

Skin Protection Effect of Grape Pruning Stem Extract on UVB-induced Connective Tissue Injury

Joung-Hee Kim and Keuk-Jun Kim*

Department of Biomedical Laboratory Science Daekyeung University, Gyeongsan, Gyeongbuk 38547, Korea

Received September 7, 2017 / Revised December 15, 2017 / Accepted December 18, 2017

This study aimed to analyze the contents of rutin, procyanidin B3, quercetin, and kaempferol, known to have antioxidant, anti-inflammatory, and anti-carcinogenic effects, among the polyphenol types contained in grape pruning stem extracts (GPSE). It utilized grape stems discarded after harvest to measure the effects of GPSE on skin moisture, inhibition of skin cell proliferation, and anti-inflammatory activity on the damaged skin of HR-1 mice induced with ultraviolet B (UVB), and to verify the applicability of GPSE as a material for functional food and functional cosmetics. The polyphenol was extracted from grape pruning stems with 80% EtOH, and then the extract was used while storing at -20°C, after filtering, concentrating, and freeze-drying it. The content of an active ingredient of GPSE was analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). From 53 kg of the grape pruning stem specimen, 2.34 kg of the EtOH fraction extracts were extracted to achieve a 4.42% yield ratio. Analysis of the active ingredients showed 0.28 mg/g of procyanidin B3, 12.81 mg/g of rutin, 0.51 mg/g of quercetin, and 8.24 mg/g of kaempferol. After UVB irradiation on the dermis, to confirm the degree of inhibition of collagen synthesis, we examined the protein expression of MMP-9 using immunohistochemical staining. The results of this study confirm the existence of active polyphenol types, such as rutin, kaempferol, quercetin, and procyanidin B3, in GPSE. Moreover, the study found that GPSE has anti-collagenase effects and it decreases the effects of UV damage on skin barrier function. GPSE is a functional ingredient with a potential for skin protection effects, and it has high utilization potential as an ingredient for functional cosmetics.

Key words : Connective tissue protective effect, grape pruning stem, polyphenol, skin barrier, UVB

서 론

캠벨얼리는 단위면적당 수확량이 많아 우리나라에서 재배 비율이 가장 높은 품종이다. 반면 Muscat Bailey A (MBA)는 캠벨얼리에 비해 우리나라에서의 재배 비율은 낮으나 과피가 단단하여 수송이 용이하고 당도가 높아 경북지역을 중심으로 재배 비율이 꾸준히 증가하고 있다[7]. 국내에서 육성된 포도 품종 중 현재 우리나라에서 많이 재배되고 있는 캠벨얼리, Muscat Bailey A (MBA) 품종의 부위별 주요 폴리페놀 화합물의 함량을 분석하여 다양한 포도 가공품의 개발 및 이용을 위한 자료도 보고되고 있다. 전체 포도 품종의 부위별 함량 비교에서는 전반적으로 송이줄기에서 가장 높은 함량을 나타내었고, 과육에서 가장 낮은 함량을 나타내었다. 따라서, 품종 또는 부위에 따라 함량의 차이가 큰 것으로 보고되었다[1, 17].

폴리페놀 화합물 함량이 재배환경과 재배조건의 차이 등 여러 환경요인에 의해 달라진다는 기존 연구결과도 있지만 동일한 재배환경 및 재배조건에서 생리활성물질의 성분별 차이는 품종간 상이한 유전적 배경에 의한 품종 고유의 특성 때문인 것으로 판단된다[1, 9]. 포도는 폴리페놀 성분이 풍부하여 여러 가지 생체조절 기능을 나타낸다고 알려져 있다. 폴리페놀 성분 중 플라보노이드 화합물(flavonoid compound)은 선택식물과 모든 관속식물에 널리 분포하는 2차 대사산물로 잎, 줄기, 뿌리, 과실, 종자, 화분 등 식물체 전 부위에 함유되어있다[2, 10, 11]. 포도 부위별 폴리페놀류 함량이 품종과 부위에 따라 차이가 있으며 과피에서는 캠벨얼리(0.26 mg/g)와 흑보석(0.61 mg/g) 품종에서만 검출되었고, 포도전정가지(Grape Pruning Stem)에서는 MBA품종(1.76 mg/g)에서 가장 catechin 함량이 높은 것으로 보고된 바 있다[1]. 포도의 3가지 주요 활성 성분으로는 anthocyanins (0.4-0.6%), procyanidines (30-60%), trans-resveratrol (5-15%)이 있으며, 최근 항암, 항산화와 관련되어 trans-resveratrol에 관한 연구가 활발히 진행 중이다[13, 15, 18, 24]. 피부건강을 위협하는 요인 중의 하나인 UV는 자연환경에서 쉽게 피부에 직접적으로 노출될 수 있어 이에 대한 관심이 급증하고 있다[8]. 그리고 최근에는 환경오염으로 인한 오존층의 파괴로 지표에 도달하는 자외선의 양이

*Corresponding author

Tel : +82-53-850-1266, Fax : +82-53-850-1496

E-mail : biomed@tk.ac.kr

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.

