大韓本草學會誌 제32권 제4호(2017년 7월)
Kor. J. Herbol. 2017 ; 32(4) : 17-24

ISSN 1229-1765(Print), ISSN 2288-7199(Online)
http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2017.32.4.17.

떫은감과 포제 떫은감의 최종당화산물 생성 억제를 통한 피부 탄력 개선 효과

김수현[1#], 이아름[1], 김수지[1], 김경조[1], 권오준[2], 최준영[3], 구진숙[4], 노성수[1*]

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 경북지역사업평가단
3 : 농업회사법인 새얼 바이오푸드 주식회사, 4 : 안동대학교 자연과학대학 생약자원학과

Skin elasticity improvement effect of Young persimmon and Heated young persimmon by decreased Advanced glycation end products(AGEs)

Soo Hyun Kim[1#], AhReum Lee[1], SuJi Kim[1], Kyeong Jo Kim[1], Ojun Kwon[2], Joon Young Choi[3], Jin Suk Koo[4], Seong-Soo Roh[1*]

1 : College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea
2 : Gyeongbuk Institute for Regional Program Evaluation, Republic of Korea
3 : Sae Earl Bio Food co., Ltd, Republic of Korea,
4 : Dept. of Bioresource Science, Andong National University

ABSTRACT

Objectives : Advanced glycation end products (AGEs) is bind formation of glucose and protein. Acceleration of AGE formation during hyperglycemia is associated with the pathogenesis of diabetic complications and causes kidney and skin damage. The aim of this study was investigated the AGEs inhibitory activity and antioxidant activity of water extracts from young persimmon (YP) and heated young persimmon (HYP).

Methods : Paeoniae Radix Alba (YP) is prepared by heating with 30% ethanol. AGEs formation inhibitory activities of YP and HYP measured using bovine serum albumin. To evaluate the protective effects of YP and HYP in diabetic rats induced with streptozotocin (STZ) and methyl glyoxal (MGO), SD rats were distributed into four groups; normal mice (Nor), AGEs-induced rats (Con), AGEs-induced rats treated with 100 ㎎/㎏ YP (YP), AGEs-induced rats treated with 100 ㎎/㎏ heated YP (HYP) for 3weeks. Heated young persimmon respectively decrease AGEs construction.

Results : YP and HYP administration inhibited the biomarkers of AGEs in serum, kidney and skin tissues. AGE-induced rats revealed that the significant decreased collagen however, heat processing methods of young persimmon up regulated inhibits AGEs-induced collagen decrease. The expressions of AGEs were decreased in YP and HYP treated group compared with the control group in tissues. It specifies that HYP has potential to serve as a positive regulator of via AGEs path way.

Conclusion : It has proposed that may have an improvement effect on diabetic complications, heated young persimmon has AGEs inhibitory excellent activities and antioxidant effect.

Key words : Young persimmon; Advanced glycation end products (AGEs); Heating; Skin; Collagen.

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.
· Tel : +82-53-770-2296 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr
#First author : Soo Hyun Kim, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.
· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : hyunsk0513@gmail.com
· Received : 11 June 2017 · Revised : 23 June 2017 · Accepted : 15 July 2017

Ⅰ. 서 론

최종당화산물 (Advanced glycation endproducts, AGEs)이란 혈중의 당이 높아졌을 때 환원당인 포도당이 단백질의 free amino group과 반응하여 단백질에 비효소적 당화 반응으로 공유결합을 이루게 된 형태를 말하며[1] 당화 반응으로 생성된 AGEs는 세포 손상, 동맥경화과 같은 질병을 일으키고 특히 피부 노화의 주요한 원인이 된다[2].

AGEs는 세포의 활성산소종 (Reactive Oxygen Species, ROS)을 유도하며 glyoxalase의 활성을 감소시켜 세포 내 스트레스를 가속화하며[3] 활성 산소종에 의하여 세포 표면의 AGEs 수용체와 결합하여 세포 손상 유발에 관여하는 것으로 보고되어 있다[4]. 이렇게 발생된 ROS는 사이토카인의 생성을 촉진하고 신호전달 체계를 활성화시킴으로써 피부 조직에 nuclear factor κB (NF-κB)의 활성화에 의한 염증반응을 일으켜,[5] 콜라겐 감소 및 피부 세포 손상, 피부 염증성 질환을 일으킨다[2]. 최근에는 AGEs의 축적을 예방하기 위해서 산화적 스트레스를 막는 역할을 하는 항산화제의 섭취가 권장되고 있으며 안전한 천연물에 대한 연구에 많은 관심이 대두되고 있다[6].

감 (*Diospyros kaki*)은 알칼리성 과일로서 포도당, 과당 등의 당질을 15-16%이상 함유하고 있으며 떫은 맛을 내는 diospyrin 이라는 탄닌 성분 함유 하고 있다. 감의 떫은맛을 나타내는 탄닌 성분은 미숙한 과일일 때는 함량이 높지만 성숙할수록 함량이 줄어들기 때문에[7] 감은 보통 곶감, 연시, 말랭이 등으로 가공되어 유통 된다[8]. 감은 성숙하는 과정에서 기후의 문제로 부패하거나 또는 감 표면에 상처가 났을 때 유통되지 못하고 다량이 폐기된다는 단점이 있다. 따라서 본 실험에서는 성숙되지 않은 떫은감을 사용하였고, 실험에서 사용된 떫은감은 발표된 논문을 통해 탄닌 성분에 의한 항산화 효과 및 항균효과[9]가 뛰어난 것으로 보고되어있음을 확인하였다.

