한국영양학회지(*Korean J Nutr*) 2012; 45(3): 211 ~ 217 ISSN 0367-6463 / E-ISSN 2005-7121
DOI 10.4163/kjn.2012.45.3.211

자외선이 조사된 무모생쥐에서 홍삼, 사상자, 산수유 혼합 추출물 섭취가 표피 세라마이드 함량 및 관련 효소의 발현에 미치는 영향

이윤주* · **오인경*** · **조윤희§**

경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과

Dietary effect of red ginseng extracts mixed with torilis fructus and corni fructus on the epidermal levels of ceramides and ceramide related enzyme proteins in uv-induced hairless mice

Lee, Yun Ju* · **Oh, Inn Gyung*** · **Cho, Yunhi§**

Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

ABSTRACT

UV-irradiation is a major factor of photo-aged skin, by which pigmentation, wrinkles and laxity are increased. In addition, the epidermal barrier is disrupted, ultimately causing dryness in photo-aged skin. As an effort to search dietary sources for improving the dryness of UV irradiated skin, the dietary effect of red ginseng based functional foods on the epidermal level of ceramides, a major lipid maintaining epidermal barrier, was determined in this study. Albino hairless mice were fed either a control diet [group UV (UV-irradiated control)] or diets with 0.5% (group M0.5) or 1% (group M1.0) of red ginseng extracts mixed with Torilis fructus and Corni fructus (66.7% red ginseng) in parallel with UV irradiation for 5 wks. A normal control group (group C) was fed a control diet without UV irradiation for 5 wks. The epidermal level of ceramides in group UV was significantly lower than that in group C, in which ceramidase, an enzyme involved in ceramide degradation, was highly expressed. In group M0.5, the epidermal level of ceramide was significantly increased to the level even higher than in group C. In addition, protein expression of serine palmitoyl transferase (SPT), a key enzyme involved in de novo ceramide synthesis, was increased in group M0.5. However the epidermal levels of ceramides as well as of ceramidase protein expression in group M1.0 did not differ from those in group UV. In conclusion, we demonstrate that dietary supplementation of red-ginseng extracts mixed with Torilis fructus and Corni fructus at a level of 0.5% level in diet increased the epidermal level of ceramides coupled with the elevated expression of SPT protein. (*Korean J Nutr* 2012; 45 (3): 211 ~ 217)

KEY WORDS: red-ginseng, UV-irradiation, ceramide, SPT, ceramidase.

서 론

피부는 크게 표피, 진피, 피하지방 세 층으로 나뉘어진다. 이 중 진피 (dermis)는 collagen과 elastin 합성을 통하여 피부 탄력 구조를 지지하는 역할을 하는 반면, 표피 (epidermis), 특히 표피의 가장 외층인 각질층은 피부 밖으로의 수분과 전해질 손실을 억제하고 피부장벽의 역할을 함으로써 피부의 정상적인 생화학적 역할을 수행 할 수 있게 한다.[1,2] 각질층의 지질은 ceramide (각질층 전체 지질의 50%), cholesterol, free fatty acid의 세 가지 혼합체로 층상구조를 이루고 있으며,[3] 이 중 ceramide는 층상구조를 유지시키는 중요한 지질로서 이를 통하여 피부의 수분 보유와 피부장벽의 역할을 한다.[4] Ceramide는 표피 기저층의 단백질 및 인지질 대사 과정에서 제공되는 serine과 palmitoyl-CoA를 기질로 SPT (Serine-Palmitoyl-Transeferase) 효소에 의해 생성되며 다양한 대사를 거친 후 최종적으로 ceramidase에 의해 최종 분해된다.[5-8]

피부는 여러 가지 위험한 외부 인자에 항상 노출되어 있고, 그 중 대표적인 위험 인자인 자외선 (UV)에 의해 주름 형성, 피부 건조화 및 피부 과증식 등이 야기된다.[9-12] 즉 과도한 자외선

접수일: 2011년 12월 14일 / 수정일: 2012년 1월 27일 / 채택일: 2012년 4월 3일
§To whom correspondence should be addressed.
E-mail: choyunhi@khu.ac.kr
*These authors contributed equally to this study.

© 2012 The Korean Nutrition Society
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

은 피지막의 주요 구성 지질인 ceramide 함량을 감소시켜 피지막 층상 구조의 파괴를 야기하고, 궁극적으로 수분손실 증가에 의한 피부 건조를 유발한다.[13,14] Ceramide 손실을 막기 위해 자외선 차단제를 피부에 직접 도포하거나 ceramide 증진 효과가 있는 기능성 식품, 또는 의약품 등의 사용이 일반화 되고 있다. 특히 최근에는 식생활을 통해 피부와 연관성을 지닌 특정 영양성분 및 식이 소재를 섭취하여, ceramide 생성을 증가시키고 장기적인 피부손상을 좀 더 효과적으로 예방할 수 있는 방법에 대한 관심이 높아지고 있다.[15]

