

http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.3.197

JCCT 2018-8-25

초임계 열처리된 무 성분을 이용한 상피세포성장인자(EGF) 유사소재 개발 및 광노화(주름개선) 효과

Development of Anti-Aging Products (Anti-Wrinkle) like Epidermal Growth Factor(EGF) Materials using Supercritical Heat-Treated Extract Radish

김현경*

Hyun Kyoung Kim*

요약 무의 껍질과 무청은 식용으로 사용하기도 하지만, 질기고 거친 식감으로 인하여 제거 후 부산물로서 폐기되거나 가축의 사료로 이용되는 실정이다. 본 연구는 초임계 열처리 가공 무추출물이 UVB로 유도된 Hos:HRM-2 주름생쥐동물모델에서 항-광노화 주름개선 효능을 검증하고자 하였다. 초임계 열처리된 무 추출물을 7주령의 HRM-2 생쥐에 UVB 램프로 등피부에 조사하여 피부 노화를 유발하여 피부두께, 탄력, 그리고 주름생성 변화에 대하여 알아보고자 하였다. 초임계 열처리된 무추출물의 UVB 조사에 의한 HRM생쥐의 주름 측정 결과는 정상군에 비해 음성대조군의 주름의 깊이가 증가되는 것을 관측할 수 있었다. 반면 무 추출물의 처리군에서는 음성대조군에 비해 주름의 깊이가 감소되었다. 초임계 열처리된 무추출물의 UVB 조사에 의한 주름관련 유전자 및 단백질의 발현에 미치는 영향에서는 음성대조군은 정상군에 비해 MMP-2 및 MMP-9 유전자의 발현이 현저하게 증가하였으나, 무 추출물의 처리에 의해 상기 유전자의 발현이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 유전자의 발현 정도는 무 추출물의 처리량에 의존적으로 감소하였다. 실험결과를 종합적으로 해석해 볼 때, 초임계 열처리된 무 추출물은 피부에 도포 시 뿐만 아니라 경구로 섭취시에도 피부 주름 개선에 효과가 있어, 건강기능식품 조성물로도 유용하게 사용될 수 있다. 특히 무는 오랫동안 복용 시에도 전혀 부작용을 나타내지 않는 안전한 식품으로 장기간 꾸준히 복용하는 것에 의해 피부 주름 및 탄력 개선 효과를 얻을 수 있다는 결론을 얻을 수 있었다.

주요어 : 무, 상피세포성장인자, 피부주름개선, 광노화

Abstract The radish skin and radish greens (*mucheong*) are an edible part of the radish. But they are removed before eating the radish and used as a byproduct or an animal feed material because of their tough and rough texture. This study was conducted to investigate the effect of supercritical heat-treated radish-extract on UV-induced Hos: HRM-2 wrinkled mouse animal model on anti-aging wrinkles. Supercritical heat-treated radish-extract was applied on the back of seven-weeks old HRM-2 mice. The effect of HRE on skin thickness, elasticity and wrinkle formation of the mice was observed by using UVB lamp to induce melanogenesis and wrinkle formation. As the result, increased depth of wrinkles was observed in the negative control group in comparison to the normal group. In contrast, decreased depth of wrinkles was observed in the radish-extract-free group compared to the negative control group. In the study of the effect of radish-extract on wrinkle-formation related gene expression and protein what protein expression, MMP-2 and MMP-2 gene expression significantly increased in the negative control group compared to the normal group. The gene expression reduced independence

*정회원, 서원대학교 식품공학과
접수일: 2018년 5월 8일, 수정완료일: 2018년 6월 15일
게재확정일: 2018년 7월 21일

Received: May 8, 2018 / Revised: June 15, 2018

Accepted: July 21, 2018

*Corresponding Author: kimhk4@seowon.ac.kr

Dept. of Food Science and Engineering, Seowon University, Korea

to the mass of radish-extract treated. Similar to quantitative results of mRNA expression, the expression of MMP-2 protein increased as a result of UVB-irradiation. The MMP-2 expression was inhibited in dependence to the mass of radish-extract treated. In conclusion, the supercritical heat-treated radish-extract has an effect on improving skin wrinkles not only when it is applied to the skin but also when orally ingested. Thus, it can be effectively used as a composition to health functional products. Thereafter, we can also conclude that radish, a food that does not show any side-effects even upon long-term intake, can reduce wrinkle formation as well as improve skin elasticity when taken regularly for a long period.

Key words : Korean radish, Epidermal growth factor, Anti-wrinkle effect, Anti-aging effect, UVB

1. 서론

주름생성의 주요 원인은 자외선, 공기오염, 담배연기, 스트레스 등을 들 수 있다. 특히, 자외선은 피부에 다양한 형태로 영향을 주어 깊은 주름, 잔주름, 피부거침, 피부 건조와 같은 현상을 발생시켜 피부 노화를 유발 시킨다. 피부의 노화는 시간의 흐름에 따른 생리적 노화(chronological aging) 과정과 외부 환경에 의한 외인성 노화(extrinsic aging)로 나뉘어진다. 피부노화에 영향을 미치는 외부인자들은 바람, 온도, 습도, 담배연기, 공해, 자외선 등이 있으며, 특히 가장 주요원인인 자외선에 의한 피부노화를 일컬어 광노화라고 한다. 자외선은 유해한 활성화 산소를 많이 만들어 내고, 피부 세포에서 유전자 돌연변이를 유발할 뿐만 아니라, 신호 전달체계나, 세포주기, 또는 암 유발 등에 관련된 유전자들의 발현을 변화 시킨다[1-5]. 노화는 피부의 대표적 증상은 잔주름 및 주름의 발생이다. 이는 피부진피조직의 교원질 중 주 단백질인 콜라겐의 현저한 감소에 의해서라고 할 수 있다[6-8]. 콜라겐은 진피의 90% 이상을 차지하고 있으면서 피부의 장력과 강도를 부여하기 때문에 외부로부터의 자극에 대해 피부를 보호하고 유지시킨다. 때문에 콜라겐의 감소는 피부노화와 매우 깊은 관계를 가지고 있다[9].