한약재는 일반적으로 건조, 절단, 정제 과정을 거쳐서 사용되며 약재의 포제는 사용목적이나 약성(藥性)을 위해 약재 본래의 성질을 변화시키는 기술을 포제(炮製)라 하며[10], 『신농본초경(神農本草經)』, 『뇌공포자론(雷公炮炙論)』등에 다양한 수치법과 포제에 따른 효능이나 독성 및 안정성 등이 기술되어 있다[11]. 떫은감을 포제한 선행연구를 살펴보면 떫은 감은 포제하였을 경우 AGEs 억제 활성 및 항산화 활성이 증가하는 것으로 보고되었다[12]. 따라서 본 연구에서는 떫은감과 포제된 떫은감을 대상으로 최종당화산물 생성 억제효능 및 항산화 효능을 통한 피부 탄력 개선 효과에 대해 실험하였고 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에서 사용한 떫은감은 경상북도 상주시에서 채취하여 사용하였다. 떫은감 포제는 roasting machine (Genesis Co., Ltd., Kyungki-do, Korea) 기기를 이용하여 200℃에서 7분간 에탄올 30% 사용해 酒炒를 하였다. 떫은감 및 포제법을 적용한 떫은감은 분쇄한 다음 10배수의 증류수를 가하고 100℃에서 2시간 동안 가열하여 추출한 다음 이를 여과지 (Whatman No.2, GE healthcare, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 여과하였다. 여과액을 rotary vacuum evaporator (JP/N-1000X, Sunileyela Co. Ltd, Gyeonggido, Korea)를 사용하여 50℃ 감압농축 후 동결건조하여 얻어진 분말을 -80℃에 보관하여 사용하였다.

2. 실험 동물

Sprague-Dawley (SD) 흰쥐 7주령 수컷 24마리를 대한바이오 (충북, 한국)에서 구입하여 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도 22±2℃, 습도 50±5%, 명암주기 (light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였다. 사료는 고형사료 (Samyang Co., Seoul, Korea) (조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다. 실험은 대구한의대학교 동물 실험 윤리위원회의 승인 (DHU2017-049)을 얻어 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다.

3. 시약

Protease inhibitor mixture, DMSO, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), streptozotocin는 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였고 methyl glyoxal solution는 Sigma Aldrich (St Luis, MO, USA)에서 구입을 하였다. 또한, 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 ECL Western Blotting Detection Reagents는 GE Healthcare (Arlington Height, IL, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Collagen, Matrix MetalloProteinase-1 (MMP-1), Histone, b-actin 과 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas CA, USA)로부터 구입해서 사용 하였으며, anti-N^{e}-(carboxyethyl)lysine (CEL) antibody and polyclonal anti-N^{e}-(carboxymethyl)lysine (CML), Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)항체는 COSMO BIO (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 단백질 정량을 위한 Bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. Blood urea nitrogen (BUN) assay kit는 아산제약주식회사 (Hwaseong, Korea)에서 구입하였다.

4. AGEs 유발

AGEs을 유도하기 위하여 streptozotocin (50 ㎎/㎏)를 단회 복강투여 하였고, 3일 후부터 3주간 100mM methyl glyoxal (MGO)를 경구 투여 하였다. 실험군은 총 4개의 군으로 정상군 (Normal rats; Nor), 100 mM MGO와 증류수를 100 ㎎/㎏으로 경구 투여한 대조군 (AGEs-induced rats; Con), 100 mM MGO와 떫은감 추출물을 100 ㎎/㎏으로 처리한 약물투여군 (AGEs-induced rats treated with YP 100 ㎎/㎏ body weight; YP), 100mM MGO와 포제 떫은감 추출물을 100

㎎/㎏으로 처리한 약물투여군 (AGEs-induced rats treated with Heated YP 100 ㎎/㎏ body weight; HYP)으로 각각 6마리씩 나누어서 사용하였다.

5. 혈액 및 조직 내 AGEs 생성량 측정

실험 종료 후 복대 정맥에서 채혈한 혈액을 4,000 rpm 10분 원심 분리하여 혈청을 얻었고 피부 조직은 적출 후 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 분쇄하여 실험에 사용하였다. 혈액 및 피부 조직의 AGEs 생산량은 rat advanced glycation end products ELISA Kit (cusabio tech, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

6. 산화적 스트레스 바이오마커 측정

산화적 스트레스 바이오 마커인 ROS 값은 혈청과 25 mM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 혼합한 후, 형광 광도계를 이용하여 0분부터 매 5분씩 emission 파장 530 nm와 excitation 파장 485 ㎚를 이용하여 30분간 측정한 산출 값을 계산하였다.

7. 혈청의 BUN 측정

심장에서 채혈한 혈액을 4,000 rpm, 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 얻었다. 신장 손상 기능을 측정은 BUN assay kit (Asan Pharm. Co., Hwaseong, Korea)를 사용하여 측정하였다.

