



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

안 홍 석 교수지도
박사학위 청구논문

SKH-1 생쥐에서 UVB 조사에 의한
육미지황탕의 광노화 피부 억제에 관한
연구

2013년

성신여자대학교 대학원
식품영양학과
전혜숙

SKH-1 생쥐에서 UVB 조사에 의한
육미지황탕의 광노화 피부 억제에 관한
연구

안 홍 석 교수지도

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2013년 5월

성신여자대학교 대학원
식품영양학과
전혜숙

인 준 서

전혜숙의 박사학위 논문으로 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

성신여자대학교 대학원

논문개요

보음제의 대표적인 처방이며, 항산화, 아토피피부염 관련 제반 증상 완화 및 면역조절을 통한 항염증 효과 등에 효과가 있다고 보고된 육미지황탕의 광노화 억제효과를 생화학적, 형태학적 및 분자생물학적으로 관찰하여 광노화 피부 억제와 관련된 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 과학적으로 검증하고자 하였다.

UVB를 4주간 반복적으로 조사한 SKH-1 hairless 마우스에 육미지황탕 추출물을 투여하거나 도포한 후 형태학적인 관찰을 위하여 피부노화와 관련된 피부주름의 육안적인 변화, 표피 상피세포의 두께, 진피층의 교원섬유(collagen fiber), 비만세포의 수적 변화 및 광노화 피부관련 인자들의 면역조직화학적 변화를 관찰하였다. 생화학적인 관찰을 위하여 human keratinocyte cell line인 HaCaT cell에 UVB를 조사하여 자극한 후 유해산소를 생성하는 효소인 XO 생성량의 변화, 유해산소를 제거하는 효소인 SOD와 catalase의 활성도를 관찰하였고, 자유라디칼 소거능 등 활성산소종 관련 인자들을 관찰하였다. 분자생물학적인 관찰을 위하여 HaCaT cell에서 광노화 피부와 관련된 염증 및 주름과 연관된 인자들의 mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 IL-1 β , TNF- α , human MMP-9 및 MMP-3의 발현을 관찰하였다.

육미지황탕 투여군(YM-O)군과 육미지황탕 투여후 도포군(YM-OA)에서의 육안적인 관찰소견은 대조군에 비하여 잔주름의 소실이 감소하였고, 깊고 굵은 주름도 대조군에 비하여 미약하게 관찰되었다. YM-O군과 YM-OA군에서의 조직학적 관찰은 대조군에 비해 상피세포층이 유의성 있게 현저히 감소하였으며, 진피층내 염증세포의 수도 대조군에 비해 현저히 감소하였다. YM-O군과 YM-OA군의 진피의 유두층에서는 대조군에 비해

aniline blue와 acid fuchsin에 강하게 염색된 교원섬유가 띠모양으로 진하게 관찰되었다. YM-O군과 YM-OA군의 등쪽과 귀에서 피부의 진피층내 비탄세포는 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다.

YM-O군과 YM-OA군에서 피부조직내 MMP-2와 MMP-3의 발현은 표피 상피세포층과 진피층에서 대조군에 비해 미약하게 발현되었으며, VEGF와 EGF도 각각 피부 상피세포층과 진피층에서 대조군에 비해 미약하게 관찰되었다.

UVB를 조사한 HaCaT 세포에 육미지황탕 추출물을 농도별로 첨가한 후 XO의 생성량을 관찰한 결과 XO는 육미지황탕 추출물 투여군이 대조군에 비해 농도의존적으로 유의성있게($p < 0.01$) 감소하였다. SOD는 HaCaT cell lysate에서 육미지황탕 추출물 투여군이 대조군에 비해 농도 의존적으로 유의성 있게($p < 0.05$) 증가하였고, catalase도 HaCaT cell lysate에서 육미지황탕 추출물 투여군이 대조군에 비해 농도 의존적으로 유의성있게($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 증가하였다.

육미지황탕(YM)의 자유라디칼 소거 능력은 10-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 활성도가 증가함을 관찰하였고, UVB의 조사에 의한 활성산소종(ROS)의 생성도 육미지황탕의 농도에(10, 50, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 비례하여 유의성 있게 억제되었다($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$).

육미지황탕(YM)의 HaCaT 세포에서의 MMP-9의 분비에 대한 효능은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 현저하게 감소함을 확인하였고, MMP-9의 활성은 직접적으로 YM에 의하여 감소되지 않음을 확인할 수 있었다. 염증 및 주름과 연관된 유전자의 발현은 YM의 농도에 비례하여 MMP-9의 발현은 감소시켰으나, 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 의 발현은 현저히 감소시키지는 않았다.

이상의 실험 결과로 육미지황탕은 자외선에 의한 광노화피부를 야기하는 여러 가지 인자들의 활성을 억제 할 것으로 사료되어 광노화에 의한 피부손

상을 예방할 수 있는 생리활성이 있는 기능성 화장품소재로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

목 차

논문개요

I. 서 론	1
II. 이론적인 배경	5
1. 피부	5
2. 피부노화	5
3. 육미지황탕	10
III. 재료 및 방법	12
1. 시약 및 기기	12
2. 시료 제조	13
3. 실험동물 및 처치	14
4. 피부노화 유발 및 시료 도포	15
5. 피부 최소홍반도 측정	16
6. 피부조직의 형태학적 관찰(In vivo)	16
1) 육안적 관찰	16
2) 광학현미경 관찰을 위한 피부조직의 일반 및 특수염색	16
3) 피부조직의 면역조직화학적 염색	17
7. HaCaT cells을 이용한 시험관내 실험(In vitro)	19
1) 세포배양	19
2) 세포생존율 측정	19
3) Ultraviolet B(UVB) 조사	20
4) 유해산소 대사 활성도 측정	20
(1) Xanthine oxidase(XO) 생성량 변화	20
(2) Superoxide dismutase(SOD)의 활성 변화	21