최근 환경 오염으로 인한 오존층의 파괴로 지상에 도달하는 자외선 양이 증가되고, 자외선의 영역 또한 변화되어 광노화가 점차 증가하고 있으며, 그 위험성은 앞으로 더욱 증가할 것으로 예측된다. 자외선에 의한 피해를 예방하기 위하여 자외선 차단제를 사용하고 있으나, 최근에는 자외선 차단제 자체가 돌연변이를 유발하여 피부암 발생 가능성을 가지고 있다는 보고가 있다. 또한

햇볕에 급격하게 노출된 경우에는 피부 진정을 위한 자극 완화제와 항산화제를 적정량 사용하고 있으나, 이러한 방법은 자외선으로부터 손상된 피부를 진정시키는 작용이나 항염 작용 등의 효과는 미흡하다. 이러한 자외선에 의한 피부 손상은 궁극적으로 피부 노화와 연관이 있으므로, 이들을 방어할 수 있는 방법은 화장품 업계의 관심사항 중 하나이다. 이에 피부 주름을 개선하고 탄력을 증진시키기 위한 연구들이 다방면으로 진행되고 있다[10-15]. 한편, 무(Radish, *Raphanus sativus* L.)는 십자화과(Cruciferae) 채소로 휘발성 함황 성분을 가지고 있어 독특한 매운 맛을 지니고 있다. 무의 독특한 매운 맛은 무에 함유된 티오글루코사이드가 잘리거나 세포가 파괴되었을 때 자체 내에 있는 글루코사이드아제라는 효소에 의하여 티오시아네이트와 이소티오시아네이트로 분리되는 것에 의한다. 무에는 다른 채소에 비해 유리아미노산, 당, 칼슘 및 인 등이 많이 함유되어 있다. 뿌리에 함유된 당분은 주로 포도당, 과당이고 이외에 다수의 유기산과 아미노산이 함유되어 있다. 특히, 비타민 C의 함량이 높아 예로부터 겨울철 비타민 공급원으로 중요한 역할을 해왔다. 무 뿌리인 나복(蘿蔔)은 가래, 기침해소, 이질 등에 효과가 있고, 어패류 또는 면류의 중독을 해소하는데도 효과가 있다고 알려져 있다. 무에 함유된 디아스타제(diastase)는 소화촉진, 식중독, 숙취 해소에 효과가 있으며 라핀(rapine)은 세균, 진균, 기생충 등에 대한 항균 작용이 있는 성분으로 알려져 있다. 특히, 무의 껍질과 무청은 식용으로 사용하기도 하지만, 질기고 거친 식감으로 인하여 제거 후 식용하는 경우가 많아 부산물로서 폐기되거나 가축의 사료로 이용되는 실정이다[16]. 따라서 본 연구는 무의 생리 활성을 더욱 증가시킬 수 있는 초임계 열처리 무의 가공물이 피부주름 및 탄력개선에 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였

다. 궁극적으로 피부에 자극이나 독성이 없이 안전하게 사용할 수 있으면서도, 피부의 주름 형성을 예방하고, 피부 주름과 탄력을 개선할 수 있는 화장료 조성물 소재로서 가능성을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 무의 열처리 추출물의 제조

농수산물 도매시장에서 한국산 무(청운무)를 구입하여 껍질과 무청을 포함하여 세척한 후 사용하였다.

열처리 장치는 10 kg/cm² 이상의 압력에서도 견딜 수 있도록 고안, 제작된 열처리장치(Jisco, Seoul, Korea)를 사용하였다. 무 시료는 통째로 용기에 담은 후, 일정량의 물이 첨가된 외부용기 안에 넣고 정해진 온도와 시간에 따라 가열하는 것에 의해 직접적인 열전달에 의한 시료의 탄화를 방지하였으며, 열처리 과정 중 수증기가 처리될 수 있도록 하였다. 열처리 온도는 110, 120, 130, 140 및 150℃로 설정하였고, 열처리 시간은 6시간으로 설정하였다 [16].

2. 열처리된 무 추출물(HRE)의 제조

열처리된 무 시료를 냉각한 후, 분쇄기를 사용하여 마쇄하고 10배의(v/v) 증류수를 가하여 14-16시간 추출하였다. 추출액은 여과한 후 동결건조하여 사용하였다.

표 1. 동물 시험군

Table 1. Experimental design

Group	Treatment
Normal	HRM-2 without any treatment (5)
Negative control	HRM-2 + UVB irradiation vehicle (5)
Positive control	HRM-2 + UVB irradiation + 0.01% sunblock (5)
Exp.1: HRE 300mpk	HRM-2 + UVB irradiation + 300 mg/kg / oral administration (5)
Exp.2: HRE 150mpk	HRM-2 + UVB irradiation + 150 mg/kg / oral administration (5)
Exp.3: 1 % HRE-O oint.	HRM-2 + UVB irradiation + 1 % HRE-Oil ointment (5)

3. 열처리된 무 초임계 추출물(HO)의 제조

열처리된 무를 24시간 바람이 잘 통하는 곳에서 건조한 후 200 메쉬 이하의 크기로 분쇄하였다. 분쇄물을 초임계유체 추출기에서 넣고 40~80℃의 추출온도, 200~500 bar의 추출압력 조건하에서 보조용매로 butylene glycol

을 사용하여 초임계 CO₂ 추출하였다. 포집된 추출액은 마찬가지로 동결건조하여 사용하였다 [16].

4. 동물실험

4.1. 실험동물의 준비

7주령의 HRM-2 마우스를 분양받아 1주일간 사육실에서 순화시킨 후, 실험에 사용하였다. 실험동물은 12시간 명암주기를 유지하면서 22℃의 온도와 50%의 습도에서 사육하였으며, 사료와 물은 제한없이 자유급이하였다. 순화 1주일 후 실시예 1에서 제조한 시료를 하루에 한번씩 경구투여 하거나, HRM-2 생쥐의 등을 2등분하여 오른쪽 등에 시료를 도포하며 UVB 조사에 의한 피부 노화에 미치는 시료의 영향을 평가하였다. 실험군은 표 1과 같이 분류하였으며, 각 군당 실험동물의 수는 다섯 마리로 하였다.

4.2. UVB조사 및 광노화 유발

7주령의 HRM-2 생쥐에 UVB 램프(15 W type, UV maximum wave length 312 nm; UV intensity 100 μW cm⁻², Ieda Boeki Co., Tokyo, Japan)로 등피부에 조사하여 피부두께, 탄력, 그리고 주름생성 변화, 색소침착에 대하여 HRE의 효과를 검증하고자 한다. HRM-2 생쥐는 첫번째 1주일에는 매일 100 mJ/cm² UVB radiatio(1 minimal erythematal dose=100 mJ/

cm²)을 조사하였고, 그런 다음 2주째 부터 5주째까지는 200 mJ/cm²으로 UVB radiation을 주에 3번(월, 수, 금) 조사한다. HRM-2 생쥐의 등피부에 base ointment와 양성대조군(0.01 % sunblock), HRE 추출물 300 mg/kg, 150 mg/kg 투여와 HRE-Oil ointment 1

%, 0.5 %의 시료를 도포하고 후 UVB를 15 cm 거리에서 5 ~10 분간 조사하였다.

