

Hairless Mice를 이용한 광노화 모델에서 꾸지뽕나무 추출물의 피부주름 형성 억제효과

김옥경¹ · 호진녕¹ · 남다은¹ · 전우진² · 이정민^{1*}

¹경희대학교 의학영양학과

²전남대학교 식품영양학과

Anti-wrinkle Activity of a *Curdrania tricuspidata* Extract on Ultraviolet-induced Photoaging

Ok Kyung Kim¹, Jin-Nyoung Ho¹, Da-Eun Nam¹, Woojin Jun², and Jeongmin Lee^{1*}

¹Dept. of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Gyeonggi 446-701, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Abstract

We investigated the anti-wrinkle activity of an 80% ethanol extract of *Curdrania tricuspidata* leaves (CTL80) on ultraviolet-induced photoaging in hairless mice. Skin wrinkles were induced by 10 weeks of UVB-irradiation on the back of Skh-1 hairless mice three times a week. Mice were divided into ten groups; normal control (-UVB), UVB irradiated control group (+UVB), dietary groups (UVB+ascorbic acid 0.1%, UVB+CTL80 0.1%, UVB+CTL80 0.25%) and topical application groups (-UVB+base lotion (BL), UVB+BL, UVB+ascorbic acid 1%+BL, UVB+CTL80 1%+BL, UVB+CTL80 2%+BL). Wrinkle formation, histological changes, superoxide dismutase (SOD) activities, glutathione peroxidase (GSH-Px), and the expression of matrix metalloproteinases (MMP-1, MMP-3 and MMP-9) were analyzed. Wrinkles for the +UVB groups formed as a pattern of deep furrows and thick crests. Wrinkles with CTL80 treatment formed as a pattern of shallow furrows and thin crests, with wrinkle areas were lower than the +UVB group. In an antioxidant analysis of mouse blood, SOD and GSH-Px activities were significantly higher in the CTL80 topical application group compared to the +UVB group. The mRNA expression of MMPs in the +UVB group was significantly higher than the normal control group, and significantly lower in the CTL80-treated group. In conclusion, CTL80 exerted anti-wrinkle activity on ultraviolet-induced photoaging by regulating antioxidative defense systems and MMPs expression.

Key words: *Curdrania tricuspidata*, antioxidant, photoaging, MMPs, wrinkle

서 론

피부의 노화는 시간 의존성 자연노화에 따른 내인성 노화 (intrinsic aging)와 외부적 요인에 의한 외인성 노화(extrinsic aging)로 구분할 수 있다. 바람, 온도, 공해, 자외선 등에 의한 외인성 노화 중 자외선에 의한 노화를 광노화라고 한다(1). 지속적인 자외선 노출은 피부의 활성산소종의 증가를 유도하여 광노화가 진행된다(2,3). 피부에 도달한 자외선은 표피에 활성산소를 과도하게 생성시키게 하고 이에 의해 멜라닌 세포의 불규칙한 멜라닌 생성으로 인한 색소 침착을 관찰할 수 있고(4), 각질형성세포의 배열을 불규칙적으로 변화시켜 피부 보습을 저하시킨다(5). 활성산소의 자극을 받은 각질형성세포는 염증성 cytokine을 분비하여 진피의 섬유아세포를 자극시켜 NF- κ B pathway와 AP(activator protein)-1의 DNA binding을 촉진시켜 MMPs의 발현을 증가시킨다. 반

면 type-1 procollagen의 합성을 감소시켜 결과적으로 교원질(collagen) 생합성 저해 및 분해 촉진을 유발시켜 피부주름을 형성하며 탄력감을 일으킨다(6,7). 이러한 생화학적 인 기전에 근거하여 광노화 피부에서는 자외선 조사에 의한 활성산소가 가장 중요한 원인으로 여겨지고 있다(8). 따라서 피부 노화방지와 주름개선에 있어서 활성산소를 제거하는 항산화 물질이나 교원질 분해 작용 억제 및 교원질 합성을 촉진시키는 소재의 발굴이 중요시 된다(9).

많은 연구 보고에서 활성산소에 대한 항산화가 주름개선에 긍정적인 영향을 미친다는 연구 결과를 바탕으로 피부 건강을 위한 항산화제에 대한 천연물질 소재 탐색 연구가 활발히 진행되고 있다. 알려져 있는 항산화 물질 중 가장 많은 부분을 차지하는 것이 페놀성 화합물이며 대표적인 것 중 하나가 플라보노이드이다(10). 최근 우리는 꾸지뽕나무 (*Curdrania tricuspidata* Burea)의 부위별 및 용매별 추출물

*Corresponding author. E-mail: jlee2007@khu.ac.kr
Phone: 82-31-201-3779, Fax: 82-31-204-8119

의 항산화 효과를 검증하고 비교하였으며, 그 결과 잎 80% 에탄올 추출물에서 높은 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 지녀 우수한 라디칼 소거능 활성이 있음을 확인한 바 있다(11). 꾸지뽕나무는 뽕나무과(Molaceae)에 속하는 낙엽활엽 교목으로 동아시아나 우리나라 전라도, 경상도, 충청남도 등에 분포하며 10월경 붉은 열매를 맺는 특징이 있다(12). 꾸지뽕나무에 대한 생리활성 연구는 항산화 활성에 대해 다양하게 연구되어 왔으며(13), 뿐만 아니라 항염(14), 항당뇨, 고혈압 억제(15) 등에 관한 연구가 보고되었다. 이에 따라 꾸지뽕나무의 기능성 입증에 대한 연구에 관심이 증가하고 있으며 이러한 생리활성 작용은 꾸지뽕나무의 페놀성 화합물의 생리활성 성분에 기인하는 것으로 보인다(11-13,16).

