



Original Article / 원저

## UVB 광손상에 대한 백작약의 보호 효과

박숙자, 이종록\*

대구한의대학교 제약공학과

## Protective Effect of *Paeoniae Radix Alba* against UVB Photodamage

Sook Jahr Park, Jong Rok Lee\*

Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University

### ABSTRACT

**Objective** : UVB damages skin health by causing skin redness and intense inflammation, sunburn, and skin cancer. *Paeoniae Radix Alba* has been used to relieve gynecological symptoms, muscle spasms, and skin ailments. This study was conducted to confirm whether it has a protective effect against UVB photodamage.

**Methods** : Ethanol extract of *Paeoniae Radix Alba* (PRA) was prepared by extracting 100 g *Paeoniae Radix Alba* in 1 L of ethanol for 48 h. Apoptosis was monitored by the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay and expression levels of apoptosis indicator proteins, and tyrosinase activity was measured with a colorimetric commercial kit.

**Results** : In human keratinocyte HaCaT cells, PRA reduced UVB-induced cell death through apoptosis by inhibiting PARP cleavage and caspase-3 and -9. UVB-induced increase in cellular reactive oxygen species (ROS) was suppressed by PRA pretreatment. PRA also showed dose-dependent ABTS and DPPH radical scavenging activities. Furthermore, the inhibitory effect of tyrosinase activity by PRA was confirmed.

**Conclusion** : These results demonstrated the protective role of PRA in UVB photodamage of human keratinocytes, mainly due to its antioxidant and antiapoptotic properties. We also suggest that PRA can be considered as an effective natural agent to prevent skin photodamage.

**Key words** : *Paeoniae Radix Alba*; UVB; apoptosis; antioxidant; tyrosinase.

## I. 서론

다년생 초본인 작약(Paeonia lactiflora Pallas)의 뿌리인 백작약(白芍藥; Paeoniae Radix Alba)은 쓰고 시며 약간 차가운 약성을 가지고 있다<sup>1)</sup>. 간경(肝經), 비경(脾經)에 들어가 양혈염음(養血斂陰), 유간지통(柔肝止痛), 평억간양(平抑肝陽)하는 효능이 있으며, 어혈성 부종, 간의 염증이 위로 상승하여 나타나는 눈의 충혈과 두통, 옆구리가 아프고 입이 쓴 증상 등에 사용되었다<sup>1,2)</sup>. 계지복령환(桂枝茯苓丸), 당귀작약산(當歸芍藥散)에 백작약이 사용되어 생리불순, 월경통, 임신시기 심복통(心腹痛) 및 설사 등을 비롯한 부인병을 치료하였고<sup>3)</sup>, 작약감초탕(芍藥甘草湯)에서는 완급지통(緩急止痛)하여 근육의 경련과 통증을 완화하였다<sup>4)</sup>.

백작약은 여러 방제에 포함되어 피부 기능을 개선하는 것으로도 알려져 있는데 백작약을 포함한 17개의 약재로 구성된 형개연교탕(荊芥連翹湯)은 비염 뿐만 아니라 여드름 및 피부 질환을 완화하는 효능이 있다<sup>5)</sup>. 향균<sup>6)</sup>, 항염<sup>7)</sup> 활성이 보고된 승마갈근탕(升麻葛根湯)에도 백작약이 사용되었다. 단미재로 백작약의 생리활성은 향균<sup>8)</sup>, 항산화<sup>9)</sup>, 항염<sup>10)</sup>, 항암<sup>11)</sup> 등이 보고되었다. 특히 항산화를 비롯한 항염 활성은 천연 화장품 소재로서 백작약을 응용하는데 있어 주요한 활성으로 간주되고 있다<sup>12)</sup>. 또한 이 등은 백작약이 B16F10 흑색종 세포에서 elastase 활성과 melanin 생성을 저해하여 화장품 소재로서의 가능성을 보였다고 보고하였다<sup>13)</sup>. 이렇게 피부 기능을 향상시키는 기능성 소재로서 백작약의 다양한 활성이 보고되었으나, 자외선 등 광손상에 대한 백작약의 효과에 대한 연구는 아직 없다.