많아져 피부질환에 자외선이 미치는 영향에 대한 보고가 증가되고 있는 추세이다[3]. 태양으로부터 방출되는 자외선은 중요한 환경적인 요인으로 많은 세포들의 증식, 생존 그리고 기능에 영향을 끼친다. 자외선은 파장에 따라 3가지 형태로 분류되는데 파장이 긴 UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) 그리고 파장이 짧은 UVC (200-280 nm) 로 분류된다[5]. 특히 UVB는 홍반의 발생, 상피세포의 증식, 과색소 침착, DNA 손상, 각종 효소와 단백질의 활성 혹은 비활성, 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)의 형성 등이 있다[22]. 또한 광 독성, 광 알레르기를 일으키는 급성 유해자극반응과 광노화(photoaging)를 촉진하거나 피부암을 유발하는 만성반응으로 나타난다[19]. 자외선에 의한 깊은 주름, 잔주름, 피부 거침, 피부 건조와 같은 현상을 발생시켜 피부노화를 유발 시킨다. 피부노화의 대표적 징후인 주름은 교원섬유의 파괴로 인해 나타나며, 교원섬유의 파괴는 부분적으로 각질형성세포(keratinocyte)와 진피 섬유아세포(dermal fibroblast)에 의해 분비된 기질금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)에 의한다. MMP는 진피의 교원섬유(collagen fiber)와 탄력섬유(elastic fiber)를 분해시키는 작용을 하는 collagenase로서 자외선, 산화 스트레스와 cytokine과 같은 다양한 자극에 의해 활성이 증가한다[21]. *In vitro* 실험에서 UVB를 조사하면 HaCaT cell은 ROS를 생성하여 COX-2 발현을 촉진한다고 보고되고 있다. 본 연구는 포도전정가지추출물(Grape Pruning Stem Extract, GPSE)로부터 폴리페놀류와 같은 유효성분을 추출, 수율 및 성분을 분석하여 자외선과 피부노화로 발생하는 섬유모세포의 손상으로 인한 교원섬유와 탄력섬유의 분해 억제 효과를 증명하고자 한다.

재료 및 방법

추출

본 연구에 사용된 포도전정가지는 경상북도 경산시 오봉지길 일대에서 재배된 캠벨얼리의 전정가지를 사용하였다. 포도전정가지 1 kg에 80% EtOH을 첨가하여 60°C에서 90분 동안 추출한 후 추출액을 No. 2 filter paper로 여과하였다. 여과액을 진공회전농축기를 사용하여 농축하고, 동결 건조한 후 실험에 사용하였다.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용한 포도전정가지 추출물의 성분 분석

분석에 사용된 표준물질인 procyanidin B3, rutin, quercetin, kaempferol은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 각 표준물질의 순도는 99.0% 이상이었다. HPLC 분석을 위한 물, acetonitrile은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며, formic acid는 특급시약으로 Junsei (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 함량분석

을 위한 HPLC는 Shimadzu 사의 LC-20A 시리즈(Kyoto, Japan)를 사용하였으며, 이 시스템은 pump (LC-20AT), on-line degasser (DGU-20A3), column oven (CTO-20A), autosampler (SIL-20AC) 및 PDA detector (SPDM20A)로 구성되어 있다. 분석 결과는 Shimadzu 사의 software인 LC solution software (Version 1.24)를 이용하여 처리하였다. 성분의 정량 분석은 크로마토그래피 방법을 이용하여 Shimadzu 사의 LC-20A 시리즈 HPLC (Shimadzu, Corp., Kyoto, Japan)로 분석하였다. 분석조건으로 column은 Waters Sunfire C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)을 사용하였으며 column 온도는 40°C, 샘플 주입량은 20 μl, 검출기는 UV detector를 이용하여 280 nm에서 측정하였다. 그리고 이동상은 0.1%(v/v) formic acid가 함유된 물 (A)과 0.1%(v/v) formic acid가 함유된 acetonitrile (B)을 사용하여 다음과 같이 기울기 용매조건(2% B (0 min), 35% B (25 min), 100% B (40 min), 5% B (45.10 min), 5% B (50 min))으로 흘러주었으며 유속은 1.0 ml/min 로 진행하였다.

실험동물

실험동물은 7주령의 암컷 HR/ICR Albino hairless (HOSINO Laboratory Animal, Japan SLC, Inc.)을 중앙실험동물로부터 구입하였으며, 1주간 사육실 환경에 적응시킨 후 체중 약 32 g의 7주령 마우스를 실험에 사용하였다. 총 40마리의 마우스를 8개의 실험 군에 각 실험군당 5마리씩 무작위로 배치하였으며, polysulfone 케이지에서 사육하였다. 사료와 물은 자유로이 공급하였다. 사육실은 온도 22±1°C, 상대습도 50±5%, 조명주기 12시간씩, 환기방식 및 회수 10회/hr, 조도 150~300 lux를 유지하였다. 본 실험을 위하여 영남대학교 의과대학 동물실험윤리위원회에서 승인을 받은 후 실험을 진행하였다(YUMC-AEC2014-017).