(3) Catalase의 활성 변화	22
5) 라디칼소거능 측정(DPPH)	23
6) 세포내 reactive oxygen species(ROS) 생성 측정	24
7) Gelatin zymography assay	24
8) 총 RNA의 추출과 RT-PCR	25
8. 자료분석	27
IV. 결 과	28
1. 육안적 피부주름 관찰조건	28
2. 피부의 일반적인 조직학적인 변화 관찰	29
1) H&E stain	29
2) Masson's trichrome stain과 Van Gieson's stain	32
3) 피부 비만세포의 수적변화 관찰	34
3. 피부의 면역조직화학적인 변화 관찰	38
1) Matrix metalloproteinase(MMP)-2와 MMP-3	38
2) Vascular endothelial growth factor(VEGF)	40
3) Epidermal growth factor(EGF)	41
4. 세포생존율에 미치는 효과	43
5. 시험관내 유해산소 대사활성도 변화	44
1) 육미지황탕의 xanthine oxidase(XO) 생성량의 변화에 미치는 영향	44
2) 육미지황탕의 superoxide dismutase(SOD)의 활성에 미치는 영향	45
3) 육미지황탕의 catalase의 활성에 미치는 영향	46
6. 자유라디칼 소거능(DPPH assay)	47
7. 육미지황탕(YM)의 세포내 활성산소종(ROS) 생성 억제효과	48
8. HaCaT 세포에서 MMP-9의 분비에 대한 억제효과	49
9. HaCaT 세포에서 염증 및 주름과 연관된 인자의 mRNA 발현에 미치는 영향	51
V. 고 찰	53

VI. 결 론 64

참고문헌

ABSTRACT

List of Tables

Table 1. The composition of Yukmijiwhangtang prescription.	14
Table 2. Oligonucleotide primers used for PCR in this study	27

List of Figures

Fig. 1. Photographs showing skin wrinkles of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N).	28
Fig. 2. Histological changes in the skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(H&E stain, x200).	30
Fig. 3. Changes of epidermal thickness in the skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N).	31
Fig. 4. Histological changes in the skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(H&E stain, x200).	32
Fig. 5. Histological changes in the skin of SKH-1 mice exposed to 4	

weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(Masson's trichrome stain, x200).	33
Fig. 6. Histological changes in the skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N) (Van Giesson's stain, x200).	34
Fig. 7. Numerical changes of mast cells in the dorsal skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N).	35
Fig. 8. Histological changes of mast cells in the dorsal skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(Toluidine blue stain, x200).	36
Fig. 9. Histological changes of mast cells in the ear skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N) (Toluidine blue stain, x200).	37
Fig. 10. Immunohistological changes of MMP-2 in skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group (N)(MMP-2 immunohistochemical stain, x400).	39

Fig. 11. Immunohistological changes of MMP-3 in skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(MMP-3 immunohistochemical stain, x400).	40
Fig. 12. Immunohistological changes of VEGF in skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(VEGF immunohistochemical stain, x400).	41
Fig. 13. Immunohistological changes of EGF in skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(EGF immunohistochemical stain, x200).	42
Fig. 14. Cytotoxic effect of Yukmijiwhangtang extracts(YM) on HaCaT cells.	43
Fig. 15. Inhibitory effects of Yukmijiwhangtang extracts(YM) on the activity of xanthine oxidase(XO) in HaCaT cells induced by UVB irradiation.	44
Fig. 16. Effects of Yukmijiwhangtang extracts(YM) on the activity of superoxide dismutase(SOD) in HaCaT cells induced by UVB irradiation.	45
Fig. 17. Effects of Yukmijiwhangtang extracts(YM) on the activity of catalase in HaCaT cells induced by UVB irradiation.	46

Fig. 18. Yukmijiwhangtang extracts(YM) scavenges free radicals.	47
Fig. 19. Yukmijiwhangtang extracts(YM) suppresses intracellular ROS generation.	48
Fig. 20. Inhibitory effect of YM on MMP-9 expression in UVB - stimulated HaCaT cells.	50
Fig. 21. YM down-regulates the expression of various inflammatory and wrinkle associated genes.	51

I. 서론

최근 인체의 건강이나 피부미용에 대한 관심이 크게 높아지면서 내적요인 뿐만 아니라 자외선 등 외적요인에 의한 피부 노화 억제 또는 노화 개선을 위한 목적으로 화장품, 식품 및 의약품을 비롯한 다양한 분야에서 항노화 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 또한 웰빙의 열풍으로 인해 실내 활동의 증가, 생명의 연장, 많은 여가 생활 등 자외선으로부터 피부를 보호하고 유지하려는 노력이 증가하는 추세이므로 광노화 피부에 대한 연구는 향후 더욱 관심의 대상이 되고 있다.

피부 노화는 나이가 증가하면서 개인의 유전적인 요인에 의하여 발생하는 내재적인 노화(intrinsic aging)와 자외선이나 외부 물질의 자극 등에 의한 산화적 스트레스에 의하여 발생하는 광노화(photoaging)로 나눌 수 있다 (Meinhard et al., 2001).

광노화 피부는 태양광선 중의 자외선에 노출되었을 때 발생하는 임상적, 조직학적 및 기능적으로 특징적인 증상을 나타내며, 자외선에 의한 만성적인 노출로 피부의 구조와 기능에 부작용을 초래하며, 자외선의 종류와 조사량에 따라 피부에 나타나는 고유한 병태생리학적 특징을 나타낸다. 피부노화의 가장 주된 원인 중 하나인 자외선에 오래 노출되면 피부에 화상, 면역억제, 암 및 조기노화(premature aging)와 같은 손상을 입히고 있다 (Cooper et al., 1992). 태양광선에 지나치게 노출되면 급성으로 화상과 면역억제 현상을 일으키고, 반복적으로 노출되면 지속적인 손상에 의하여 피부암이나 광노화(photoaging)를 초래한다(Fisher et al., 1997).