이러한 꾸지뽕나무의 항산화 활성은 자외선에 의한 활성산소의 증가를 억제시켜 주름개선 효과에 긍정적인 효과를 보일 것으로 기대된다. 이에 본 연구에서는 사전 연구를 통해 가장 높은 항산화 활성을 보인 꾸지뽕나무 잎 80% 에탄올 추출물(CTL80)을 이용하여 광노화 유발 동물모델에서 식이 투여와 로션 도포를 통한 주름 형성 억제효과를 비교 및 검증하기로 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 처치

대한바이오링크(Eumseong, Korea) 실험동물 사육장에서부터 공급 받은 20 g 내외의 6주령 암컷 hairless mouse (Skh-1)를 일주일 동안 설치류 사육실에서 적응시킨 후 적응기간 중 일반 상태를 관찰하여 건강한 개체만 실험에 사용하였다. 사육환경은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 에서 light cycle을 12시간으로 유지하였고 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 군 분리를 실시하였다.

군 분리는 Table 1에 제시한 바와 같이 크게 식이 투여군과 로션 도포군으로 나누어 각 군당 5마리씩 분류하였다. 기본 식이는 AIN93G를 제공하였으며, 기본로션은 propylene glycol : ethanol : distilled water = 5:3:2로 제조하여 동물의 등 부위에 200 μL 씩 도포하였다. 자외선 조사와 함께

식이제공을 실시하였으며 자외선 조사 2시간 전에 로션을 도포하였다.

자외선 조사에 의한 주름 유발

자외선 조사는 UVB lamp(5 Sankyo Denky G5T5 lamps, Sankyo Denki Co., Yokohama, Japan)를 이용하여 최소 홍반량(minimal erythromal dose, MED)을 $100 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ 로 하여 1주일에 3회씩 mouse의 등 부위에 조사하였으며, 1주는 1MED($100 \text{ mJ}/\text{cm}^2$), 2주는 2MED($200 \text{ mJ}/\text{cm}^2$), 3주는 3MED($300 \text{ mJ}/\text{cm}^2$), 4주부터 10주까지 4MED($400 \text{ mJ}/\text{cm}^2$)로 조사하여 주름살을 유도하였다. 10주의 시험 종료 후 각 군의 시험동물을 희생시켜 혈액과 피부 조직을 얻었다.

형태학적 관찰

형태학적인 변화를 관찰하기 위해 디지털 카메라로 mouse의 등 부위를 근접 촬영하였으며, 보다 자세한 관찰을 위해 digital microscope(DG-3x, Scalar Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 피부의 주름 형태를 관찰하였다.

조직병리학적 관찰

조직 준비를 위해 mouse를 희생시킨 후 등쪽 피부를 떼어 내어 filter paper에 편평하게 부착한 후 10% 중성 포르말린에 고정시킨 다음 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매하여 조직절편기(RM2125, Leica, Wetzlar, Germany)를 이용해 $4 \mu\text{m}$ 의 두께로 절단한 다음 polylysine으로 coating된 slide에 붙였다. 조직절편은 xylene을 이용하여 paraffin을 제거하고 alcohol과 증류수로 10분간 흡수시켜 증류수로 세척한 후, 피부조직의 변화양상을 관찰하기 위하여 H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색을 실시하였다.

항산화 효소 활성 측정

동물을 희생시켜 얻은 혈액을 16,000 rpm에서 20분 동안 원심분리 하여 혈청을 얻은 후 superoxide dismutase(SOD)와 glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성을 측정하였다. SOD 활성은 SOD assay kit-WST(Dojindo, Kumamoto, Japan)를 이용하여 지시대로 측정하였다. 96-well plate에 혈청을 넣고 WST-1(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, mono-sodium salt)

Table 1. Experimental design of animals

(n=5/group)

Groups		Experimental groups	
Normal control		-UVB	AIN93G
	Control	+UVB	AIN93G
Dietary	Positive control	+UVB	Ascorbic acid 0.1% AIN93G
	CTL80 0.1%	+UVB	CTL80 0.1% AIN93G
	CTL80 0.25%	+UVB	CTL80 0.25% AIN93G
		+UVB	CTL80 0.25% AIN93G
Topical application	Vehicle control	-UVB	AIN93G + Base lotion (BL) ¹⁾
	Control	+UVB	AIN93G + BL
	Positive control	+UVB	AIN93G + Ascorbic acid 1% + BL
	CTL80 1%	+UVB	AIN93G + CTL80 1% + BL
	CTL80 2%	+UVB	AIN93G + CTL80 2% + BL
	CTL80 2%	+UVB	AIN93G + CTL80 2% + BL

¹⁾Base lotion (BL): propylene glycol (5) + ethanol (3) + distilled water (2).

과 xanthine oxidase working solution을 첨가한 다음 37°C에서 20분간 배양한 후 microplate reader(Molecular Devices, Menio Park, CA, USA)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. GSH-Px 활성은 glutathione peroxidase activity assay kit(BioVision Inc., Mountain View, CA, USA)를 이용하여 지시대로 측정하였다. 96-well plate에 NADH, glutathione, glutathione reductase 용액을 첨가한 후 microplate reader를 이용하여 340 nm에서 흡광도의 변화 값을 측정하였다.