피부 손상회복을 위한 *in vivo*용 시료 제조 및 자외선 조사

피부 손상회복 정도를 측정하기 위해 *in vivo* 실험에 사용된 GPSE와의 혼합 사용하는 serum base는 한국 콜마에서 구입하였다. GPSE를 serum base에 125, 250, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg의 농도로 용해시켜 시험물질을 제조하였다. 시험물질은 0.2 ml를 취하여 주 7회 일정한 양을 등쪽 면에 12주간 도포하였다. 실험 군은 정상군(normal control group, NC): 아무런 처치를 하지 않은 군, UVB 대조군(UVB group, UVB): 자외선 조사+serum base 도포군, 양성대조군(UVB+SC): 자외선조사+suncream 도포군, GPSE 도포군(UVB+GPSE): 자외선조사+GPSE 125, 250, 500, 1,000, 2,000 mg/kg 도포군의 총 8개 실험군으로 하였다. UVB 조사는 광원으로 UVB lamp GL20SE (Sankyo denki, Japan)를 이용하여 제작한 UVB 조사기를 사용하였으며 광량은 Solarmeter (Solartech, USA)로 측정하였다. 자외선 조사용 cage를 이용하여 실험동물의 등부위에 균등하게 초기 1주부터 3주까지는 60 mJ/cm², 4주부터 6주까지

는 90 mJ/cm², 7주부터 12주까지는 120 mJ/cm²의 광량으로 격일 간격으로 1주일에 3회, 12주 동안 조사하였다.

염색을 위한 시료의 전처리

GPSE를 도포 후 UVB에 조사된 albino mice를 도살, 피부를 10% 포르말린에 24시간 고정하였다. 조직을 절취하여 자동칩 투기에서 파라핀을 칩투 시킨 후 포매, 4 μm 두께로 절편제작 후 60°C에서 건조, 접착한 후 탈파라핀, 합수과정을 거쳐 시료를 준비 하였다.

Masson's trichrome stain

교원섬유의 정량적인 평가를 위해 전처리한 시료를 weigert iron hematoxylin 용액에 10분 염색 후 수세, biebrich scarlet red 용액에 15분간 염색, phosphomolybdic acid/phosphotungstic acid 용액에 15분간 감별 후, aniline blue 용액에 15분간 염색 후 1% acetic acid 용액에 3분간 감별 후 탈수, 투명, 봉입하였다. DP71 microscope digital camera (Olympus, Japan)를 사용, 이미지를 획득한 후 Leopard (zotos, korea) 프로그램을 사용, collagen fiber를 측정하였다.

Verhoeff's elastic fiber stain

탄력섬유의 정량적인 평가를 위해 hematoxylin, ferric chloride, iodine 용액이 포함된 verhoeff 염색용액에 30분 염색 후 수세, 2% ferric chloride 수용액에 감별 후 5% sodium thiosulfate 용액에 1분간 정착시킨 후 수세, van Gieson 용액으로 3분간 대조염색 후 탈수, 투명, 봉입하였다. DP71 microscope digital camera (Olympus, Japan) 를 사용, 이미지를 획득한 후 Leopard (zotos, korea) 프로그램을 사용, elastic fiber를 측정하였다.

면역조직화학적 염색

UVB에 대한 피부장벽의 염증 회복의 정도를 정량적인 평

가를 위해 anti-rabbit MMP-9 (dilution ratio 1:100, abcam, USA) 항체를 사용, 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 조직 절편을 탈파라핀 후 합수과정을 거쳐 내인성과산화효소를 제거하기 위하여 3% H₂O₂/methanol을 10분간 처리하였고, 수세 후 포르말린에 의해 감추어진 항원결합부위인 epitope site를 부활시키기 위해 citric acid buffer pH 6.0 용액에 슬라이드를 넣고 120°C 10분간 autoclave 한 후 실온에 20분간 식히고 수세 후 1차 항체 MMP-9 항체를 60분간 반응시킨 후 TBS buffer에 5분간 수세, 2차 항체인 DAKO EnVision+HRP detection system kit 를 사용 30분간 반응시킨 후 TBS buffer에 5분간 3회 수세 후 DAB (3,3'-Diaminobenzidine) 로 발색시킨 후 mayer hematoxylin으로 대조염색을 하여 수세, 탈수, 투명, 봉입하였다. DP71 microscope digital camera (Olympus, Japan)를 사용, 이미지를 획득한 후 Leopard (zotos, korea) 프로그램을 사용 MMP-9 에 염색된 정도를 정량적으로 측정하였다.

통계학적 분석

본 연구에서 결과는 평균표준편차(±)로 나타내었으며, 유의성 검사는 SPSS (v20.0) 통계프로그램으로 one-way ANOVA test를 실시하였고, 대조군 UVB control과 GPSE 도포군 간의 유의성을 Tukey's multiple comparison test로 검증하였다. p<0.05 이상일 때만 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

포도전정가지 추출물의 유효성분 수율분석

포도전정가지 53 kg을 이용하여 80% EtOH로 추출한 결과 최종 2.342 kg의 추출물을 얻었고, 수율은 4.42%였다.