4.2. 체중 및 식이섭취량

시료의 처리 및 UVB 조사가 HRM-2 생쥐의 식이섭취량 및 체중에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 실험동물의 처치과정에서 매주 목요일 10시에 체중과 식이 섭취량을 측정하여 기록하였다[9].

4.3. 무 추출물이 UVB 조사에 의한 주름형성에 미치는 영향 평가

UVB에 의해서 유도된 피부노화의 정도는 주름형성상태를 관찰함으로써 측정하였다. 주름의 형성을 평가하기 위해, 각각의 HRM-2

생쥐는 6주째와 9주째에 chloral hydrate (체중 0.1 ml/7 % CH/25 g mouse)의 복강 내 주사하여 마취 한 후, UVB 조사 된 dorsa의 larea (주름 사이트)을 촬영 하였다. 피부주름은 UVB를 조사한 후 DETAX System II (MIXPAC)과 Double-Stick Disc (3M, Germany)을 사용하여 측정한다. 실험 후 마우스 피부에 Double-Stick Disc를 붙이고, DETAX System II를 이용하여 혼합용액을 분사하여 2-3분 정도 후에 완전히 굳어진 Disc를 떼어내어 주름의 정도를 관찰한다. Disc에 생긴 주름은 Bissett 등에 의해서 제시된 scoring system에 따라 평가하였다. 이러한 평가에서 grade 0은 주름이 없는 경우, grade 1는 몇 개의 얇은 주름이 있는 경우, grade 2는 일부 주름이 있는 경우, grade 3는 몇 개의 깊은 주름이 생긴 경우로 정의하여 측정하였다.

4.4. 무 추출물이 UVB 조사에 의한 주름관련 유전자 및 단백질의 발현에 미치는 영향 평가

UVB 조사 5주차에 생쥐를 희생시킨 후 UVB가 조사 된 등 피부조직을 분리하였다. 분리된 등조직에 Trizol 500 μ l를 넣고 homogenizer로 세포들을 분쇄하였으며 여기에 chloroform (CHCl₃) 100 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리하였고 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80 % EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다.

추출된 총 RNA 3 μ g을 75°C에서 10분 동안 변성시킨 다음 2.5 μ l의 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 45 μ l 5 × RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT (200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC(diethyl pyrocarbonate)가 처리된 증류수를 사용하여 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5 초간 원심침강하여 37°C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시켰다. 합성된 cDNA를 사용하여 RT PCR을 수행하였다. PCR에 사용된 프라이머 서열은 표 2에 기재하였으며, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)을 이용하였다. TaqMan probe (FAM dye-labeled, ABi, USA)를, internal standard로 생쥐 GAPDH probe set: Endogenous Control(VIC® /MGB Probe, Probe

표 2. RT PCR
Table 1. Experimental design.

Group	Primer	Sequences	
MMP-2	Forward	5'-CAG GGA ATG AGT ACT GGG TCT ATT-3	서열번호 1
	Reverse	5'-ACT CCA GTT AAA GGC AGC ATC TAC-3'	서열번호 2
MMP-9	Forward	5'-AAT CTC TTC TAG AGA CTG GGA AGG AG-3'	서열번호 3
	Reverse	5'-AGC TGA TTG ACT AAA GTA GCT GGA-3'	서열번호 4

limited, Applied Biosystems 4352339E)를 사용하였고, 프라이머의 최종 농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. Real time quantitative PCR의 조건은 pre-denaturation은 50 °C에서 2 분간, 94 °C에서 10 분간, 그리고 40 cycles을 95 °C에서 15초간 및 60 °C에서 1분간 수행하였다.

4.4. 무 추출물이 UVB 조사에 의한 피부의 조직학적 관찰

각 실험군에서 적출한 피부조직은 10 % formalin 용액에 48시간 정도 고정된 뒤, 카세트에 들어갈 만한 적당한 크기로 절단하여 카세트에 넣고 labeling을 하였다. 그리고 이들 조직은 조직처리기 (Thermo Shandon Ltd./Thermo Fisher Scientific, England)를 이용하여 alcohol 70, 80, 90, 95, 100 %에 각각 1~2시간정도 처리한 후 xylene으로 4시간 처리하고, paraffin에서 4시간 처리하였다. 고정된 조직은 Paraffin Embedding Station (LEICA MICROSYSTEMS NUSSLOCH GMBH, Germany)을 사용하여 embedding한 후 냉동실에서 하루 정도 보관하고 Rotary Microtome (LEICA MICROSYSTEMS NUSSLOCH GMBH, Germany)을 사용하여 block을 박절하였다. 박절된 조직은 H&E staining을 실시하기 위하여 xylene에 3분씩 3번, alcohol 100 %에 각각 2분, 1분, alcohol 95, 80, 70 %에 각 1분 30초 담근 후에 물로 1분 세척하고, hematoxylin에 1분, 10 % scott's tap water에 1분, eosin에 3분 동안 처리과정을 거쳐 염색을 실시하였다. 염색된 조직은 다시 alcohol 70, 80, 95, 100%에 순서대로 처리하여 dehydration 한 후 xylene에 3분씩 3번 처리하였다. 슬라이드를 건조 후 kanadabalsam과 xylene를 이용하여 permounting을 실시한 후 현미경을 이용하여 표피/내피의 두께, lipid pore 등을 관찰하였다. 전반적인 피부 조직의 변화를 관찰하기 위하여 Harris hematoxylin 용액에 옮겨 5 분간 핵을 염색한 후 흐르는 물에 수세하고 1 % HCl-alcohol 용액으로 3 회 침적 후 충분히 수세하여 1 % ammonium 용액으로 청색화 하고 eosin 용액에 3 분간 세포질을 염색한 후 80 % 알코올로 이동하였으며 95 % 및 100 % 알코올을 사용하여 탈수시켰다. 다른조직 슬라이드는 피부 dermis층에서 콜라겐 침착을 관찰하기 위하여 Masson's trichrome염색을 실시하였다. 청명 과정을 거친 후 canada balsam 으로 봉입 후 현미경으로 검정하였다.