피부 질환은 스트레스, 음주, 흡연 등 다양한 원인으로 나타나며 지나치게 일광에 노출될 때에도 발생한다<sup>14)</sup>. 광에 의한 피부 손상은 최근의 기후변화로 인한 비정상적 지구 온도 상승과 함께 심각하게 받아들여지고 있다. 왜냐하면 대기로 배출된 환경오염물질은 온실기체로 작용하여 온실효과를 유발할 뿐만 아니라 성층권에서 오존층 파괴를 통해 UVB와 같이 인체에 유해한 자외선을 증가시키기 때문이다<sup>15)</sup>. 태양으로부터 지구표면에 도달하는 자외선은 대부분 UVA와 UVB로 구성되어 있는데 좀 더 짧은 파장의 UVB는 피부 표피층에

흡수되면서 일광 화상, 피부암을 일으킨다<sup>16)</sup>. UVB가 표피의 기저층까지 침투하면 색소형성세포인 melanocytes를 자극하여 과도한 melanin 생성으로 기미가 생기고 색소침착이 일어나게 된다<sup>17)</sup>. 이러한 UVB 광손상은 회복하는데 많은 시간과 비용이 소요되며 건강수명을 단축시킬 수 있어 광손상을 경감시킬 수 있는 다양한 방법들이 연구되고 있다.

인간 각질형성세포주인 HaCaT cell은 UVB의 영향을 조사하기 위한 시험관 내 모델로 광범위하게 사용되고 있다<sup>18)</sup>. UVB에 노출되면 DNA 손상, death receptor의 활성화와 같은 경로를 통해 세포자멸사가 일어나게 되는데 HaCaT cell에서 UVB에 의한 세포자멸사가 보고되어 있다<sup>19)</sup>. 본 연구에서는 UVB에 노출된 HaCaT cell에서 세포자멸사에 대한 백작약 에탄올 추출물(PRA)의 보호작용과 그 기전을 살펴보고자 하였으며, 색소침착의 주요원인으로 작용하는 tyrosinase 활성에 대해 어떤 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (DMEM/F12), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin는 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고 protease inhibitor cocktail, BCA protein assay kit, chemiluminescence detection kit는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Anti-mouse, anti-rabbit IgG 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), caspase-3, caspase-9,  $\beta$ -actin 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT) 및 기타 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

\*Corresponding author: Jong Rok Lee, Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

Tel : +82-53-819-1804, Fax : +82-53-819-1406, E-mail : jrlee@dhu.ac.kr

•Received : August 16, 2023 / Revised : August 21, 2023 / Accepted : August 22, 2023

## 2. 백작약 에탄올 추출물의 제조

백작약(Paeoniae Radix Alba)은 대원약업사(Daegu, Korea)에서 구입하여 품질 검증을 실시한 후 건조 중량으로 100 g을 에탄올 1 L에 넣고 상온에서 48시간 동안 추출하였다. 추출물은 filter paper (Toyo Roshi Kaisha Ltd, Tokyo, Japan)로 여과하여 회전농축기 (EYELA, Tokyo, Japan)로 진공 농축하였고, ultra-low temperature freezer (FDU-1100; EYELA, Tokyo, Japan)로 12시간 동안 동결건조 하였다. 백작약 에탄올 추출물(PRA)의 최종 수율은 1.07%였으며, 실험 사용 전까지 -20°C에 보관하였다.

## 3. 세포 배양 및 MTT 분석법

인간 각질형성세포주인 HaCaT cell은 10% FBS, 100 units/ml penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM/F12 배지로 80-90%의 confluence 범위에 도달하도록 배양하여 실험에 사용하였다. UVB 광손상에 대한 HaCaT 세포 생존율은 MTT 분석법으로 측정하였다. 24 well plate에 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well씩 분주하여 PRA를 농도별(0, 3, 10, 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 18 시간동안 전처리한 후에 UV crosslinker (BoTeck, Gunpo, Korea)를 사용하여 UVB (300  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )에 노출시켰다. UVB 조사 5 시간 후에 세포를 0.5  $\text{mg}/\text{ml}$  MTT 용액으로 반응(37°C, 4 h)시켜 형성된 formazan을 DMSO로 녹여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조세포에 대한 백분율로 다음과 같은 수식에 의해 계산하였다.  

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 \times (\text{absorbance of treated sample})/(\text{absorbance of control})$$

## 4. DPPH 및 ABTS radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능은 다양한 농도(0.25-2.0  $\text{mg}/\text{ml}$ )의 PRA와 동일한 부피의 0.2 mM DPPH solution을 혼합하여 암실에서 30분 동안 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거능은 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 1:1(v/v)로 섞어 실온에서 12 h 반응(12-16 h)시켜 제조한 ABTS solution을 메탄올에 희석하여 734 nm에서 흡광도가  $0.70 \pm 0.02$ 가 되도록 준비한 후 PRA와 동일한 부피로 혼합하여 암실에서 10분 동안 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조물질로 ascorbic acid를 사용하였으며 DPPH와 ABTS radical 소거능은 다음 수식에 따라 저해 백분율로 계산하였다.

$$\text{Inhibition \%} = [(\text{absorption of control} - \text{absorption of sample})/(\text{absorption of control})] \times 100$$

## 5. ROS 분석

세포 내 ROS 수준은 ROS에 의해 산화되어 녹색 형광을 띠는 물질로 전환되는 DCFH-DA를 이용하여 분석 하였다. UVB 처치가 완료된 세포에 10  $\mu\text{M}$  DCFH-DA를 첨가하여 30분 동안 반응시키고, 형광 분광 광도계(BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)로 excitation 485 nm, emission 530 nm 파장에서 형광 강도를 측정하였다.