Ceramide 생성을 증가시키는 식이 소재로 홍삼을 이용하고자 하는 시도가 진행되고 있다. 홍삼은 동양뿐 아니라 서구에서도 강장제 또는 건강식품, 그리고 대체의학의 Herbal therapy로서 사용되어 왔다.[16] 홍삼의 학명은 Panax ginseng C.A. Meyer로, 이는 백삼과 달리 수삼을 증숙한 후 건조하여 제조한 것으로 이러한 과정에 의한 화학성분의 변화가 수삼 또는 백삼과는 다른 홍삼의 생리활성 변화를 유도하는 것으로 알려져 있고, 부작용이 거의 없는 생약으로 인정되어 소비자의 효능에 대한 인지도는 가장 높다고 할 수 있다.[17-20] 검증되는 효능들 중 동물 및 in vitro 실험을 통해서 항산화 작용을 통한 항피로, 항노화 작용과 관련된 효능 보고가 이어지고 있는데,[21] 이는 특히 홍삼의 특수 제조과정에서 생성되는 Maltol이 vitamin E의 구조와 매우 흡사하여 인체 노화 억제를 야기 하는 것에 기인한다.[22] 홍삼 함유 건강식품에는 원료 단가의 경감을 위해 빈번히 사상자 (Torilis fructus)와 산수유 (Corni fructus)를 첨가한다. 사상자는 산형과에 속하는 사상 (Torilis japonica)의 과실로써 식품공전 상에 식품부원료로 분류되어 있으며, 습창, 완선, 음중, 옴 등의 피부 질환에 유효하다고 알려져 있다.[23,24] 산수유는 산수유나무 (Corni officinalis SIEB et. zucc)의 과육으로 씨를 제거하여 사용하며 생리활성으로는 항산화, 항균, 항알러지 및 미백 작용이 보고되어 있고,[25-27] 특히 피부의 색소 침착을 억제한다는 보고가 있다.[28] 시중에 홍삼, 사상자, 산수유를 함유한 건강기능식품이 상용되고 있으며 건강한 피부 유지 기능이 있는 것으로 여겨지고 있으나 아직까지 구체적으로 이들 혼합 추출물과 표피 ceramide의 관계를 밝혀 광노화에 효과적임을 입증하는 연구가 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 자외선 조사에 의해 노화가 유도된 무모생쥐에서 홍삼, 사상자, 산수유 혼합 추출물의 식이 공급이 표피 ceramide 함량 및 관련인자 발현에 미치는 영향에 대해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

PCR-Premix는 (주)바이오니아에서 구입하였고 AMV Reverse Transcriptase, RNasinA Ribonucle-ase Inhibitor는 (주)서린바이오사이언스에서 구입하였다. 6X-loading dye와 100 bp ladder marker는 (주)대명사이언스에서 구입하였다. 단백질 발현에 사용되는 SPT와 Ceramidase (1차 항체)는 Lab Frontier. Korea에서 주문 제작하여 사용하였다.

실험동물

20 g 내외의 수컷 SKH-1 무모생쥐를 중앙 실험동물 사육장으로부터 공급 받아서 사료와 물을 마음껏 섭취 하도록 하며 온도 22 ± 1℃, 습도 60 ± 5%가 유지되고 12시간 간격으로 명암을 바꿔주는 동물 무균 실에서 적응시켰다.

자외선 조사

UVB (약 30% 정도의 UVA를 함유하고 있음: 5 Sankyo Denky G5T5E lamps, Sankyo Denki Co., Japan)을 사용하여 1주일에 3회 동물의 등 부위에 조사하였다. 첫째 주는 1 MED (100 mJ)씩, 둘째주는 2 MED, 셋째주는 3 MED, 넷째주부터 다섯째주까지는 4 MED를 조사하여 주름살을 유도하였다.

홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물

본 연구에 사용한 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물은 한국인삼공사 (Korea Tobacco and Ginseng Corp)에서 제공받았다. 제공받은 이들 혼합 추출물은 한국산 홍삼추출 분말과 중국산 사상자 (Torilis fructus) 및 산수유 (Corni fructus) 혼합 분말이 45.3 : 54.6%의 비율로 함유되어 있었다.[29] 홍삼 추출 분말은 6년근 홍삼에 55% 주정을 6배량 가하여 65~68℃에서 24시간 추출한 다음, 상층액과 침전물을 분리하여 6회 반복하였다. 사상자는 중국산을 사용하였고, 산수유는 국산으로 시중에서 구입하여 사용하였다. 정제수를 2 : 1비율의 사상자 및 산수유 중량의 6배량을 가하여 85℃에서 4시간동안 추출한 후, 원심분리 여과한 상층액을 감압 농축하여 수분함량 40%의 엑기스를 제조한 다음 동결 건조하였다. 준비한 홍삼 사상자 및 산수유 혼합 추출물의 지표물질은 ginsenoside-Rb1, torilin 및 loganin이 각각 10.85 mg/g, 0.12 mg/g, 3.33 mg/g으로 파악되었다.[29]

식이구성

실험 식이로 사육하기 전 1주 동안 고형배합 사료로 적응시켰다. 체중에 따라 난괴법으로 4군으로 나눈 후 실험군은 자외선 조사와 병행하여 실험 식이를 5주간 공급하였다. 각 실험군의 식이 조성은 Table 1과 같으며 식이 지방은 식이 무게의 10%로 고정시키고 corn oil을 공급하였다. 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물의 식이 급여군은 전체 식이 무게의 0.5% (M0.5군), 1.0% (M1.0군)에 상응하는 분말을 식이에 혼합하여 공급하였다. 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물 분말의 사용에서 생기는 건분 식이 무게 차이는 옥수수 전분을 감하여 조정하였

다. 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물이 함유되어 있지 않는 식이를 5주간 공급받는 군 (정상대조군: C군)을 양성대조군으로, 이들 혼합 추출물이 함유되어 있지 않는 식이와 함께 자외선 조사를 5주간 병행하는 군(자외선 조사 대조군: UV군)은 음성대조군으로 두었다.