RNA추출 및 실시간 정량 PCR

피부조직으로부터 총 RNA의 추출은 TRIzol®(Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA)의 제조사에서 제공하는 방법을 이용하여 추출하였다. cDNA 합성은 각 시료에 대하여 1 µL의 RNA를 이용하여 iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)로 합성하였다. 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green(iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Laboratories, Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR(real time quantitative PCR)을 실시하였고, 기기는 Real-Time PCR(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였다. 모든 유전자의 PCR 산물의 크기는 100 bp 내외로 하였고, Tm(melting temperature) 값도 54°C 부근으로 디자인하였다. 각각의 유전자에 대한 PCR primer의 염기서열은 다음과 같다. GAPDH forward primer 5'-CAT GGC CTT CCG TGT TCC TA-3', reverse primer 5'-GCG GCA CGT CAG ATC CA-3'; MMP-1 forward primer 5'-TTG CCC AGA GAA AAG CTT CAG-3', reverse primer 5'-TAG CAG CCC AGA GAA GCA ACA-3'; MMP-3 forward primer 5'-CCC CTG ATG TCC TCG TGG TA-3', reverse primer 5'-GCA CAT TGG TGA TGT CTC AGG TT-3'; MMP-9 forward primer 5'-AGT GGG ACC ATC ATA ACA TCA CAT-3', reverse primer 5'-TCT CGC GGC AAG TCT TCA G-3'. Real-time PCR 반응은 총 20 µL 내에 cDNA 1 µL와 10 µL의 2×SYBR mix, primer는 각각 100 pmol/µL를 1 µL씩 첨가하였고 나머지는 증류수로 채워 주었다. 모든 유전자에 대하여 PCR 증폭 단계는 다음과 같고 증폭 cycle은 40 cycle을 실시하였다. Hot start를 위해 95°C에서 10분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 55°C에서 15초, extension을 72°C에서 10초간 반복하며, 각 cycle의 extension 후에 값이 기록되었다. 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve 분석을 실시하였다. mRNA의 상대적인 함량은 자외선 처리와 물 투여군에 대한 상대적인 양으로 나타내었다. 결과의 분석은 Applied Biosystems에서 제공하는 One step System software v2.1로 분석하였다.

통계처리

본 실험결과는 SPSS(Statistical Package for the Social

Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) version 18.0 프로그램을 이용하여 분석하였다. 모든 측정 항목의 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였고 실험군간 평균의 차이는 one-way ANOVA로 유의성을 확인한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후 검증하였으며 p<0.05 수준에서 유의성의 여부를 검증하였다.

결과 및 고찰

피부의 형태학적 관찰

피부는 외부에 항상 노출되어 있는 조직이기 때문에 다양한 환경적 요인의 영향을 많이 받으므로 노화 현상을 연구하는데 있어 가장 적합한 기관이다(17). 그러나 자외선 노출에 의한 인체 피부노화 연구는 오랜 기간이 소요되며 자외선 노출량을 조절하기 어렵다. 따라서 광노화 연구에 있어서 인간의 표피 및 진피의 변화와 유사한 양상을 보이는 hairless mouse가 광노화 연구 모델로 적합하여(18), 본 연구에서는 hairless mouse를 이용하여 UVB를 조사함으로써 광노화 유발 모델을 만들어 항산화 작용이 뛰어난 비타민 C와 CTL80의 주름 형성 억제효과를 살펴보았다.

광노화 피부의 임상적인 특징은 피부표면이 거칠고 건조하며, 비정상적인 탄력섬유물질이 축적되어 탄력성이 감소하고 심하면 피부가 처져 주름살이 나타나게 되는 것이다(19). 따라서 이러한 피부 주름 변화의 형태학적인 관찰을 위하여 디지털 카메라로 mouse의 등 부위를 촬영하여 관찰하였으며 digital microscope를 이용하여 피부 표면을 더 자세하게 관찰하였다. UVB 조사 6주 이후에 주름이 형성되는 것을 육안으로 확인하였으며 8주째가 되자 깊은 주름이 형성되었다. 실험기간 10주째 피부주름의 변화를 비교한 결과 UVB 조사한 군은 비조사군과 비교하였을 때 주름 능선의 두께가 굵고 간격이 넓으며 주름이 깊게 형성되었으며 각질이 증가되었음을 확인할 수 있었다. 하지만 비타민 C와 CTL80을 처리한 군들에서는 주름 형성이 억제되었음을 육안으로도 확인할 수 있었다. 특히 CTL80의 처리 농도가 높아질수록 억제 효과가 더 커졌으며, 로션 도포군이 식이 투여군보다 더 효과가 좋았음을 확인하였다(Fig. 1). 이는 로션의 도포가 UVB로부터의 피부손상을 직접적으로 보호한 효과를 갖은 것이라고 예측할 수 있다.