## 6. TUNEL 염색

세포자멸사의 확인을 위해 TUNEL 염색을 하였다. 4 well chamber slide에  $1 \times 10^5$ /well의 농도로 세포를 배양하여 PRA (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 18 시간 동안 전처리하고 300  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ 의 세기로 UVB에 노출시킨 후 5시간 더 배양하였다. 배양세포는 formaldehyde로 고정하고 *in situ* cell death detection kit, POD (Roche, Basel, Switzerland)을 사용하여 제조회사에서 제공하는 실험방법에 의해 TUNEL 염색하였고 light microscope (Eclipse Ti-E, Nikon, Japan)로 관찰하였다.

## 7. Western blot analysis

배양세포에 protease inhibitor cocktail이 포함된 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl)를 첨가하여 4°C에서 30분 동안 lysis시켜 전세포 추출액 (whole cell lysates)을 얻었다. BCA protein assay kit로 정량한 단백질을 (30  $\mu\text{g}/\text{lane}$ )을 10%의 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 전이 하였다. 여기에 일차항체(1:1000)로 2시간 동안 처리한 후, 이차항체(1:10000)를 1시간 반응시켜 준 다음 chemiluminescence detection kit로 발광시켜 ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 단백질 밴드를 확인하였다.

## 8. Tyrosinase 저해 활성 측정

PSA의 tyrosinase 저해 활성은 tyrosinase inhibitor screening kit (BioVision, Milpitas, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. PSA를 여러 농도(1, 2, 5, 10  $\text{mg}/\text{ml}$ )

로 준비하고 kit에 포함된 guide에 따라 준비한 효소액과 혼합한 다음 효소기질을 첨가하여 30°C에서 60분간 효소 활성을 510 nm의 흡광도로 측정하였다.

### 9. 통계적 검정

실험 결과는 mean ± S.D.로 나타내었으며 유의성 검정은 윈도우용 SPSS ver. 23 프로그램을 사용하여 one way analysis of variance (ANOVA) 분석을 실시하였다. 사후 검정은 Tukey HSD를 사용하였으며, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

## III. 실험결과

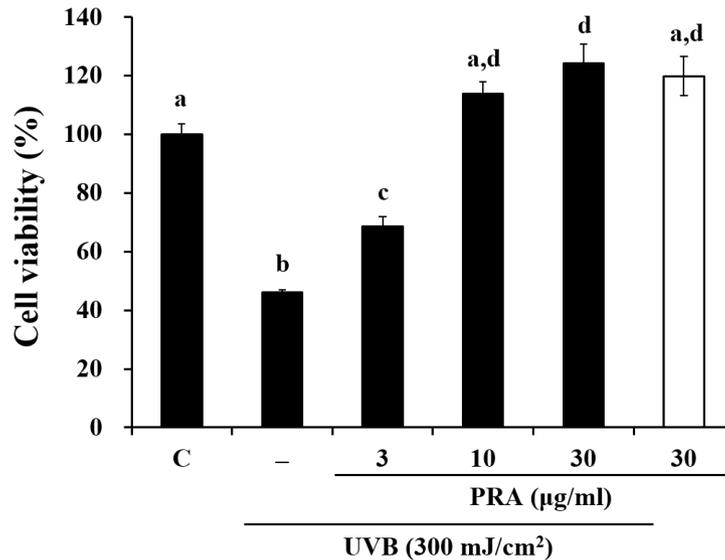


Fig. 1. Effect of PRA on UVB photodamage of human keratinocytes HaCaT cells. Cells were pre-treated with various concentrations (3, 10, 30 µg/ml) of PRA for 18 h, then exposed to UVB (300 mJ/cm<sup>2</sup>) and incubated for an additional 5 h. Different letters in a bar chart indicate statistically significant differences at  $p < 0.05$  using the Turkey's HSD test. Bars with no common letter differ significantly between groups ( $p < 0.05$ ).

