

초피나무 열매 추출물의 COP1 및 PPAR- α 조절을 통한 자외선에 대한 피부 보호 효과

김윤선[†] · 김유미 · 이상화

(주) LG생활건강 기술연구원

(2016년 11월 2일 접수, 2016년 12월 1일 수정, 2016년 12월 6일 채택)

Effect of *Zanthoxylum piperitum* Extract on Human Skin Protection from UVB by Regulation of COP1 and PPAR- α

Yun-Sun Kim[†], Yumi Kim, and Sanghwa Lee

Research Park, LG Household & Healthcare Ltd., 175 Gajeong-ro, Youseong-gu, Daejeon 34114, Korea

(Received November 2, 2016; Revised December 1, 2016; Accepted December 6, 2016)

요약: 자외선은 피부 노화를 가속화하여 피부 광노화를 유발하고, 일광 화상, 피부암 등을 유발한다. 자외선 차단제를 사용하더라도 일부 자외선에 의하여 피부 손상은 유발될 수 있기 때문에 자외선에 대한 피부 자체의 방어력을 올려주는 것이 필요하다. 최근, 식물에서 자외선 보호 기능을 하는 것으로 알려진 COP1이 사람의 피부에서도 자외선에 대한 반응들을 조절한다고 새롭게 밝혀졌다. 본 연구에서는, COP1과 그의 결합 단백질 DET1이 사람 피부의 각질형성세포에서 자외선에 대한 시그널 조절 물질인 c-Jun 단백질 양을 조절하는 것을 확인하였다. 자외선에 노출 시 COP1과 DET1 발현이 감소하였고, 그 영향으로 c-Jun 단백질이 증가하였다. 반대로 COP1과 DET1을 발현하는 DNA를 transfection 시켜줄 경우 c-Jun 단백질 양이 감소하였다. 피부 각질형성 세포에서 COP1과 DET1의 발현을 조절할 수 있는 물질을 탐색한 결과, 초피나무 열매 추출물이 COP1과 DET1의 발현을 증가시켜 주었다. 초피나무 열매 추출물은 c-Jun 시그널에 의해서도 조절되는 MMP1이 자외선에 의해 유도되는 것을 억제하였다. 뿐만 아니라, 초피나무 열매 추출물 PPAR- α 활성이 있어 장벽강화를 통한 피부 보호 효과가 있는데, 자외선에 의하여 염증 유발 물질인 IL-6와 IL-8의 발현이 증가하는 것도 억제하였다. 사람의 팔에 자외선을 쬐어 준 경우에도 초피나무 열매 추출물이 홍반이 생기는 것을 억제하고 홍반에 의한 색소침착도 억제하였다. 종합적으로, 초피나무 열매 추출물은 다양한 메카니즘을 통하여 자외선으로부터 피부를 보호해 줄 것으로 기대된다.

Abstract: Ultraviolet (UV) irradiation from the sun is the primary environmental factor that causes skin damages including skin cancer and premature skin aging. Because, even the most powerful sunscreen can't always afford enough protection, it is necessary to enhance the defensive power of skin against UV. Recently, constitutive photomorphogenic protein-1 (COP1) has shown to contribute to the regulation of UVB response of keratinocytes. In this study, we represent that COP1 and its associated protein, de-etiolated 1 (DET1), might participate in photoaging process in human skin as *Arabidopsis* COP1 does sun-protective function in plants. After UVB irradiation, the decrease of COP1 and DET1 mRNA expression was followed by the increase of c-Jun total protein. Moreover, transfection with DNA vectors expressing COP1 and DET1 down-regulated the c-Jun total protein. We found that *Zanthoxylum piperitum* extract (ZE) up-regulated the expression of COP1 and DET1 on human keratinocytes, and inhibited the expression of MMP1 which is one of the genes regulated by c-Jun signal. In addition, ZE has been reported to stimulate PPAR- α and strengthen the

[†] 주 저자 (e-mail: yunsunkim@lgcare.com)
call: 042)860-8455

skin barrier. We found that ZE decreased the UVB-induced IL-6 and IL-8 in NHEK cells. In human study, ZE protected skin against UV-B induced erythema and erythema-induced pigmentation. These results indicate that ZE could be useful for the protection against the adverse effects of UV irradiation through various mechanisms.

Keywords: COP1, DET1, photoaging, PPAR- α , *Zanthoxylum piperitum* extract

1. 서 론

피부는 환경에 노출되어 있기 때문에 환경적 요인에 의하여 손상되기 쉽다. 특히, 태양광에 의한 자외선 노출은 피부암을 일으키거나 피부 노화를 촉진시키는 등 피부에 미치는 영향이 크다[1]. 자외선 노출이 반복될 경우 피부 처짐, 거칠어짐, 건조함, 색소 침착, 주름과 같은 현상이 일어나며, 이러한 태양광에 의해 피부 노화현상이 가속화 되는 것을 광노화라고 일컫는다[2]. 자외선은 피부의 분자 생물학적 물질들의 작용을 변화시켜 광노화가 진행되게 한다. 대표적으로, 자외선에 노출되면 피부세포에서 활성산소의 작용이 증가되며, 증가된 활성산소는 세포 표면의 수용체에 결합하여 신호전달체계를 활성화시켜 전사인자인 NF- κ B와 AP-1이 활성화된다[3]. NF- κ B가 활성화되면 IL-1, IL-6, VEGF과 같은 사이토카인의 분비가 증가하고, 이러한 물질들은 섬유아세포에서 콜라겐 분해 효소인 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 분비를 촉진시키며, matrix metalloproteinase-8 (MMP-8)을 분비하는 호중구의 진피로의 유입을 촉진하여 세포외 기질의 분해를 가속화할 수 있다. AP-1이 활성화되면 섬유아세포의 콜라겐 합성이 감소하고 섬유아세포 및 각질세포에서 MMP1 등의 진피층 세포외 기질 분해 효소의 발현이 증가한다[1,4]. 그 결과, 피부 진피층의 세포외 기질의 분해가 촉진되어 피부의 탄력이 감소하고 주름이 증가될 수 있다.