피부의 조직병리학적 관찰

광노화 피부의 조직학적인 특징은 표피의 두께가 두꺼워지며 각질세포의 배열이 불규칙해지거나 세포의 모양이 비정상적으로 변화한다. 진피에서는 교원질의 양이 심하게 감소되고 상부 진피에 비정상적인 탄력섬유물질이 광범위하게 침착되면서 피부주름살, 탄력감소 등이 더 심하게 나타나게 된다(20). 이러한 조직학적인 변화를 관찰하기 위해 동물을 희생시킨 후 등 부위의 피부조직을 H&E 염색을 하여 표피와 진피의 변화를 관찰하였다. 연구 보고된 바와 일치하

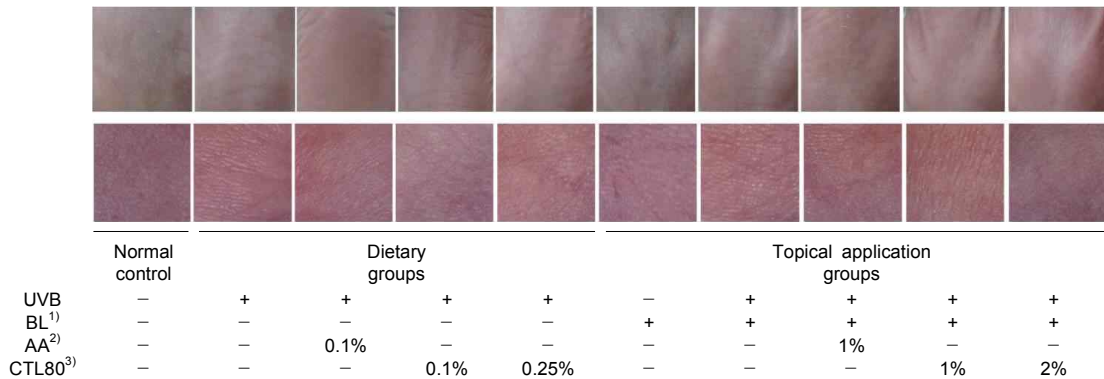


Fig. 1. Effects of CTL80 on UVB-induced wrinkle formation on the back of hairless mice skin at the end of the irradiation period (10 weeks later). ¹⁾Base lotion: propylene glycol (5)+ethanol (3)+distilled water (2). ²⁾Ascorbic acid. ³⁾CTL80: 80% ethanol extract of *Cudrania tricuspidata* leaves.

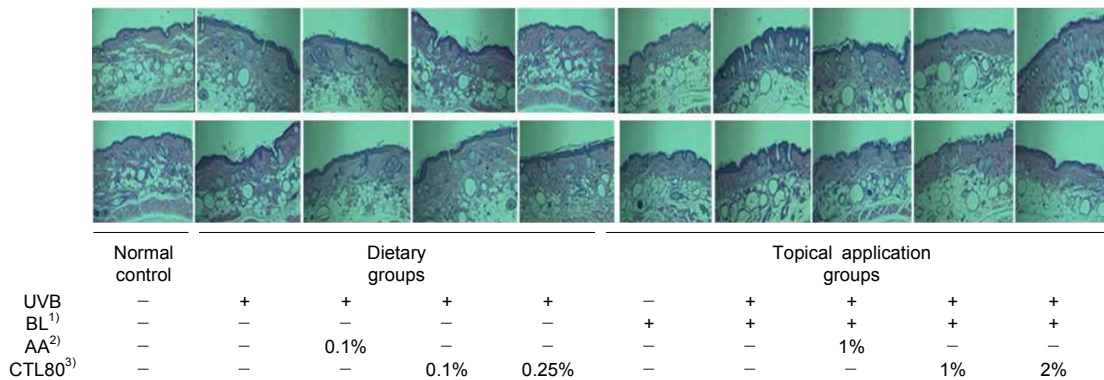


Fig. 2. Histological observation on UVB-induced hairless mice skin after 10 weeks experiment to evaluate the inhibitory effect of CTL80. ¹⁾Base lotion: propylene glycol (5)+ethanol (3)+distilled water (2). ²⁾Ascorbic acid. ³⁾CTL80: 80% ethanol extract of *Cudrania tricuspidata* leaves.

게 UVB 비조사군에 비하여 UVB 조사군에서는 표피의 두께가 두꺼워졌고 각질세포의 다형성이 관찰되었으며 모낭의 크기도 증가하였다. 진피에서는 교원섬유의 배열이 불규칙적으로 변하였고 탄력섬유가 증가되었다. 하지만 비타민 C와 CTL80 처리군에서는 대조군에 비하여 각질층과 표피층의 증가가 감소하였으며 진피층의 교원섬유가 증가되었고 배열이 상대적으로 조밀하고 규칙적으로 나타났다. 특히 실험군 간의 비교에서는 2% CTL80 로션 도포군의 효과가 가장 높게 나타났다(Fig. 2). 조직학적인 변화도 형태학적인 변화를 관찰한 결과와 비슷한 양상을 나타냈다.

혈액의 항산화효소 활성 변동

자외선이 피부에 과량으로 노출되면 활성산소가 많이 발생하여 항산화 방어체계가 손상 받게 됨으로써 주름 형성, 피부의 탄력성 저하 등의 피부노화가 가속화된다. 산화적 스트레스는 생체대사 과정 중에 자유라디칼을 생성하여 세포에 상해를 주는데, 이러한 자유라디칼 중 세포내 호흡 부산물로서 생성되는 superoxide anion radical은 SOD에 의해 과산화수소(H₂O₂)로 전환되며 이것은 다시 CAT 및 GSH-Px에 의해 물과 산소로 분해되어 해독화 된다(21). 뿐만 아니라 GSH-Px는 세포질과 미토콘드리아에 존재하여 과산

화수소의 축적을 막아 조직이 손상되는 것을 방어하는 기능을 한다(22). 따라서 본 실험에서는 광노화 유발된 mouse의 항산화 방어체계의 변화를 살펴보기 위해 SOD와 GSH-Px의 활성도를 측정하였다.