체중 및 실험식이 섭취량 측정

식이효율 측정을 위해 주 1회 체중과 남은 식이량 및 공급량을 측정하였고, 식이효율은 실험기간 동안의 체중증가량을 식이섭취량으로 나누어 계산하였다. 5주간의 식이 급여 후 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율은 군간의 유의성이 없었다 (data not shown).

표피 조직의 분리

식이 급여 5주에 cervical dislocation의 방법으로 희생시키고 얻어진 피부조직에 dermis을 아랫방향으로 넣은 후 HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)와 Dispase solution (gradeII, 2.4 unit/mL)을 1 : 1비율로 혼합한 용액을 첨가하여 4℃에서 18시간동안 반응시켜 표피를 분리하였다.[30]

항체 제작

SPT의 1차 항체는 primer sequence (UniSTS D19271)[10]을 기준으로 하여 whole protein에서 antigenicity를 가지는 몇 개의 peptide 위치를 찾아내었다. 그 중, C-term 끝부분에 위치하고 antigenicity가 상대적으로 가장 높은 Peptide sequence DRPFDETTYEETED (14mer)을 선택한 후 다른 SPT 단백질과의 일치성을 Homology search (NCBI)을 통해 살펴보았다. Ceramidase의 1차 항체는 primer sequence (UniSTS AI662009)[11]을 기준으로 SPT와 같은 방법으로 진행하여 Peptide sequence RTEYKKIRDDDLRHC (15mer)을 선택하였다. 각각의 1차 항체 SPT와 ceramidase의 peptide는 Carrier protein에 conjugation하여 rabbit에 주입하였다. 항체 생성여부는 효소면역측정법으로 확인하고 심장 채혈 후 혈청을 affinity column을 사용하여 purification하여 항체로 사용하였다 (Lab Frontier. Korea).

Table 1. Diet composition of experimental groups (g/kg)

Ingredients	Experimental groups			
	C	UV	M0.5	M1.0
Cornstarch	372	372	367	362
Sucrose	200	200	200	200
Cellulose powder	50	50	50	50
Corn oil	100	100	100	100
Vitamin mixture[1]	10	10	10	10
Salt mixture[2]	35	35	35	35
L-cystine	3	3	3	3
Casein[3]	230	230	230	230
Medicinal plant mixture contained diet	−	−	5	10
Fibroin	−	+	+	+

Composition is in units of g/kg of diet. Group C, hairless mice fed a control diet without UV irradiation for 5 weeks; groups UV, M0.5, and M1.0, hairless mice fed a control diet (UV) or diets supplemented with 0.5% (M0.5) or 1.0% (M1.0) of red ginseng extracts mixed with Torilis fructus and Corni fructus (66.7% red ginseng) contained diet in parallel with UV irradiation for 5 wks
1) AIN-93 Vitamin Mix #310025 (Dyets Inc., Bethlehem, PA)[39] 2) AIN-93G salt mix 3210025 (Dyets Inc.)[39] 3) Casein (nitrogen × 6.25), 870 g/kg

Ceramides 함량 측정

Ceramides의 정량분석을 위해 실험동물에서 채취된 표피 조직에 Tris-HCl 800 μL을 가하여 polytron으로 분쇄하고 folch 용액 400 μL (Chlroform : methanol = 2 : 1, v/v)을 첨가하여 3,000 rpm, 5분 동안 원심분리 하였다. 이 과정을 2회 반복 후 모아진 하층액을 N_2 Gas로 건조시키고, 2% Isopropanol을 함유한 hexane을 첨가한 후 filtering한 sample을 high performance liquid chromatography (Waters 1525 Binary HPLC pump, Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector, Waters Co., U.S.A)를 이용하여 분석하였다. 분석에 이용한 column은 Type UG120 (250 mm × 4.6 mm, ID; 5 μm, Shiseido co. Japan)을 사용하였고 Mobile phase는 hexane과 2% Isopropanol의 혼합액을 사용하였으며, flow rate는 1 mL/min, 흡광도는 230 nm에서 측정하였다.[31]

Serine palmitoyl transferase (SPT)와 ceramidase의 mRNA발현 변화

분리한 표피조직에 Trizol reagent (Gibco 15596-026)를 이용하여 RNA를 분리·정제하고 파장 260 nm에서 정량하였다. Total RNA (1 μg/μL)를 65℃에서 10분간 가열하고 4℃에서 10분 동안 방치한 후 1 μL oligo (dT) 15 primer (0.5 μg/μL), 1 μL M-MLV RT (10 unit/μL; Promega, USA), 1 μL RNase inhibitor (20~40 unit/μL; Promega, USA), 10 μL 5X RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH8.3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$), 5 μL 2.5 mmol/L dNTP mixture, 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) 증류수를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 가열하여 cDNA를 합성하였다.