광노화 된 피부에서 나타나는 특징적인 증상은 주름형성, 피부늘어짐, 색소침착, 갈색반점 및 피부가 가죽같이 두꺼워진다(Gilchrest and Yaar, 1992). 그러나 태양광선으로부터 보호받은 노인성 노화피부(chronologically aged skin)는 광노화 된 피부와는 대조적으로 탄력이 감소하고, 반

점이 없으며, 매끄럽고 얇은 피부의 특징을 나타낸다(Lavker, 1995).

자외선은 파장의 종류에 따라 피부에 침투하는 부위에 차이가 있어 ultraviolet B(UVB)는 파장이 280-320nm로 대체로 표피에서 흡수되므로 표피상피(각질세포)에 영향을 미치며, ultraviolet A(UVA)는 파장이 320-400nm로 보다 심층부위에 침투하여 표피의 각질세포와 진피의 섬유아세포(fibroblast)에 영향을 미친다. UVA는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성, 지질의 과산화(lipid peroxidation), 전사인자(transcription factor)의 활성화 및 DNA가닥의 절단(DNA strand break)을 일으켜 피부노화를 촉진시킨다(Berneburg et al., 2000). Ultraviolet B(UVB)는 피부 세포내 활성산소를 생성하여 직접 DNA의 손상을 일으켜 항산화 방어체계의 불균형에 의한 산화적 스트레스를 유발시키고, 또한 기질금속 단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMPs)의 활성을 증가시켜 결합조직성분의 분해, 절단 및 비정상적인 교차결합에 의하여 주름을 생성시킨다(Afaq, 2007; Park and Lee, 2008; Berneburg et al., 2000)

자외선에 의해 생성된 활성산소종은 피부 세포 내의 여러가지 신호전달체계를 활성화시킴으로써 기질금속 단백분해효소(MMPs)와 같은 구조단백질 분해효소를 증가시켜 콜라겐의 생성 및 탄력섬유의 합성을 감소시켜 피부주름을 생성하는 광노화의 주된 원인이 되는 것으로 알려져 있다(Berneburg et al., 2000). 자외선에 노출될 때 가장 현저하게 나타나는 특징은 변성된 탄력섬유가 많은 부위에 나타나는 elastosis(탄력섬유증)으로서 일반적으로 진피의 유두층과 망상층의 이행부위에서 시작된다(Lavker, 1979; Kligman et al., 1986; Kligman, 1969). 다른 특징으로는 성숙한 교원섬유(collagen fiber)가 호염기성의 collagen으로 대체되는 basophilic degeneration(호염기성 퇴행)이 일어나거나, 진피의 세포외 기질단백질(dermal extracellular matrix protein)인 glycosaminoglycan(Smith et al., 1962), elastin(Smith et al., 1962)과 분절된 탄성섬유(fragmented elastic fiber)의 축적

이 증가된다(Mitchell, 1967; Chen et al., 1986).

최근에는 피부노화의 기전에 대한 연구가 활발하여 새로운 피부노화 억제제나 치료제 개발을 위한 연구가 많이 진행되고 있으나 대부분 유기합성에 의하여 개발된 비타민 유도체가 많이 사용되고 있다(박창민 등, 2008). 이러한 유도체들은 분자 자체가 매우 불안정하며, 많은 양이 피부에 유입되면 강한 피부자극을 유발하게 되고, 적은 양이라도 사람의 체질에 따라 민감한 반응을 일으킬 수 있으므로 피부노화의 징후인 주름개선과 예방을 위하여 부작용이 적은 기능성 소재를 천연물에서 찾으려고 하고 있다(Wyss, 1995; Weiss et al., 1988; Gary et al., 2002).

국내에서도 hairless mice나 인체 피부세포를 이용하여 피부내 부작용이 적은 천연 식물소재에서 피부노화 억제와 관련된 기능성 물질을 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Kim et al., 2009; 전테레사 등, 2011; Lee et al., 2012; 이회경, 2012; 오수정과 모정희, 2011; 오경동과 김호철, 2011).

임상적 또는 실험적으로 다양한 분야에 활용되고 있는 처방인 육미지황탕은 산수유, 백봉령, 택사, 숙지황, 구기자, 목단피 등 6종의 약재로 구성되어 있으며, 지금까지 임상에 널리 활용되고 있다. 육미지황탕의 실험적 연구로는 면역기능(정다영 등, 2010), 아토피피부염(조재훈과 김윤범, 2009), 항염작용(이귀희와 유동렬, 2012) 등에 대하여 보고하였고, 또한 노화 흰쥐에서 과산화지질의 생성억제와 대사효소계에 긍정적인 영향을 미친다는 보고(윤철호, 1995; 윤일지, 1998)와 활성산소 분해계 효소활성 증가(정지천, 1996)에 의한 항산화 기능이 있다고 보고하였다.

이에 본 연구에서는 보습제의 대표적인 처방인 육미지황탕이 항산화, 아토피피부염 관련 제반 증상 완화 및 면역조절을 통한 항염증 효과 등에 효과가 있다고 보고되고 있으므로, UVB를 반복적으로 조사한 hairless 마우스에 육미지황탕 추출물을 투여하거나 도포한 후 피부노화 억제와 관련된

인자들에 미치는 변화를 생화학, 형태학 및 분자생물학적으로 관찰하여 광노화 피부 억제와 관련된 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 과학적으로 검증하고자 하였다.