8. 조직 Western blotting

신장과 피부의 세포질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM $MgCl_2$, 15 mM $CaCl_2$, 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT, protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder (BioSpec Product, Oklahoma, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 20분간 정치시킨 후 12,000 rpm으로 2분간 원심분리 하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 헹구고 100 ㎕의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)를 첨가해 재부유 시킨 뒤 10분마다 vortex을 3번 하였다. 4℃에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80℃에서 각각 냉동 보관하였다. 신장 조직 세포질의 RAGE, CML, CEL, β-actin과 피부 조직의 RAGE, CML, CEL, Collagen, MMP-1, β-actin, Histone 단백질 발현을 측정하기 위하여 10 ㎎의 단백질을 8~15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기연동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4℃에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBS-T로 1:3000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co. Ltd, Seoul, Korea)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan) 프로그램을 사용하여 정량하였다.

9. 통계분석

모든 수치는 평균과 표준오차로 표시하였으며, SPSS (Version 22.0, IBM, Armonk, NY, USA)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 least-significant differences (LSD) test로 사후검증을 실시하여 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성을 p-value < 0.05에서 검증하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 체중 변화율 및 식이섭취량 측정

AGEs가 유발된 동물모델에서 떫은감 추출물 투여군과 포제 떫은감 추출물 투여가 체중변화와 식이섭취량에 미치는 영향을 조사해본 결과, 체중 증가량은 정상군 (102 ± 17.39 ($p < 0.001$)에 비해 대조군 (44.55 ± 40.31)은 유의성 있게 체중 증가량이 감소하였고 떫은감 추출물 투여군 (41.13 ± 15.57)과 포제 떫은감 추출물 투여군 (42.38 ± 10.24)은 체중변화가 유의성 없었으나 정상군에 비하여 체중증가량이 감소하는 경향으로 나타났다(Table 1).

식이섭취량은 정상군 (25.42 ± 1.32 ($p < 0.001$))에 비해 대조군 (36.93 ± 5.44)은 유의성 있게 증가하였고, 떫은감 추출물 투여군 (40.79 ± 3.48 ($p < 0.01$)) 및 포제 떫은감 추출물 투여군 (39.35 ± 2.94 ($p < 0.05$)) 또한 식이섭취량이 유의하게 증가하였다 (Table 1).

Table 1. Initial and final body weight, body weight change and food intake in SD rats.

Group	Body weight			Food intake (g/day)
	Initial (g)	Final (g)	Gain (g/21 days)	
Nor	291.5 ± 10.31*	393.5 ± 24.27***	102.00 ± 17.39***	25.42 ± 1.32***
Veh	250.55 ± 29.37	295.09 ± 66.93	44.55 ± 40.31	36.93 ± 5.44
YP	247.25 ± 20.58	288.38 ± 34.43	41.13 ± 15.57	40.79 ± 3.48**
HYP	248.38 ± 18.13	290.75 ± 15.69	42.38 ± 10.24	39.35 ± 2.94*

Normal rats; Nor, AGEs-induce rats; Con, AGEs-induce with treated YP 100 ㎎/㎏ body weight rats; YP, AGE-induce with treated HYP 100 ㎎/㎏ body weight rats; HYP. The results are presented as the means ± SD, n=6 rats. Significance: $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ vs. AGE-induce rats.

2. 혈청의 ROS 및 BUN 측정

혈청을 이용하여 산화적 스트레스 바이오 마커인 ROS를 측정한 결과, 정상군 (52 ± 1.2 (p〈0.001))에 비하여 대조군 (64.1 ± 1.9)은 유의하게 증가하였고, 떫은감 추출물 투여군 (41.5 ± 1.6 (p 〈0.001)) 및 포제 떫은감 추출물 투여군 (40.4 ± 1.6 (p〈0.001))은 유의성 있게 감소하였다(Fig. 1(A)).

또한 신장 손상 정도인 바이오 마커인 BUN을 측정한 결과, 정상군 (10.48 ± 0.51 (p〈0.001))에 비하여 대조군 (20.15 ± 1.23)은 유의하게 증가하였고, 떫은감 추출물 투여군 (20.02 ± 2.15) 및 포제 떫은감 추출물 투여군 (18.66 ± 0.83)은 유의성은 없었으나 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 1(B)).

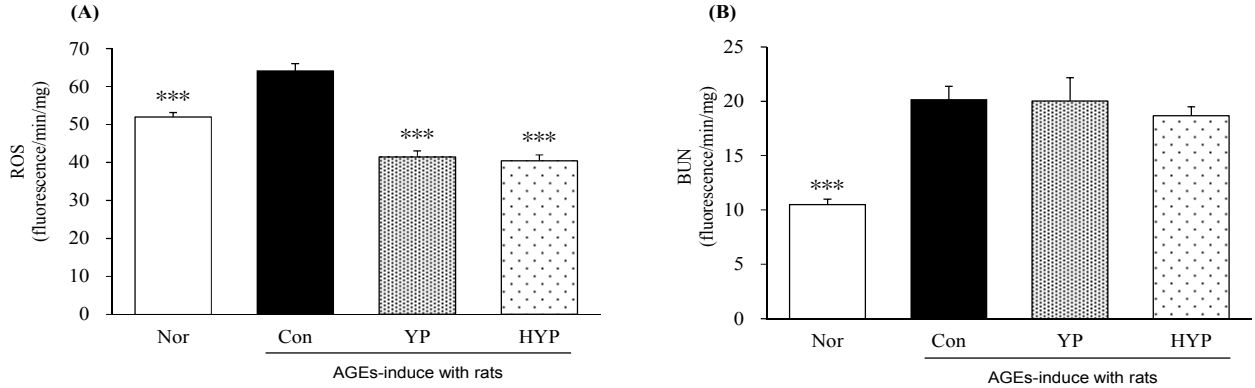

Fig. 1. ROS and BUN in serum.
Oxidative stress biomarkers reactive oxygen species (ROS) and (BUN) in serum. Normal rats; Nor, AGEs-induce rats; Con, AGEs-induce with treated YP 100 ㎎/㎏ body weight rats; YP, AGE-induce with treated HYP 100 ㎎/㎏ body weight rats; HYP. The effects of YP treated rats and HYP treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means ± SEM, n=6 rats per group. Significance: *p〈0.05, **p〈0.01, ***p〈0.001 vs. AGE-induce rats.