### 2. UVB로 유도된 HaCaT cell의 세포자멸사에 PRA가 미치는 효과

UVB 광손상이 세포자멸사에 의한 세포 사멸을 유도하는지 확인하기 위해 TUNEL 염색법을 실시하였다. 그 결과 UVB에 의해 TUNEL 염색에 양성을 보이는 세포의 수가 확연히 증가하는 것을 관찰하였고 UVB 광

### 1. UVB 광손상에 대한 PRA의 세포 보호 효과

PRA (3–30 µg/ml)를 18시간 전처리한 HaCaT cell에 300 mJ/cm<sup>2</sup>의 세기로 UVB를 조사하여 세포의 광손상을 유도한 다음 MTT 분석법으로 세포 생존율을 조사하였다. UVB 조사는 HaCaT cell의 생존율을 급격히 감소시킴으로써 광손상을 유발하였다. 하지만 PRA를 전처리한 경우 유의하게 세포 생존율이 증가하였다 (Fig. 1). UVB 광손상에 대한 PRA의 세포 보호 효과는 농도 의존적이었으며, 30 µg/ml 농도에서 UVB만 조사된 세포와 비교하여 270 ± 10.9%의 우수한 세포 생존율을 보였다. 실험에 사용한 최고 농도의 PRA (30 µg/ml)를 단독 처리하였을 때 HaCaT cell에 대한 세포 독성은 확인되지 않았다.

손상에서 세포자멸사가 진행됨을 확인할 수 있었다. PRA 전처리는 TUNEL 양성 세포의 수를 감소시켜 세포자멸사에 의한 UVB 광손상으로부터 세포를 보호하였다 (Fig. 2A). 세포자멸사에 대한 PRA의 효과를 좀 더 살펴보기 위해 세포자멸사 관련 단백질 발현을 Western blot으로 조사한 결과 TUNEL에서와 같은 결과가 나타

났다. 즉, UVB에 의해 caspase-3와 -9의 발현이 증가하였고 PARP cleavage도 관찰되었으나 PRA 전처치에 의해 이러한 변화들이 억제되었다 (Fig. 2B). 이 결과로

부터 PRA는 caspase의 발현과 PARP cleavage를 저해함으로써 UVB에 의한 세포자멸사 억제에 기여함을 알 수 있다.

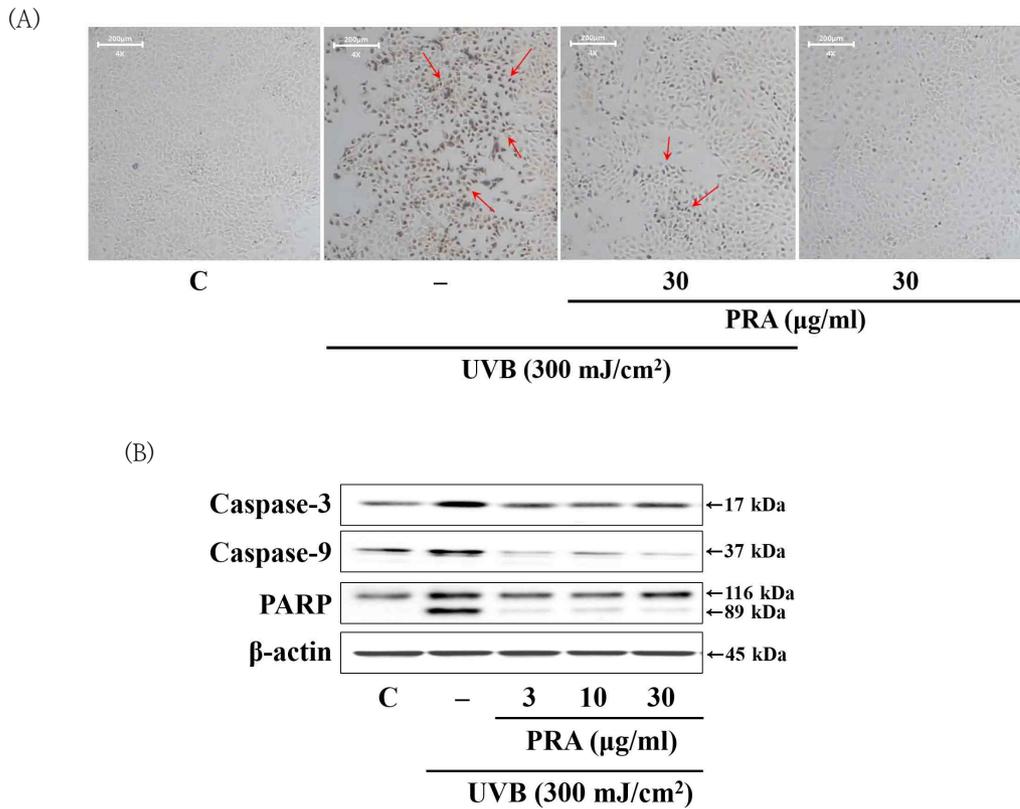


Fig. 2. Effect of PRA on UVB-induced apoptosis in HaCaT cells. (A) TUNEL assay was conducted to performed to confirm apoptosis. Arrows indicate TUNEL-positive cells. 4× magnification. Scale bar represents 200 μm. (B) The expression of apoptosis marker proteins was monitored by Western blot analysis, and β-actin was used as a loading control.

