大田大學校 韓醫學硏究所 論文集
第21卷 第2號 2013年 2月 20日

地楡의 피부 老化에 대한 硏究

김경신[1] · 탁동률[1] · 김병수[1] · 강정수[1]*

Study on Anti-Skin Aging Effect of Sanguisorba officinalis L.

Kim Kyoung-Shin[1] · Tak Dong-Yul[1] · Kim Byoung-Soo[1] · Kang Jung Soo[1]*
[1]Department of Physiology, Colleage of Oriental Medicine, Daejeon University

To develop a new anti-skin aging cosmetics or functional foods by using antioxidative activity and collagenase inhibitor, a potent collagenase or elastase inhibitor was screened from various extracts of medicinal plants and its optimal extraction condition was investigated. And antioxidative activity, antimicrobial activity and inhibitory of effect against collagenase activity were investigated.

In the these results, we selected the Sanguisorba (Sanguisorba officinalis L.) that presents a potential biological activities. Sanguisorba which is very rich in triterpenoid saponin and tannins was recently reported its anti-oxidant activities and phytoestogenic activities in vivo test and many clinical studies. The experiments were carried out in vitro to determine anti-oxidant activities of Sanguisorba extracts on DPPH radical scavenging activity assay, Superoxidase scavenging activity assay, Elastase and collagenase activity assay.

It show that the Sanguisorba extracts have the most significant anti-oxidant on free radical scavenging activity assay, and also inhibited significantly activities of elastase, collagenase. Further, Sanguisorba extracts are activated Type I collagen protein expression in CCD-986sk cells.

These result suggest that the Sanguisorba extracts on DPPH radical scavenging activity assay, Superoxidase scavenging activity assay, elastase and collagenase activity assay, Type I collagen protein expression in CCD-986sk cells effected could be developed cosmetic ingredients for anti-aging.

Key word : Sanguisorba (Sanguisorba officinalis L.), Anti oxidative, Anti aging

Ⅰ. 서 론

노화란 나이가 들면서 신체의 구조와 기능이 점진적으로 저하되고 질병과 사망에 대한 감수성이 급격히 증가하면서 쇠약해지는 과정이다. 최근의 노화 가설들 중 프리래디칼 가설과 산화적 손상가설로 이러한 산화적 스트레스에 의한 노화 현상이 가장 잘 설명되고 주목을 받고 있다[1-2].

특히, 피부노화는 광노화와 자연노화로 구분되어지며, 자외선에 의해 유발되는 광노화의 조절기작은 많은 연구가 진행되고 있다. 광노화에서는 자외선 조사로 생성된 활성 산소류가 피부의 효소 및 비효소적 방어계에 손상을 주어서 세포성분들의 손상을 야기시킨다[3-4]. 또한 활성 산소류는 멜라닌 생성을 촉진시키고 주름을 생성시키는 원인 물질로 받아들이고 있는데, 특히 광노화를 주름생성의 원인으로 보는 이유는 자외선으로 인해 진피 조직이 심각하게 손상되기 때문이다. 이와같은 계속된 산화적 스트레스는 지질과산화,

* 교신저자 : 강정수, 대전대 한의과대학 생리학교실
E-mail : omdkjs@dju.kr
투고일 : 2013년 1월13일 수정일 : 2013년 2월4일
확정일 : 2013년 2월4일

단백질산화, 간질성분을 파괴시키는 단백질 분해효소의 활성화, 탄력섬유인 콜라겐과 엘라스틴 사슬의 절단 및 멜라닌 생성반응촉진, DNA 산화와 같은 생체 구성 성분의 손상을 야기시킨다.

주름 생성 억제 및 개선의 효과로 사용할 수 있는 지유는 장미과 속하는 다년생 초본 오이풀(Sanguisorba officinalis L.) 및 同屬近緣식물의 뿌리와 근경을 건조한 것이다. 지유는『神農本草經』[5]에 "主婦人乳痛 七傷 帶下病 止痛 除惡肉 止汗 療金瘡"이라고 처음으로 기재된 이래, 寒性은 凉血하고, 澁味는 收斂하여 양호한 止血作用을 가지고 있으며, 味苦性降하여 下로 走하여 下焦의 血分濕熱을 淸熱燥濕시켜 便血과 痔瘡出血, 血痢 및 崩漏 등을 치료하는 약제이다[6]. 또한 지유의 잎과 뿌리를 오래 달여서 만든 약은 갖가지 염증과 피부병, 화상 치료에 효력이 뛰어나며, 그 중에서도 화상으로 인한 화독을 없애고 감염을 막는데 최상의 약초로, 2차적인 조직 괴사와 삼출액이 빨리 줄어들고 화상부위가 깨끗하게 되면서 새살이 돋아 나오게 한다[7-8]. 지유의 주성분은 tannin, triterpenoid계 saponin, ziyu glycoside Ⅰ 및 pomolic acid, ziyu glycoside Ⅱ, ziyu glycoside B 등이 함유[9]되어 있으며 止血作用, 抗炎作用, 抗菌作用, 促進傷口愈合 등의 약리작용이 있다고 보고[10]되었다. 지유에 대한 실험적 연구는 지유 및 형개 약침이 지혈효과에 미치는 영향[11], 지유의 생리활성과 화장품소재로의 활용에 대한 연구[12], 활성화 된 T 세포에 대한 면역억제 효과 연구[13] 등이 있다.