포도전정가지 추출물의 성분 분석결과

포도전정가지의 주요성분에 대한 함량분석을 위한 검량선

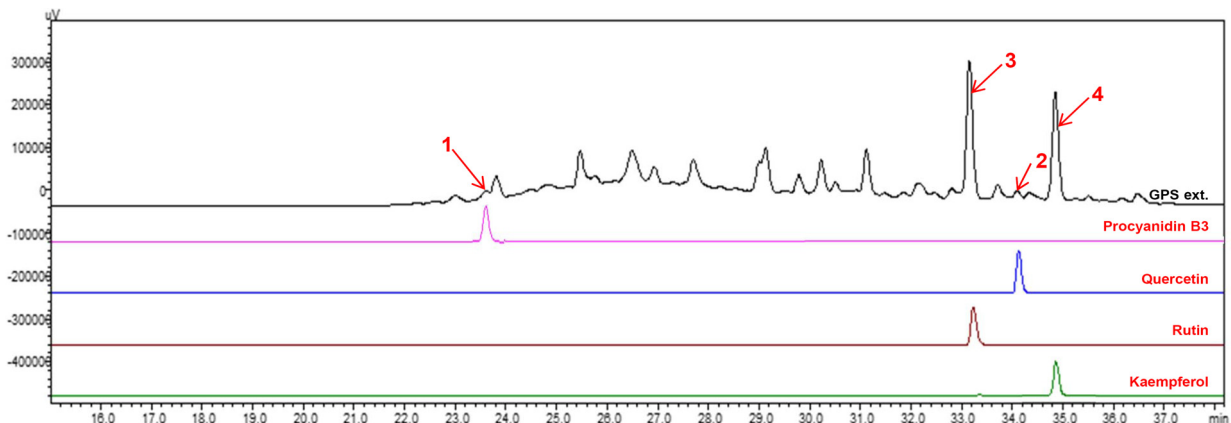


Fig. 1. HPLC chromatograms of EBT and marker compounds. The pattern of EBT (1. Procyanidin B3; 2. Rutin; 3. Quercetin; 4. Kaempferol).

Table 1. Results of chemical composition analysis of grape pruning stem extract

Components	Area (%)			
	Procyanidin B3	Rutin	Quercetin	Kaempferol
Grape pruning stem extract	0.28	12.81	0.51	8.24

은 상관계수(r^2)를 구하여 직선성을 판단하였으며, 4종 성분에 대한 검량선 작성 결과 상관 계수(r^2) 값이 0.9998 이상으로 1.0에 가까운 양호한 직선성을 나타내었다. 검액에서의 피크 확인은 표준물질의 피크머무를 시간과 UV 흡수 파장을 비교하여 확인하였다. procyanidin B3, rutin, quercetin 및 kaempferol 4종의 성분은 22.48분, 33.57분, 34.21분 및 34.73분에 각각 검출되었다(Fig. 1). 설정된 HPLC PDA 분석법으로 포도전정가지의 4종 성분에 대한 함량 분석을 실시한 결과, procyanidin B3, 0.28 mg/g, rutin 12.81 mg/g, quercetin 0.51 mg/g 및 kaempferol 8.24 mg/g로 나타났다(Table 1).

교원섬유와 탄력섬유 분해 억제 효과

UVB 를 조사한 대조군과 비교하였을 때 GPSE와 serum base의 혼합물의 모든 농도에서 평균 약 90% 감소하는 결과를 보여, GPSE는 교원섬유와 탄력섬유를 분해하는 효소를 억제

하는 결과로 유의성이 있는 것으로 나타났다($p<0.05$)(Fig. 2).

피부손상보호를 통한 콜라겐파괴 억제 효과

UVB를 조사한 대조군과 비교하였을 때 GPSE와 serum base의 혼합물의 모든 농도에서 평균 24%의 콜라겐 파괴 억제율을 보였고, GPSE와 serum base의 혼합물 농도 2,000 mg/kg에서 43%로 가장 우수한 콜라겐 파괴 억제 효과와 유의성이 나타났다($p<0.05$)(Fig. 3).

피부손상보호를 통한 탄력섬유 파괴 억제 효과

UVB 를 조사한 대조군과 비교하였을 때 GPSE와 serum base의 혼합물의 모든 농도에서 평균 12%의 탄력섬유 파괴 억제율을 보였고, GPSE와 serum base의 혼합물 농도 1,000 mg/kg에서 35%로 가장 우수한 탄력섬유 파괴 억제 효과와 유의성이 나타났다($p<0.05$)(Fig. 4).