Murine SPT의 sense primer (5'primer; GACTGAGCCTT TCTGGTGCT 3', 10 pmole/μL) 및 antisense primer (3'primer; AATGCCATTTGGAGTGAA GG-3'(UniSTS D19271)[23] (10 pmole/μL)를 각각 합성된 cDNA (1 μL)에 0.1% DEPC-Water와 함께 PCR-premix tube [(주)바이오니아]에 첨가하여 Denaturation은 94℃에서 1분, annealing은 65℃에서 1분, extension은 72℃에서 1분 동안 43 cycle로 진행하였다. Murine ce-

ramidase의 PCR은 5'primer; TGTGGAGCAGAAAATCA AGC 3' (10 pmole/μL), 3'primer; CAACATCATGGGGCAC TTAG 3' (UniSTS AI662009),[24] (10 pmole/μL)이며, denaturation은 94℃에서 1분, annealing은 65℃에서 1분 30초, extension은 72℃에서 1분 동안 47 cycle로 진행하였다. SPT와 Ceramidase의 Fragment size는 각각 159 bp, 103 bp이며 PCR 생성물은 3.0% agarose gel에서 확인하였다. PCR 생성물의 양은 Housekeeping gene인 GAPDH를 기준으로 정량하였으며 imaging densitometer (Labwork version 4.6 UVP.CA)를 사용하여 측정하였다.

Serine palmitoyl transferase와 ceramidase의 단백질 발현

분리된 표피 조직의 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준으로 한 Bio-rad protein assay를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 준비된 상층액을 95℃에서 5분간 가열한 다음 10% PAGE/SDS gel에서 전기 영동시킨 후 nitrocellulose membrane에 흡착시켰다. 1차 항체 (Serine Palmitoyl Transferase; acid ceramidase: Lab Frontier. Korea)를 4℃에서 16시간동안 incubation 한 후 PBST로 15분씩 3회 세척하였다. Peroxidase-conjugated anti-IgG 2차 항체와 실온에서 1시간 동안 반응 시킨 후 PBST로 3회 세척하고 발색은 ECL hyperfilm으로 확인하였다. 각 band의 intensity는 imaging densitometer (Labwork version 4.6 UVP.CA)를 사용하여 정량하였으며 β-actin의 발현을 기준으로 % control로 나타내었다.

통계분석

모든 실험 결과는 (SPSS, Ver 12.0) program을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 평균 (mean) ± 표준오차 (standard error mean, SEM)로 표시 하였다. 각 실험군의 평균의 차이는 General Linear Model (GLM)의 Duncan's multiple range test를 사용하여 $p < 0.05$, 0.01, 0.001에서 유의성을 검증하였다 (Duncan 1955).

결 과

표피 세라마이드의 총 함량 변화

피부의 자외선 노출은 표피장벽의 붕괴[32]와 더불어 표피 세라마이드 (Cer), 또는 그들의 대사 물질의 감소에 의해 피부의 장벽 항상성 유지를 방해한다고 알려져 있다.[33] 5주간의 식이 공급 후 각 군의 표피에서 측정된 총 세라마이드 함량은 UV군이 C군에 비해 유의적으로 낮았다 (Fig. 1). M0.5군의 표피 세라마이드 총 함량은 UV군 뿐 아니라 C군 보다도 유의적으로 높은 수준이었다. 반면 M1.0군의 세라마이드 총 함량은 UV군과

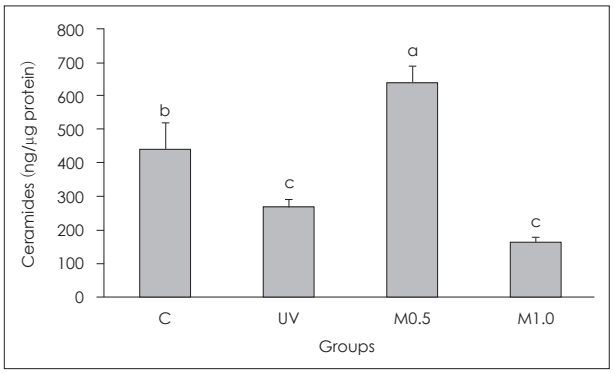

Fig. 1. Ceramide levels in the epidermis of hairless mice fed a control diets without UV irradiation for 5 weeks (group C) and UV-irradiated hairless mice fed a control diet (group UV) or diets supplemented with 0.5% (M0.5) or 1.0% (M1.0) of red ginseng extracts mixed with Torilis fructus and Corni fructus (66.7% red ginseng) in parallel with UV irradiation for 5 weeks. The ceramide levels were determined in the epidermis of group C, UV, M0.5, and M1.0 by high-performance thin-layer chromatography and expressed as ng of ceramides/μg of protein. Date are mean ± SEM (n = 10). Values without a common letter are significant different ($p < 0.05$) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

유사한 수준이었다. 이러한 결과에서 M0.5군의 세라마이드 총 함량 증가는 식이 0.5% 수준의 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물 섭취가 표피 세라마이드의 함량을 증가시켜 자외선 조사로 손상된 각질층의 장벽을 회복시켰음을 의미한다.