4.5. 무 추출물이 UVB 조사에 의한 MMP-2 ELISA 측정

실험 종료 후 각 HRM-2 동물로부터 적출한 등 피부 조직(dorsal skin tissue)에서의 MMP-2 단백질의 발현량을 ELISA법으로 측정하였다. 생쥐용 MMP-2 ELISA (R&D System, USA) kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 MMP-2 코팅 antibody를 microwell에 100 μ l씩 분주하고 4°C에서 16시간 두었으며 각 well을 wash buffer로 세척하고 assay diluent를 200 μ l씩 넣어서 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. 표준품을 희석하고 상청액을 20배 희석한 후 microplate를 세척하고 각 표준품과 상청액을 100 μ l씩 넣었으며 2시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였다. Microplate를 세척하고 working detector를 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 1시간 동안 well을 막은 후 실온에서 배양하였으며, microplate를 세척하고 substrate solution을 만들어서 각 well에 100 μ l씩 넣고 30분 동안 어두운 곳에서 실온으로 배양하였다. Stop solution을 각 well에 50 μ l씩 넣고 microplate spectrophotometer에서 흡광도 450nm로 측정하였다.

5. 통계처리

각 실험군 결과 값은 unpaired student's T-test 통계 프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, p<0.05 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

III. 실험결과

1. 체중변화 및 식이 섭취량

초임계 열처리된 무 추출물(HRE)에 대한 피부 주름개선 효과 및 체중변화를 측정하기 위해 HRM-2 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 매주 체중변화를 측정한 결과, HRE 추출물에 대한 체중변화는 HRM-2 생쥐에 UVB를 조사와 관계없이 그룹 간 체중변화는 크게 나타나지 않았다(Figure 1). 그림 1은 시간의 경과에 따른 체중의 변화를 보여주는 그래프이며, 그림 2는 5주 동안의 식이섭취량과 식이효율을 보여주는 그래프이다. 식이효율(FER %)은 5주간의 식이섭취량에 대한 5주간의 체중증가량의 비율을 의미한다(Figure 2). 그림 1은 UVB의 조사나 시료의 처리에 의해 그룹간 유의미한 체중변화가 관측되지 않음을 보여주었다. 또한 정상군에

비해 음성대조군에서는 식이섭취량이 약간 감소하고, 식이효율은 증가하였으나 유의성은 없었다. 무 추출물의 경구 투여나 oint 도포군에서의 식이섭취량은 정상군과 유사하였으나, 식이효율은 모든 군에서 음성 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다.

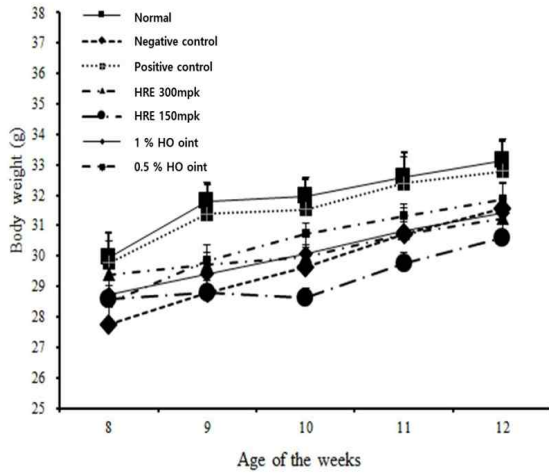


그림 1. 무 추출물이 UVB 조사에 의한 체중변화
Figure 1. Change of body weight.

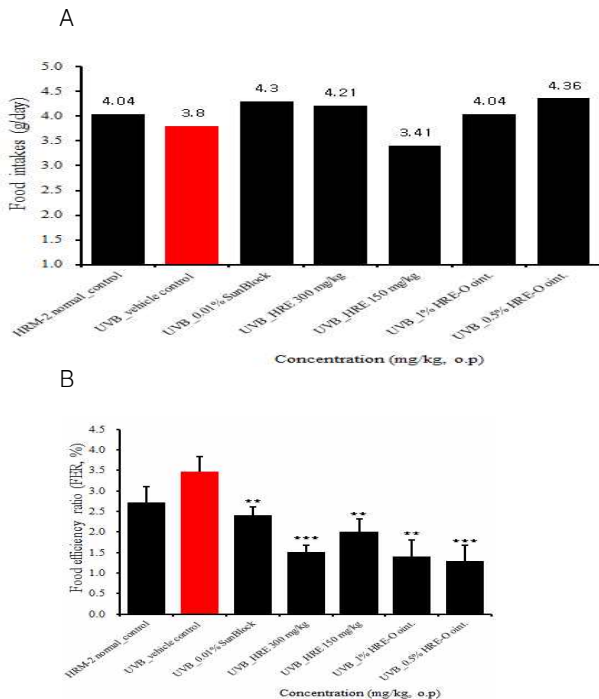


그림 2. 식이 섭취량 효율(A, B)
Figure 2. Change of food intakes and food efficiency ratio.

2. 무 추출물이 UVB 조사에 의한 혈청중 GOT, GPT 활성변화

HRE 추출물에 대한 혈청 GOT 및 GPT 활성을 측정 한 결과, GPT 활성은 그룹간의 크게 차이가 나타나지 않은 것으로 나타났으며, GOT 활성은 정상군에 비해 UVB-대조군에 유의적으로 증가되었고, HRE 300 mg/kg 투여군에서 UVB-대조군에 비해 유의적으로 감소되었다.(Figure 3).

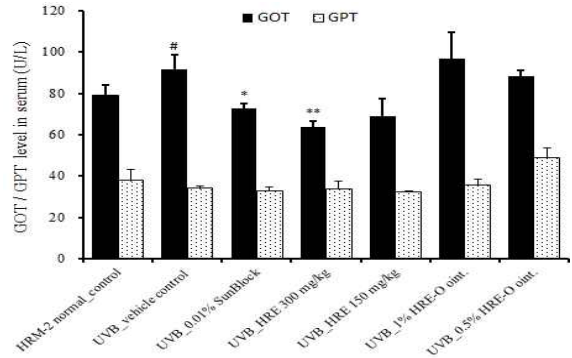


그림 3. 무 추출물이 UVB 조사에 의한 혈청중 GOT, GPT 활성 변화

Figure 3. Effects of HRE extract on the GOT and GPT activity in serum of HRM-2 mice exposed to UVB.

Blood samples were collected using cardiac puncture method. The results were expressed the mean \pm SD (n= 5). Values are expressed as means \pm S.D. from two-independent experiments(* p<0.05, ** p<0.01). # : p<0.05 compared with normal group.