### 3. PRA가 radical 소거와 UVB에 의한 ROS 생성에 미치는 효과

UVB는 radical을 비롯한 반응성 화학종을 형성하여 피부의 광손상을 유도할 수 있으므로<sup>20)</sup> PRA가 radical 소거능을 발휘할 수 있는지 ABTS와 DPPH assay를 통해 살펴보았다. 그 결과 농도 의존적인 radical 소거능이 관찰되었다 (Fig. 3A). PRA는 2 mg/ml의 농도에서 97.3 ± 0.2%의 ABTS radical 저해능을 보여 100 μM의 ascorbic acid (86.5 ± 1.3%) 보다 우수한 효과를 나타내었다. DPPH radical 소거능 실험에서 PRA는 1과 2 mg/ml의 농도에서는 각각 83.8 ± 0.4%, 86.9 ±

0.5%의 소거능을 보여 100 μM ascorbic acid (87.3 ± 0.1%)와 비슷한 수준으로 DPPH radical을 저해하였다.

PRA의 항산화 활성을 좀 더 살펴보기 위해 세포 내 ROS 수준을 형광 흡광도로 측정하였다. Fig. 3B에서 보는 것처럼, 유의하게 증가한 형광 흡광도로부터 UVB에 의해 세포 내 ROS 생성이 증가하였음을 확인하였다. 30 μg/ml의 농도에서 PRA는 형광 흡광도 증가를 감소시켜 유의한 ROS 저해 효과를 나타내었다. 저농도 (3, 10 μg/ml)에서 PRA는 평균적으로 UVB에 의한 형광 흡광도 증가를 감소시켰지만 유의성은 나타나지 않았다.

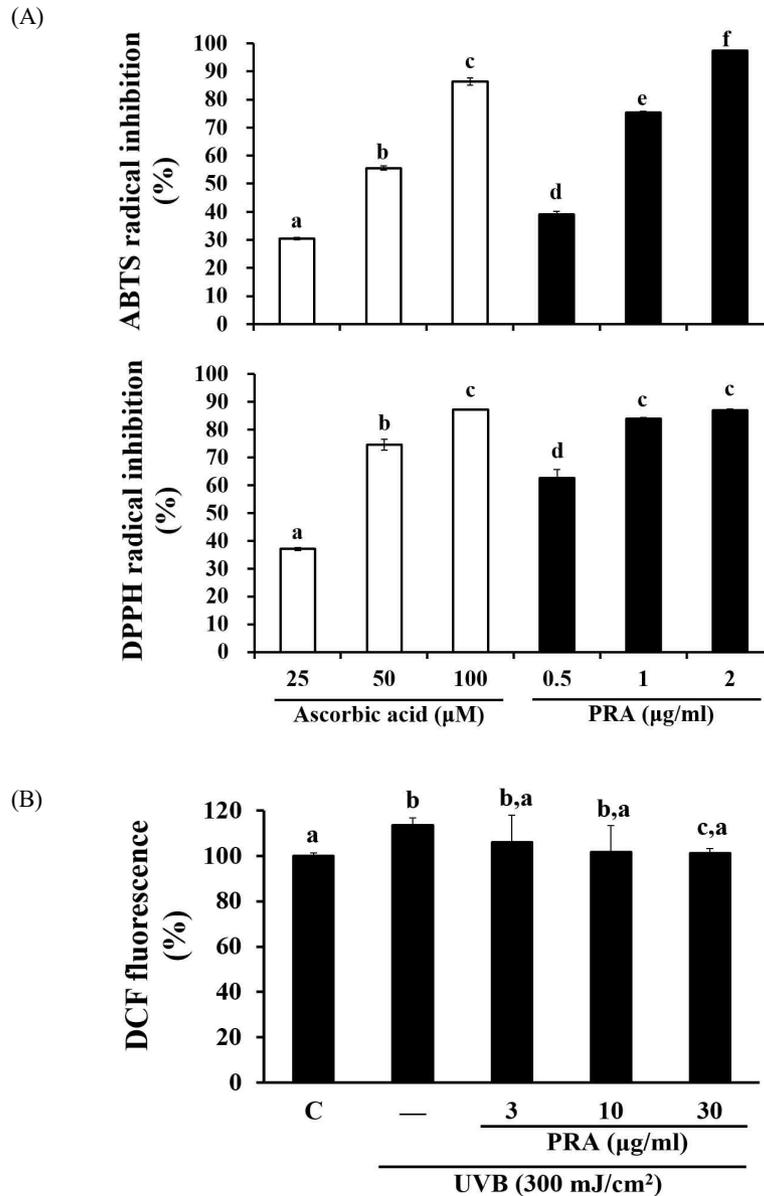


Fig. 3. Effect of PRA on radical scavenging and UVB-induced ROS production. (A) ABTS and DPPH radical scavenging activity of PRA in cell-free tests. (B) Green fluorescence generated by oxidation of DCFH-DA in the presence of ROS was measured in HaCaT cells exposed to UVB after PRA pretreatment for 18 h. Different letters in a bar chart indicate statistically significant differences at  $p < 0.05$  using the Turkey's HSD test. Bars with no common letter differ significantly between groups ( $p < 0.05$ ).