표피 SPT 및 ceramidase의 mRNA와 단백질 발현

자외선 조사와 병행된 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물의 섭취로 인한 세라마이드 함량 변화를 설명하기 위해 SPT 및 ceramidase의 단백질 발현을 살펴보았다 (Fig. 2). SPT는 세라마이드 de novo 합성 과정에서 세라마이드를 증가시키는 주요 효소이고,[5-8] ceramidase는 세라마이드 분해 효소이다.[34] UV군의 SPT 단백질 발현은 C군과 유사한 수준이었으나, M0.5군은 UV군에 비해 유의적으로 매우 높게 나타났다. UV군의 ceramidase 발현은 C군에 비해 유의적으로 현격히 높게 나타났으며 M0.5군은 C군과 비교하여 유사한 수준으로 감소하였다. 반면 M1.0군의 SPT 발현은 모두 C군과 유사한 수준이었으나 ceramidase 발현은 C군 및 UV군과 유사하였다. 즉, 이 결과는 자외선 조사로 인한 표피 세라마이드 함량 감소는 ceramidase 단백질 발현 증가와 병행되었고 M0.5군의 표피 세라마이드 함량 증가는 SPT의 단백질 발현 증가와 함께 de novo 세라마이드 함량 증가가 병행되었음을 의미한다. Ceramidase의 단백질 발현은 UV군에서, SPT의 단백질 발현은 M0.5군에서 유의적으로 높게 나타났지만, ceramidase와 SPT의 mRNA 발현을 분석한 결과 각 군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Table 2). 이상의 결과는 0.5% 식이 수준의 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물의 5주간의 식이 공급은 SPT의 단백질 발현 증가와 더불어 표피 세라마이드 함량을 증가시켰음을 제시한다.

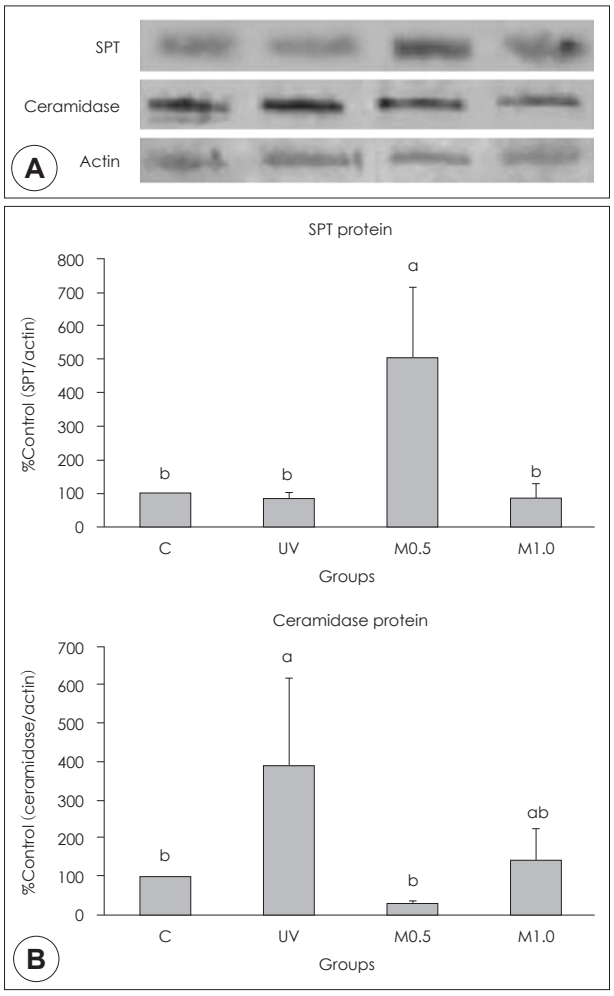

Fig. 2. Altered expression of SPT and ceramidase proteins in the epidermis of hairless mice fed a control diet without UV irradiation for 5 weeks (group C) and UV-irradiated hairless mice fed a control diet (group UV) or diets supplemented with 0.5% (M0.5) or 1.0%(M1.0) of red ginseng extracts mixed with Torilis fructus and Corni fructus (66.7% red ginseng) in parallel with UV irradiation for 5 weeks. A: Representative expressions of SPT and ceramidase protein in epidermis of mice. Protein extracts (15 μg each) from groups C, UV, M0.5, and M1.0 were subjected to 10% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with polyclonal antiserum against SPT (67 kDa) or ceramidase (45 kDa) and with actin (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)-specific antibodies. The region of gel shown for SPT was between the 62- and 83-kDa prestained molecular markers. The region of each gel shown for ceramidase and actin was between the 34- and 55-kDa prestained molecular markers. B: The signal intensities from multiple experiments of (A) were quantified, and the integrated areas were normalized, first to the corresponding value of actin and then to the signal observed in the normal control group (group C). Data are mean ± SEM (n = 10). Values without a common letter are significant different ($p < 0.05$) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test.