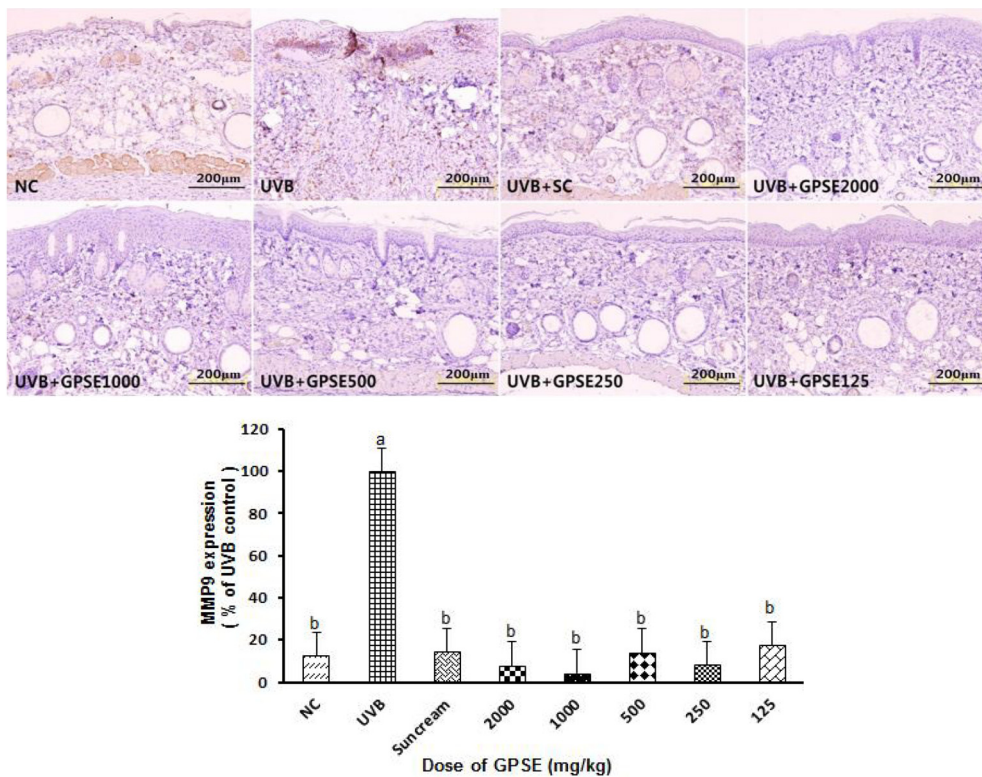


Fig. 2. GPSE diminishes MMP-9 expression in UVB-induced HR-1 hairless mice. Skin tissue sections were stained with MMP-9 immunohistochemical stain and the images were obtained using an DP71 microscope digital camera (Olympus, Japan). Dermis was measured with a Leopard (zotos, korea) image analyzer and results are expressed as mean \pm SD (n=5). Different letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey’s multiple comparison test.

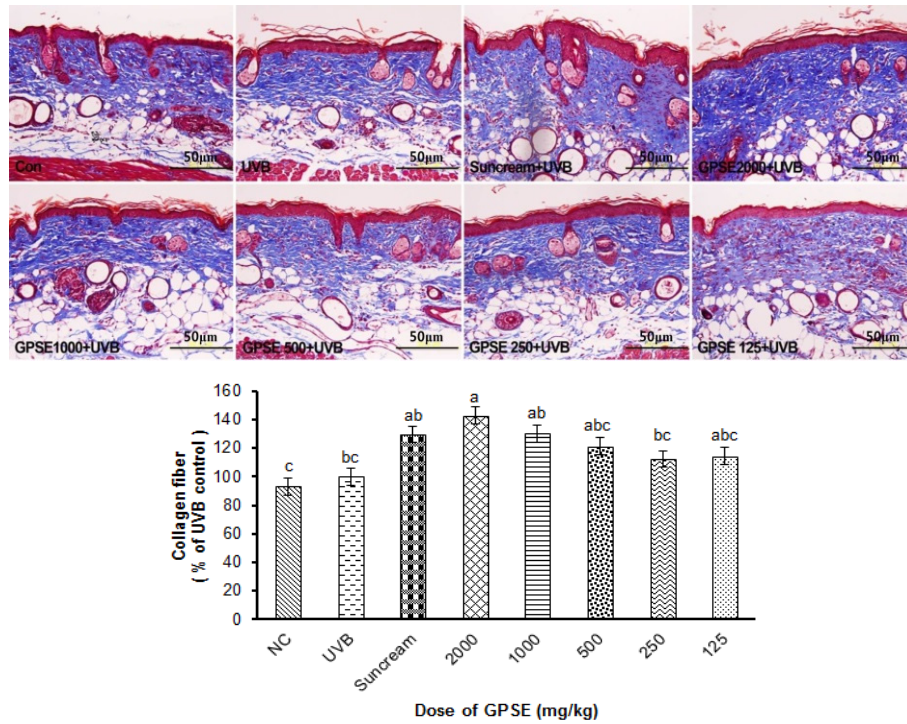


Fig. 3. GPSE increase collagen fiber in UVB-induced HR-1 hairless mice. Skin tissue sections were stained with Masson's trichrome stain and the images were obtained using an DP71 microscope digital camera (Olympus, Japan). Dermis was measured with a Leopard (zootos, korea) image analyzer and results are expressed as mean \pm SD (n=5). Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's multiple comparison test.