지유의 항산화 효과 즉, free radical 자체의 소거능을 알아보기 위하여 DPPH radical 소거작용과 superoxide의 활성을 측정하였고, 항피부노화 즉, 피부재생 및 탄력에 대한 효과를 알아보기 위하여 elastin의 가수분해효소인 elastase와 collagen의 가수분해효소인 collagenase의 활성억제 작용 측정 등을 실험한 바, 지유가 항산화 및 항피부 노화에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

본 실험에 사용한 지유(Sanguisorba)는 중국 하북 지역에서 생산되어 건조된 것으로 중국 안국시장에서 구입하였다.

2) 시약

3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT), NaOH, Dimethyl Sulfoxide (DMSO), DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium, GIBCO, USA) medium, isopropanol, D-PBS (dulbecco's phosphate buffered saline, GIBCO, USA), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), Elastase, Arbutin, N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-P-Nitroanilide (SANA), Potassium Phosphate Dibasic, Potassium Phosphate Monobasic, Trypsin-EDTA (GIBCO BRL, USA), FBS (fetal bovine serum, GIBCO, USA), Hyclone(Sigma chemical Co, USA), SOD assay kit(Dojindo, Japan), EAE(ethyl ascorbyl ether, Cosmol) 및 기타 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

3) 기기

열탕추출기(대웅, Korea), rotary vacuum evaporator(Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer(EYELA FDU-540, Japan), CO2 incubator(Forma scientific Co., U.S.A), clean bench(Vision scientific Co., Korea), autoclave(Sanyo, Japan), micro-pipet(Gilson, France), water bath(Vision scientific Co., Korea), vortex mixer(Vision scientific Co., Korea), spectrophotometer(Shimazue, Japan), deep-freezer(Sanyo, Japan), thermocycler system(MWG Biotech., Germany), plate shaker(Lab-Line, U.S.A) 및 ELISA reader(Molecular Devices, U.S.A) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 추출물의 제조 (Sanguisorba Extract ; SE)

지유 100g을 증류수 1,000㎖에 넣고 2시간 동안 가열한 후 여과하여 얻은 액체성분을 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 약리성분을 추출하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 7.8 g의 분말을 얻었다. 얻은 분말은 냉동고에 보관하면서 사용시 필요한 농도로 phosphate buffer에 희석하였다.

2) 세포주 배양

Human fibroblast로 부터 유래된 CCD-986sk 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM medium으로 plate에 well당 5×104개의 세포를 배양한 후 12시간이 지난 후 세포가 plate에 완전히 부착된 것을 확인 후에 사용하였다. 배양 후, 배지를 제거하고 지유 추출물(SE)을 같은 배지로 적당히 희석하여 첨가한 후, 5% CO2, 37℃ 조건하에서 세포가 well의 바닥에 약 80%이상 될 때까지 배양하였다. 96 well 조직배양 plate(NUNC, Denmark)에 2x104 cell/well 농도로 2 ml씩 첨가하고, 5% CO2, 37℃ 조건하에서 24시간 배양하였다.

3) MTT에 의한 독성 검사

세포를 96-well plate에 well당 2×105 개의 세포를 전체 배양 부피를 200 ㎕로 하였다. 5% CO2 배양기 37℃에서 48 시간 동안 배양한 후, MTT solution을 세포가 함유된 100㎕ culture medium이 담긴 96-well plate에 20㎕의 MTT solution을 넣고 4시간 더 배양한 후 각 well에 10 ㎕ DMSO를 넣어 반응을 끝낸 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) DPPH radical 소거능 측정

DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 산화/환원 환경에 따라 색을 띠는 라디칼로 시료의 라디칼 제거능력을 측정할 수 있다. 시료의 free radical 소거 활성은 stable radical인 DPPH에 대한 환원력을 측정한 것으로 시료를 phosphate buffer에 녹여 100 ㎕에 200 mM DPPH 900 ㎕를 shaking한 후 상온에서 10 분간 방치 후 O.D 517 nm에서 측정하였다.

(Blank : phosphate buffer, Control : phosphate buffer + DPPH)

Free radical scavenging activity(%) = [1-(Absorbance of test compound / Absorbance of control)] X 100.

5) SOD 활성 측정 실험

96-well plate의 각 well에 sample solution 20 ㎕를 첨가한 후 reagent solution 200 ㎕를 넣은 후 마지막으로 enzyme working solution을 넣어준 후, 37℃에서 20 분간 반응시켰다. O.D 450 nm에서 측정 한 후, SOD activity (inhibition rate %)를 계산하였다.