3. 혈청 및 조직에서 AGEs 생성량 측정

혈청을 이용하여 AGEs량을 측정한 결과, 정상군 (13.32 ± 0.6 (p〈0.05))에 비하여 대조군 (16.30 ± 1)은 유의하게 증가하였고, 떫은감 추출물 투여군 (15.08 ± 0.9) 및 포제 떫은감 추출물 투여군 (13.34 ± 0.7 (p〈0.05))은 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 2(A)).

또한 조직에서 AGEs량을 측정한 결과, 정상군 (98 ± 16.27 (p〈0.05))에 비하여 대조군 (150 ± 15.32)은 유의하게 증가하였고, 떫은감 추출물 투여군 (136 ± 14.96) 및 포제 떫은감 추출물 투여군 (127 ± 5.08)은 감소하는 경향을 나타냈다 (Fig. 2(B)).

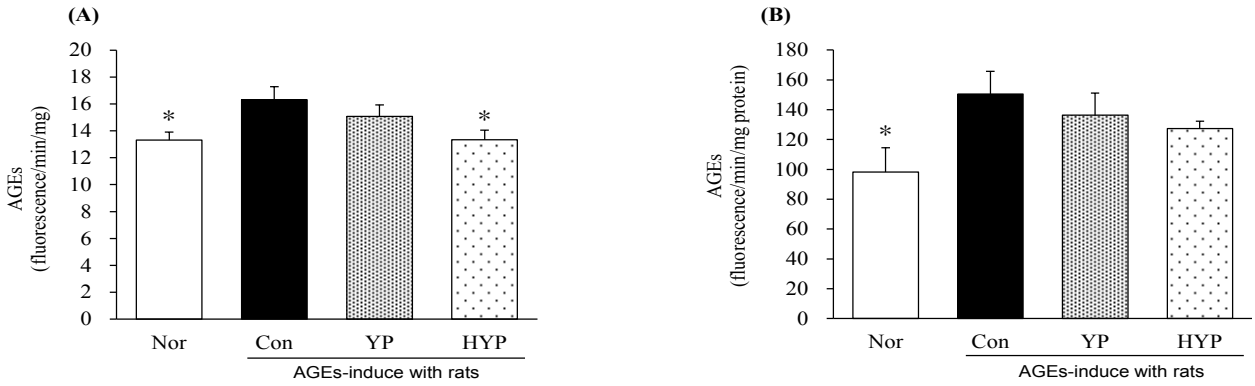

Fig. 2. AGEs accumulation in serum and tissue.
Advanced glycation end products (AGEs) accumulation in serum and tissue. Normal rats; Nor, AGEs-induce rats; Con, AGEs-induce with treated YP 100 ㎎/㎏ body weight rats; YP, AGE-induce with treated HYP 100 ㎎/㎏ body weight rats; HYP. The effects of YP treated rats and HYP treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means ± SEM, n=6 rats per group. Significance: *p〈0.05, **p〈0.01, ***p〈0.001 vs. AGE-induce rats.

4. 신장 조직에서 AGEs 형성 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

신장 조직에서 western blot을 실시하여 AGEs 형성 관련 단백질인 RAGE, CEL와 CML을 측정하였다. 그 결과 RAGE는 정상군 (1.00 ± 0.14) 보다 대조군 (1.42 ± 0.17)은 단백질 발현이 증가하는 경향을 보였으며 대조군에 비하여 떫은감 추출물 투여군 (1.24 ± 0.14) 및 포제 떫은감 추출물 투여군 (1.23 ± 0.14)은 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3(A)).

CEL은 정상군 (1.00 ± 0.12 (p〈0.01)) 보다 대조군 (1.60

± 0.21)에서 단백질 발현이 유의성 있게 증가하였다. 대조군에 비하여 떫은감 추출물 투여군 (0.92 ± 0.05 (p〈0.01))은 유의성있게 감소하였으며 포제 떫은감 추출물 투여군 (0.89 ± 0.07 (p〈0.001)) 또한 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3(B)).

CML은 정상군 (1.00 ± 0.19 (p〈0.05)) 보다 대조군 (1.56 ± 0.20)의 단백질 발현이 유의성 있게 증가하였으며 대조군에 비하여 떫은감 추출물 투여군 (1.14 ± 0.12 (p〈0.05)) 및 포제 떫은감 추출물 투여군 (1.08 ± 0.1 (p〈0.05))은 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3(C)).