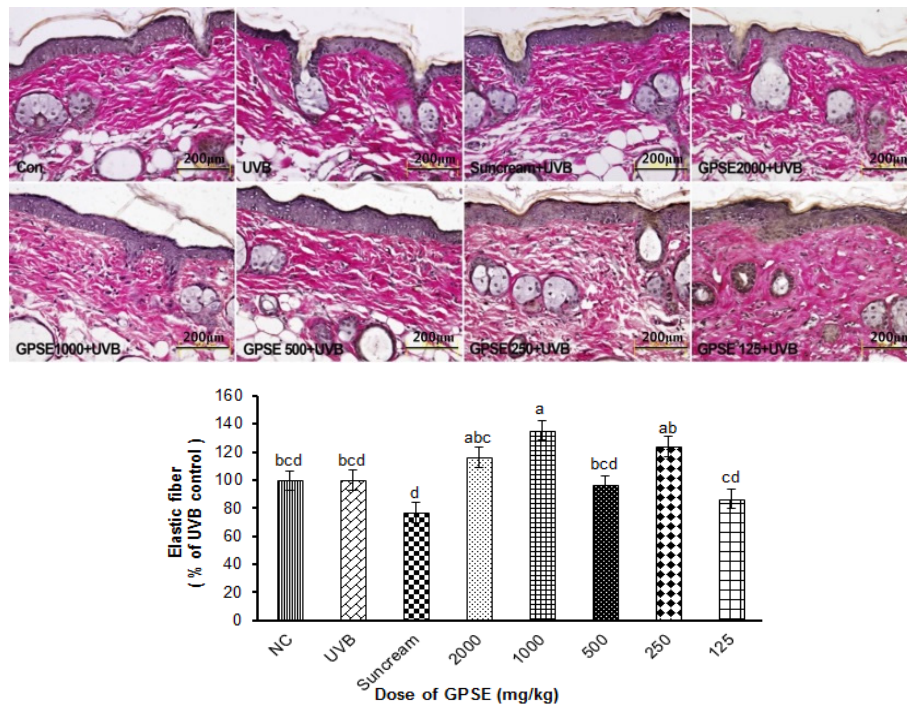


Fig. 4. GPSE increase elastic fiber in UVB-induced HR-1 hairless mice. Skin tissue sections were stained with Verhoeff elastic fibers Stain and the images were obtained using an DP71 microscope digital camera (Olympus, Japan). Dermis was measured with a Leopard (zootos, korea) image analyzer and results are expressed as mean \pm SD (n=5). Different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's multiple comparison test.

고찰

본 연구는 경상지역 포도농가에서 포도 수확 후 버려지는 포도전정가지에서 폴리페놀류와 같은 항산화 물질을 추출하여 유효성분을 분석하고 UVB로 유도된 피부손상에 따른 교원섬유와 탄력섬유의 분해 억제효과를 증명하고자 *in vitro* 실험 후 *in vivo* 실험 결과를 관찰하였다. 선행연구에서 포도의 3가지 주요 활성 성분으로는 anthocyanins (0.4-0.6%), procyanidines (30-60%), trans-resveratrol (5-15%)이 있으며, 최근 항암, 항산화와 관련되어 trans-resveratrol에 관한 연구가 활발히 진행 중이다[13, 15, 18, 24]. Anthocyanin은 천연 항산화제로서 생명체의 노화와 질병을 유발하는 산화물질(free-radical: 자외선, 중금속, 활성산소, 아세테이트알데히드 등) 혹은 활성산소를 중화하거나 제거시키는 항산화 작용으로 피부 노화방지는 물론 주름개선에 효과가 있다고 보고된 바 있다[6]. 본 연구는 포도전정가지의 유효성분 분석 결과, procyanidin B3 (0.28 mg/g), rutin (12.81 mg/g), quercetin (0.51 mg/g) 및 kaempferol (8.24 mg/g)로 나타나 폴리페놀류 중 rutin (12.81 mg/g)의 함량이 가장 높은 것으로 나타나(Table 1), 포도나무 품종과 부위에 따라 차이가 있음을 확인하였다. 광노화에 관하여 maceliganan이 COX-2와 MMP-9의 발현을 억제한다는 선행연구도 보고되고 있다[16, 23]. UVB에 조사되면 수포[12], 세포골격 분자 변화[14], 세포자살(apoptosis)의 증가[4, 20]로 각질형성세포의 생존력을 감소시키고, MMP는 진피의 교원섬유(collagen fiber)와 탄력섬유(elastic fiber)를 분해시키는 작용을 하는 collagenase로서 자외선, 산화 스트레스와 cytokine과 같은 다양한 자극에 의해 활성이 증가한다고 보고되고 있다[21]. 기존의 *in vitro* 상에서의 MMP-9 단백질발현에 대한 보고는 있었으나, *in vivo*에서의 연구는 미비하여 본 연구는 *in vivo* 실험을 통해 검증, 확인하고자 하였고, 실험 결과 GPSE와 serum base의 혼합물 도포한 그룹에서 자외선에 의한 콜라겐과 탄력섬유를 분해하는 MMP-9 단백질발현을 억제하는 효과(대조군 대비 평균 약 90% 감소)도 얻을 수 있었다. 콜라겐합성, 탄력섬유합성은 GPSE 농도의존적으로 증가하지는 않았지만, 125 mg/kg의 농도에서도 UVB 대조군과 suncream에 비하여 전반적으로 증가하였다. MMP-9의 단백질발현 또한 농도의존적으로 감소하지 않았지만 전반적인 감소 결과를 보였다. UVB에 유도된 피부손상 모델에 GPSE를 이용하여 *in vivo* 실험한 선행연구결과가 없어 콜라겐합성 증가, 탄력섬유합성 증가, MMP-9 발현감소에 관한 농도의존적 큰 차이가 없는 이유는 추후 해결하여야 할 것으로 사료된다. 이상의 결과는 GPSE가 진피층의 세포 외 기질(ECM)에 UVB 조사에 의해 파괴되는 콜라겐, 탄력섬유의 파괴를 억제하는 작용을 한다는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로 포도전정가지로부터 rutin, kaempferol, quercetin, procyanidin B3 등의 페놀성 화합물이 화장품 기초 원료인 serum base에 함유토록 제조된 GPSE는