그 밖에도 자외선은 피부세포에서 많은 유전자의 발현에 변화를 주는데, human constitutive photomorphogenic protein-1 (COP1)에 의하여 자외선에 대한 피부의 반응들이 조절됨이 최근에 보고되었다. COP1은 *Arabidopsis*에서 처음 발견되었으며, 식물이 자외선에 대한 내성을 갖도록 하고 광형태형성 (photomorphogenesis)을 조절한다[5]. 사람의 경우에는 COP1은 E3 ligase 기능을 가지고 있으며, human de-etiolated-1 (DET1)와 복합으로 p53이나 c-Jun 단백질

의 분해에 관여한다[6,7]. 자외선에 의하여 각질형성세포 및 섬유세포에서 COP1과 DET1 발현이 자외선에 의하여 감소하였으며[6,8,9], 결과적으로 p53과 c-Jun 단백질을 세포 내에 축적시킬 수 있음이 보고되었다[5].

자외선에 의한 c-Jun 단백질의 축적은 AP-1 활성화에 기여한다. AP-1은 c-Jun과 c-Fos로 이루어진 헤테로다이머인데, c-Jun은 자외선 노출 후 단백질 양이 증가하는 반면 c-Fos는 일정 수준을 유지한다[10,11]. 따라서 자외선에 의한 자외선에 의한 AP-1 활성화는 주로 c-Jun 증가에 의해 유발된다고 볼 수 있다. 이때 c-Jun의 증가는 주로 전사 후 과정에서 조절된다. c-Jun 단백질은 자외선 노출 후 1 h 후부터 증가하여 최대 증가치가 24 h 후까지 유지된다[10-12]. 반면에 c-Jun mRNA 발현은 일시적으로만 증가하는데, 자외선 노출 후 1 h 후에 증가했다가 6 h 후면 평소 상태로 다시 돌아온다[6,12].

본 연구에서는 COP1이 식물에서 자외선에 대한 보호 기능을 하는 것처럼, 사람 피부에서도 DET1과 함께 c-Jun 단백질양을 조절하여 AP-1 시그널을 통한 광노화 과정에 관여할 것이라 가설을 세우고, 이를 확인하였다. 또한 초피나무 열매 추출물이 COP1과 DET1의 발현을 증가시켜 자외선에 대한 피부 반응을 조절할 뿐만 아니라, 다양한 메커니즘을 통해서 자외선에 의한 광노화 및 광손상을 억제하는 것을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포 배양

인간 각질형성세포 세포주인 HaCaT은 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 키웠으며, 각질형성세포 1차 세포(normal human epidermal keratinocytes, NHEK)는 Lonza (USA)에서 구입하여 Clonetics™ keratinocyte growth media (Lonza, USA)배지에서 배양하였다. 세포들은 37 °C의 5% CO₂ 세포 배양기에서 키웠다.

2.2. *In Vitro* 자외선 조사

인간 각질형성세포를 60 mm dish에 키운 후 자외선을 조사하기 전에 배지를 제거하고 PBS 500 μ L를 넣어 주었다. RMX-300 (Vilber Lourmat, France) 자외선 조사기를 이용하여 312 nm에서 10, 20 또는 40 mJ/cm²세기로 자외선을 조사하였다. 자외선 조사 직후에 serum이 들어있는 세포 배양액으로 교환해 주었다. 대조군의 경우 자외선 조사 과정을 제외한 동일한 처리를 해주었다.

2.3. mRNA 추출 및 Real-time PCR

RNeasy mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 제조사가 제안하는 실험 방법대로 total RNA를 추출하였다. M-MLV reverse transcriptase (Lifetechnology, USA)를 이용하여 reverse transcription을 수행하여 cDNA를 제작하였으며, SYBR-Green PCR master mix (Applied Biosystems (AB), USA)와 AB StepOne plus real time PCR systems을 이용하여 real time PCR을 수행하였다. 타겟 유전자의 발현을 측정하기 위하여 아래 시퀀스의 프라이머를 사용하였다. COP1; 5'-GCA TGA GAA GAG GTG TTG GAG TGT-3', 5'-GCT TGC CAC TGA GTT GTC TAG ATT GG-3', DET1; 5'-GTG AGG ATG TAG TAA CAC TGC GAG TC-3', 5'-AGC AAT CAC CTC TGT CGT CAC CAT-3' GAPDH; 5'-TCG ACA GTC AGC CGC ATC TTC TTT-3', 5'-ACC AAA TCC GTT GAC TCC GAC CTT-3'. mRNA 발현양은 GAPDH 발현양에 대한 상대값으로 보정하여 표현하였다.