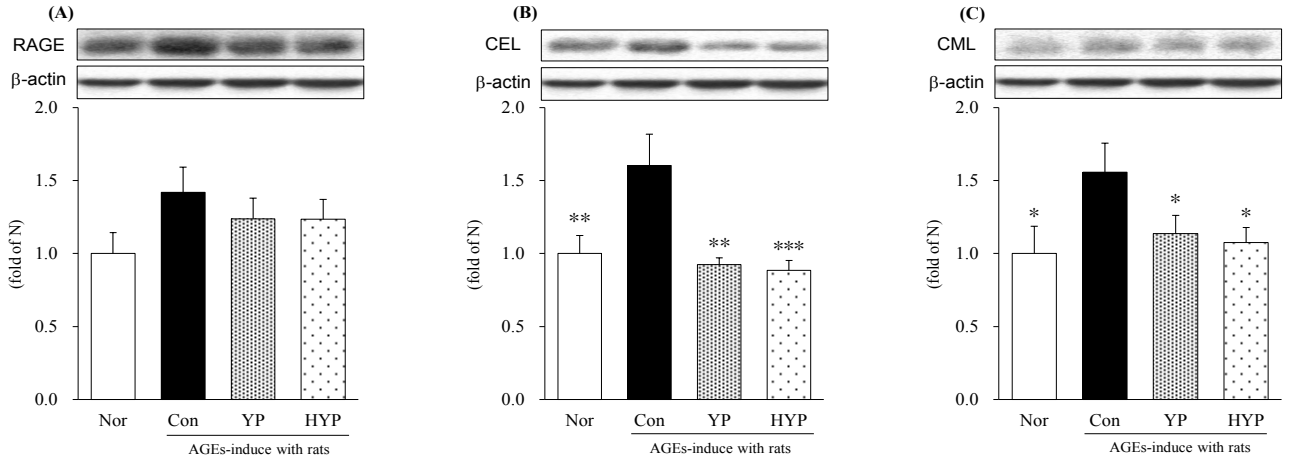

Fig. 3. Expression AGEs-related protein in kidney.
Western bolt analysis of RAGE, CEL, CML, B-actin expression; (A), RAGE; (B), CEL; (C), CML, expression levels in the kidney. Normal rats; Nor, AGEs-induce rats; Con, AGEs-induce with treated YP 100 ㎎/㎏ body weight rats; YP, AGE-induce with treated HYP 100 ㎎/㎏ body weight rats; HYP. The effects of YP treated rats and HYP treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means ± SEM, n=6 rats per group. Significance: *p〈0.05, **p〈0.01, ***p〈0.001 vs. AGE-induce rats.

5. 피부 조직에서 AGEs 형성 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

피부 조직에서 AGEs 형성 관련 단백질인 RAGE, CEL와 CML을 측정한 결과 RAGE는 정상군 (1.00 ± 0.09 (p〈0.01)) 보다 대조군 (1.32 ± 0.08)에서 단백질 발현이 유의성 있게 증가하였다. 대조군에 비하여 떫은감 추출물 투여군 (1.11 ± 0.08)은 감소하는 경향 보였으며 포제 떫은감 추출물 투여군 (0.93 ± 0.08 (p〈0.01))은 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 4(A)).

CEL은 정상군 (1.00 ± 0.08 (p〈0.001)) 보다 대조군 (1.64 ± 0.18)은 단백질 발현이 유의성 있게 증가하였으며 대조군에 비하여 떫은감 추출물 투여군 (1.25 ± 0.06 (p〈0.05)) 및 포제 떫은감 추출물 투여군 (1.23 ± 0.09 (p〈0.05))은 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4(B)).

CML은 정상군 (1.00 ± 0.09) 보다 대조군 (1.35 ± 0.21)은 증가하는 경향을 보였으며 대조군에 비하여 떫은감 추출물 투여군 (1.09 ± 0.08) 및 포제 떫은감 추출물 투여군 (1.04 ± 0.05)은 감소하는 경향으로 나타났다(Fig. 4(C)).

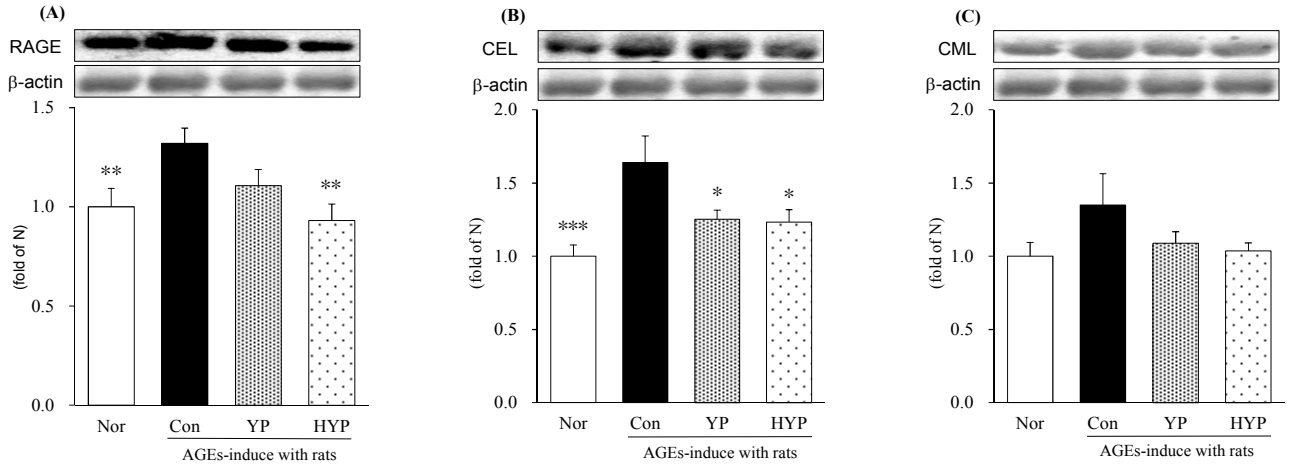

Fig. 4. Expression AGEs-related protein in skin tissues.
Western bolt analysis of RAGE, CEL, CML, B-actin expression; (A), RAGE; (B), CEL; (C), CML, expression levels in the skin. Normal rats; Nor, AGEs-induce rats; Con, AGEs-induce with treated YP 100 ㎎/㎏ body weight rats; YP, AGE-induce with treated HYP 100 ㎎/㎏ body weight rats; HYP. The effects of YP treated rats and HYP treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means ± SEM, n=6 rats per group. Significance: *p〈0.05, **p〈0.01, ***p〈0.001 vs. AGE-induce rats.