#### 4. PRA가 tyrosinase 활성 저해에 미치는 효과

피부 색소침착은 미용적인 면에서 나타나는 UVB의 부정적인 기능으로 melanin 합성의 주효소인 tyrosinase

의 과도한 활성이 하나의 원인이다<sup>7)</sup>. 따라서 tyrosinase의 활성 저해는 UVB를 포함한 광에 노출되어 그을린 피부에 대해 미백효과를 가지는 것으로 해석된다. PRA가

tyrosinase의 활성화에 어떤 효과를 나타내는지 살펴본 결과, 여러 농도(1-10 mg/ml)에서 농도 의존적인 tyrosinase 활성화 저해 효과가 관찰되었다 (Fig.4). 정상적으로 기질을 첨가했을 때의 tyrosinase 활성을 영점으로 하여 상대적인 PRA의 효과를 조사하였을 때, 10 mg/ml의 농도

에서  $37.8 \pm 0.3\%$ 의 tyrosinase 활성화 저해 효과가 나타났다. 대조물질로 사용된 kojic acid는 0.75 mM (≒ 106 mg/ml)의 농도에서  $61.4 \pm 0.9\%$ 의 활성화 저해 효과를 보였다.

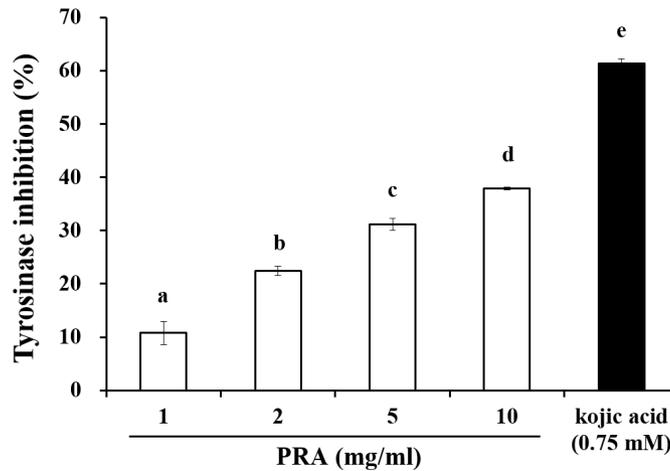


Fig. 4. Tyrosinase inhibitory effect of PRA. The effect of various concentrations (1-10 mg/ml) of PRA on tyrosinase activity was determined. Kojic acid was a tyrosinase inhibitor included in commercial kits. Different letters in a bar chart indicate statistically significant differences at  $p < 0.05$  using the Turkey's HSD test. Bars with no common letter differ significantly between groups ( $p < 0.05$ ).

#### IV. 고찰

각질형성세포(keratinocyte)는 피부 표피를 구성하는 주요 세포 중의 하나로 자외선을 포함한 환경 손상에 대하여 일차적인 보호 역할을 담당한다<sup>21</sup>. UVB는 keratinocyte 광손상의 주요 원인 인자로서 DNA 손상을 통해 세포를 사멸시키고 피부의 색소침착, 염증, 암을 유발하는데 기여한다<sup>16,17</sup>. 본 연구에서는 인간 각질형성세포주인 HaCaT cell에서 UVB 매개 광손상에 대한 PRA의 보호 효과를 확인하고자 하였다. PRA는 UVB에 의한 세포자멸사를 감소시켰고 세포 생존율을 증가시켜 광보호제 활성을 보여주었다. 또한 radical 소거능과 ROS 저해 활성이 확인되었으며 피부 색소침착에 중요한 tyrosinase 활성을 저해한다는 것이 입증되었다.