CTL80의 식이 섭취와 로션 도포가 SOD 효소 활성도에 미치는 효과를 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. UVB 비조사군들(54.20±4.39%, 58.95±2.49%)에 비하여 식이 투여군과 로션 도포군의 대조군이 각각 32.67±2.94%, 37.01±2.17%로 활성도가 유의적으로 크게 감소하였다. 반면 양성 대조군들과 CTL80 처리군들에서는 활성도가 유의적으로 증가하였는데, 식이 투여군에서는 UVB만 조사한 군에 비하여 CTL80가 농도 의존적으로 활성을 증가시켰으며 양성대조군보다 CTL80 0.25%가 유의적으로 높았다. 또한 로션 도포군에서는 UVB 조사+base lotion군(37.01%)에 비하여 비타민 C, CTL80 1%와 CTL80 2% 각각의 활성도가 59.63±2.18%, 64.51±7.46%, 66.06±2.12%로 유의적으로 증가하였다. 특히 CTL80 로션 도포군에서 유의적으로 활성도가 가장 증가하였지만 농도 의존적이지는 않았다.

GSH-Px 효소 활성도 결과 또한 UVB 비조사군들에 비하여 식이 투여군과 로션 도포군의 대조군의 활성도가 크게

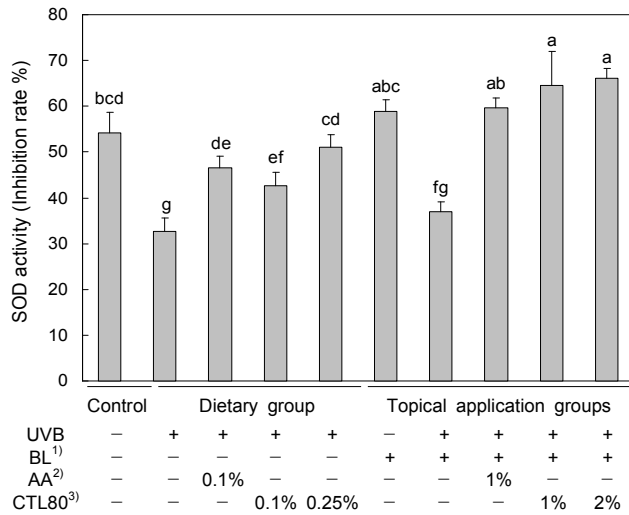


Fig. 3. Effects of CTL80 on serum superoxide dismutase activity of UVB-induced photoaging in hairless mice. Values are means \pm SD of 5 mice. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. ¹⁾Base lotion: propylene glycol (5)+ethanol (3)+distilled water (2). ²⁾Ascorbic acid. ³⁾CTL80: 80% ethanol extract of *Cudrania tricuspidata* leaves.

감소하였다. 식이 투여군의 UVB만 조사한 군(0.10 ± 0.02 mU/mL)은 정상군(0.75 ± 0.01 mU/mL)에 비하여 0.65 mU/mL만큼 낮은 활성도를 보이면서 유의적으로 가장 활성도가 낮았으며, 로션 도포군은 UVB 비조사+base lotion군(0.74 ± 0.03 mU/mL)에 비하여 UVB 조사+base lotion군(0.28 ± 0.02 mU/mL)에서 0.46 mU/mL만큼 유의적으로 낮은 활성도를 보였다. 반면 양성대조군과 CTL80 처리군들에서는 활성도가 증가하였는데 식이 투여군에서는 UVB만 조사한 군에 비하여 비타민 C가 0.23 mU/mL만큼 유의적으로 활성을 증가시켰고 CTL80은 농도 의존적으로 활성을 증가시켰다. 로션 도포군에서는 GSH-Px 효소 활성도가 비타민 C는 0.57 ± 0.04 mU/mL, CTL80 1%는 0.62 ± 0.04 mU/mL, CTL80 2%는 0.60 ± 0.03 mU/mL로 UVB 조사+base lotion군에 비하여 각각 활성이 0.29 mU/mL, 0.34 mU/mL, 0.31 mU/mL만큼 유의적으로 증가되었다(Fig. 4). 따라서 CTL80의 로션 도포에서는 농도와 크게 차이 없이 양성대조군과 유의적인 차이가 없게 GSH-Px 효소 활성도를 증가시켰다.

UVB 비조사군에 비하여 UVB만 조사군들은 효소 활성도가 낮아졌음을 확인하였고 비타민 C와 CTL80의 처리를 통하여 활성도가 증가하였음을 확인하였다. SOD와 GSH-Px의 활성도 측정 결과 모두에서 CTL80의 식이 투여군보다 로션 도포군에서 뛰어난 항산화 활성을 보였다. 이는 자외선 조사로 증가한 자유라디칼을 체내에서의 빠른 제거를 하기 위해 활성이 증가된 것으로 보인다.