6. 피부 조직에서 피부 탄력 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

피부 조직에서 western blot을 실시하여 피부 탄력 관련 단백질인 MMP-1과 Collagen을 측정하였다. 그 결과 MMP-1는 정상군 (1.00 ± 0.19 ($p<0.05$))과 비교하였을 때 대조군 (1.64 ± 0.2)에서 단백질 발현이 유의성 있게 증가하였다. 대조군에 비하여 떫은감 추출물 투여군 (1.27 ± 0.2) 및 포제 떫은감 추출물 투여군 (1.21 ± 0.15)은 감소하는 경향으로 나타났다(Fig. 5(A)).

Collagen는 정상군 (1.00 ± 0.14)보다 대조군 (0.87 ± 0.08)은 감소하는 경향으로 나타났으며 대조군에 비하여 떫은감 추출물 투여군 (0.98 ± 0.08)과 포제 떫은감 추출물 투여군 (1.05 ± 0.09)은 유의성은 없었으나 증가하는 경향으로 나타났다 (Fig. 5(B)).

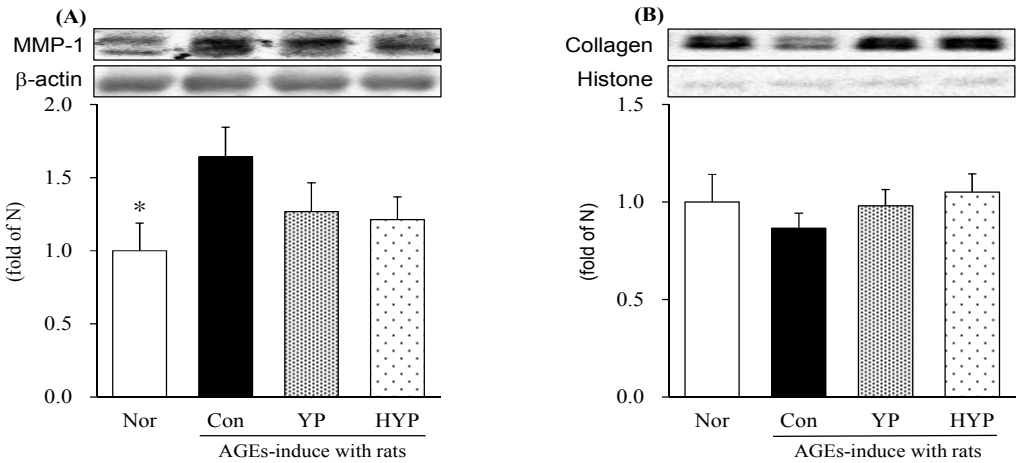

Fig. 5. Expression AGEs-related protein in skin tissues.
Western bolt analysis of MMP-1, COL1A2, B-actin, Histone expression; (A), MMP-1; (B), COL1A2. expression levels in the skin. Normal rats; Nor, AGEs-induce rats; Con, AGEs-induce with treated YP 100 ㎎/㎏ body weight rats; YP, AGE-induce with treated HYP 100 ㎎/㎏ body weight rats; HYP. The effects of YP treated rats and HYP treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means ± SEM, n=6 rats per group. Significance: *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$ vs. AGE-induce rats.

Ⅳ. 고 찰

AGEs는 고혈당 조건에서 조직에 축적되는 단백질 당화산물로서 당뇨병 환자는 정상인보다 체내 최종당화산물의 함량이 수배 이상 증가하는 것으로 밝혀져 있다[13]. 당뇨병 치료에 사용되는 인슐린은 결합물질 대사에 관련되어 있는데, 당뇨를 유발한 실험 동물에 인슐린 치료를 하지 않으면 AGEs가 증가하고 이로 인하여 피부조직의 collagen이 감소한다는 보고가 있다[14]. 피부의 주요 구성 성분인 collagen는 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질로 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포접착의 지탱, 세포 분할과 분화의 유도등의 기능을 가지고 있고 피부의 주름 형성과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다[15].

이에 본 연구에서는 최종당화산물 유발 모델에 떫은감 추출물과 포제한 떫은감 추출물을 경구 투여하였고 피부조직에서 피부 주름 개선과 관련된 항산화 및 AGEs 합성 억제 관련 인자를 분석-하였다.

AGEs를 유발하기 위하여 7주령 SD 흰쥐에 STZ를 50 ㎎/㎏의 농도로 단회 복강투여 하였고 체내 AGEs 축적을 가속화시키기 위하여 MGO를 100 ㎎/㎏의 농도로 3주간 경구 투여하였다. 약물 투여군은 MGO 경구 투여 기간 동안 떫은감 추출물 및 포제 떫은감 추출물을 100 ㎎/㎏로 3주간 경구 투여를 한 후 부검하여 얻은 혈청 및 피부조직, 신장조직을 분석하여 AGEs 저해 활성 및 피부 주름 개선 효과를 평가하였다.