콜라겐과피 억제, 탄력섬유과피 억제 효과 및 피부손상 기능 개선 효과의 결과를 얻을 수 있었다. 본 연구의 의의는 지역포도농가에서 수확 후 버려지는 포도전정가지에서 폴리페놀류와 같은 유효성분을 확보하여 화장품 원료로서의 활용 가치가 높을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2013년도 기술혁신개발사업(No. S2085017)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

- Chang, E. H., Jeong, S. M., Park, K. S. and Lim, B. S. 2013. Contents of phenolic compounds and trans-resveratrol in different parts of Korean new grape cultivars. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **6**, 708-713.
- Filip, V., Plockova, M., Smidrkal, J., Spickova, Z., Melzoch, K. and Schmidt, S. 2003. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chem.* **83**, 585-593.
- Freedberg, I. M., Eisen, A. Z., Wolff, K., Austen, K. F., Katz, S. I. and Fitzpatrick, T. M. 1999. *Dermatology in General Medicine*, 5th ed. McGraw-Hill, New York.
- Godar, D. E. 1996. Preprogrammed and programmed cell death mechanisms of apoptosis: UV-induced immediate and delayed apoptosis. *Photochem. Photobiol.* **63**, 825-830.
- Kadekaro, A. L., Kavanagh, R. J., Wakamatsu, K., Ito, S., Pipitone, M. A. and Abdel-Malek, Z. A. 2003. The melanocyte vs. the sun: Who will win the final round? *Pigment Cell Res.* **16**, 434-447.
- Kim, H., Deshane, J., Barnes, S. and Meleth, S. 2006. Proteomics analysis of the actions of grape seed extract in rat brain: technological and biological implications for the study of the actions of psychoactive compounds. *Life Sci.* **78**, 2060-2065.
- Korea Agro-Fisheries & Food Trade Corporation. 2011. Grape in agricultural products consumption actual condition. Seoul Korea. pp. 655-666.
- Kripke, M. L. 1991. Immunological effects of ultraviolet radiation. *J. Dermatol.* **18**, 429-433.
- Lacopini, P., Baldi, M. and Storchi, P. I. 2008. Sebastiani, Catechin, Epicatechin, Quercetin, Rutin and resveratrol in red grape: content *in vitro* antioxidant activity and interactions. *J. Food Compos. Anal.* **21**, 589-598.
- Lee, E., J. Min, H. Y., Park, H. J., Chung, H. J., Kim, S. H., Han, Y. N. and Lee, S. K. 2004. G2/M cell cycle arrest and induction of apoptosis by a stilbenoid, 3, 4, 5-trimethoxy-4-bromo-cis'-stilbene, in human lung cancer cells. *Life Sci.* **75**, 2829-2839.
- Lee, H. J., Seo, J. W., Lee, B. H., Chung, K. H. and Chi, D. Y. 2004. Syntheses and radical scavenging activities of resveratrol derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 463-466.
- Malorni, W., Donelli, G., Straface, E., Santini, M. T., Paradisi, S. and Giacomoni, P. 1994. Both UVA and UVB induce cy-