6) Elastase 측정 실험

96-well plate의 각 well에 10 nM Elastase (0.25 mg/ml) 20 ㎕를 첨가한 후 0.2M Tris-Cl (pH 8.0)으로 희석된 시료 280 ㎕를 넣은 후 25℃에서 10 분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 125 mM SANA 10 ㎕를 첨가한 후 O.D 410 nm에서 측정하였다. 평가방법은 시료에 의해 Elastase의 활성 감소가 클수록 Elastase 억제력이 효과적으로 작용한 것으로 판별한다.

7) Collagenase 활성 측정

Buffer A (20 mM Tris-Hcl, pH 7.5 + 5 mM CaCl2)에 collagen을 녹여 반응 기질액을 만들었다 (3 mg/ml). 이 반응 기질액에 collagenase (Type IIIA)와 시료 농도에 맞춘 후 37℃에서 1시간 배양하였다. Ninhydrin reagent (Buffer B : Solution A = 1 : 1)[(Buffer B: 0.5 M acetic acid + 0.1 M cictrc acid, pH 5.0), (Solution A: 200mg ninhydrin + 20mg SnCl2 in 10ml of methylcellosolve)] 1 ml를 각각을 20분간 배양한 후 급속히 냉각시켜 정지시키고 희석용 용액(n-propanol : water = 1 : 1 , v/v)으로 희석하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

collagenase type IIIA에 의해 유리된 양을 collagen-like polymer(CLP)로 간주한다[14-15].

8) Type Ⅰ 콜라겐 생합성량 측정

지유 추출물 대한 Type Ⅰ collagen 생합성량을 측정하였다[16]. 인간 섬유아세포에서 배지로

배출되는 콜라겐 합성량을 측정하기 위하여 procollagen Type I C-peptide ELA kit (procollagen type I C-peptide ELA kit, TaKaRa, MK101)을 사용하였다. Kit를 사용하기 전 인간 섬유아세포를 1×104 세포/㎖의 농도로 하여 24-well 배양접시에 접종하였다. 배지는 FBS 10%를 함유한 DMEM 배지를 사용하였다. 접종 후 24시간 후 시험 시료를 50 ㎍/㎖의 농도로 10 ㎕ 첨가하고 3일 동안 37℃, 5% CO2 배양기에서 배양하였다. 배양한 배지를 E-tube로 옮기고 15,000rpm에서 30초 동안 원심분리 하였다. 이 배지 상층액을 시험 시료로 하여 procollagen Type I C-펩타이드 ELA kit를 프로토콜에 의해 실시하였다.

3. 통계 분석

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 평균값 ± 표준편차로 기록하였고 유의성 검증은 Student's T-test 분석방법을 이용하여 결정하였다. 특별한 언급이 없는 경우, 실험값이 95% 유의성이 인정되는 경우를 유의한 것으로 판단하였다.

III. 결 과

1. MTT assay에 의한 cell viability 측정

MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띄는 비수용성의 MTT formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다. CCD-986sk 세포주에 지유를 1, 10, 100, 1000 μg/ml의 농도로 처리하여 세포 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 지유의 농도에 따른 커다란 영향을 보이지 않았으며 95% 이상의 viability를 나타냈고 세포의 성장에 영향을 주지 않았다 (Fig. 1).

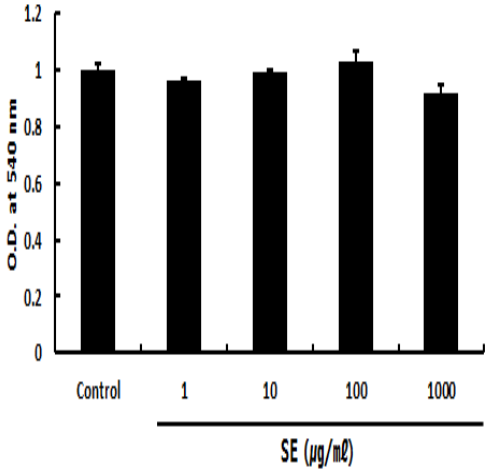

Fig. 1. Effect of Sanguisorba Extract (SE) on CCD-986sk cell viability. CCD-986sk cells were treated with 0 to 1000 μg/ml of SE for 15 hours and viability was assayed with MTT reagent. Sanguisorba Extract (SE) showed no cytoxicity on the CCD-986sk cell. Values presented are the mean ± standard error, n=3.

2. 항산화 효과

1)DPPH 라디칼 소거능

DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 반응으로 지유 추출물의 항산화 작용을 측정한 결과, 지유의 추출액은 농도에 의존적 항산화 작용을 보였다. 비타민C는 대표적인 항산화 물질로 본 실험에서 EAE(ethyl ascorbyl ether)를 사용하였다. EAE는 비타민C를 안정화시킨 물질로 빛, 열, pH 등에 의해 기존의 비타민 C 보다 쉽게 변성되지 않는다. 지유의 추출액은 62.5, 125, 250, 500, 750 ㎍/㎖의 농도에서 농도에 의존적 항산화 작용을 보였다.