ROS는 항산화 시스템의 불균형으로 과도하게 발생될 경우 세포 손상을 일으킨다[16]. 또한 각종 염증반응 및 피부 노화등과 밀접한 관련이 있어 항산화제들은 산화 스트레스를 조절하여 피부의 콜라겐 감소를 억제한다고 알려져있다[17]. 본 실험에서는 혈청을 분리하여 산화 스트레스 바이오 마커인 ROS를 측정하였다. ROS 측정 결과 대조군에서는 높은 산화적 스트레스가 보였으며 떫은감 추출물 투여군 및 포제 떫은감 추출물 투여군은 대조군에 비하여 각각 35.31%, 36.95% 감소하는 것으로 나타났다.

BUN은 신장 대사에 의해 조절되는 항목으로 신장 독성으로 인하여 신장세포의 파괴와 괴사가 진행되었을 때 혈중에서 높은 수치를 나타내기 때문에 신장 손상의 지표로 사용된다[18]. 혈청에서 BUN 측정 결과 대조군에서는 높은 수치를 보였고, 떫은감 추출물 투여군 및 포제 떫은감 추출물 투여군에서는 유의하게 감소한 것을 확인하였다. 대조군은 STZ 및 MGO 투여로 인하여 AGEs 축적이 과다하게 일어나게 되면 신장세포가 파괴됨으로서 BUN 수치가 증가한 것으로 판단되었고, 떫은감 및 포제 떫은감이 신장세포의 파괴를 억제하여 BUN 수치를 감소시키는 것으로 사료된다.

혈청 및 피부조직에서 AGEs 생성량 측정 결과 대조군에서는 혈청 및 피부 조직에서 높은 수준의 AGEs 생성량을 나타났으며 떫은감 추출물 투여군 및 포제 떫은감 추출물 투여군에서는 혈청과 피부조직 모두에서 AGEs 생성량이 감소한 것으로 나타났다.

AGEs 형성과 관련된 단백질을 분석하기 위하여 피부조직 및 신장조직에서 RAGE, CML, CEL을 측정하였다. AGEs는

RAGE와 상호작용하고 ROS를 증가시켜 산화적 스트레스를 유발시킨다. CML은 AGEs의 대표적인 물질로서 AGE를 측정하는 중요한 지표로 사용되고 있으며 CEL은 CML과 화학적으로 동종의 물질로서 마찬가지로 AGEs를 측정하는 지표로 사용된다[19].

신장 및 피부 조직 내의 RAGE, CML, CEL을 분석한 결과, 대조군에서는 수치가 크게 증가하였고 떫은감 추출물과 포제 떫은감 추출물 투여군에서는 RAGE는, CML는, CEL는 단백질 발현이 감소하였다.

피부 주름 형성의 원인은 콜라겐의 합성량이 줄어들거나 이를 분해하는 MMPs 발현량이 증가하는데 있다[20]. 피부 주름 개선 효능을 평가하기 위하여 피부 조직 내의 MMP-1, COL1A2을 분석한 결과, 떫은감 추출물과 포제 떫은감 추출물의 경구 투여는 MMP-1 단백질의 발현을 대조군에 비하여 각각 22.75%, 26.00% 감소시켰고 COL1A2 단백질 발현은 증가시키는 경향을 나타내었으나 유의성은 없었다. 실험 동물의 신장과 피부 조직에서 AGEs의 축적을 확인하였고 MMP-1의 단백질 발현 감소를 확인하였으나

COL1A2의 단백질발현이 유의하게 감소하지 않은 것은 실험이 단기간내 이루어 졌기 때문이라고 사료된다.

이러한 실험결과를 종합하여 보았을 때 떫은감 추출물의 경구 투여는 AGEs 형성을 막고 산화적 스트레스를 억제하여 피부 주름 개선 효과가 있는 것으로 사료되며 떫은감을 포제하였을때 이러한 효과가 증가하는 것으로 판단된다.

Ⅴ. 결 론

본 연구에서는 떫은감 및 포제 떫은감 추출물을 AGEs 유발 동물모델에 경구 투여하여 AGEs 억제를 통한 피부 주름 개선 효과를 확인하기 위하여 실험을 진행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 떫은감 및 포제 떫은감 추출물의 경구 투여는 혈액에서 ROS 및 BUN 수치를 유의적으로 감소시켰다.

2. 떫은감 및 포제 떫은감 추출물의 경구 투여는 혈액과 피부 조직에서 AGEs 생성을 억제하였다.

3. 포제 떫은감 추출물의 경구 투여는 떫은감 추출물과 비교하였을 때, 신장조직에서 AGEs를 더 효과적으로 억제하였다.

4. 포제 떫은감 추출물의 경구 투여는 대조군과 떫은감 추출물에 비하여 피부 조직에서 AGEs를 더 효과적으로 억제하였다.

5. 포제 떫은감 추출물의 경구 투여는 대조군과 떫은감 추출물에 비하여 피부조직에서 MMP-1의 발현을 감소시켜 collagen 생성을 증가하는 경향을 보였다.