3. 무 추출물이 UVB 조사를 통한 피부손상 유발 병태모델에서 피부염증 유전자 IL-1 β mRNA 발현 분석

HRE 추출물에 대한 피부 주름개선 효과를 측정하기 위해 HRM-2 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 5주째 등 피부조직을 분리하여 염증관련 mRNA 유전자 IL-1 β 발현을 측정 한 결과로 UVB-대조군 IL-1 β mRNA 유전자 발현의 RQ값을 1로 했을 때 KRG 처리군의 상대정량 값을 분석하였다. 그 결과, IL-1 β mRNA 유전자 발현은 UVB-대조군에서 정상군에 비해 증가를 나타내었고, UVB-0.5% HRE-Oil ointment 도포군을 제외한 HRE 투여군과 HRE-Oil ointment 도포군에서 UVB-대조군에 비해 IL-1 β mRNA 유전자 발현 감소를 나타내었지만 유의성은 나타나지 않았다(Figure. 4).

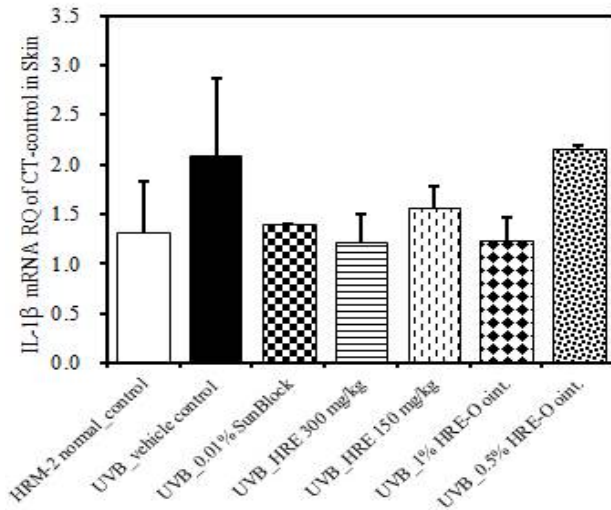


그림 4. 무 추출물이 UVB 조사를 통한 피부손상 유발 병태모델에서 피부염증 유전자 IL-1 β mRNA 발현 분석
 Figure 4. Effects of HRE extract on IL-1 β mRNA gene expression in animal skins exposed to UVB. 5 weeks after the initiation of UVB irradiation (the stage of hyperpigmentation); The expression of IL-1 β mRNA levels in each sample was analyzed by real-time PCR and the relative quanyitatives (RQ) of IL-1 β mRNA was normalized to the quantity of GAPDH. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Values are expressed as means \pm S.E. from two-independent experiments.

4. 열처리된 무 추출물(HRE추출물)의 UVB조사를 통한 피부손상 유발 병태모델에서 피부 MP-2, MMP-9 염증 유전자 발현 분석

HRE 추출물에 대한 피부 주름개선 효과를 측정하기 위해 HRM-2 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 5주째 등 피부조직을 분리하여 MMP-2와 MMP-9 mRNA 유전자 발현을 측정한 결과로 UVB-대조군 MMP-2, MMP-9 mRNA 유전자 발현의 RQ값을 1로 했을 때 HRE 처리군의 상대정량 값을 분석하였다. 그 결과 MMP-2 mRNA 유전자 발현은 정상군에 비해 UVB-대조군에서 유의성 있게 증가되었으며, HRE 300 mg/kg 투여군과 HRE-Oil ointment(1 %, 0.5 %) 도포군에서 UVB-대조군에 비해 MMP-2 mRNA 유전자 발현이 유의성 있게 감소되었다(Figure 5A). 또한, MMP-9 mRNA 유전자 발현은 정상군에 비해 UVB-대조군에서 증가되었지만 유의성은 나타나 않았으며, HRE 투여군과

HRE-Oil ointment 도포군에서 UVB-대조군에 비해 MMP-9 mRNA 유전자 발현이 감소되었지만 HRE 300 mg/kg 투여군에서만 유의성이 있었다(Figure 5B).

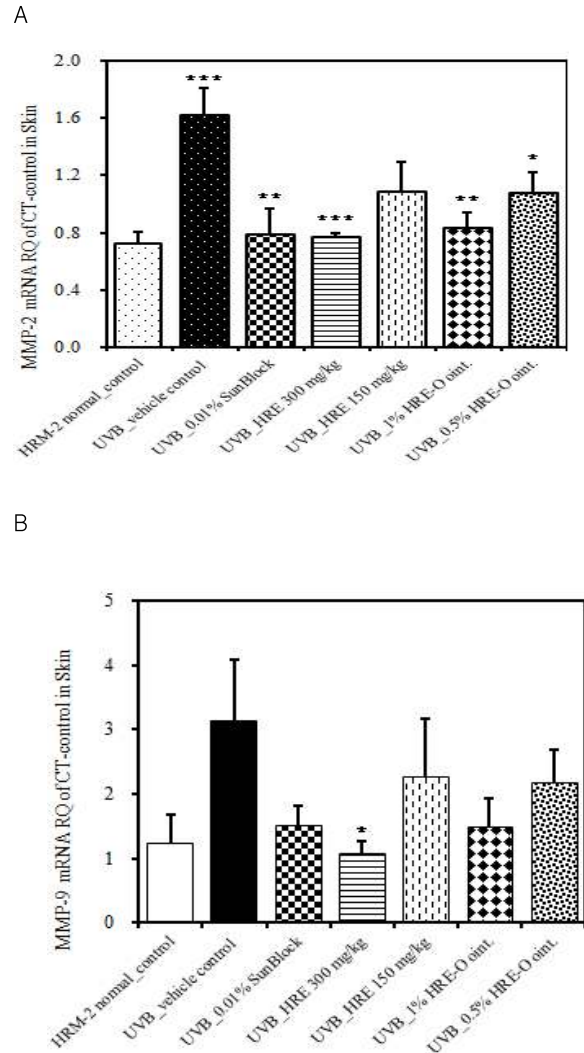


그림 5. 열처리된 무 추출물(HRE추출물)의 UVB조사를 통한 피부손상 유발 병태모델에서 피부 MP-2, MMP-9 염증 유전자 발현 분석
 Figure 5: Effects of HRE extract on MMP-2 and MMP-9 mRNA gene expression in animal skins exposed to UVB. 5 weeks after the initiation of UVB irradiation(the stage of hyperpigmentation); The expression of MMP-2 and MMP-9 mRNA levels in each sample was analyzed by real-time PCR and the relative quanyitatives (RQ) of MMP-2 and MMP-9 mRNA was normalized to the quantity of GAPDH. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Values are expressed as means \pm S.E. from two-independent experiments

(* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). ### : p<0.001 compared with normal group.