피부조직의 MMPs mRNA 발현 변동

자외선을 조사한 피부에서는 표피의 각질형성세포와 진피의 섬유아세포 표면에 있는 성장인자나 cytokine 수용체

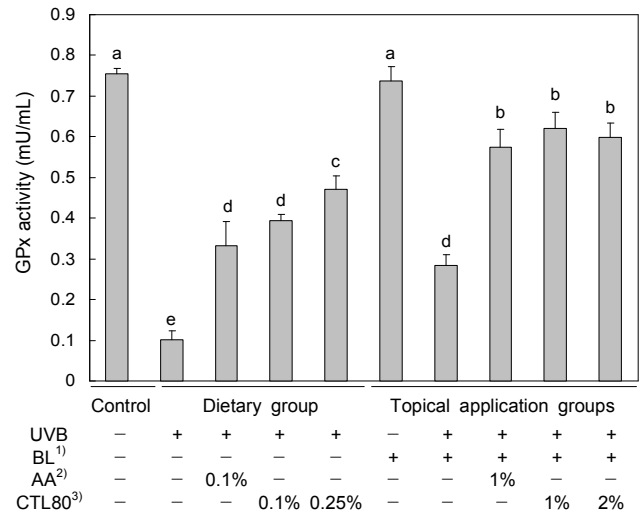


Fig. 4. Effects of CTL80 on serum glutathione peroxidase activity of UVB-induced photoaging in hairless mice. Values are means \pm SD of 5 mice. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test. ¹⁾Base lotion: propylene glycol (5)+ethanol (3)+distilled water (2). ²⁾Ascorbic acid. ³⁾CTL80: 80% ethanol extract of *Cudrania tricuspidata* leaves.

를 활성화시켜 NF- κ B pathway와 AP(activator protein)-1의 DNA binding을 촉진시키고, 이는 MMPs의 유전자 전사를 증가시키게 한다. MMPs는 활성 중심부에 아연을 가지는 금속단백분해 효소로 세포 외적 성분과 기저막 성분을 분해하는 능력이 있다(6,7,23,24). MMP-1은 교원질분해효소로서 type-I procollagen으로부터 합성된 교원질의 분해를 촉진한다. MMP-3은 제IV형 교원섬유를 분해하고 proMMP-1을 활성화시키며(25), MMP-9은 교원질분해효소를 조절함으로써 교원질의 분해를 촉진시켜 주름 형성과 탄력 감소를 일으키게 된다(1). 따라서 MMPs는 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있으며 피부노화 지표로 사용되고 있다.

피부조직의 MMPs의 유전자 발현량 변동을 측정된 결과 UVB 조사한 군들에서 MMP-1, MMP-3, MMP-9의 발현량이 모두 증가되었음을 관찰할 수 있었다. MMP-1의 발현 정도에서는 식이 투여군에서 양성대조군과 CTL80의 처리가 UVB로 증가된 MMP-1의 발현을 유의적으로 감소시켰으나 CTL80 농도에 따른 유의적인 차이는 없었다. 하지만 양성대조군에 비하여 CTL80 0.25%가 유의적으로 낮은 발현을 보였다. 로션 도포군에서도 UVB 조사+base lotion군에 비하여 양성대조군과 CTL80이 유의적으로 낮은 발현을 보였으나 군간 유의적인 차이는 보이지 않았다(Fig. 5).

MMP-3의 발현 정도를 살펴본 결과 또한 식이 투여군과 로션 도포군 모두 UVB 조사한 군들이 UVB 비조사군에 비하여 발현이 유의하게 높게 나타났다. 식이 투여군과 로션 도포군 모두 양성대조군과 CTL80의 처리가 발현을 UVB를 조사한 군들보다 유의적으로 감소시켰다. 하지만 식이 투여군과 로션 도포군에서 양성대조군들과 CTL80을 처리한 군

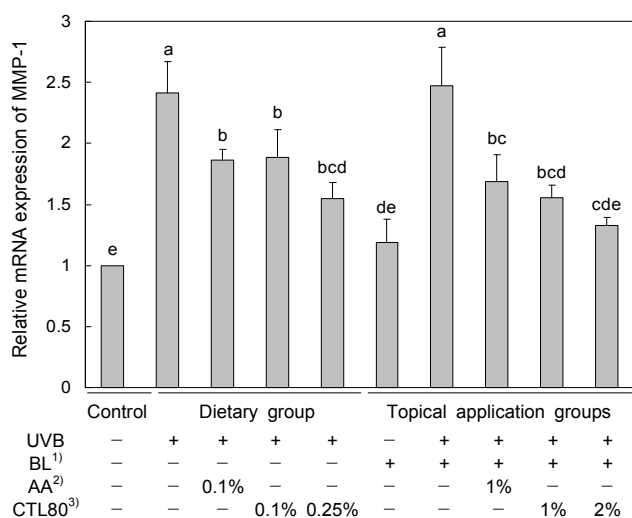


Fig. 5. Inhibition of UVB-induced MMP-1 production by CTL80 in hairless mice. Values are means±SD of 5 mice. Different letters show a significantly difference at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test. ¹⁾Base lotion: propylene glycol (5)+ethanol (3)+distilled water (2). ²⁾Ascorbic acid. ³⁾CTL80: 80% ethanol extract of *Cudrania tricuspidata* leaves.

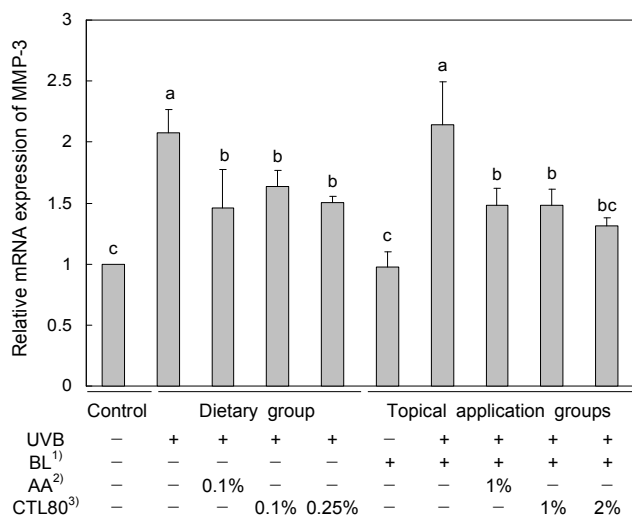


Fig. 6. Inhibition of UVB-induced MMP-3 production by CTL80 in hairless mice. Values are means±SD of 5 mice. Different letters show a significantly difference at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test. ¹⁾Base lotion: propylene glycol (5)+ethanol (3)+distilled water (2). ²⁾Ascorbic acid. ³⁾CTL80: 80% ethanol extract of *Cudrania tricuspidata* leaves.