2.4. COP1, DET1 과발현

클로닝을 통하여 COP1과 DET1을 각각 발현하는 벡터를 제작하였다. pcDNA3.1/Flag 벡터와 pcDNA3.1/myc-his A 벡터(Lifetechnology, USA), COP1과 DET1의 cDNA (Dharmacon, USA)를 각각 삽입하여 pcDNA3.1-COP1-Flag와 pcDNA4.1-DET1-myc-His를 만들었다. LipofectamineTM과 PlusTM reagent (Lifetechnology, USA)를 이용하여 HaCaT 세포에 제작한 벡터를 transfection 하였다. 4 h 후에 시료를 제거한 후 새 배지로 교체해 주고 20 h 추가로 배양하였다.

2.5. c-Jun ELISA

InstantOneTM ELISA assay kit (eBioscience, USA)를 이용하여 토탈 c-Jun 양을 측정하였다. 간단히 요약하

면, 24-well에서 부착하여 자란 세포를 PBS로 간단히 세척한 후 키트에 들어있는 cell lysis buffer mix (1X)로 세포를 용해 시켰다. 총 단백질 양을 일정하게 한 세포 용해액과, capture antibody 그리고 detection antibody를 동시에 microplate wells에 넣어주고 1 h 반응을 시켰다. 세척액으로 세척해준 후 발색 시약을 넣어주고 460 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. 초피나무 열매 추출물

초피나무 열매 추출물을 OBM lab (Daejeon, Korea)에서 구매하였다. 건조한 초피나무 열매를 경동시장에서 구입하여 10배 볼륨의 95% 에탄올에 담가 실온에서 3일간 추출하였다. 에탄올 추출액은 진공농축기를 이용하여 농축한 후 건조중량 5%가 되도록 70% 에탄올에 녹였다.

2.7. 자외선에 대한 피부 보호 효능 인체 평가

LG 생활건강 임상시험심사위원회에서 IRB 심사를 받은 후((제5939-A-N-01호) LG-SKEP-2016-0602, (제5939-A-N-01호) HRL-2015-0429-1), 30대 및 40대 남성 자원자의 동의를 받은 후 헬싱키 선언의 윤리적 기준에 따라 인체 효능 평가를 실시하였다. 본 실험에 앞서, 초피나무 열매 추출물에 대하여 세포독성, 알러지 유발 가능성이 없음을 *in vitro*에서 확인하였으며, patch test를 통하여 초피나무 열매 추출물을 건조중량 0.5%가 되도록 70% 디프로필렌글리콜(DPG)에 녹인 시험물질과 초피나무 열매 추출물 건조중량 0.4%가 되도록 제조한 크림에 대해서 피부 자극성이 없음을 확인하였다(data not shown). 또한 자원자별로 최소 홍반량(minimal erythema dose, MED)를 측정하였다. 본 실험을 위하여 자원자 상완의 2 cm \times 2 cm 영역에 초피나무 열매 추출물 함유 시험물질을 10 μ L씩 하루 2회씩 7일간 발라주었다. 그리고 solar simulator (LG 생활건강, Korea)로 1.5 MED의 광량으로 UVB를 쬐어 주었다. 자외선 조사 후 24 h, 72 h 그리고 96 h 후에 Mexameter (Courage-Khazaka Electronic, Germany)로 홍반 생성 정도를 erythema value로 측정하였으며, 96 h 후에 홍반에 의한 색소 침착 정도를 melanin value로 측정하였다. 피부의 붉어짐 정도는 색차계 CR-300 (Konica Minolta, Japan)를 이용하여 측정하였다.

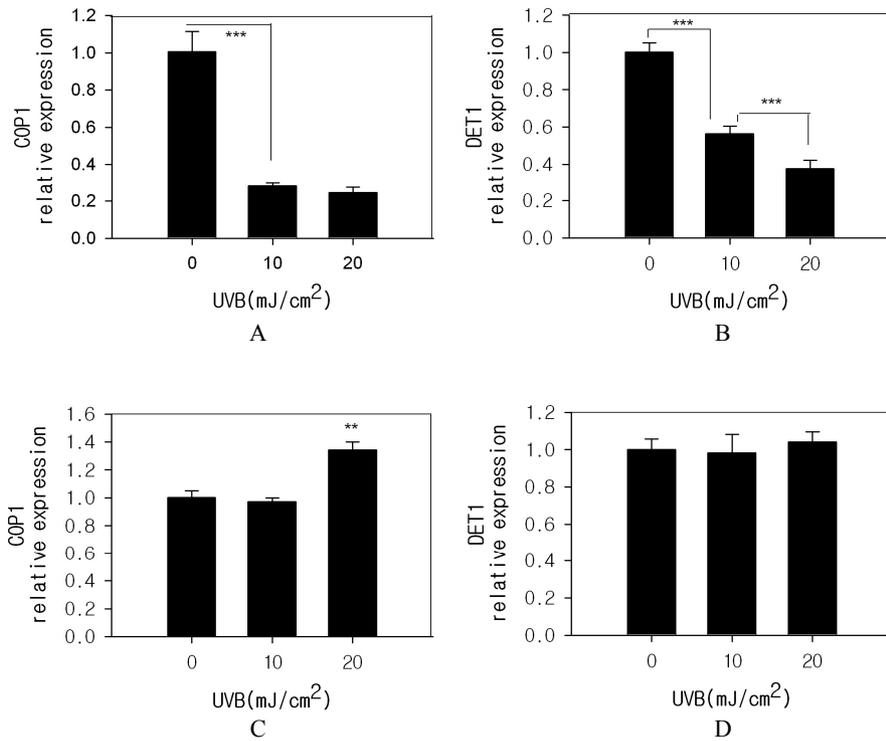


Figure 1. Expression of COP1 and DET1 after UVB irradiation. HaCaT cells were irradiated with UVB. The mRNA expression levels of COP1 and DET1 were measured 4 h (A, B) and 24 h (C, D) after UVB irradiation (** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$).