고 찰

본 연구는 자외선 조사에 의해 광노화가 유도된 무모생쥐에서 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물의 식이공급이 세라마이드 및 관련인자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 자외선 노출은 피부 조직의 과증식, 거침, 주름형성, 색소 침착 등과 유해현상을 유발시킬 뿐 아니라[35] 표피장벽의 붕괴[32]와 더불어 표피 세라마이드 (Cer), 또는 그들의 대사 물질에 의해 피부의 장벽 항상성 유지를 방해하여 피부 건조를 유발한다.[33] 광노화 유도 후 측정한 UV군의 피부 보습은 C군 보다 감소하여 피부 건조화를 유발하였지만, 홍삼 함유 건강기능식품을 전체식이의 0.5% 또는 1.0% 수준에 섭취시킨 M0.5군 및 M1.0군은 UV군과 비교하여 유사한 수치를 보여 피부 보습에 변화를 초래하지 않았다 (date not shown). 그러나 피부장벽의 주요 구성 지질로 피부 보습의 생체지표인 총 세라마이드 함량은 UV군이 C군에 비해 감소한 반면, M0.5군에서는 표피의 세라마이드 총 함량이 C군 보다도 유의적으로 높았다. Holleran 등은 자외선 조사된 쥐의 표피에서 세라마이드 생성이 억제됨을 보고하였다.[36] 또한 Meguro 등의 논문에서는[10] 주요 자외선인 UVB 조사군에서 각질층의 ceramide가 유의적으로 감소함을 보고하였다. 이들 연구와 연관하여 본 연구 결과에서 C군에 비해 UV군의 표피 총 세라마이드 함량이 현격하게 저하되었음은 자외선에 의한 세라마이드 감소로 볼 수 있으며, 이것과 비교하여 M0.5군의 세라마이드 총 함량 증가는 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물의 식이 공급이 표피 세라마이드의 함량 증가를 초래하여 자외선 조사로 손상된 표피 장벽 복구를 야기 시켰다고 볼 수 있다. 이상의 결과에서 5주간의 0.5% 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물의 식이 공급은 자외선 조사로 인해 유도된 피부 건조화를 개선시키기에는 충분하지 않은 기간이었으나 피부 장벽의 주요 지질인 표피의 세라마이드 함량은 증가시켰음을 알 수 있다.

자외선 조사와 병행된 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물의 식이 공급으로 인한 세라마이드 함량 변화를 설명하기 위해 살펴본 SPT 및 ceramidase의 mRNA 발현은 군 간 유의성을 보이지 않았으나, UV군의 ceramidase의 단백질 발현은 C군에 비해 유의적으로 매우 높게 나타났으므로 자외선 조사로 인한 표피 세라마이드 함량 감소는 ceramidase 단백질 발현 증가에 의한 결과로 보인다. 반면 UV군의 SPT의 단백질 발현은 C군과 유사한 수준이었으나, M0.5군은 C군과 비교하여 유의적으로 현격히 높은 수치를 보였는데, 이는 0.5% 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물의 식이공급에 의한 표피 세라마이드 함량 증가는 SPT 단백질 발현 증가와 더불어 세라마이드 함량이 증가되었기 때문으로 보인다.

Ceramide는 Serine과 palmitoyl CoA가 결합하여 3-keto-sphinganine, sphinganine, sphingosine의 중간산물을 거쳐 de novo 합성된다. 이 de novo 합성 과정에 SPT가 주요 효소로 작용하는 것으로 밝혀져 있으며[5-8] de novo 합성 이외에 세

Table 2. Altered mRNA levels of SPT and ceramidase in the epidermis of hairless mice

	Percentage of control in group[1)]			
	C	UV	M0.5	M1.0
SPT (SPT/GAPDH)[3)]	100.00 ± 0.00[a,2)]	62.63 ± 10.85[a]	98.18 ± 24.81[a]	105.59 ± 23.86[a]
Ceramidase (ceramidase/GAPDH)	100.00 ± 0.00[a]	219.20 ± 109.25[a]	91.36 ± 28.44[a]	144.27 ± 9.79[a]

1) Data are mean ± SEM value (n = 10). Group C, hairless mice fed a control diet without UV irradiation for 5 weeks; groups UV, M0.5, and M1.0, hairless mice fed a control diet (UV) or diets supplemented with 0.5% (M0.5) or 1.0% (M1.0) of red ginseng extracts mixed with Torilis fructus and Corni fructus (66.7% red ginseng) in parallel with UV irradiation for 5 weeks 2) Date are mean ± SEM (n = 10). Values without a common letter in the same row are significantly different ($p < 0.05$) using one-way ANOVA and Duncan's multiple range test 3) Total RNA in the epidermis of group C, UV, M0.5, and M1.0 was isolated, and real-time PCR was performed for SPT and ceramidase mRNAs. The signal intensities from real-time PCR analysis were quantified and normalized, first to the corresponding values for the GAPDH internal controls and then to that of normal control group (group C)

라마이드 함량을 증가시키는 요인으로 1) sphingomyelinase (SMase)의 활성을 통한 sphingomyelin 가수분해의 증가와, 2) glucosyceramidase (GlcCerase)의 활성을 통한 glucosylceramide 가수분해 증가가 알려져 있으며, SPT이외에 SMase 및 GlcCerase 효소들 또한 그 중요성이 부각되고 있다.[37] 한편으로 자외선 조사가 세라마이드 생성을 증가시킨다는 본 연구와 상반되는 연구 보고가 있으나 이는 1일 미만의 단기적인 자외선 조사의 경우로[36,38] 5주간 저용량의 장기적인 자외선 조사를 시행한 본 연구와는 다른 경우이다.