Table 1. Effect of Sanguisorba Extract (SE) on DPPH Radical-Scavenging Activity

Sample	Concentraion	Scavenging effect (%)
Sanguisorba Extract (SE)	750 μg/ml	60.20 ± 7.27*
	500 μg/ml	54.89 ± 0.06*
	250 μg/ml	41.26 ± 1.4*
	125 μg/ml	26.22 ± 2.71*
	62.5 μg/ml	16.43 ± 0.29*
EAE (ethyl ascorbyl ether)	1000 mM	83.58 ± 0.20*
	500 mM	82.53 ± 0.14*
	250 mM	76.13 ± 0.29*
	125 mM	74.54 ± 0.58*
	62.5 mM	71.76 ± 0.20*
	31.5 mM	68.68 ± 0.71*
	15.5 mM	68.30 ± 0.91*

Each value is mean ± S.E. (n>3). (*, p<0.05)

2) Superoxide anion radical(SOD) 소거능

SOD 활성 측정으로 지유 추출물의 항산화 작용을 측정한 결과, 지유의 추출액은 62.5, 125, 250, 500, 1000 ㎍/㎖의 농도에서 농도에 의존적 항산화 작용을 보였다. 1000 ㎍/㎖에서는 99.35 ± 0.90%, 500 ㎍/㎖에서는 96.07 ± 0.56%, 250 ㎍/㎖에서는 87.83 ± 0.90%, 125 ㎍/㎖에서는 77.66 ± 4.86%, 62.5 ㎍/㎖에서는 60.14 ± 8.37%로 우수한 효능을 나타냈으며 농도 의존적인 효능을 갖는 것으로 확인되었다(Fig 2).

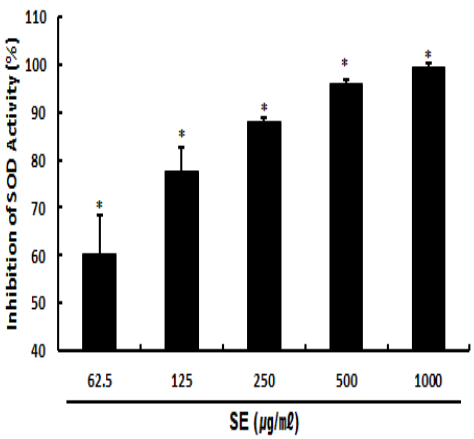

Fig. 2. Effect of Sanguisorba Extract(SE) on the Superoxide dismutase (SOD) activity. The effect on SOD was tested with Sanguisorba Extract(SE), Date are expressed as % of control and each column represents the mean ± S.D. of three determination. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, * p < 0.05.

3. Elastase 억제능 측정

Elastase 활성 측정으로 지유 추출물의 elastase 작용을 측정한 결과, 지유의 추출액은 1, 10, 100, 1000 ㎍/㎖의 농도에서 농도에 의존적 elastase 작용을 보였다. 1 ㎍/㎖에서 16.58 ± 4.00%, 10 ㎍/㎖에서 17.70 ± 0.51%, 100 ㎍/㎖에서 18.46 ± 0.32%, 1000 ㎍/㎖에서 31.13 ± 4.76%로 측정되어 유의한 효능을 확인하였다 (Fig. 3).

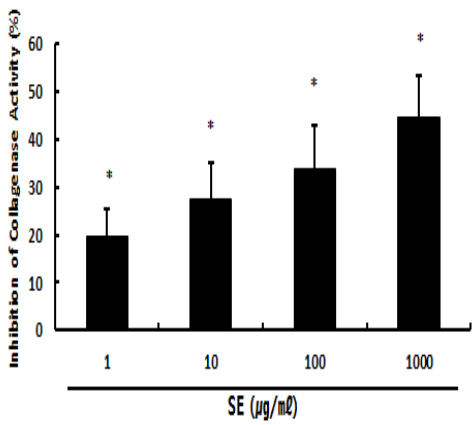

Fig. 3. Effect of Sanguisorba Extract(SE) on the Elastase. The effect on Elastase inhibitiory activity was tested with Sanguisorba Extract(SE). Date are expressed as % of control and each column represents the mean ± S.D. of three determination. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, * p < 0.05.

4. Collagenase 활성 억제능 측정

피부 재생 및 탄력에 중요한 역할을 하는 섬유상태의 collagen을 분해하는 collagenase의 작용을 이용하여 collagenase 활성을 평가하였다. Collagenase 활성 측정으로 지유 추출물의 collagenase 작용을 측정한 결과, 지유의 추출액은 1, 10, 100, 1000 ㎍/㎖의 농도에서 농도에 의존적 collagenase 작용을 보였다. 1000 ㎍/㎖에서는 44.55 ± 8.66%, 100 ㎍/㎖에서 33.79 ± 8.98%, 10 ㎍/㎖에서 27.46 ± 7.75%, 1 ㎍/㎖에서는 19.65 ± 5.63%로 나타냈으며 농도 의존적으로 효능을 갖는 것으로 확인되었다(Fig 4).