2.8. 통계 분석

본 연구의 실험은 두 번 이상 수행하였으며, 이때 결과 값들은 mean \pm standard deviation (S.D.)으로 나타내었다. 실험 군에 따른 데이터 사이의 통계적 유의성 검정은 two-tailed Student's *t*-test를 통하여 검증하였고, *P* 값이 0.05 이하일 경우 통계학적으로 유의적인 차이가 있는 것으로 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 자외선에 의한 hCOP1과 hDET1의 발현양 감소

최근 보고된 논문에 의하면 배양된 인간 각질형성세포에서 COP1이 검출되고 자외선에 의하여 그 발현양이 감소하였다[6,8,9]. 이를 확인하기 위하여 HaCaT 세포주를 0, 10 그리고 20 mJ/cm² 세기의 자외선으로 조사한 후 COP1 mRNA 발현양을 측정해 보았다. 그 결과 COP1 뿐만 아니라 E3 ligase로 작용하는데 보조인자로 작용하는 DET1[6]의 mRNA 발현도 자외선에 의하여 감소하였다. COP1과 DET1 모두 자외선 조사 후

4 h 후에 가장 많이 감소했다가 24 h 후에는 정상 상태로 돌아오거나 다소 증가한 상태가 되었다(Figure 1).

3.2. 자외선에 의한 세포 내 c-Jun 단백질 및 MMP1 발현 증가

COP1은 세포에서 c-Jun 단백질양을 낮은 수준으로 유지하는 작용을 한다[6]. COP1이 결핍된 마우스의 경우 피부에 c-Jun이 증가되어 있고, AP-1 활성화도 증가되어 있는 것이 보고되었다[7]. 이러한 보고와 일맥상통하게 각질형성세포에 자외선을 조사할 경우 토털 c-Jun의 양이 증가하였다(Figure 2A). COP1과 DET1 발현양이 자외선 조사 후 24 h 만에 정상으로 돌아오는 것과는 달리(Figure 1), c-Jun 단백질양은 24 h 후에도 증가된 상태에 있었다. 또한 자외선 조사 후 MMP1 발현이 증가되었는데, 자외선 조사 후 4 h 후에는 오히려 발현이 감소하는 경향이 있었으나 24 h 후에는 증가되는 현상을 보여주었다(Figure 2A, B). 이는 COP1과 DET1이 자외선에 대한 피부세포의 반응 과정에서 초기 조절자로 작용하는 요소일 가능성이 있음을 시사한다.

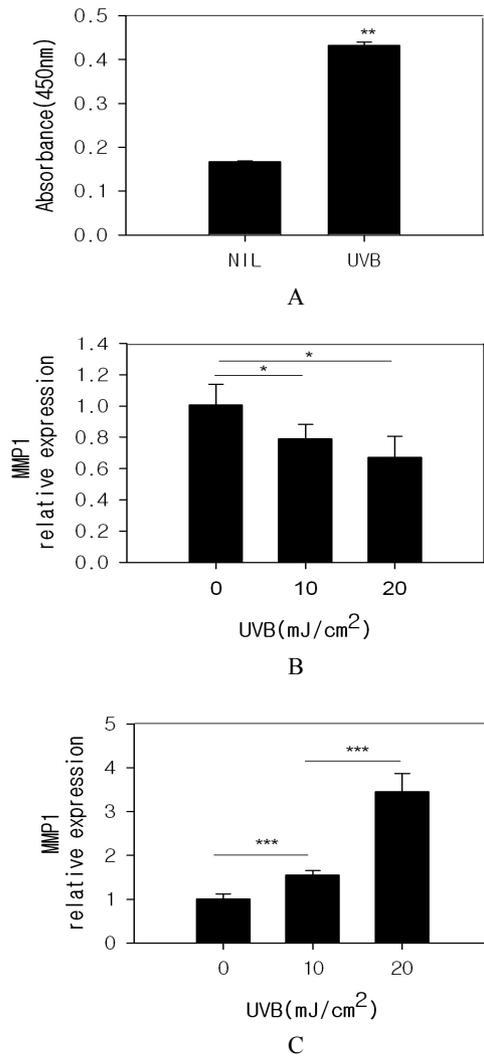


Figure 2. Increase of c-Jun protein and MMP1 mRNA after UVB irradiation. (A) HaCaT cells were irradiated with 20 mJ/cm² of UVB. The amount of total c-Jun was measured 24 h after UVB irradiation using InstantOne™ ELISA assay kit. (B, C) The mRNA expression level of MMP1 was measured 4 h (B) and 24 h (C) after UVB irradiation (* $p < 0.5$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$).