본 연구에서 장기적인 저용량의 자외선 조사와 병행된 0.5% 식이 수준의 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물의 섭취는 표피 장벽 유지의 주요 구성 지질인 세라마이드 함량을 증가시켰으나, UV군에 비해 감소된 ceramidase 단백질 발현에도 불구하고 1% 식이 수준의 동일한 혼합 추출물 급여군 (M1.0군)은 효능이 나타나지 않아, 이는 긍정적 결과를 위한 건강기능 식품섭취에는 적정 용량이 있음을 제안한다. 홍삼 및 사상자, 산수유에는 지표물질인 ginsenoside-Rb1, torilin 및 loganin 이외의 페놀성 화합물, 폴리아세틸린계 화합물 등 여러 성분들이 함유되어 있으며, 이들이 항상 용량 의존적인 방식으로 활성화되는 것은 아니다.[39-41] 즉, 0.5% 및 1% 식이 공급시 서로 상반되는 결과가 초래된 것은[39-41] 여러 함유 성분들의 상호 상승 및 억제 등의 복합적인 작용에 의한 것으로 여겨지며, 이들 지표성분들의 혼합에 의한 세라마이드 함량 및 관련효소의 발현 또는 활성 변화에 대한 연구가 추후 진행될 필요성이 있다. 또한 본 연구의 사전 연구인 Kim 등의 논문에서는[13] 혼합 추출물이 아닌, 홍삼 추출물 자체 성분 섭취에 따른 피부 장벽 유지 기능에 대해 살펴보았으며 그 결과는 0.5% 식이 수준에서만 세라마이드 함량을 증가시킨 본 연구의 결과와 유사하였다. 예로부터 습창, 완선, 옴 등이 피부 질환에 유효하다고 기록되어 있는 사상자 (Torilis fructus)와[23,24] 항산화, 항알러지의 생리활성과 함께[25-27] 피부 주름 억제 효능이 보고되어 있는[28] 산수유 (Corni fructus)를 홍삼과 혼합하여 건강기능식품을 만들 경우 홍삼 자체 성분과 비교하여 효능은 유사하지만 단가를 감소시킬 수 있다는 점에 기여할 것으로 여겨진다.

요약 및 결론

자외선 조사에 의한 피부 광노화 유도와 함께 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물의 식이 공급이 무모생쥐 표피의 세라마이드 함량 및 관련인자 발현에 미치는 영향을 알아보았으며 그 결과는 다음과 같다.

1) 5주간 자외선 조사를 받은 UV군 (Photoaged control)의 세라마이드 함량은 자외선 조사를 하지 않은 C군 (Normal control)에 비해 현저히 낮았다.

2) 5주간 자외선 조사와 함께 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물을 식이 무게의 0.5% 공급한 M0.5군의 표피 세라마이드 함량은 C군보다 유의적으로 높았다.

3) M0.5군의 SPT의 단백질 발현양은 UV군에 비해 높게 증가되었고, UV군의 ceramidase의 단백질 발현 양은 C군에 비해 유의적으로 높았다.

4) 5주간 자외선 조사와 함께 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물을 1% 수준으로 식이 공급한 M1.0군은 UV군에 비해 감소된 ceramidase 단백질의 감소에도 불구하고 표피 세라마이드 함량이 UV군과 유사한 수준으로 낮았다.

5) 5주간 식이 공급 후 SPT 및 ceramidase의 mRNA 발현양은 군간 유의적인 차이를 보이지 않았다.

이상의 결과는 0.5% 식이 수준의 홍삼, 사상자 및 산수유 혼합 추출물 섭취는 표피 세라마이드 함량을 높이는데 효과적임을 제시한다.

Literature cited

1) Elias PM. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 1983; 80 Suppl 1: 44s-49s
2) Feingold KR, Schmuth M, Elias PM. The regulation of permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 2007; 127(7): 1574-1576