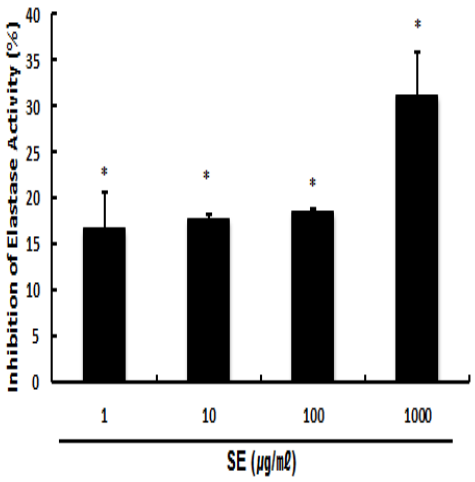

Fig. 4. Effect of Sanguisorba Extract(SE) on the Elastase. The effect on Elastase inhibitiory activity was tested with Sanguisorba Extract(SE). Date are expressed as % of control and each column represents the mean ± S.D. of three determination. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, * $p < 0.05$.

5. Type Ⅰ Collagen 생합성량 측정

Type Ⅰ 콜라겐 생합성량 측정을 위해 인간 섬유아세포에서 배지로 배출되는 콜라겐 합성량을 측정하기 위하여 PIP(procollagen type I C-peptide ELA kit(TaKaRa, MK101))을 사용하였다. Collagen 측정으로 지유추출물의 collagen을 측정한 결과, 지유의 추출액은 10, 25, 50, 100 ㎍/㎖의 농도에서 농도에 의존적 collagen 합성작용을 보였다. 지유 농도 100 ㎍/㎖에서는 316.27 ± 0.35 ㎍/㎖의 collagen을 생성했으며, 지유 농도 50 ㎍/㎖는 277.23 ± 6.55 ㎍/㎖, 25 ㎍/㎖에서는 250.18 ± 1.56 ㎍/㎖, 10 ㎍/㎖에서는 203.99 ± 8.28 ㎍/㎖의 collagen을 생성 유도하는 것으로 나타냈으며 농도 의존적으로 효능을 갖는 것으로 확인되었다.

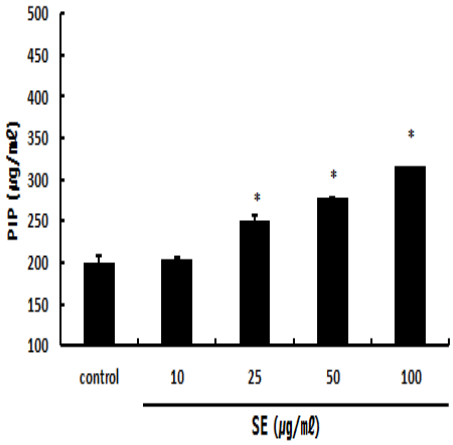

Fig. 5. Effect of Sanguisorba Extract(SE) on the Type I collagen protein expression in CCD-986sk cells (Human fibroblast). The Type I collagen was measured by described in Material and Methods. Date are expressed as % of control and each column represents the mean ± S.D. of three determination. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, * $p < 0.05$.

Ⅳ. 고 찰

노화과정은 시간에 따라 기능의 저하를 초래한다. 이러한 기능의 변화는 생물체 내외의 요인으로부터 초래되는 산화적 스트레스를 견뎌낼 수 있는 능력을 상실하게 하고, 세포내의 항상성을

잃게 한다. 최근에는 산화적 손상가설[16]과 프리래디칼 가설[2]로 노화현상을 설명하고 있다.

피부노화는 주름 증가와 탄력감소, 색소 침착 등 여러 형태로 나타나며, 그 중 가장 대표적인 노화의 현상은 주름이다[17]. 피부노화는 두 종류로 나눌 수 있다. 한 가지는 내인성 노화(intrinsic aging)로서 세월이 흘러감에 따라 피할 수 없는 노화 현상을 말하며, 다른 하나는 광노화 (photoaging)로서 오랫동안 햇빛에 노출된 얼굴, 손등, 목뒤 등의 피부에서 관찰되는 노화 현상을 말하는 것으로 내인성 노화 현상과 자외선에 의한 영향이 합쳐진 결과로 발생한다. 광노화 현상은 자외선의 노출을 피하면 예방할 수 있는 피부노화 현상이다. 임상적 특징은 비교적 경미하며, 잔주름, 피부건조증, 탄력감소 등을 들 수 있으며, 광노화의 특징은 내인성 노화에 비하여 심하고 일찍부터 관찰되며, 내인성 노화에 비하여 굵고 깊은 주름이 발생하며 잔주름도 많이 발생한다. 햇빛에 노출된 피부에 불규칙한 색소침착이 발생하며 일광흑자 (solar lentigo) 등의 색소질환이 증가한다. 피부가 매우 거칠고, 건조해지며 탄력성이 감소하여 심한 경우 피부가 처지게 된다[18].