3.3. COP1 증가에 의한 c-Jun 감소

COP1과 DET1의 발현을 조절함으로써 각질형성세포에서 c-Jun 단백질 양을 조절할 수 있는지 확인하기 위하여 COP1과 DET1을 발현하는 벡터를 transfection 하여 HaCaT 세포에 COP1과 DET1을 과발현 시킨 후 c-Jun 단백질 양을 측정하였다(Figure 3). 그 결과, COP1과 DET1의 발현량을 증가 시킬 경우 토탈 c-Jun

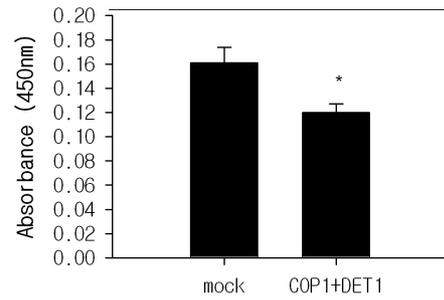


Figure 3. Decrease of c-Jun protein after overexpression of COP1 and DET1. HaCaT cells were transfected with pcDNA3.1-COP1-Flag and pcDNA4.1-DET1-myc-His simultaneously. The amount of total c-Jun was measured 24 h after transfection using InstantOne™ ELISA assay kit (* $p < 0.5$).

양이 감소되었다. Anzi 연구팀도 COP1을 과발현 시키고 c-Jun의 양을 비교하는 연구를 보고하였는데, COP1만 증가시켜 주는 것은 c-Jun 양의 증가를 억제하지 못하였다. 본 연구팀은, COP1이 E3 ligase로서 작용할 때 보조인자 역할을 하는 DET1을 동시에 과발현 시켜주었고, 그 결과 c-Jun 단백질양을 감소시킬 수 있었다. COP1과 DET1은 c-Jun이 인산화된 상태에 따라 조절자 역할을 하는 Fbw7과 Itch와는 달리 인산화 상태와 상관없이 c-Jun 단백질 양을 조절하므로[6,13], 자외선 노출되지 않은 상황에서도 COP1과 DET1의 증가가 c-Jun의 감소를 야기했다. 종합적으로, COP1과 DET1은 c-Jun 매개 반응을 조절할 수 있는 타겟이 될 가능성이 있음을 알 수 있었다.

3.4. 초피나무 열매 추출물에 의한 COP1과 DET1 발현 증진 및 MMP1 억제 효과

인간 피부의 각질형성세포에서 COP1과 DET1의 발현을 증가시키는 것이 피부 광노화 현상을 줄여줄 수 있을 것으로 기대되어, 인간 각질형성세포에서 COP1과 DET1의 발현을 동시에 증가 시켜 줄 수 있는 소재를 탐색하였다. 그 결과 초피나무 열매 추출물이 *in vitro*에서 각질형성세포에 처리 시 COP1과 DET1의 발현을 증가 시켜 주는 것을 확인할 수 있었다. NHEK 세포에 초피나무 열매 추출물(ZE)을 20, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리해 주었더니 COP1과 DET1 mRNA 발현이 농도 의존적으로 증가하였고, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 약 3배 정도 증가하였다(Figure 4A, B). HaCaT 세포주에서는 효능이 좋았던 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 조건에서 다시 확인하였는데,