5. 무 추출물이 UVB 조사에 의한 주름관련 유전자 및 단백질의 발현에 미치는 영향 평가

HRE 추출물에 대한 피부 주름개선 효과를 측정하기 위해 HRM-2 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 5주째 등 피부조직을 분리하여 UVB 광노화에 의한 피부 콜라겐 분해로 형성되는 주름생성 변화를 관찰하기 위하여 MMP-2 단백질량발현을 측정된 결과, 그림 6는 RT PCR 결과를 보여주는 그래프로, UVB 조사에 의해 음성대조군은 정상군에 비해 MMP-2 및 MMP-9 유전자의 발현이 현저하게 증가하였으나, 무 추출물의 처리에 의해 상기 유전자의 발현이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 유전자의 발현 정도는 무 추출물의 처리량에 의존적으로 감소하였다. 분리한 등 피부조직으로부터 MMP-2 단백질의 발현량을 생쥐용 MMP-2 ELISA (R&D System, USA) kit를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 ELISA법으로 측정하였다. 그림 6에서 확인할 수 있듯이 mRNA에 대한 정량결과와 마찬가지로, MMP-2 단백질의 발현 역시 UVB의 조사에 의해 크게 증가하였으며, 무 추출물은 처리량에 의존적으로 MMP-2 단백질의 발현을 억제하였다.

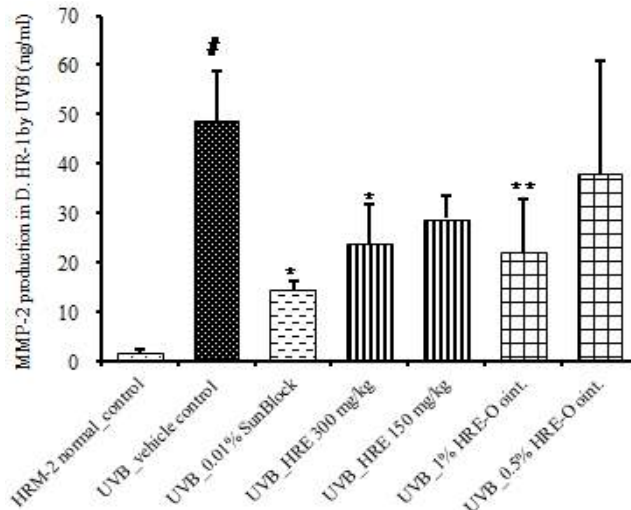


그림 6. 무 추출물이 UVB 조사에 의한 주름관련 유전자 및 단백질의 발현에 미치는 영향 평가
Figure 6: Effects of HRE extract on MMP-2 protein expression in animal skins exposed to UVB.

5 weeks after the initiation of UVB irradiation (the stage of hyperpigmentation); The expression of MMP-2 protein production in each sample was analyzed by ELISA. The amount of MMP-2 ELISA kit was measured at the end of each cycle.

Values are expressed as means ± S.E. from two-independent experiments(* p<0.05, ** p<0.01). # : p<0.05 compared with normal group.

7. 무 추출물이 UVB 조사에 의한 HRM2 생쥐의 주름 측정 (Dermobella)분석

HRE 추출물에 대한 등 피부 주름깊이 (wrinkle depth)개선 효과를 측정하기 위해 HRM-2 생쥐에 UVB를 조사하여 광노화를 유도한 다음 등 피부 주름 깊이를 skin dermobella 3D 분석기로 UVB조사 3주, 4주, 5주에 측정 하였다(Figure. 7). 그 결과 3주, 4주, 5주에서 정상군에 비해 UVB-대조군에서 UVB 광노화로 주름형성 및 깊이가 증가되었다. 반면 HRE (300, 150 mg/kg) 투여군과 HRE-Oil ointment (1%, 0.5%) 도포군에서는 주름형성 및 깊이가 UVB-대조군에 비해 감소되는 것을 확인하였다.

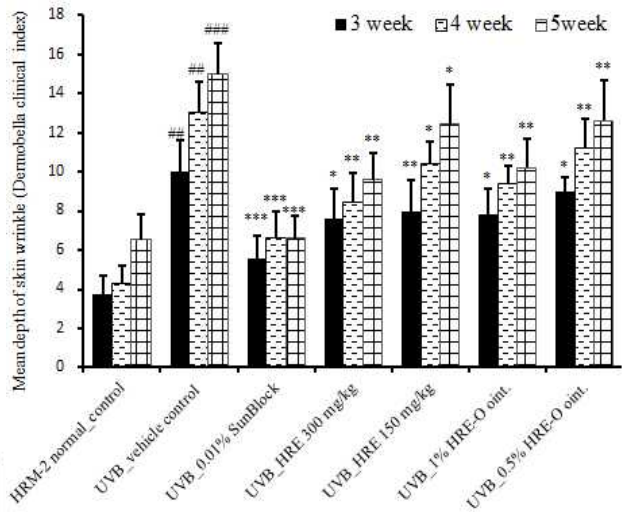


그림 7. 무 추출물이 UVB 조사에 의한 HRM2 생쥐의 주름 측정 (Dermobella)분석

Figure 7: Analysis of skin dermobella taken from the dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Effects of HRE extract on UVB-induced mean depth of skin wrinkle. Values are means±S.E.M. for 5 mice. *Significantly different from UVB/vehicle control treatment (p<0.05). **Significantly different from UVB/vehicle control treatment (p<0.01). ***Significantly different from UVB/vehicle control treatment (p<0.001). ## : p<0.01, ### : p<0.001 compared with normal group.

UVB 조사에 의해 정상군에 비해 음성대조군의 주름의 깊이가 증가되는 것을 관측할 수 있다. 반면 무 추출물의 처리군에서는 음성대조군에 비해 주름의 깊이가 감소되었다.

8. 무 추출물이 UVB 조사에 의한 RM2 생쥐의 상피조직 두께 및 피부 콜라겐섬유 (collagen fiber) 변화에 미치는 영향

HRE 추출물에 대한 피부 주름개선 효과를 측정하기 위해 HRM-2 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 5주 후 등 피부조직을 H&E 염색을 하여 현미경 상에서 상피조직 두께를 측정된 결과, Fig. 8와 같이 정상군에 비하여 UVB-대조군에서 상피조직 두께가 두꺼워져 있고, HRE extract (300, 150 mg/kg) 투여군에서 상피조직 두께가 UVB-대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다. 그리고, Fig. 9는 피부 주름개선 효과를 측정하기 위해 HRM-2 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 5주 후 등 피부조직을 Masson's trichrome 염색을 하여 현미경 상에서 콜라겐 섬유 (collagen fiber) 변화를 측정된 결과로 정상군에 비해 UVB-대조군에서 M-T 염색의 강도가 감소된 것으로 보아 콜라겐 섬유(collagen fiber)의 분해가 진행되어 주름형성이 가속된 것으로 생각되는 결과이다. 그러나 KRG extract (300, 150 mg/kg) 투여군에서는 콜라겐 섬유 (collagen fiber)의 양이 UVB-대조군에 비해 증가되었고, 이러한 결과는 HRE 추출물에 의해 주름개선이 되었다고 생각된다(Figure 8).