피부는 신체를 싸고 있는 조직이며, 인체에 五臟六腑 이외의 부분을 皮肉筋骨脈 五體라 하는데, 皮는 그 중 하나이며 '肺主皮'라 하여 肺의 영역으로 배속하고 있다. 인체의 표면을 서술할 때 흔히 사용되는 용어로 皮膚, 皮毛 등이 있는데, 한의학 관점으로 보면 그 의미가 다르다.『說文解字』,『辭源』 등을 중심으로 字意를 분석해 보면, 皮毛는 털이 붙은 가죽, 신체 표면에 난 털, 신체를 덮는 것 등을 의미하고, 皮는 짐승의 벗긴 가죽, 인체에서 표피 등을 의미하며, 膚는 皮보다 심층부를 말한다[19-21].『內經』을 보면 皮毛와 皮膚는 의미상 다른 내용을 담고 있다.『靈樞·歲露論』[22]에 "寒則皮膚急而腠理閉, 暑則皮膚緩而腠理開", "人氣血虛, 其衛氣去, 形獨居, 肌肉減, 皮膚縱, 腠理開, 毛髮殘, 膲理薄, 煙垢落"라 하였고,『靈樞·刺節眞邪』22)에 "人氣在外, 皮膚緩, 腠理開, 血氣減, 汗大泄, 皮淖澤. 寒則地凍水冰, 人氣在中, 皮膚緻, 腠理閉, 汗不出, 血氣强, 肉堅濇"라 하여 피부는 주로 外感六氣가 인체에 영향을 미칠 때 인체의 '외부'라는 의미로 많이 사용되었다.

현대적 의미에서 皮毛는 피부와 털 그리고 이에 수반되는 피지선이나 땀샘 등을 총괄한다. 즉 전도, 증발을 통해 체온조절을 하고 있으며 땀샘을 통해서도 하고 피부혈관에 의해서도 체온을 조절하고 있다. 예를 들어 추위에 노출되면 피모는 수축하여 치밀하게 되고 더위에 노출되면 피모는 이완하여 疏散하게 된다. 이와 같이 피모의 작용이란 액체화한 노폐물을 체외로 배설함으로써 농도를 조절하고 여러 기전에 의하여 체온을 조절하니 그 적응기능과 肺의 관계가 인정된다. 즉, 肺와 皮毛는 조절기능에서 상관관계가 있으니 한의학에서는 이를 "肺主身之皮毛", "其華在毛 其充在皮" 등으로 표현하였다[23-24].

한의학에서 노화를 五臟六腑의 氣血이 消耗되고 陰陽이 失調되어 발생하는 것으로 보고 있다.『素問·上古天眞論』[25]에 "丈夫八歲 腎氣實, 髮長齒更. 二八 腎氣盛, 天癸至, 精氣溢寫, 陰陽和故能有子. 三八 腎氣平均, 筋骨勁强, 故眞牙生而長極. 四八 筋骨隆盛, 肌肉滿壯. 五八 腎氣衰, 髮墮齒槁. 六八 陽氣衰竭於上, 面焦, 髮鬢頒白"이라 하여 腎氣의 盛衰가 성장발육 및 피부, 모발, 치아 등의 노화에 직접적으로 관여한다고 하였고,『靈樞·天年論』[22]에 "五十歲 肝氣始衰, 肝葉始薄, 膽汁始減, 目始不明. 六十歲 心氣始衰, 苦憂悲, 血氣懈惰, 故好臥. 七十歲 脾氣虛, 皮膚枯. 八十歲 肺氣衰, 魄離, 故言善悞. 九十歲 腎氣焦, 四藏經脈空虛"라 하여 五臟의 생리기능이 쇠퇴하여 몸이 쇠약해진다고 보았으며, 특히 脾臟의 氣虛로 인하여 피부가 마른다고 하였다. 따라서 피부노화는 생리적 상관관계에 있는 肺와 先天之本인 腎氣의 盛衰에 의해 영향을 받으면서 後天之本인 脾胃의 기능과도 밀접한 연관이 있는 것으로 보인다.

지유는 凉血止血藥으로 血熱로 인한 出血이 상용하는 약물로,『本草求眞』[26]에서 "性沈而澁, 苦寒, … 得此則能澁血不解. 其熱不除 則血不止

其熱旣淸 則血自安 且其性主收斂 旣能淸降 又能收澁"이라고 한 바와 같이, 炎症반응인 血熱을 沈澁하고 苦寒한 氣味로 인하여 억제하는 기능이 있다. 한의학적인 분석과 과학적 분석을 통해 지유의 약리작용을 살펴보면 止血作用, 抗炎作用, 抗菌作用, 促進傷口愈合 鎭吐作用 등이 있는 것으로 보고되고 있다[3,8]. 따라서 지유는 포도상구균, 대장간균, 결핵간균 등 다양한 병원성 미생물 활동을 억제하는 연구가 많이 제출[10,27-28]되고 있는 것으로 보아 염증성 생리기전을 억제하는 것으로 보인다.

지유는 출혈을 멎게 하고 잎과 뿌리를 오래 달여서 만든 고약은 갖가지 염증과 피부병, 화상 치료에 효력이 뛰어나다. 특히 화상으로 인한 화독을 없애고 감염을 막는데 최상의 약초로, 2차적인 조직 괴사와 삼출액이 빨리 줄어들고 화상부위가 깨끗하게 되면서 새살이 돋아 나오게 한다. 괴사된 피부 조직에 피부 이식 수술을 하지 않아도 새살이 돋아 나와 흉터가 거의 남지 않게 한다.

