 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.
35. 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.
36. Fisher GJ et al. c-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid. *J Cret Invest* 2000; 106:663-70.