들 간에 유의적인 차이는 없었다(Fig. 6).

MMP-9 발현 변동에서는 UVB를 조사하지 않은 군에 비하여 UVB 조사군에서 5배 정도 발현이 증가되어 가장 크게 변화하였음을 관찰하였다. 증가된 MMP-9의 발현을 로션 도포군의 비타민 C군이 가장 유의적으로 낮은 발현을 보였다. 또한 CTL80의 처리가 발현을 유의적으로 감소시켜 주었으며, 특히 식이 투여군보다 로션 도포군에서 유의적으로 발현을 감소시켰으나 농도 의존적인 결과는 보이지 않았다(Fig. 7). 따라서 MMP-1, MMP-3, MMP-9의 발현의 감소량은 정도의 차이가 있었으나 CTL80의 처리가 발현을 감소

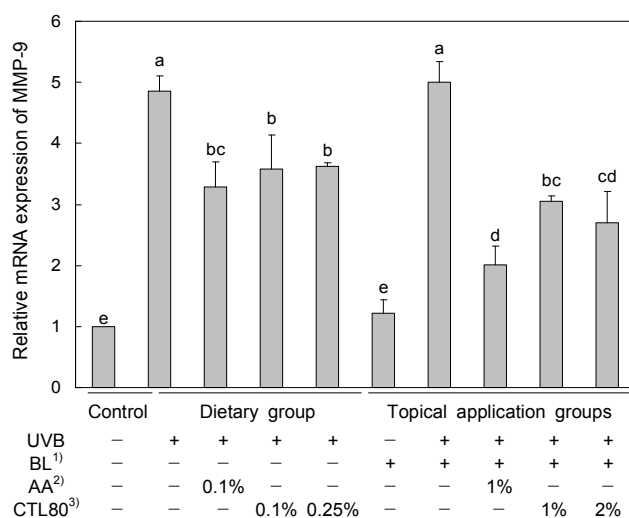


Fig. 7. Inhibition of UVB-induced MMP-9 production by CTL80 in hairless mice. Values are means±SD of 5 mice. Different letters show a significantly difference at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test. ¹⁾Base lotion: propylene glycol (5)+ethanol (3)+distilled water (2). ²⁾Ascorbic acid. ³⁾CTL80: 80% ethanol extract of *Cudrania tricuspidata* leaves.

시켰으며, 특히 MMP-9의 발현이 CTL80의 로션 도포군에서 크게 감소되었다는 것을 살펴볼 수 있었다.

이상의 실험 결과를 통해서 꾸지뽕나무의 잎 80% 에탄올 추출물이 자외선 조사에 의해 증가한 활성산소를 제거하기 위해 항산화 효소 활성이 증가되었으며, 이러한 체내 항산화 방어 체계에 의해 UVB에 의한 활성산소 생성을 억제시키고 MMPs의 발현을 감소시켜, 결과적으로 주름 형성을 억제시켰음을 확인하였다. 따라서 꾸지뽕나무는 광노화에 의한 주름 형성 억제 효능을 지니는 기능성 소재로써 활용가치 및 실용가능성이 있을 것으로 기대할 수 있다.

요 약

본 실험에서는 안전하고 우수한 효능을 지닌 천연항산화제의 광노화에 의한 피부주름 형성을 억제하는 천연물질을 탐색하기 위한 연구의 일환으로 CTL80의 식이투여와 로션 도포가 광노화를 유발한 동물모델에서 주름 형성에 미치는 영향을 살펴보았다. 광노화 유발 동물모델을 만들기 위해 hairless mice에 10주 동안 UVB 조사를 주 3회 실시하였다. 형태학적 변화를 관찰한 결과 UVB를 조사한 군은 각질이 증가하고 주름 능선의 두께가 굵고 주름이 깊게 형성한 반면, 양성대조군인 비타민 C와 CTL80 처리한 군에서 주름 형성이 감소하였으며, 특히 2% CTL80 로션 도포군이 가장 주름 형성을 억제하였다. 피부조직의 H&E 염색을 통한 조직학적인 변화에서는 UVB 조사로 두꺼워진 각질층과 표피층을 관찰하였으며 진피층의 교원섬유가 감소되었음이 관찰되었다. CTL80은 각질층과 표피층의 증가를 감소시켰으며 진피층의 교원섬유를 증가시켰음을 관찰하였다. 형태학