V. 결 론

무의 껍질과 무청은 식용으로 사용하기도 하지만, 질기고 거친 식감으로 인하여 제거 후 식용하는 경우가 많아 부산물로서 폐기되거나 가축의 사료로 이용되는 실정이다. 따라서 본 연구는 무의 생리 활성을 더욱 증가시킬 수 있는 가공방법으로 무껍질과 무청을 포함한 무의 가공물이 피부주름 및 탄력개선에 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다. 실험 결과, UVB의 조사나 시료의 처리에 의해 그룹간 유의미한 체중변화가 관측되지 않았으며, 정상군에 비해 음성대조군에서는 식이섭취량이 약간 감소하고, 식이 효율은 증가하였으나 유의성은 없었다. GPT 활성은 그룹간의 크게 차이가 나타나지 않았으며, GOT 활성은 정상군에 비해 UVB-대조군에 유의적으로 증가되었고, HRE 300 mg/kg 투여군에서 UVB-대조군에 비해 유의적으로 감소되었다. IL-1 β mRNA 유전자 발현은 UVB-대조군에서 정상군에 비해 증가를 나타내었고, UVB-0.5 % HRE-Oil ointment 도포군을 제외한 HRE 투여군과 HRE-Oil ointment 도포

군에서 UVB-대조군에 비해 IL-1 β mRNA 유전자 발현 감소를 나타내었지만 유의성은 나타나지 않았다. 초임계 열처리된 무추출물의 UVB 조사에 의한 HRM생쥐의 주름 측정 결과는 정상군에 비해 음성대조군의 주름의 깊이가 증가되는 것을 관측할 수 있다. 반면 무 추출물의 처리군에서는 음성대조군에 비해 주름의 깊이가 감소되었다. 초임계 열처리된 무추출물의 UVB 조사에 의한 의한 주름관련 유전자 및 단백질의 발현에 미치는 영향에서는 음성대조군은 정상군에 비해 MMP-2 및 MMP-9 유전자의 발현이 현저하게 증가하였으나, 무추출물의 처리에 의해 상기 유전자의 발현이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 유전자의 발현 정도는 무추출물의 처리량에 의존적으로 감소하였다. mRNA에 대한 정량결과와 마찬가지로, MMP-2 단백질의 발현 역시 UVB의 조사에 의해 크게 증가하였으며, 무추출물은 처리량에 의존적으로 MMP-2 단백질의 발현을 억제하였다. 이상의 결과를 종합적으로 해석해 볼 때, 초임계 열처리된 무추출물은 피부에 도포 시 뿐만 아니라 경구로 섭취시에도 피부 주름 개선에 효과가 있어, 건강기능식품 조성물로도 유용하게 사용될 수 있다. 특히 무는 오랫동안 복용 시에도 전혀 부작용을 나타내지 않는 안전한 식품으로 장기간 꾸준히 복용하는 것에 의해 피부 주름 및 탄력 개선 효과를 얻을 수 있다는 결론을 얻을 수 있었다.

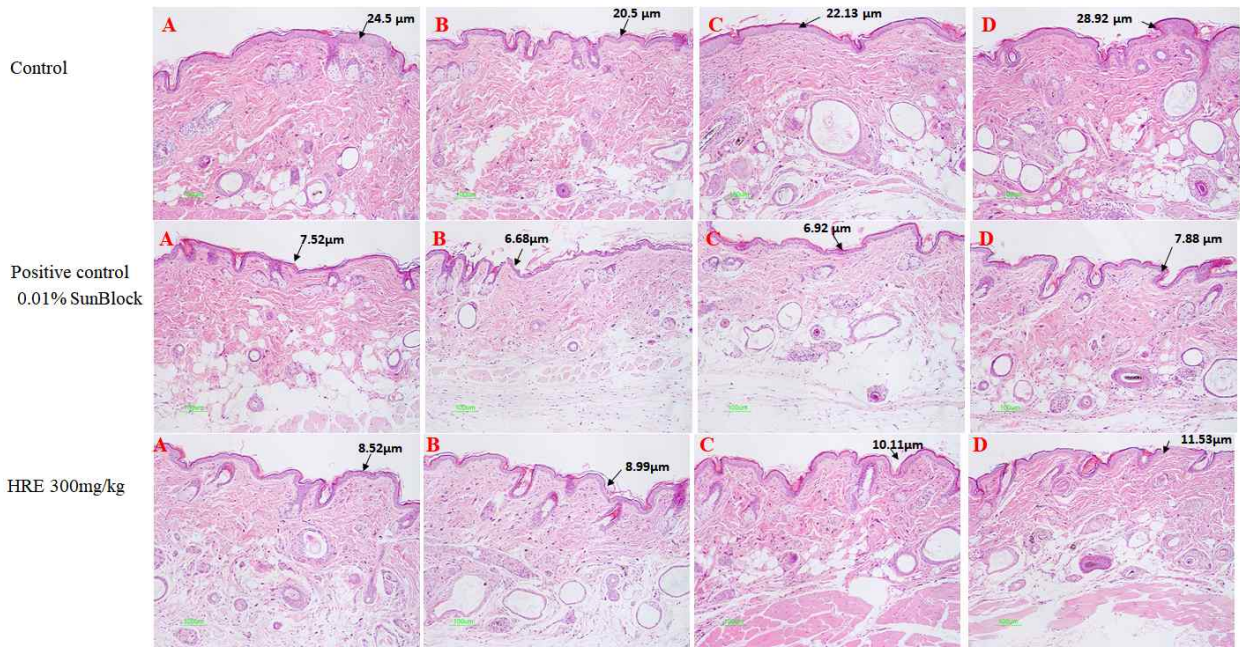


그림 8. 무 추출물이 UVB 조사에 의한 H&E stain에 의한 skin tissue

Figure 8: Inhibition of skin thickening by 300 mg/kg KRG on epidermis induced by UVB irradiation.