3) Elias PM, Menon GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res* 1991; 24: 1-26
4) Harding CR. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther* 2004; 17 Suppl 1: 6-15
5) Holleran WM, Takagi Y, Imokawa G, Jackson S, Lee JM, Elias PM. beta-Glucocerebrosidase activity in murine epidermis: characterization and localization in relation to differentiation. *J Lipid Res* 1992; 33(8): 1201-1209
6) Takagi Y, Kriehuber E, Imokawa G, Elias PM, Holleran WM. Beta-glucocerebrosidase activity in mammalian stratum corneum. *J Lipid Res* 1999; 40(5): 861-869
7) Dickson RC, Lester RL, Nagiec MM. Serine palmitoyltransferase. *Methods Enzymol* 2000; 311: 3-9
8) Hanada K. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1632(1-3): 16-30
9) Rittié L, Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 2002; 1(4): 705-720
10) Meguro S, Arai Y, Masukawa Y, Uie K, Tokimitsu I. Relationship between covalently bound ceramides and transepidermal water loss (TEWL). *Arch Dermatol Res* 2000; 292(9): 463-468
11) Meguro S, Arai Y, Masukawa K, Uie K, Tokimitsu I. Stratum corneum lipid abnormalities in UVB-irradiated skin. *Photochem Photobiol* 1999; 69(3): 317-321
12) Menon GK, Ghadially R, Williams ML, Elias PM. Lamellar bodies as delivery systems of hydrolytic enzymes: implications for normal and abnormal desquamation. *Br J Dermatol* 1992; 126(4): 337-345
13) Kim H, Oh I, Park KH, Kim NM, Do JH, Cho Y. Stimulatory effect of dietary red ginseng on epidermal hydration and ceramide levels in ultraviolet-irradiated hairless mice. *J Med Food* 2009; 12(4): 746-754
14) Bak H, Hong SP, Jeong SK, Choi EH, Lee SE, Lee SH, Ahn SK. Altered epidermal lipid layers induced by long-term exposure to suberythemal-dose ultraviolet. *Int J Dermatol* 2011; 50(7): 832-837
15) Boelsma E, Hendriks HF, Roza L. Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(5): 853-864
16) Smith M, Boon HS. Counseling cancer patients about herbal medicine. *Patient Educ Couns* 1999; 38(2): 109-120
17) Song JH, Park MJ, Kim E, Kim YC. Effect of Panax ginseng on galactosamine-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Yakhak Hoeji* 1990; 34(5): 341-347
18) Tomoda M, Takeda K, Shimizu N, Gonda R, Ohara N, Takada K, Hirabayashi K. Characterization of two acidic polysaccharides having immunological activities from the root of Panax ginseng. *Biol Pharm Bull* 1993; 16(1): 22-25
19) Park JD. Recent studies on the chemical constituents of Korean ginseng (Panax ginseng C. A. Meyer). *Korean J Ginseng Sci* 1996; 20(4): 389-415
20) Kwak YS, Park JD, Yang JW. Present and its prospect of red ginseng efficacy research. *Food Ind Nutr* 2003; 8(2): 30-37
21) Nam KY. The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs, processed ginsengs (Panax ginseng C. A. Meyer). *J Ginseng Res* 2005; 29(1): 1-18
22) Zhang D, Yasuda T, Yu Y, Zheng P, Kawabata T, Ma Y, Okada S. Ginseng extract scavenges hydroxyl radical and protects unsaturated fatty acids from decomposition caused by iron-mediated lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1996; 20(1): 145-150
23) An DK. Medicinal herbs. Seoul: Kyohak; 2003
24) Shin JH, Shin YW. Illustrated book of medical herbs from hyangyakjipseongbang. Daegu: Keimyung University Press; 2006
25) Lee EB, Choi BC, Cho TS. Pharmacological studies on ether fraction of Corni fructus. *Yakhak Hoeji* 1985; 29(1): 1-10
26) Park JH. Medical plants of Korea. Seoul: Shinil books; 2004
27) Choi WY, Chun HJ, Lee JH, Baek SH. Effects of methanol extract from Cornis fructus on melanogenesis. *Korean J Pharmacogn* 2003; 34(1): 70-74
28) Cha HJ, Park MT, Chung HY, Kim ND, Sato H, Seiki M, Kim KW. Ursolic acid-induced down-regulation of MMP-9 gene is mediated through the nuclear translocation of glucocorticoid receptor in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Oncogene* 1998; 16(6): 771-778
29) So SH, Lee SK, Hwang EI, Koo BS, Han GH, Kim NM. Effects of Korean red ginseng and herb extracts mixture (KTNG0345) on procollagen biosynthesis and matrix metalloproteinase-1 activity in human dermal fibroblast. *J Ginseng Res* 2007; 31(4): 196-202
30) Park KH, Choi YS, Kim HA, Lee KG, Yeo JH, Jung DH, Kim SH, Cho Y. Dietary effect of silk protein on ceramide synthesis and the expression of ceramide metabolic enzymes in the epidermis of NC/Nga mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2007; 36(5): 554-562
31) Tohyama J, Oya Y, Ezoe T, Vanier MT, Nakayasu H, Fujita N, Suzuki K. Ceramide accumulation is associated with increased apoptotic cell death in cultured fibroblasts of sphingolipid activator protein-deficient mouse but not in fibroblasts of patients with Farber disease. *J Inherit Metab Dis* 1999; 22(5): 649-662
32) McAuliffe DJ, Blank IH. Effects of UVA (320-400 nm) on the barrier characteristics of the skin. *J Invest Dermatol* 1991; 96(5): 758-762
33) Elias PM, Friend DS. The permeability barrier in mammalian epidermis. *J Cell Biol* 1975; 65(1): 180-191
34) Ohnishi Y, Okino N, Ito M, Imayama S. Ceramidase activity in bacterial skin flora as a possible cause of ceramide deficiency in atopic dermatitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(1): 101-104
35) Imokawa G, Takema Y, Yorimoto Y, Tsukahara K, Kawai M, Imayama S. Degree of ultraviolet-induced tortuosity of elastic fibers in rat skin is age dependent. *J Invest Dermatol* 1995; 105 (2): 254-258
36) Holleran WM, Uchida Y, Halkier-Sorensen L, Haratake A, Hara M, Epstein JH, Elias PM. Structural and biochemical basis for the UVB-induced alterations in epidermal barrier function. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1997; 13(4): 117-128
37) Holleran WM, Takagi Y, Uchida Y. Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett* 2006; 580(23): 5456-5466
38) Uchida Y, Nardo AD, Collins V, Elias PM, Holleran WM. De novo ceramide synthesis participates in the ultraviolet B irradiation-induced apoptosis in undifferentiated cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2003; 120(4): 662-669
39) Kang KS, Kim HY, Pyo JS, Yokozawa T. Increase in the free radical scavenging activity of ginseng by heat-processing. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(4): 750-754
40) Halladay AK, Yu YL, Palmer J, Oh KW, Wagner GC. Acute and chronic effects of ginseng total saponin and amphetamine on fixed-interval performance in rats. *Planta Med* 1999; 65(2): 162-164
41) Bae EA, Han MJ, Shin YW, Kim DH. Inhibitory effects of Korean red ginseng and its genuine constituents ginsenosides Rg3, Rf, and Rh2 in mouse passive cutaneous anaphylaxis reaction and contact dermatitis models. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(9): 1862-1867