적 변화와 같이 2% CTL80 로션 도포군의 효과가 가장 양호하게 나타났다. 항산화 상태에 미치는 영향을 살펴보기 위해 동물 혈청의 SOD와 GSH-Px의 활성을 측정된 결과, 비타민 C와 CTL80처리 군에서 UVB만 조사한 군에 비하여 활성이 유의적으로 높아졌음을 살펴볼 수 있었다. 항산화 활성 또한 CTL80에 농도 의존적이지는 않았으나 식이 투여군에 비하여 로션 도포군에서 높은 활성을 보였다. 교원질 합성을 억제하고 분해를 촉진시키는 MMPs(MMP-1, MMP-3, MMP-9)의 발현을 실시간 정량 PCR로 측정하여 발현 변화를 살펴 보았다. 그 결과 식이 투여군과 로션 도포군 모두 UVB 조사군에서는 발현이 현저히 높아졌으나 비타민 C와 CTL80 처리 군에서 유의적으로 낮아졌음을 살펴볼 수 있었다. 특히 CTL80 로션 도포군에서 MMP-9의 발현이 확연히 낮아졌음을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과를 통하여 CTL80은 높은 항산화 활성을 지녔으며 이러한 항산화능을 통하여 UVB로 광노화를 유발시킨 동물모델에서 주름 생성 억제에 긍정적인 영향을 미쳤고 주름 억제 효능을 지니는 기능성 소재로써 개발 가능성을 확인하였다.

문 헌

- Rittie L, Fisher GJ. 2002. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Research Reviews* 1: 705-720.
- Bernerd F, Vioux C, Asselineau D. 2000. Evaluation of the protective effect of sunscreens on in vitro reconstructed human skin exposed to UVB or UVA irradiation. *Photochem Photobiol* 71: 314-320.
- Yasui H, Sakurai H. 2003. Age-dependent generation of reactive oxygen species in the skin of live hairless rats exposed to UVA light. *Exp Dermatol* 12: 655-661.
- Ansel JC, Luger TA, Lowry D, Perry P, Roop DR, Mountz JD. 1988. The expression and modulation of IL-1 α in murine keratinocytes. *J Immunol* 140: 2274-2278.
- Castanet J, Ortonne JP. 1997. Pigmentary changes in aged and photoaged skin. *Arch Dermatol* 133: 1296-1299.
- Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang SW, Voorhees JJ. 1997. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *New Eng J Med* 337: 1419-1428.
- Shephard P, Martin G, Smola-Hess S, Brunner G, Krieg T, Smola H. 2004. Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte-fibroblast co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor- β and interleukin-1. *Am J Pathol* 164: 2055-2066.
- Steenvoorden DP, Henegouwen GM. 1997. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol B* 41: 1-13.
- Darr D, Fridovich I. 1994. Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 102: 671-675.
- Masteikova R, Muselik J, Bernatoniene J, Majiene D, Savickas A, Malinauskas F, Bernatoniene R, Peciura R, Chalupova Z, Dvorackova K. 2008. Antioxidant activity of tinctures prepared from hawthorn fruits and motherwort herb. *Ceska Slov Farm* 57: 35-38.
- Kim OK, Ho JN, Nam DE, Jun WJ, Hwang KT, Kang JE, Chae OS, Lee JM. 2012. Hepatoprotective effect of *Cudrania tricuspidata* extract against oxidative damage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 7-13.
- Kim JY, Chung JH, Hwang I, Kwan YS, Chai JK, Lee KH, Han TH, Moon JH. 2009. Quantification of quercetin and kaempferol contents in different parts of *Cudrania tricuspidata* and their processed foods. *Kor J Hort Sci Technol* 27: 489-496.
- Choi SR, You DH, Kim JY, Park CB, Kim DH, Ryu J. 2009. Antioxidant activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* Bureau according to harvesting parts and time. *Korean J Med Crop Sci* 17: 115-120.
- Oh PS, Lim KT. 2011. Anti-inflammatory effect of glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* Bureau: involvement of MAPK/NF- κ B signaling. *Immunol Invest* 40: 76-91.
- Kang DG, Hur TY, Lee GM, Oh H, Kwon TO, Sohn EJ, Lee HS. 2002. Effects of *Cudrania tricuspidata* water extract on blood pressure and renal functions in NO-dependent hypertension. *Life Sci* 70: 2599-2609.
- Lee IK, Song KS, Kim CJ, Kim HM, Oh GT, Yoo ID. 1994. Tumor cell growth inhibition and antioxydative activity of flavonoids from the stem bark of *Cudrania tricuspidata*. *Agric Chem Biotechnol* 37: 105-109.
- Chung JH. 2003. Photoaging in asians. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 19: 109-121.
- Kligman LH. 1996. The hairless mouse model for photoaging. *Clin Dermatol* 14: 185-195.
- Seite S, Zucchi H, Septier D, Igondjo-Tchen S, Senni K, Godeau G. 2006. Elastin changes during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20: 980-987.
- Woods GM, Malley RC, Muller HK. 2005. The skin immune system and the challenge of tumour immuno-surveillance. *Eur J Dermatol* 15: 63-69.
- Deisseroth A, Dounce AL. 1970. Catalase physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiol Rev* 50: 3-24.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1998. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, London, UK. p 32.
- Kirnbauer R, Kock A, Neuner P, Forster E, Krutmann J, Urbanski A, Schauer E, Ansel JC, Schwarz T, Luger TA. 1991. Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. *J Invest Dermatol* 96: 484-489.
- Ikeda T, Tsutsumi T. 1990. Function and skin depigment activity of crude drugs. *Fragrance J* 6: 59-66.
- Talwar HS, Griffiths CEM, Fisher GJ, Hamilton TA, Voorhees JJ. 1995. Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin. *J Invest Dermatol* 105: 285-290.

(2012년 12월 6일 접수; 2013년 1월 11일 채택)