II. 이론적인 배경

1. 피부(skin)

피부는 표피(epidermis)와 진피(dermis)로 구성되며, 표피는 피부의 제일 바깥층으로서 피부를 보호하는 상피층으로 구성되었으며, 표피 아래의 진피는 표피를 기계적으로 지지하는 지지층인 결합조직으로 구성되어있다. 진피의 세포외기질(extracellular matrix)은 주로 type I collagen으로서 피부에 장력과 탄력을 제공하며, 일부 type III collagen, 엘라스틴, 단백당 및 fibronectin 등으로 구성되어있다(Uitto, 1993). 진피는 세포와 물을 제외하면 세포외기질이 대부분을 차지하고 있으며, 이 기질에는 단백질과 복합당으로 구성된 무형질(ground substance)과 정렬된 망상의 섬유가 배열되어 다양한 기능을 수행하고 있다. 이러한 단백질과 당은 비활성의 구조적인 물질이지만 세포의 성장, 이주 및 자신의 분비산물을 조절하는 신호로서 작용한다. 진피층의 세포외기질은 각질세포, 염증세포 및 섬유아세포에서 분비한 성장인자와 같은 다양한 자극에 의하여 섬유아세포에서 합성된다. 진피의 섬유아세포는 세포외기질 분자가 주위의 환경에 반응하는데, 태양광선과 같은 물질적인 요인들은 진피의 세포외기질의 형태와 성분들을 변화시킨다(Bernstein and Uitto, 1996).

2. 피부노화(skin aging)

피부의 노화는 나이가 증가하면서 개인의 유전적인 요인에 의하여 발생하는 내재적인 노화(intrinsic aging)와 자외선이나 외부 물질의 자극 등에 의한 산화적 스트레스에 의하여 발생하는 광노화(photoaging)로 나눌 수 있

다(Meinhard et al., 2001). 내재적인 노화(intrinsic ageing)는 공통적으로 모든 생물체에서 기본적으로 일어나는 생물학적인 기전으로서 나이가 증가함에 따라 피부의 구조와 기능이 퇴행하면서 피부가 건조하고, 잔주름이 생기며, 탄력이 감소하는 임상적인 특징을 나타내고, 조직학적으로는 표피가 위축되거나 표피-진피 결합부위가 편평해지는 특징을 나타낸다(Lavker, 1979). 광노화(photoageing)는 태양광선에 장기간 노출되었을 때 조기에 주름이 형성되는 노화현상(premature ageing)이 일어나, 피부에 잔주름과 굵은 주름이 생기고, 거칠어지는 피부결, 불규칙한 색소침착, 모세혈관확장증(telangiectasis) 및 종양형성 등과 같은 여러 가지 임상적인 특징을 나타내고(Gilchrest, 1989; Griffiths, 1992), 조직학적으로는 세포이형성(cellular atypical), 세포극성의 소실, 표피-진피 결합부위의 편평해짐, 콜라겐 감소 및 진피의 탄력섬유증과 같은 조직학적인 특징을 나타낸다(Lavker, 1979; Kligman et al., 1986).

노화된 피부는 피부에 주름을 형성하고, 늘어지게 하며, 가죽과 같은 모습을 나타내는 임상적인 특징을 나타내는 광노화(actinic aging)의 증상들은 진피 결합조직의 조직학적 및 미세구조적 변화와 밀접한 관계가 있다. 효소에 의한 분해와 신생 콜라겐합성의 감소와 같은 변화들은 조기에 피부 주름을 형성하게 한다. 히알루로난(hyaluronan)과 단백당질(proteoglycan)과 같은 기질의 변화는 수분함량을 감소시켜 더욱 피부를 늘어지게 한다. 뿐만 아니라 UV에 의한 세포외기질의 재구성(remodeling)에 의하여 진피 섬유아세포의 재생능력과 같은 세포 표현형에 많은 영향을 미친다(Röck and Fischer, 2001). 최근에는 UV에 의하여 유발된 세포외기질의 분자 및 세포학적 기전을 이해하는 데에 많은 진전된 연구가 진행되었으며, 이 분야의 새로운 연구 결과들은 진피노화(dermal aging)에 대하여 관심을 갖게 하여 광노화의 치료를 위한 새로운 목표와 전략을 제공하였다.

자외선에 의하여 생성된 활성산소종은 콜라겐, 엘라스틴 및 글라이코스아

미노글리칸과 같은 세포외기질의 구조적, 기능적인 변화를 야기한다. 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에는 $^1\text{O}_2$ (singlet oxygen), H_2O_2 (hydrogen peroxide)와 같은 비라디칼종과 O_2^- (superoxide anion), OH (hydroxyl radical)와 같은 산소중심의 라디칼(free radicals), 그리고 생체성분과 활성산소종과의 반응에서 유래된 ROO(alkyl-peroxyl radical), RO(alkoxy radical), ROOH(alkyl-hydroperoxide) 등이 있다 (Barry, 1987). ROS의 생성은 호기적인 상황에서의 생명현상과 관련되어 있으며 병적인 상태나 생리적인 상황에서 생성된다. 생체내에서 과잉의 ROS가 생성되면 암, 심혈관질환, 고혈압, 당뇨, 퇴행성신경질환 및 노화와 같은 질병을 유발시킨다(Kehrer, 1993). 피부는 ROS 생성을 촉진하는 불포화지방산이 풍부하고 고산소분압 및 자외선에 노출되므로 ROS에 의하여 쉽게 손상을 받는다(Pillai et al., 2005). 피부에는 자유기(free radical)와 같은 ROS를 방어하는 항산화 방어체계가 발달되어 있어 ROS에 대한 보호작용을 한다. 그러나 많은 양의 자외선에 노출되면 계속된 ROS의 공격에 의하여 방어체계가 무너져 자유기에 의하여 세포내 단백질, 지질 및 DNA의 손상과 같은 산화적 스트레스를 일으킨다(Kehrer 1993; Aruoma 1994). 이러한 산화적 스트레스에 의하여 생성된 ROS는 세포자멸사(apoptosis) 또는 괴사(necrosis)에 의하여 세포를 사멸시킨다(Fishers et al., 1999). 특히 축적된 ROS는 피부 진피층의 결합조직에 심각한 손상을 일으켜 내재적인 노화나 광노화를 유발시키기 때문에 여러가지 피부암이나 다른 피부 염증질환을 일으킬 가능성이 높다(Record et al., 1991; Kawaguchi et al., 1996).