본 실험에서는 지유의 항산화 효과 즉, free radical 자체의 소거능을 알아보기 위하여 DPPH radical 소거작용과 superoxide의 활성을 측정하였고, 항피부노화 즉, 피부재생 및 탄력에 대한 효과를 알아보기 위하여 elastin의 가수분해효소인 elastase와 collagen의 가수분해효소인 collagenase의 활성 억제 작용 측정 등을 실험하였다.

MTT assay를 통해 지유의 세포증식에 미치는 영향을 조사하였다. CCD-986sk 세포주에 지유를 농도별로 처리한 결과, 농도에 따른 커다란 영향을 보이지 않았으며 90% 이상의 viability를 나타냈고 세포의 성장에 영향을 주지 않았다(Fig. 1).

산화반응은 생체내 대사과정 중에 생겨나는 여러 가지 산화물들에 의해서 야기되는 세포에 대한 해로운 반응으로 산화에 의한 손상이 노화와 밀접한 연관성이 있다. 또한 비타민 C는 대표적인 항산화 물질로, 빛, 열, pH 등과 같은 조건하에서 ascorbic acid는 매우 불안정하므로 매우 제한적으로 사용된다. 본 실험에서는 ethyl ascorbyl ether(EAE)를 사용하였는데, 이는 ascorbic acid의 3번 위치에 OH-기를 ethyl기로 치환한 형태의 유도체로서 수·유용성으로 사용이 가능하기 때문이다. DPPH를 이용한 유리라디칼 소거 반응으로 지유 추출물의 항산화 작용을 측정한 결과, 농도에 의존적 항산화 작용을 보였다(Table 1).

Superoxide dismutase는 가장 중요한 항산화 효소 중의 하나이다. 본 논문에서는 tetrazolium salt를 이용, SOD에 의한 환원으로 수용성의 WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)를 형성하여 SOD assay를 측정하였다. SOD 활성 측정으로 지유 추출물의 항산화 작용을 측정한 결과, 지유의 추출액은 농도에 의존적 항산화 작용을 보였다(Fig. 2).

광노화의 대표적인 조직학적 변화는 solar elastosis (일광 탄력섬유증) 라고 알려진 elastin 섬유의 주성분인 elastin 등의 축적이다. 자외선에 노출된 피부세포에서 elastin 유전자의 발현이 두드러지게 활성이 촉진되어 있으며 elastin 유전자의 발현은 free radicals에 의해 유발된다고 한다. Elastase는 피부에 존재하는 대표적인 단백질분해 효소로서 나이가 증가함에 따라 그 역가가 증가하여 피부구조 단백질인 elastin을 분해하여 피부구조 자체를 파괴한다. Elastase의 역가가 활성화될수록 구조 단백질인 elastin이 파괴되어 주름이 늘어나게 된다. 따라서 elastase 역가를 저해할 수 있는 물질은 주름개선 등의 항노화 성분으로 사용되어질 수 있다. 본 실험에서 elastase 활성 측정으로 지유 추출물의 elastase 작용을 측정한 결과, 지유의 추출액은 농도에 의존적 elastase 작용을 보였다(Fig. 3).

콜라겐의 분해는 광노화를 유발하는 주된 요소이다. 특히, elastic material의 축적은 주위 콜라겐다발의 동시 파괴에 의해 유발되는 현상이며 그 증거로 광노화에서 ECM 분해를 담당하는 matrixmetallo-proteinases(MMPs)의 존재로 알 수 있다. 본 실험에서는 피부재생 및 탄력에 중요

한 역할을 하는 섬유상태의 collagen을 분해하는 collagenase의 작용을 이용하여 collagenase 활성을 평가하였다. Collagenase 활성 측정으로 지유 추출물의 collagenase 작용을 측정한 결과, 지유의 추출액은 농도에 의존적 collagenase 작용을 보였다(Fig. 4).

콜라겐은 동물조직의 껍질, 뼈, 인대, 혈관, 근막 등 생체조직 전반에 걸쳐 분포되어 있는 구조단백질로서 조직의 종류에 따라 섬유상 특성이 striated fiber 콜라겐(Type Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ), nonfibrous 콜라겐(Type Ⅳ) 및 microfibrillar 콜라겐(Type Ⅴ, Ⅵ, Ⅶ, Ⅸ, Ⅹ) 등으로 구분된다. Striated fiber 콜라겐은 α사슬의 조성과 분자형태에 따라 Type Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ로 분류하고 있으며, Type Ⅰ 콜라겐은 피부, 건, 뼈, 혈관 등에, Type Ⅱ 콜라겐은 연골조직에 그리고 Type Ⅲ 콜라겐은 Type Ⅰ과 같지만 뼈에는 존재하지 않는 것으로 알려져 있다. Collagen 측정으로 지유 추출물의 collagen을 측정한 결과, 지유의 추출액은 농도에 의존적 collagen 합성작용을 보였다(Fig. 5).