HRM-2 hairless mice dorsal skin of Hematoxylin and eosin (H&E) staining of UVB-irradiated hairless mice skin. Original magnification 100x

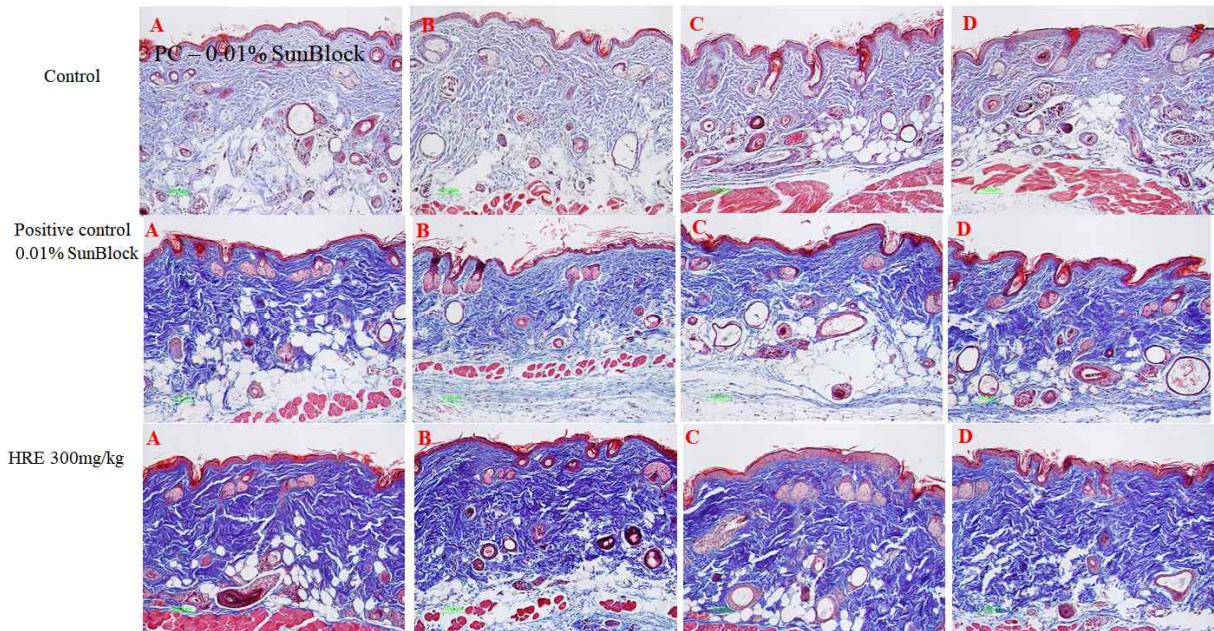


그림 9. 무 추출물이 UVB 조사에 의한 MT stain에 의한 skin tissue

Figure 9: Inhibition of collagen deposition by 300 mg/kg KRG on epidermis induced by UVB irradiation.

HRM-2 hairless mice dorsal skin of Masson's Trichrome (M-T) staining of UVB-irradiated hairless mice skin. Original magnification 100x

References

- [1] Kim HK, "The Functional effects of anti-microbial activity and anti-inflammatory of seaweed polysaccharide extracts," *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4(2), pp. 155-163, 2018.
- [2] Kim DB, Ahn EY, and Kim EJ, "Improvement of insulin resistance by curcumin in high fat diet fed mice," *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4(1), pp. 315-323, 2018.
- [3] Kim JL, and Kim HJ, "A study of control capacity structure of by the lipid state of stratum on the skin," *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 3(3), pp. 37-41, 2017.
- [4] Lee JN, Kim SW, Yoo YK, Lee GT, and Lee K K, "Anti-wrinkle effect of *Morinda citrifolia*(Noni) extracts," *The of the Society of Cosmetic Scientists of korea*, Vol. 32,(4) pp. 227-231, 2006.
- [5] Saliou C, Ktazawa M, Mclaughlin L, Yang JP, Lodge JK, Tetsuka T. Lwasaki K. Cillard J. Okamoto, T. and Packer L, "Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-Kappa-B activation in a human keratinocyte cell line," *Free radical Biology and Medicine*, Vol.26(1-2), pp. 174-183, 1999.
- [6] Cadenas E, "Biochemistry of oxygen toxicity," *Annual Review of Biochemistry*, 58, pp. 79-111, 1989.
- [7] Yaar M and Gilchrest BA, "Aging versus photoaging, postulated mechanisms and effectors," *Journal of investing dermatol. symposium Proceedings*, Vol. 3(1), pp. 47-51, 1998.
- [8] Li JJ, Dong Z. Dawson MI, and Colburn NH, "Inhibition of tumor promoter-induced transfor mation by retinoids the transrepress AP-1 without transactivation retinoic acid response element," *Cancer Research*, Vol. 56(3), pp. 483-489, 1996.
- [9] Huang C, Ma WY. Dawson MI, Rincon, M. Flavell RA, and Dong Z, "Blocking activator protein I activity, but not activation retinoic acid response effect of retinoic acid," *Proc. Acad. Sci, USA*, Vol. 94, pp. 5826-5830, 1997.
- [10] Kim C, Jeong SB, Im GH, Gang MH, An J. H, Kim JH, and Lee H, "Development of multifunctional natural sunscreen(BHC-S) Having sunscreensing and anti-wrinkle," *The Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol. 43(4), pp. 321-327, 2017.
- [11] Mukhtar H, and Elmetts CA, "Photocarcino genesis: mechanisms, models and human health implications," *Journal photochemistry and photo biology*, Vol. 63(4), pp. 355-357, 1996.
- [12] Lee HJ, Kim SR, Kim JS, Moon C, kim JC, Bae CS, Jang JS, Jo SK, and Kim JC, "The effect of red ginseng on ultraviolet b-induced skin damages in mouse," *Journal of Ginseng Research*, Vol. 30(4), pp. 194-198, 2006.
- [13] Podda M. and Kollmann MG, "Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing," *Clin. Exp. Dermatol*, Vol. 26(7), pp. 578-308, 2001.
- [14] Brown S, Diffey BL, "The effect of applied thickness on sunscreen protection : in vivo and in vitro studies," *Journal photochemistry and photobiology*, Vol. 44(4), pp. 509-513, 1986.
- [15] Lee C, "Anti-aging effects of marine natural extracts against uvb-induced damages in human skin cells," *The Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol. 38(3), pp. 255-262,
- [16] Ku KH, Lee KA, and Kim YE, "Physiological activity of extracts from radish(*Raphanus sativus* L.) leaves" *Journal of the Korean Society of Food Science Nutrition*, 37(3), 390-395 (2008).