피부가 자외선에 노출되면 진피층의 섬유아세포에서의 교원질(collagen)의 생산이 감소하는데, 이는 자외선에 의하여 진피층에 존재하는 기질 단백질 분해 효소인 matrix metalloproteinases(MMPs)의 활성이 증가하여 기질 단백질의 분해를 촉진시켜 교원질 결핍에 의한 피부주름을 형성하고 탄

력을 감소시켜 노화를 촉진시킨다고 알려졌다(Chung et al., 2001; Gilchrest, 1996; Fisher et al., 1996; Kiss et al., 1991).

MMPs는 세포외기질의 재구성(remodeling)에 관여하는 Zn 의존성 펩티드내부가수분해효소(endopeptidase)로서 형태발생(morphogenesis), 혈관신생(angiogenesis), 관절염, 피부궤양(skin ulcer), 종양 침입 및 전이에 관여하는 중요한 역할을 한다(Birkedal-Hansen, 1995). 정상적인 피부에서는 저농도의 MMPs가 내재적인 억제제와 결합되어 불활성화 형태로 존재하며, 자외선 조사나 염증반응 및 정상적인 노화가 일어날 때에는 MMPs가 활성화되어 세포외기질의 분해를 증가시킨다(Pillai et al., 2005). 현재까지 알려진 MMPs 군은 collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins 및 membrane-type MMPs 5군으로 알려졌으며, 콜라겐, 단백당(proteoglycan), 당단백(glycoprotein)의 분해에 관여한다(Kligman et al., 1986).

MMPs는 사람의 섬유아세포(Herrmann et al., 1993; Kawaguchi et al., 1996; Brenneisen et al., 1998)와 사람의 피부(Koivukangas et al., 1994; Fisher et al., 1996)를 이용한 실험에서 자외선 조사에 의하여 MMP-1, MMP-2, MMP-3 및 MMP-9가 증가되기 때문에 광노화와 관련이 있으며, 특히 Fisher 등(1996)은 매우 낮은 강도의 UVB에 노출된 사람의 피부에서도 MMPs는 증가하기 때문에 MMPs는 UV에 유발된 노화인자(aging factors)라고 하였다. MMPs는 불활성화 된 zymogen (proMMP)으로 분비되며, 제 기능을 하기 위해서는 활성화(active MMP) 되어야한다. proMMP 합성을 자극하는 것은 대체로 성장인자(growth factor) 또는 사이토카인(cytokines)에 의한 전사수준에서 조절된다(Reynolds, 1996).

UVB(290-320nm) 조사 후 화상이 일어나기 시작할 때 나타나는 부종 및 홍반과 같은 급성염증은 피부 비만세포에서 분비하는 히스타민이 중요한 매개 기능을 한다(Gilchrest et al., 1981). 사람의 피부에 자외선을 노출한

후 1시간째에는 비만세포 탈과립과 관련된 정맥주위의 부종들이 나타나기 시작하며, 조사 후 3-4시간째에는 홍반(erythema)이 일어나기 시작한다(Hart et al., 2000). UVB 조사량의 10% 이하 정도가 진피에 전달되어 피부의 비만세포가 간접적으로 UVB에 자극받아 탈과립되며, 또한 표피에 있는 UVB 광수용체에서 면역억제 신호가 개시된다(Hart et al., 2000). 비만세포 탈과립에 의하여 방출된 히스타민은 피부 비만세포의 주요 생체아민(biogenic amines)으로서 홍반반응시 중요한 기능을 하며(Pentland et al., 1990), 히스타민은 UVB에 의한 전신성 면역조절을 개시하기위한 경로에서 결정적인 역할을 한다(Hart et al., 1998). UVB 조사에 의한 비만세포 활성화는 많은 양의 미리 형성된 TNF- α 를 방출하게 하여 2시간내에 피하 내피세포에 대한 CD54와 CD62E 부착분자를 유도한다(Walsh, 1995). 진피에 있는 혈관의 활성화와 함께, 조사된 피부로 염증세포의 이동을 증가시켜 태양광선으로 인한 화상에 반응한다. 또한 TNF- α 는 UV 조사된 피부에서 림프절로 랑거한스세포(Langerhans cells)의 이주를 조절한다(Moodycliffe et al., 1994). 히스타민은 각질세포에 영향을 미칠 뿐만 아니라 직접 UV가 조사된 부위(Laberge et al., 1995) 또는 인접한 림프절로 면역세포를 이동시켜 림프구 증식과 여러 가지 사이토카인의 방출을 조절한다(Lagier et al., 1997).

피부노화와 관련된 국내의 연구동향은 동물, 사람유래 각질세포 및 진피의 섬유아세포에 자외선을 조사하여 광노화를 유발시킨 후 천연물인 녹차(양규환, 1997; 정진호, 2001), 홍차(전데레사, 2011), 적송엽(박성규 등, 2005), 인삼열매(염명훈 등, 2010), 누룩(Lee et al, 2012), 치자(형순희, 2008), 애엽(박시향 등, 2008), 황백(배인순, 2008) 등의 추출물이나 분획물의 항산화, 항염 등의 피부보호 및 노화억제 효과 규명에 대한 연구가 주류를 이루고 있다. 피부노화에 관한 연구는 생화학적으로 자유라디칼 소거능, 활성산소종 생성 억제능 및 MMPs 생합성 억제능 등을 관찰하였고, 형태학

적으로는 광학현미경적 관찰을 위해 일반 및 특수염색을 시행하여 표피상피 세포, 진피의 아교섬유와 탄성섬유의 변화를 관찰하였다. 면역조직화학 염색에 의하여 MMPs의 발현, nuclear factor-kappa B(NF- κ B)의 활성화, iNos, P53, HSP70 등 산화적 스트레스 및 염증억제 등과 관련된 인자들의 변화를 관찰하였다. 또한 분자생물학적으로 탄력소 유전자 발현량, MMPs 발현, NF- κ B 및 activator protein(AP)-1과 같은 전사인자 활성화도 등에 관한 연구가 진행되었다.