세포자멸사는 세포의 항상성을 유지하기 위한 자발적이고 규칙적인 세포 사멸 경로이며<sup>22</sup> keratinocyte에서는 UVB 노출로 생성된 산화물질이 미토콘드리아 기능 장애를 일으키고 DNA 손상 및 세포자멸사를 유도하는

것으로 보고되었다<sup>19,23</sup>. 미토콘드리아 막 전위의 손상은 caspase-9의 활성화와 관련되어 있으며<sup>24</sup>, UVB에 의한 HaCaT cell의 미토콘드리아 막 전위 소실도 보고되었다<sup>25</sup>. PRA는 UVB로 증가된 caspase-9의 발현을 저해하였고 caspase-3와 PARP cleavage도 억제하였다. 이런 항세포자멸사 효과는 TUNEL 염색으로도 확인할 수 있었다. 하지만 PRA의 caspase-9에 대한 저해효과가 미토콘드리아 기능장애와 연관된 세포자멸사를 억제하였는지를 이해하기 위해서는 미토콘드리아 막 전위에 대한 후속 연구가 더 필요하다.

단파장 UVB (280~315 nm)는 에너지가 높아 피부세포 손상, 색소침착 등 노화를 촉진시키는 물질로 radical과 ROS가 피부노화 촉진에 중요하다는 사실이 많은 연구에서 입증되었다<sup>20,26,27</sup>. 따라서 산화 스트레스는 광손상의 주요 위험인자라 할 수 있으며, UVB의 keratinocyte에 대한 광손상을 줄이기 위해 PRA가 항산화 효과를 가지는지 조사하였다. 본 연구에서 PRA는 UVB에 의한 세포내 ROS의 과다생성을 억제하였고 ABTS 및 DPPH

radical 소거활성을 나타냈다. 천연물의 radical 소거능은 종종 추출물에 함유된 polyphenol과 flavonoid 화합물의 함량과 유사하게 나타난다는 보고가 있다<sup>28)</sup>. 백작약의 주요성분으로는 polyphenol류(paeonol), terpene류(paeoniflorigenone, paeoniflorin), flavonoid류(catechin), gallate, phenylethanol 등이 있으며<sup>1)</sup>, PSA에 포함된 polyphenol과 flavonoid 화합물이 항산화 활성에 기여했는지를 설명하기 위해서는 성분연구가 더 필요하다. 정 등은 백작약 열수추출물에서 gallate와 catechin을 DPPH radical 소거능을 가진 산화 스트레스 억제 유효 성분으로 확인하였다<sup>9)</sup>.

Melanocytes에 UVB가 과도하게 조사되면 비정상적인 melanin 생성으로 피부 색소침착이 유발된다<sup>11)</sup>. Melanin 합성은 melanosome에서 이뤄지는 연쇄적이며 특이적인 효소반응으로 melanin 합성뿐만 아니라 분비에도 기능을 하는 tyrosinase가 주요한 역할을 담당한다. Tyrosine을 hydroxylation시켜 DOPA로 변환하고 DOPA를 DOPAquinone으로 산화하는 활성을 가지고 있는 tyrosinase의 활성이 저해되면 melanin 합성은 중지된다<sup>29)</sup>. 따라서 tyrosinase 활성 저해는 과도한 melanin 생성이 원인이 되는 색소침착과 같은 UVB 매개 광노화를 억제할 수 있다. 본 연구에서는 PSA의 농도의존적인 tyrosinase 저해 활성이 확인되어 UVB 광손상에 대한 보호 효과를 지닌 한약재로서의 가치가 입증되었다.

## V. 결론

본 연구에서는 백작약 에탄올 추출물(PSA)을 사용하여 인간 각질형성세포인 HaCaT cell의 UVB 매개 광손상에 대한 보호 효과를 살펴보았다. 그 결과, 항세포자멸사 및 항산화 활성으로 인해 PRA가 피부세포 보호 효과를 나타냄을 입증하였다. PRA는 PARP cleavage와 caspase-3 및 -9을 억제하여 UVB로 인한 세포자멸사를 감소시켰다. PRA의 항산화 활성은 UVB로 과다 생성된 ROS를 저해하고 ABTS 및 DPPH radical 소거능을 발휘함으로써 나타났다. 또한 PRA에 의한 tyrosinase 활성 억제 효과도 확인되었다. 이러한 결과는 UVB 광손상에 대한 PRA의 보호 효과를 명확하게 보여주며, PRA가 피부 광손상을 방지하는 효과적인 천연 제제로 사용될 수 있는 가능성을 제시한다.

## 감사의 글

이 논문은 2023년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2018R1A5A2025272).