- toskeleton-dependent surface blebbing in epidermoid cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* **26**, 265-270.
13. Mertens-Talcott, S. U. and Percival, S. S. 2005. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Lett.* **218**, 141-151.
 14. Moll, I., Bohnert, E., Treib, U. and Jung, E. G. 1994. Effects of ultraviolet B radiation on cytoskeletal and adhesion molecules in human epidermis. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **10**, 26-32.
 15. Murias, M., Jager, W., Handler, N., Erker, T., Horvath, Z., Szekeres, T., Nohl, H. and Gille, L. 2005. Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogue: structure-activity relationship. *Biochem. Pharmacol.* **69**, 903-912.
 16. Rittie, L. L. and Fisher, G. J. 2002. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev.* **1**, 705-720.
 17. Ruggieri, L., Cadena, E. and Martinez-Blanco, J. 2009. Recovery of organic wastes in the spanish wine industry Technical, economic and environmental analyses of the composting process. *J. Clean. Prod.* **17**, 830-838.
 18. Sgambato, A., Ardito, R., Faraglia, B., Boninsegna, A., Wolf, F. I. and Cittadini, A. 2001. Resveratrol a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutat Res.* **496**, 171-180.
 19. Shin, D. C., Lee, J. T., Jeong, Y., Kang, N. K. and Yang, J. Y. 1996. Application of the health risk models estimating skin cancer caused by UVB radiation. *J. Environ. Toxicol.* **11**, 1-10.
 20. Shindo, K. Y. and Hashimoto, T. 1998. Ultraviolet B-induced cell death in four cutaneous cell lines exhibiting different enzymatic antioxidant defences: involvement of apoptosis. *J. Dermatol. Sci.* **17**, 140-150.
 21. Svobodova, A., Psotova, J. and Walterova, D. 2003. Natural phenolics in the prevention of uv-induced skin damage a review. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.* **147**, 137-145.
 22. Takahashi, H., Komatsu, N., Ibe, M., Ishida-Yamamoto, A., Hashimoto, Y. and Lizuka, H. 2007. Cystatin A suppresses ultraviolet B-induced apoptosis of keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* **46**, 179-187.
 23. Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M. and Margioris, A. N. 2006. Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 54-61.
 24. Zunino, S. J. and Storms, D. H. 2006. Resveratrol-induced apoptosis is enhanced in acute lymphoblastic leukemia cells by modulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Cancer Lett.* **240**, 123-134.

초록 : 포도전정가지 추출물이 UVB로 유도된 결합 조직 손상에 미치는 피부 보호 효과

김정희 · 김극준*

(대경대학교 임상병리과)

본 연구는 포도수확 후 버려지는 가지를 이용한 포도전정가지 추출물(Grape Pruning Stem Extracts, GPSE)에 함유된 polyphenol류 중 항산화, 항염증, 항암 등의 효과가 있다고 알려진 rutin, procyanidin B3, quercetin, kaempferol의 함량을 분석하고, UVB로 유도된 HR-1 mice의 손상된 피부에 대한 교원섬유, 탄력섬유 파괴억제 효과를 측정하여 기능성 화장품 소재로서의 응용 가능성을 확인하고자 하였다. 포도전정가지에서 polyphenol 성분을 80% EtOH로 추출하고 여과하여 농축한 후, 동결건조하여 -20℃에 보관하면서 사용하였다. GPSE의 유효성분 함량은 HPLC를 사용하여 분석하였다. 피부손상을 유도하기 위해 UVB를 HR-1 hairless mice에 조사하였고, 손상된 피부에 교원섬유 파괴억제 효과를 보기 위해 Masson's trichrome stain, 탄력섬유 파괴 억제 효과를 보기 위해 Verhoeff's elastic fiber stain, MMP-9 단백 발현을 보기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 본 연구에 사용된 포도전정가지 시료 53 kg에서 EtOH 분획 추출물 2.34 kg을 추출하여 4.42%의 수율 결과를 얻었다. 유효성분 분석 결과, procyanidin B3, 0.28 mg/g, rutin 12.81 mg/g, quercetin 0.51 mg/g 및 kaempferol 8.24 mg/g로 나타났다. GPSE와 serum base를 혼합 도포한 그룹에서 UVB에 의한 교원섬유와 탄력섬유를 분해하는 MMP-9 단백질 발현 결과, 대조군 대비 평균 약 90% 감소 억제하는 효과를 볼 수 있었다. 교원섬유 파괴억제 효과는 모든 농도에서 평균 24%의 억제율과, GPSE와 serum base의 혼합물 농도 2,000 mg/kg 에서 43%로 가장 우수한 교원섬유 파괴억제 효과가 나타났으며, 탄력섬유 파괴 억제 효과는 모든 농도에서 평균 12%의 억제율과 GPSE와 serum base의 혼합물 농도 1,000 mg/kg에서 35%로 가장 우수한 탄력섬유 파괴 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 이 결과는 GPSE가 진피층의 세포 외 기질에 UVB 조사에 의해 파괴되는 교원섬유, 탄력섬유의 파괴를 억제하는 작용을 한다는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로 포도전정가지로부터 rutin, kaempferol, quercetin, procyanidin B3 등의 폴리페놀성 화합물이 화장품 기초 원료인 serum base에 함유토록 제조된 GPSE 는 교원섬유 파괴 억제, 탄력섬유 파괴 억제 효과 및 피부손상 기능개선 효과의 결과를 얻을 수 있었다. 본 연구의 의의는 지역포도농가에서 수확 후 버려지는 포도전정가지에서 폴리페놀류와 같은 유효성분을 확보하여 화장품 원료로서의 활용 가치가 높을 것으로 기대된다.