피부노화와 관련된 국외의 연구동향은 사람, 실험동물 및 사람 유래 피부 세포를 이용하여 MMPs, MAP kinases, COX-2 발현억제 기전, reactive oxygen species(ROS) sensitive signaling pathway에 의한 천연물의 각질세포 보호, 항염, 광노화억제 효과 등을 관찰하였다(Quan et al., 2009; Wen et al., 2012). 또한 광노화 피부에서 ROS, 염증, 단백질분해효소의 활성화와의 관계, 자외선과 transforming growth factor-(TGF-)/Smad signaling과의 관계, MMPs의 분자생물학적 기전, AP-1과 NF- κ B 전사인자활성, 자외선에 의한 염증반응과 신경내분비계통과의 관계에 대한 연구가 진행되고있다(Pallea et al., 2010; Valko et al., 2007; Fisher et al., 1996; Wen et al., 2012)

3. 육미지황탕(Yukmijihwangtang)

육미지황탕은 동의보감(허준, 1983)에 "治虛勞腎氣衰弱久新憔悴寢汗"라 하였고, 본초학(생약학교수협의회, 1994)에서는 滋補肝腎, 清虛熱, 利濕이라 하여 만성 소모성 질환, 대사성 이화작용 항진, 내분비기능 실조 등에 補肝 및 補腎劑로 사용해왔다. 육미지황탕은 숙지황, 산수유, 산약, 택사, 목단피, 복령으로 구성되며, 약물의 효능은 熟地黃은 滋陰補血, 益精填髓하고 山茱萸는

補益肝腎, 澀精固脫하고 山藥은 健脾, 補肺, 固腎, 益精하고 澤瀉는 利水滲濕, 腎中瀉火하며 熟地黃의 滋膩를 방지하고 牡丹皮는 清熱涼肝, 瀉陰中之伏火하고 茯苓은 山藥을 助하여 補脾하고 澤瀉를 助하여 利水한다고 하였다(한의과대학 방제학교실, 2003).

육미지황탕은 腎氣虛乏으로 인한 腎怯失音, 腦開不合, 腎不足, 目中白睛多 등에 응용되는 방제로서(錢乙, 1983) 이에 대한 연구로는 카드뮴 중금속에 의한 간보호 효과(서은실과 임종필, 2000), 면역(정다영 등, 2010; 전진오와 정현우, 2000), 항염(이귀희와 유동열, 2012), 항산화(문성식 등, 2003; 정지천, 1996; 윤철호, 1995; 윤일지, 1998) 및 아토피(조재훈과 김윤범, 2009) 등에 관한 연구가 이루어졌다.

신장의 기능은 노화와 수명연장과 관계가 있으며, 임상에서 노화로 인하여 나타나는 제반 장애들이 신장과 상생관계에 있는 간의 기능저하에 의해 유발되므로 간과 신장의 기능은 노화와 밀접한 관계가 있다(홍원식, 1981). 육미지황탕은 기와 혈을 보하고 인체의 음양과 장부의 기능실조를 조정하여 질병에 대한 저항력을 증강시켜 질병의 발생을 억제하고 치료하는데 중요하다. 신장과 간을 보하는 육미지황탕을 이용하여 광노화피부와 관련된 연구는 진행된 바 없고, 보음제의 대표적인 처방인 육미지황탕이 항산화, 아토피피부염 관련 제반 증상 완화 및 면역조절을 통한 항염증 등의 효과가 있다고 보고되고 있으나 광노화피부와 관련된 연구는 진행된 바 없으므로 본 연구에서 육미지황탕을 이용하여 생화학적, 형태학적 및 분자생물학적으로 체계적인 광노화 피부의 억제에 관한 연구가 필요하였다.

III. 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약은 세포배양을 위하여 fetal bovine serum (FBS) 과 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 등을 이용하였고, 항산화 관련 실험을 위하여 xanthine oxidase activity assay kit (BioVision Inc, CA, USA), superoxide dismutase assay kit 및 catalase assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI)를 이용하였다. 일반 및 특수조직염색법을 위하여 hematoxylin & eosin (H&E), acid fuchsin, paraplast (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하였다. 면역조직화학염색법을 위하여 Hydrogen peroxide와 potassium phosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 trizol reagent (Invitrogen, CA, USA)를 이용하였고, 일차항체는 epidermal growth factor(EGF), vascular endothelial growth factor(VEGF), matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-3 및 MMP-9 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 등을 이용하였고, 이차항체와 발색을 위한 효소 복합체로서 biotinylated anti-IgG와 ABC complex (Vector Laboratories, Inc., CA, USA) 및 발색제인 3-3' diaminobenzidine (DAB, 화광순약공업주식회사, Japan)을 이용하였다.