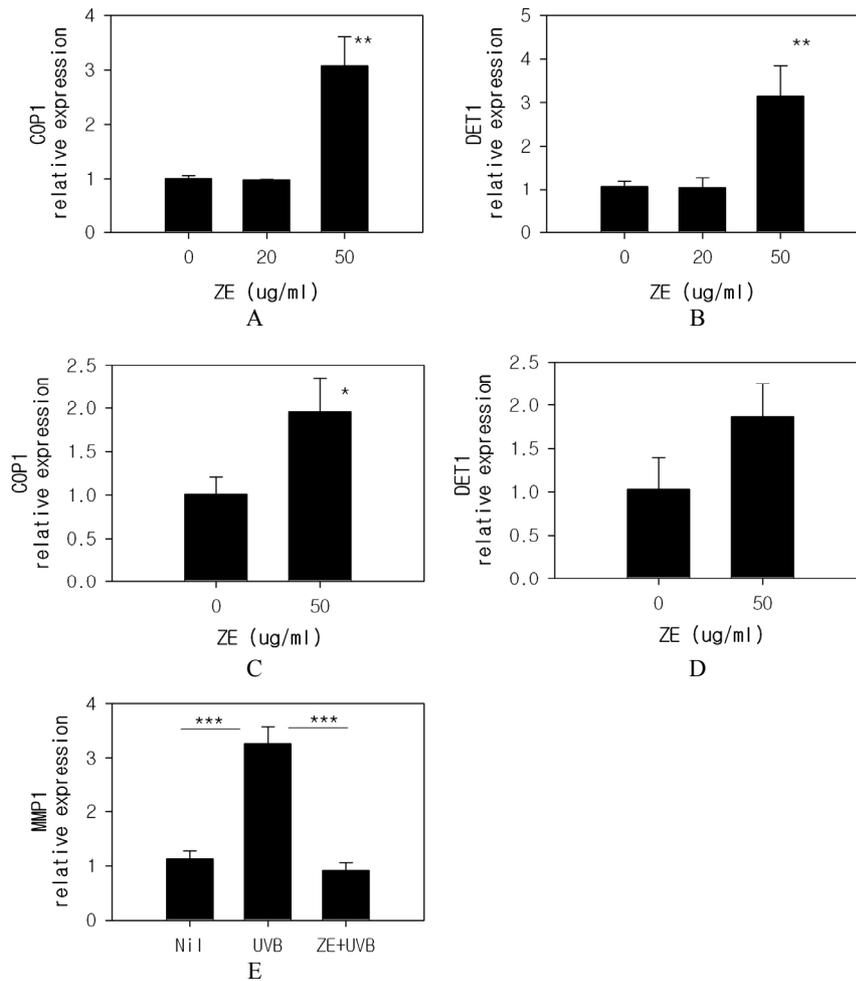


Figure 4. ZE regulated the expression of COP1 and DET1. (A, B) NHEK cells were treated ZE for 24 h and then the mRNA expression levels of COP1 and DET1 were measured. (C, D) HaCaT cells were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ZE for 72 h and RNA was prepared to measure the mRNA expression levels of COP1 and DET1. (E) NHEK cells were pre-treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ZE for 24 h. After irradiation with 20 mJ/cm^2 of UVB, the cells were incubated in the ZE containing culture media for 24 h. And then, the mRNA expression level of MMP1 was measured (* $p < 0.5$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0001$).

72 h 이상 처리해 줄 경우 COP1과 DET1 발현이 약 2 배 증가되었다(Figure 4C, D). 세포주에 따라 정도의 차이는 있었지만, 초피나무 열매 추출물이 각질형성세포에 작용하여 COP1과 DET1의 발현을 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 초피나무 열매 추출물이 각질형성세포에서는 COP1과 DET1의 발현을 증가시켰지만 진피층을 구성하는 섬유아세포에서는 COP1과 DET1의 발현에 영향을 주지 않았다(data not shown).

그리고 초피나무 열매 추출물을 미리 처리해준 경우, 자외선에 의하여 MMP1이 증가되는 것이 억제되었다. NHEK에 초피나무 열매 추출물을 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도

로 24 h 처리해 주고 자외선 조사하였더니, 초피나무 열매 추출물을 처리하지 않은 경우 MMP1 발현이 약 3배 증가하였으나, 초피나무 열매 추출물을 처리해준 경우 자외선에 노출되지 않은 대조군 수준으로 유지되었다(Figure 4E).

3.5. 초피나무 열매 추출물의 자외선에 대한 피부 보호 효과

본 연구팀은 이전 연구에서, 산초 약재가 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α 활성이 있음을 보고한 바 있다[14]. PPAR- α 활성 물질은 피부 각질층의 분화를 조절하여 피부 장벽을 강화해 줄 수 있는

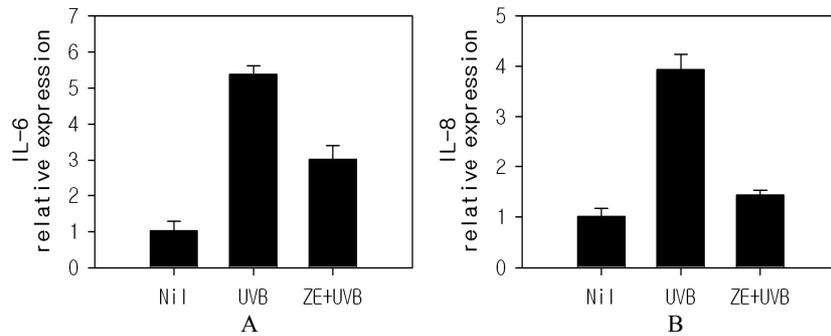


Figure 5. ZE regulated UVB-induced inflammation. NHEK cells were pre-treated with 50 $\mu\text{g/mL}$ of ZE for 24 h. After irradiation with 20 mJ/cm^2 of UVB, the cells were incubated in the ZE containing culture media for 24 h. And then, the mRNA expression levels of IL-6 and IL-8 were measured.

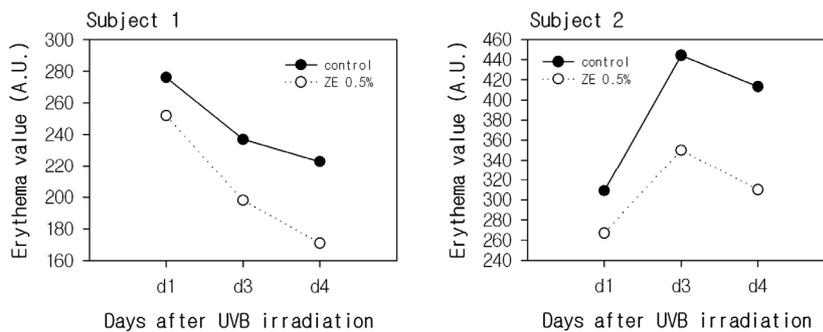


Figure 6. ZE reduced UVB-induced erythema. Two subjects were pre-treated with 0.5% ZE twice a day for 7 days on their upper arm. For control, 70% DPG was applied. Following 1.5 MED UVB challenge, the erythema value was measured using Mexameter after 1, 3 and 4 days.