따라서 떫은감과 비교하여 포제 떫은감의 경구 투여는 혈액, 피부, 신장조직에서 AGEs의 축적을 저해하였고, 항산화 및 AGEs 억제 효과를 통하여 MMP-1의 발현량을 감소시켜 결과적으로 collagen 생성을 증가시켰다. 따라서 포제 떫은감은 AGEs 억제를 통한 피부 주름 개선 효과가 뛰어나 항산화 및 항주름 소재로서의 활용가능성이 높다고 사료된다.

감사의 글

이 연구결과는 2017년도 중소기업청에서 시행한 기업부설연구소 신규설치사업(과제번호 : C0268169)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Park SJ, Chung H. Outer blood-retinal barrier alteration induced by intraocular advanced glycation end product. J. Korean Ophthalmol. Soc. 2001 ; 42(2) : 151-5.
2. Sung GA, Kim MH, Park SN. Anti-inflammatory and Whitening Effects of Protaetia brevitarsi Seulensis Extracts by Oriental Conversion Methods. J. Nutr Health. 2016 ; 49(4) : 233-40.
3. Kwon HO, Lee MH, Kim YJ, Kim E, Kim OK. Beneficial effects of Acanthopanax seticosus extract in type Ⅱ diabetes animal model via down-regulation of advanced glycated hemoglobin and glycosylation end products. J. Korean Soc Food Sci Nutr. 2016 ; 45(7) : 929-37.
4. Kang S, Cho S, Chung JH, Hammerberg C, Fisher GJ, Voorhees JJ. Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor-κB and activator protein-1 in inflammatory acne lesions in vivo. Am. J. Pathol. 2005 ; 166 : 1691-9.
5. Edelstein D, Brownlee M. Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. Diabetes. 1992 ; 41 : 26-9.
6. Lee DR, Kim CY. Inhibition of advanced glycation end product formation by burdock root extract. J. Nutr Health 2016 ; 49(4) : 233-40.
7. Matsuo T, & Ito S. The chemical structure of kaki-tannin from immature fruit of the persimmon (Diospyros kaki L.). Agric. Biol. Chem. 1978 ; 42(9) : 1637-43.
8. Bian LL, You SY, Park JJ, Yang SJ, Chung HJ. Characteristics of Nutritional Components in Astringent Persimmons according to Growing Region and Cultivar. J. Korean Soc Food Sci Nutr. 2015 ; 44(3) : 379-85.
9. Seo JH, Jeong YJ, Kim KS. Physiological characteristics

of tannins isolated from astringent persimmon fruits. Kor. J. Food Sci. Technol. 2000 ; 32(1) : 212-7.
10. Kim KS, Kim SG, Chae SK, Kim BS Analysis on Patent Trends in Nonthermal Processing Technologies for Medicinal Herbs. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2013 ; 27(4) : 367-73.
11. Jeong GH, Roh SS, Choo BK, Seo YB. Studies on steaming processing method in the literatures 'Roegongpojaron', Pojadaebub', and 'Susajinam' Kor. J. Herbology. 2013 ; 28(1) : 73-82.
12. Lee AR, Kwon OJ, Choi JY, Roh SS. RohInhibitory Activity of Advanced Glycation Endproducts (AGEs) Formation and Antioxidant Activity of Processed Korean Medicines. Kor. J. Herbol. 2017 ; 32(3) : 63-9
13. Sato T, Iwaki M, Shimogaito N, Wu X, Yamagishi S, Takeuchi M. TAGE (toxic AGEs) theory in diabetic complications. Curr Mol Med 2006 ; 6 : 351-8.
14. Schneir M, Bowersox J, Ramamurthy N, Yavelow J, Murray J, Edin-Folz E, Golub L. Response of rat connective tissues to streptozotocin diabetes: Tissue specific effects on collagen metabolism. Biochim Biophys Acta. 1979 ; 583(1) : 95-102.
15. Liu B, Xu Z, Yu R. Experimental and clinical observation on wrinkle correction by medical cosmetic collagen injection. Zhongguo YiXue Ke Xue Yuan Xue Bao. 1994 ; 16 : 197-200.
16. Kang HE, Lee AR, Roh SS, Seo YB. Orostachydis Herba and Fermented Orostachydis Herba Enhances Anti-Inflammatory and Anti-oxidant Effect against Lipopolysaccharide-Induced Acute Liver Injury in Mice. Kor. J. Herbol. 2017 ; 32(2) : 65-75.
17. Lee KW, Hong CO, Hong ST, Koo YC, Yang SY, Lee JY, Lee YH, Ha YM. Protective Effect of Plantago asiatica L. Extract Against Ferric Nitrilotriacetate (Fe-NTA) Induced Renal Oxidative Stress in Wistar Rats. J. Fd Hyg. Safety 2011 ; 26(2) : 107-13.
18. Hyun JK, Kwon OJ, Lee JY, Roh SS, Seo YB. Preventive effect of fermented red ginseng on cisplatin-induced nephrotoxicity mouse. J. Appl Biol Chem. 2016 ; 59(2) : 113-24.
19. Kim SJ, Lee YK, Lee HJ, Kim JS. The Effects of LR3 and SP6 Acupuncture on Liver Damage of Streptozotocin-induced Diabetic Mice. The Acupuncture. 2016 ; 33(3) : 29-43
20. Jeon SH, Yi DH. Effects of Alliin on Cellular Protection, Up-regulation of Collagen and Down-regulation of MMP1 in Human Dermal Fibroblasts Kor. J. Aesthet. Cosmetol., 2014 ; 12(2) : 248-58.