본 실험에 사용된 기기는 육미지황탕 추출액의 농축을 위하여 rotary vacuum evaporator (NE2001형, EYELA, Japan)를 이용하였고, 피부 자외선 조사를 위하여 20W Ultraviolet B(UVB) lamp(Sankyo G20T10E, 20W, Japan)와 UV light meter(UV-340, UVA+UVB, Lutron, Taiwan)를 이용하였다. 세포배양 관련 실험을 위하여 CO2 incubator(SHEL LAB,

Korea)와 inverted microscope(Carl Zeiss Inc., Axiovert 25C, Germany)를 이용하여 관찰하였다. 광학현미경적 관찰과 면역조직화학 염색을 위한 조직 절단기로서 microtome(Jung histocut 820, Leica, Germany)을 이용하였고 조직관찰, 결과자료 수집 및 촬영을 위하여 Axioscope microscope(Carl Zeiss, Germany)를 이용하였다. 분자생물학적 실험을 위하여 Wallac 1420 VICTOR3 multilabel counter (PerkinElmer Life Science, Turku, Finland), Ultra-Turrax (T10 basic, (주)엘케이 랩코리아), Vacuum drying oven(국제 싸이엔, Korea) 및 Microplate reader(Molecular Device, VERSAmax, Sunnyville, CA, USA), cold plate for embedding (Leica EG 1130, Germany) 등을 이용하였다

2. 시료 제조

육미지황탕의 처방구성은 방약합편(신재용, 1984)에 준하였으며 약재는 삼흥건재약업사(경동시장)에서 국산만을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 육미지황탕의 처방 내용은 다음과 같다(Table I). 육미지황탕 10첩 분량(45.8g)을 둥근 플라스크에 넣고 증류수 4L를 넣은 후 약 3시간 전탕하여 여액을 rotary vacuum evaporator(NE2001형, EYELA, Japan)로 감압 농축하여 추출물 182g을 회수하였다. 회수한 추출물을 95% EtOH, 85% EtOH, 75% EtOH로 다시 추출하여 여과하였다. 여과액은 rotary vacuum evaporator로 감압 농축한 후 동결 건조하여 86g을 회수하였다.

Table 1. The composition of Yukmijiwhangtang prescription.

Yukmijiwhangtang		
Name of Herbs	Pharmacognostic Name	Weight(g)
熟地黄	<i>Sinomenium acutum</i>	14.0
山藥	<i>Astragali Radix</i>	7.5
山茱萸	<i>Atractylodis Lanceae Rhizoma</i>	7.5
白茯苓	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	5.6
牡丹皮	<i>Ziziphi Fructus</i>	5.6
澤瀉	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	5.6
Total		45.8

3. 실험동물 및 처치

본 실험에 사용한 7주령, 수컷, hairless 생쥐(SKH-1 hairless mice)는 오리엔트바이오에서 분양받아 1주일간 사육실에서 적응시킨 후 항온항습 ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\pm 2\%$ RH)하에서 사육하였고, 사료는 시판하는 고형사료를 공급하였다. 실험동물은 4개군으로 분류하여 군별로 5마리씩 배정하여 실험에 사용하였다. 모든 실험군은 정상군, 대조군, YM-O군(육미지황탕 투여군) 및 YM-OA군(육미지황탕 투여 후 도포군)으로 나누었다. 정상군은 아무런 처치도 하지 않았으며, 대조군은 생리식염수 투여 후 무시료 도포액인 기본로션(vehicle)만을 도포하였다. YM-O군과 YM-OA군의 육미지황탕 투여액은 회수한 육미지황탕 동결건조물 5g을 50ml의 증류수에 용해하여 1.2g/Kg B.W. 용량(사람 용량의 4배 정도)으로 1일 1회 경구 투여하였다. 실험II군의 육미지황탕 도포액은 에탄올, 프로필렌글리콜(propylene glycol), 증류수를 각각 30:20:50(v/v/v)의 비율로 잘 혼합한 기본로션에

육미지황탕 동결건조물을 2% 농도로 첨가하여 제조한 후 1일 1회 도포액 100 μ l를 hairless 생쥐의 귀에서 등 부위 전체에 도포하고 후 잘 문질러준 후 1시간 후에 UVB를 등 부분에 조사하였다. 실험이 종료된 후 실험동물을 마취한 후 등쪽 피부조직을 절취하여 일부는 냉동고에 보관한 후 분자생물학적 검사에 사용하였고, 일부는 Bouin solution 용액에 고정하여 광학 및 면역조직화학적 염색에 사용하였다.

<실험 동물군 분류>

정상군 (Normal, N군) : 아무런 처치를 하지 않은 군

대조군 (Control, C군) : 자외선조사 + Saline 투여 + 기본로션 도포

YM-O군 (Yukmijiwhangtang oral administration group) : 자외선 조사 + 육미지황탕 투여

YM-OA군 (Yukmijiwhangtang oral administration and Yukmijiwhangtang application group) : 자외선조사 + 육미지황탕 투여 + 육미지황탕 도포

4. 피부노화 유발 및 시료 도포

자외선 조사장치는 실험실에서 자체 제작한 캐비닛 내에 20W Ultraviolet B(UVB) lamp(Sankyo G20T10E, 20W, Japan)를 부착한 후 조사한 광원을 UV Light meter(UV-340, UVA+UVB, Lutron, Taiwan)로 측정 한 후 UVB 강도(intensity)가 0.3 mW/cm²가 되는 높이에서 조사하였다. 실험동물의 UVB 조사는 아크릴로 제작한 조사틀에 실험군 별로 각각의 생쥐를 가둔 후 생쥐의 등부위가 노출되도록 위쪽은 철망을 부착하였다. UVB 조사량은 최초 1주간은 1 MED(minimal erythema dose)에 해당하는 60 mJ/cm²를 1주에 3회(200초)씩 조사하였고, 2주는 100 mJ/cm²(333초), 3주는

120 mJ/cm²(400초), 4주는 140 mJ/cm²(467초)로 1주에 3회씩 조사하여 총 4주간 실시하였다.

5. 피부 최소홍반도 측정

피부 최소홍반도를 측정하기 위하여 20W UVB lamp(Sankyo G20T10E, 20W, Japan)에서 조사한 자외선 강도가 0.3 mW/cm²가 되도록 UV Light meter(UV-340, UVA+UVB, Lutron, Taiwan)로 측정하여 조사높이를 정한 후 최소홍반량(minimal erythema dose)을 결정하였다. 최소홍반량은 hairless 생쥐의 등에 1x1 cm²의 넓이로 소구획을 나눈 후 UVB를 30 mJ/cm²에서 80 mJ/cm²까지의 조사량을 10 mJ/cm² 간격으로 증가시키며 조사(자극)하였다. UVB 조사 후 24시간이 경과한 후에 경계가 분명하고 네 모서리가 뚜렷한 홍반을 보이는 가장 낮은 광량인 60 mJ/cm²을 최소홍반량으로 정하였다.