데, 자외선에 의한 염증 반응으로부터 피부를 보호할 수 있다는 보고가 있다[15]. 초피나무 열매는 산초 약재에 속하기 때문에, 초피나무 열매 추출물이 COP1과 DET1 조절 작용뿐만 아니라 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 다른 효능도 있을 것으로 기대되었다. 이를 확인하기 위하여 자외선에 의해 유도된 염증반응에 어떤 영향을 주는지 평가를 해보았다. 자외선 조사 시 각질형성세포에서 염증성 사이토카인인 IL-6와 케모카인인 IL-8 발현이 증가하였는데, 초피나무 열매 추출물 처리군에서는 증가폭이 유의적으로 감소되었다(Figure 5). 종합하면, 초피나무 열매 추출물은 광노화 과정에 관여할 것으로 여겨지는 COP1과 DET1 증진 효과뿐만 아니라 자외선에 의한 염증반응을 억제하는 복합적인 기능을 가지고 있어, 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움이 될 것으로 여겨진다.

초피나무 열매 추출물이 실제 사람 피부에서 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움이 되는지 확인하기 위하여 인체 실험을 실시하였다. 건강한 40대 남성 2명의 팔 안쪽에 초피나무 열매 추출물을 0.5% 농도로 70% DPG 용매에 녹인 시험물질을 10 μL 씩 7일간 아침과 저녁으로 두 번씩 발라준 후 1.5 MED로 UVB를 쬐어 주었다. 자외선에 의한 피부 보호 지표로 홍반 생성 정도와 홍반에 의한 색소침착 정도를 측정하였다. 그 결과, 개체차이로 인해 홍반 생성 정도와 홍반이 유지되는 정도는 차이가 있었지만, 피험자 모두에서 초피나무 열매 추출물을 발라준 부위가 대조군 보다 홍반이 약하게 생긴 것을 확인하였다(Figure 6). 자외선을 쬐은 후 96 h 후에 홍반에 의해 색소 침착되어 어둡게 변한 정도를 melanin value로 측정하여 비교한 경우에도 초피나무 열매 추출물을 발라준 부위가 대조군을 바른 부위와 비교 시 피부가 어둡게 변하는 정도가

Table 1. *Zanthoxylum piperitum* Extract Reduced Erythema-induced Pigmentation

	Melanin value (A.U.)		Inhibition rate (%)
	Control	ZE 0.5%	
Subject 1	116.67	106.67	8.5
Subject 2	96.33	79.33	17.6

Two subjects were pre-treated with 0.5% ZE or 70% DPG for control twice a day for 7 days on their upper arm. Following 1.5 MED UVB challenge, the melanin value was measured using Mexameter after 4 days.

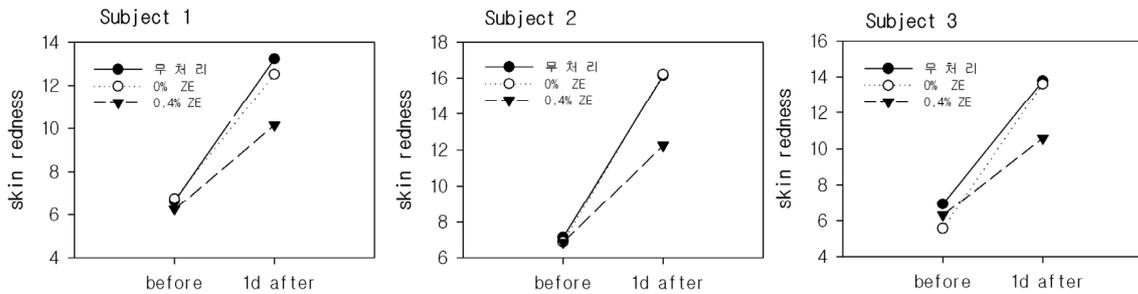


Figure 7. Cream containing ZE reduced UVB-induced redness. Three subjects were pre-treated with creams containing 0% or 0.4% ZE twice a day for 7 days on their upper arm. Following 1.5 MED UVB challenge, skin redness was measured using color measurement after 24 h.

8.5%, 17.6%씩 억제되었다(Table 1). 화장품 제형에 초피나무 열매 추출물을 0.4% 처방하여 초피나무 열매 추출물 함유 크림을 제조하였다. 30 ~ 40대 건강한 남성 피험자 3명에게 7일간 발라주고, 자외선 조사 후 피부가 붉어지는 정도를 색차계를 이용하여 측정하였다. 화장품 크림 자체는 자외선에 의해 피부가 붉어지는 것을 억제하지 않았다. 반면, 초피나무 열매 추출물 함유 크림은 자외선에 의해 피부가 붉어지는 것을 방지하는 효과가 있었다(Figure 7). 참여한 피험자 수가 적어 통계처리가 불가능하였으나, 초피나무 열매 추출물이 자외선으로부터 피부를 보호하는 경향성이 있음을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

자외선은 피부 노화를 일으키는 주요 인자이고 심하면 피부암도 유발할 수 있기 때문에 자외선으로부터 피부를 보호해야 한다고 한다. 가장 일반적인 방법은 자외선 차단제를 사용하는 것이지만, 자외선 차단제도 완벽하게 피부를 보호할 수 없다[16]. 따라서 피부 자체의 자외선에 대한 방어능력을 올려주는 것이 필요하다. 이를 위하여 자외선이 피부 안에서 어떤 메카니즘