Ⅴ. 결 론

지유의 항산화, 항피부노화작용을 알아보기 위하여 DPPH radical 소거작용, superoxide의 활성 측정, elastase와 collagenase의 활성 억제작용 측정 등을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT assay에 의해 viability를 측정한 결과 지유는 95% 이상의 viability를 나타냈고 세포독성에 영향을 주지 않았다.

2. DPPH와 SOD에 의한 항산화능을 측정한 결과 농도에 따라 유의성 있게 효능을 나타냈었다.

3. Elastase과 Collagenase를 측정한 결과 농도에 따라 유의성 있게 효능을 나타내었다.

4. Collagen 합성 측정 결과 농도에 따라 유의성 있는 효능을 나타내었다.

이상의 결과로 볼 때 지유추출물은 항산화, 항피부노화 작용이 있다. 피부 노화와 주름 생성에는 많은 원인과 기전이 작용하므로 다양한 방면의 연구 진행이 이루어져야 할 것이며, 향후 피부 미백 및 주름 완화제 개발 등의 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

참고문헌

1. Harman D. Free radical theory of aging: nutritional implications. AGE 1. pp. 143-150, 1978.
2. Yu BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. Free Radic Biol Med 21, 651-668, 1996.
3. Rozanski GJ, Witt RC. Alterations in repolarization of cardiac Purkinje fibers recovering from ischemic-like conditions: genesis of early afterdepolarizations. J Cardiovasc Electrophysiol, 4(2):134-43, 1993.
4. Oikarinen A. The aging of skin: chronoaging versus photoaging. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 7(1):3-4, 1990.
5. 손영기·신영환 편역. 본초삼가합주. 서울, 일중사, pp. 237-238, 2000.
6. 李尙仁 외. 本草學. 서울, 영림사, pp. 392-393, 1998.
7. 한문화·최진규. 약이 되는 우리풀 꽃 나무2. 서울, 한문화, pp. 204-210, 2001.
8. 문관심. 약초의 성분과 이용. 서울, 일월서각, pp. 362-363, 1999.
9. 신민교 외. 도해 향약대사전. 영림사, pp. 654-656, 1990.
10. 國家中醫藥管理局中華本草編委會. 中華本草(卷四). 上海, 上海科學技術出版社, pp. 281-287, 1999.
11. 정현식·이경섭·송병기. 지유 및 형개약침이 지혈효과에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지, 13(1):18-34, 2000.
12. 이순애. 지유의 생리활성기능검증 및 화장

품소재로서의 활용에 관한 연구. 경북, 경산대학교, 2003.
13. 국순호. 활성화된 T 세포에 대한 지유추출물의 면역억제효과. 대전대학교 대학원 박사학위논문, 2004.
14. Deters AM, Schröder KR, Hensel A. Kiwi fruit (Actinidia chinensis L.) polysaccharides exert stimulating effects on cell proliferation via enhanced growth factor receptors, energy production, and collagen synthesis of human keratinocytes, fibroblasts, and skin equivalents. J Cell Physiol, 202(3):717-22, 2005.
15. Yin J, Tomycz L, Bonner G, Wang DI. A simple and rapid assay of collagen-like polymer in crude lysate from Escherichia coli. J Microbiol Methods, 49(3):321-3, 2002.
16. Kanayama N, Terao T. Relationship of serum levels of pro-type I collagen peptide, pro-type III collagen peptide and type IV 7S collagen with cervical maturation. Gynecol Obstet Invest, 34(1):24-6, 1992.
17. Peter T., et al. Physiology Of The Skin. Allured Publishing Corporation, pp. 61-72, 2001.
18. Herrmann G. et al.. Photosensitization of Uroporphyrin Augments the Ultraviolet A-Induced Synthesis of Matrix Metalloproteinases in Human Dermal Fibroblasts. Journal of Investigative Dermatology, 107(3):398-403, 1996.
19. 段玉齊. 說文解字注. 서울, 大星文化社, p. 122, 167, 398, 1990.
20. 辭源修訂組編輯部. 辭源(縮印合訂本). 香港, 商務印書館, p. 1184, 1396, 1987.
21. 龔廷賢. 對譯萬病回春. 서울, 法仁文化社, p. 83, 2007.
22. 홍원식. 정교황제내경영추. 서울, 동양의학연구부출판부, p. 241, 316, 338, 1985.
23. 이선동. 백반증의 한방치료. 서울, 정담, p. 46, 1996.
24. 김병수, 강정수. 피부생리의 원리 연구. 동의생리병리학회지, 16(6):1110-1116, 2002.
25. 홍원식. 정교황제내경소문. 서울, 동양의학연구부출판부, p. 11, 1985.
26. 黃宮繡. 本草求眞. 北京, 人民衛生出版社, p. 216, 1987.
27. 王本詳. 現代中藥藥理學. 天津, 天津科學技術出版社, pp. 785-790, 1997.
28. 鄭虎占·董澤宏·余靖. 中藥現代硏究與應用2. 北京, 學苑出版社, pp. 1774-1788, 1997.