## References

1. Kim DG, Kim MB, Kim H, Park JH, Lim JP, Hong SH. Herb Medicinal Pharmacognosy. Seoul : Shinil. 2005:383-4.
2. Oriental Pharmacology Committee. Oriental Pharmacology. Seoul : Shinil. 2006:133-4.
3. Professors of Herbal Formula in Korea. Herbal Formula. Seoul : Younglim. 2000:581.
4. Kook YB, Lee JC, Kim HS. Effects of Jakyakgamchotang Extract on the Trachea Smooth Muscle. Herb Formula Sci. 2002;10(2):143-58.
5. Gushi A, Koriyama C, Yoshinaga R, Yano H, Tsumagari J, Tahara E. Efficacy of Kampo Medicine for Acne of the Face with Nonreactive Standard Dermatological Therapy. Kampo Med. 2016;67(2):123-30.
6. Lee JY, Bae HJ, Park TS, Kim TW, Moon DH, Kwon OJ et al. Anti-oxidant and Anti-microbial Activities of Seungmakalgeuntang. J Appl Biol Chem. 2010;53(1):13-20.
7. Keum JH, Seo YS, Kang OH, Choi JG, Kwon DY. Anti-inflammatory effect of Seungmagalgeun-tang extract in human mast cells. Kor J Herbol. 2013;28(5):7-11.
8. Bae JH. Effect of Extracts from Paeonia japonica on the Growth of Food-borne Pathogens. J East Asian Soc Dietary Life. 2011;21(2):272-6.
9. Jeong IY, Lee JS, Oh H, Jung U, Park HR, Jo SK. Inhibitory Effect of Hot-Water Extract of Paeonia japonica on Oxidative Stress and Identification of Its Active Components. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2003;32(5):739-44.
10. Kim DY, Kim MK. Anti-inflammatory Effect of Paeonia japonica Extracts in HaCaT cells. J Invest Cosmetol. 2019;15(3):247-54.



11. Kim JH, Kimm EJ. Evaluation of Anti-oxidative, Anti-thrombin, Anti-invasive and Pro-apoptotic Activities of *Paeonia japonica*. *Korean J Plant Res.* 2018;31(1):16-23.
12. Kim MY, Yoon BY, Ko KS. Study on Cosmeceutical Activities of *Paeonia japonica* Ethanol Extracts. *J Kor Soc Cosmetol.* 2016;22(4):818-23.
13. Lee JC, Park SY, Choi JH, Kim JH. Effects of *Paeoniae radix alba*(PRA) on Skin whitening and Elasticity using Melanoma cells. *JKOOD.* 2012; 25(1):1-11.
14. Amaro-Ortiz A, Yan B, D'Orazio JA. Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation. *Molecules.* 2014; 19(5):6202-19.
15. Murayama N, Murayama K. Data on substantial gravity of carbon dioxide due to pressured metered-dose inhaler steroid treatments for the 2006 year in Japan. *Data Brief.* 2018;20:1580-6.
16. Bessou S, Surlève-Bazeille JE, Sorbier E, Taïeb A. Ex vivo reconstruction of the epidermis with melanocytes and the influence of UVB. *Pigment Cell Res.* 1995;8(5):241-9.
17. Yardman-Frank JM, Fisher DE. Skin pigmentation and its control: From ultraviolet radiation to stem cells. *Exp Dermatol.* 2021;30(4):560-71.
18. Catani MV, Rossi A, Costanzo A, Sabatini S, Levrero M, Melino G, Avigliano L. Induction of gene expression via activator protein-1 in the ascorbate protection against UV-induced damage. *Biochem J.* 2001;356(Pt 1):77-85.
19. Yoon SD, Baek WK, Kim SP, Lee KS, Cho JW. Induction of Apoptosis and Autophagy in UVB-Treated HaCaT Cells. *Korean J Dermatol.* 2013; 51(8):600-7.
20. Tyrrell RM. Ultraviolet radiation and free radical damage to skin. *Biochem Soc Symp.* 1995;61:47-53.
21. Eckhart L, Zeeuwen PLJM. The skin barrier: Epidermis vs environment. *Exp Dermatol.* 2018;27(8):805-6.
22. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495-516.
23. Paz ML, González Maglio DH, Weill FS, Bustamante J, Leoni J. Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2008;24(3):115-22.
24. Samraj AK, Sohn D, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Loss of caspase-9 reveals its essential role for caspase-2 activation and mitochondrial membrane depolarization. *Mol Biol Cell.* 2007;18:84-93.
25. Wang CB, Huang MQ, Tao GL, Yu GY, Han ZW, Yang ZH, Wang YJ. Polypeptide from *Chlamys farreri* protects HaCaT cells from UVB-induced apoptosis. *Chem Biol Interact.* 2004;147(2):119-27.
26. Masaki H, Atsumi T, Sakurai H. Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;206(2):474-9.
27. Dwivedi A, Mujtaba SF, Kushwaha HN, Ali D, Yadav N, Singh SK et al. Photosensitizing mechanism and identification of levofloxacin photoproducts at ambient UV radiation. *Photochem Photobiol.* 2012; 88(2):344-55.
28. Shalaby EA, Shanab MM. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian J Geo-Marine Sciences.* 2013;42(5):556-64.
29. Rescigno A, Sollai F, Pisu B, Rinaldi A, Sanjust E. Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2002;17(4):207-18.