으로 피부 노화 및 손상을 일으키는 지 많은 연구가 되어왔고[1-4], 그 메카니즘은 자외선으로부터 피부를 보호하는 물질을 개발하는 타겟이 되었다. 레티노익산이 자외선에 의한 AP-1 시그널을 억제하여 광노화를 예방 개선할 수 있다고 알려져 있지만[10-12], 레티노익산은 피부 자극이 있고, 여러 부작용이 있어 보다 안전한 물질 개발이 요구되어 왔다. 본 연구에서는 COP1과 DET1이 자외선 노출 후 각질형성세포에서 발현이 감소하는데, 이는 c-Jun 단백질 축적을 야기하여 피부 광노화 및 광손상 과정에 관여할 가능성이 있음을 확인하였고, 자외선으로부터 피부를 보호하기 위하여 COP1과 DET1을 조절하는 것이 새로운 타겟이 될 수 있음 보여주고 있다. 그리고 초피나무 열매 추출물이 각질형성세포에서 COP1과 DET1의 발현을 증가시키고, 자외선 조사 시 콜라겐분해 효소인 MMP1 발현을 감소시키는 것도 확인하였다. 초피나무 열매 추출물이 속하는 산초가 PPAR- α 활성 작용도 보고된 바 있는데[14], 초피나무 열매 추출물은 각질형성세포에서 자외선에 의하여 IL-6와 IL-8의 발현이 증가하는 것도 억제하였다. 초피나무 열매 추출물이 다양한 기전을 통하여 자외선으로부터 피부를 보호하는 데 도움이 될 것으로 보여 이를 인체 실험을 통해 확인해 본 결과에

서도, 자외선에 의하여 홍반이 생기고 이로 인해 피부가 붉어지거나 어둡게 변하는 현상을 예방해 주는 효과가 있었다. 따라서 초피나무 열매 추출물은 자외선에 의한 피부 손상 및 광노화를 억제하는 용도로 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

Reference

- G. J. Fisher, S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, and J. J. Voorhees, Mechanism of photoaging and chronological skin aging, *Arch. Dermatol.*, **138**(11), 1462 (2002).
- G. Jenkins, Molecular mechanisms of skin ageing, *Mech. Ageing Dev.*, **123**(7), 801 (2002).
- M. Yaar and B. A. Gilchrist, Photoaging: mechanism, prevention and therapy, *Br. J. Dermatol.*, **157**(5), 874 (2007).
- A. Peter, S. Axel, and S. K. Marina, Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology, *Oncogene*, **20**(19), 2413 (2001).
- J. J. Favory, A. Stec, H. Gruber, L. Rizzini, A. Oravec, M. Funk, A. Albert, C. Cloix, G. I. Jenkins, E. J. Oakeley, H. K. Seidlitz, F. Nagy, and R. Ulm, Interaction of COP1 and UVR8 regulates UVB-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*, *EMBO J.*, **28**(5), 591 (2009).
- S. Anzi, S. Finkin, and E. Shaulian, Transcriptional repression of c-Jun's E3 ubiquitin ligases contributes to c-Jun induction by UV, *Cell Signal.*, **20**(5), 862 (2008).
- D. Migliorini, S. Bogaerts, D. Defever, R. Vyas, G. Denecker, E. Radaelli, A. Zwolinska, V. Depaepe, T. Hochepped, W. C. Skarnes, and J. C. Marine, Cop1 constitutively regulates c-Jun protein stability and functions as a tumor suppressor in mice, *J. Clin. Invest.*, **121**(4), 1329 (2011).
- A. Kinyó, Z. Kiss-Laszló, S. Hambalkó, A. Bebes, M. Kiss, M. Széll, Z. Bata-Csörgo, F. Nagy, and L. Kemény, COP1 contributes to UVB-induced signaling in human keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **130**(2), 541 (2010).
- B. Fazekas, H. Polyanka, A. Bebes, G. Tax, K. Szabó, K. Farkas, A. Kinyó, F. Nagy, L. Kemény, M. Széll, and E. Adam, UVB-dependent changes in the expression of fast-responding early genes is modulated by huCOP1 in keratinocytes, *J. Photochem. Photobiol. B*, **140**, 215 (2014).
- G. J. Fisher, S. C. Datta, H. S. Talwar, Z. Q. Wang, J. Varani, S. Kang, and J. J. Voorhees, Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism, *Nature*, **379**, 335 (1996).
- G. J. Fisher, H. S. Talwar, J. Lin, P. Lin, F. McPhillips, Z. Wang, X. Li, Y. Wan, S. Kang, and J. J. Voorhees, Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*, *J. Clin. Invest.*, **101**(6), 1432 (1998).
- G. J. Fisher, S. Datta, Z. Wang, X. Li, T. Quan, J. H. Chung, S. Kang, and J. J. Voorhees, c-Jun-dependent inhibition of cutaneous procollagen transcription following ultraviolet irradiation is reversed by all-trans retinoic acid, *J. Clin. Invest.*, **106**(5), 663 (2000).
- W. Wei and W. G. Kaelin, Good COP1 or bad COP1? *in vivo* veritas, *J. Clin. Invest.*, **121**(4), 1263 (2011).
- Y. H. Chang and S. Lee, Development of PPAR reagent, *The Journal of Skin Barrier Research*, **14**(2), 56 (2012).
- S. Kippenberger, S. M. Loitsch, M. Grundmann-Kollmann, S. Simon, T. A. Dang, K. Hardt-Weinelt, R. Kaufmann, and A. Bernd, Activators of peroxisome proliferator-activated receptors protect human skin from ultraviolet-B-light-induced inflammation, *J. Invest. Dermatol.*, **117**(6), 1430 (2001).
- D. Brain, Sunscreens: expectation and realization, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **25**(5), 233 (2009).