6. 피부조직의 형태학적 관찰 (In vivo)

1) 육안적 관찰

피부의 육안적 관찰은 실험 4주째 에테르로 가볍게 마취를 하고 디지털카메라로 사진촬영을 한 후 컴퓨터에서 확대하여 주름의 양상을 군별로 비교 관찰하였다.

2) 광학현미경 관찰을 위한 피부조직의 일반 및 특수염색

절취한 피부조직을 실온에서 Bouin solution에 24시간 고정 한 후 통상적인 방법으로 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거친 다음 파라핀에 포매하고 7

7 μm 두께로 절편을 만들어 일반적인 조직학적 구조를 관찰하기 위하여 hematoxylin & eosin(H&E) 염색을 시행하여 광학현미경으로 피부조직의 변화를 관찰하였다. 또한 특수염색으로는 진피층 내 교원섬유(collagen fiber)의 양과 형태를 광학현미경으로 관찰하기 위하여 Masson's trichrome 염색과 Van Gieson's 염색을 시행하였고, 진피층 및 피하층 내 비만세포(mast cell)의 분포양상 및 탈과립 정도를 관찰하기 위하여 toluidine blue 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다.

3) 피부조직의 면역조직화학적 염색

피부 조직내 사이토카인, 효소 및 수용체에 대한 면역조직화학적 변화를 관찰하고자 피부조직을 절취한 후 Bouin solution에 24시간 고정한 후 일반적인 방법으로 파라핀 절편을 제작하였다. 파라핀 절편은 7 μm 의 두께로 절단한 후 100% methanol에 0.3 % H_2O_2 를 넣은 용액에서 endogenous peroxidase를 제거하였다. 그 후 비특이적인 면역반응을 제거하기 위하여 30분간 정상혈청(normal serum, 1:50)으로 처리하였다. UVB 조사 후 변화가 있을 것으로 예상되는 여러 가지 사이토카인인 epidermal growth factor(EGF, 1:100, Santa Cruz, CA, USA), vascular endothelial growth factor(VEGF, 1:50, Santa Cruz, CA, USA), MMP(matrix metalloproteinase)-2(1:100, Santa Cruz, CA, USA), MMP-3(1:100, Santa Cruz, CA, USA)를 일차항체로 이용하였다. 일차항체의 희석배율은 구입한 회사에 따라 차이가 있으므로 각각의 항체에 대한 positive control test를 실시하여 적절한 항체 희석 배율을 정한 후 4°C의 moisture chamber에서 24시간 염색하였다. 2차항체는 1차항체 반응 후 5분간 3회 0.1 M PB로 수세과정을 거친 후에 Hsu 등(1981)의 방법에 따라 biotinylated anti-IgG(Vector Laboratories, Inc., CA, USA)를 1:200으로 희석한 후 실온의 moisture chamber에서 30분 반응시켰다. 다시 5분간

3회 0.1 M PB 수세과정을 거친 후 peroxidase가 표지된 ABC 용액에서 30분간 반응시켰다. 그 후 다시 0.1 M PBS로 15분간 2회 수세하고 나서 30 mg의 3-3' diaminobenzidine를 150ml 의 0.1 M PBS에 녹인 용액에서 5분간 반응시킨 후 과산화수소를 0.005% 되게 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 15분간 시행하였다. 반응이 끝난 조직들은 통상적인 방법에 따라 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

7. HaCaT cells을 이용한 시험관내 실험(In vitro)

1) 세포배양

Human keratinocyte(HaCaT cells)는 CLS (Cell Lines Service)로부터 분양을 받아 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)(Hyclone; Logan, UT, USA)에 10% FBS, 100U/ml penicillin과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)를 첨가하여 배양하였다. 세포는 37 °C incubator에서 5 % CO₂ 상태에서 배양하였다. 배양후 수거한 세포를 trypan blue로 염색하고 세포계수기(Hematocytometry, Germany)를 이용하여 세포를 계수하여 세포밀도 3×10^5 cells/ml이 되게 하여 6 well plate에 배양하였다.

2) 세포생존율 측정

Mosmann이 보고한 방법(Mosmann, 1983)에 따라 살아있는 세포의 효소 활성으로 인한 tetrazolium dye인 MTT를 자줏빛의 불용해성 포르마잔으로 환원하는 원리를 이용한 MTT assay를 통하여 육미지황탕(YM)이 HaCaT 세포의 생존에 미치는 효과를 측정하였다. HaCaT 세포를 96-well plate에 well 당 1×10^5 cells 밀도로 분주한 후 농도별로 YM을 처리하여 37 °C, 5 % CO₂, 습도 100 % 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 새로운 배지로 교환하여 4 시간 동안 배양한 후 PBS에 용해한 MTT(0.5 mg/ml)용액 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ 를 각 well에 넣고 3 시간 동안 배양하였다. 그런 다음 배양액을 버리고 0.01N HCl로 만든 10% SDS를 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 넣어 MTT-formazan crystal을 용해한 후 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 확인하였다. 살아있는 세포의 백분율은 미처리

세포를 기준으로 계산하였고, 모든 실험은 3번 반복하였다.

3) Ultraviolet B(UVB) 조사

세포배양 실험의 자외선 조사는 20W Ultraviolet B(UVB) lamp(Sankyo G20T10E, 20W, Japan)에서 조사한 광원을 UV Light meter(UV-340, UVA+UVB, Lutron, Taiwan)로 측정한 후 UVB 강도(intensity)가 0.3 mW/cm^2 가 되는 높이에서 $3 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 의 농도로 DMEM medium에 부유시켜 6 well plate에 분주한 후 육미지황탕 추출물을 실험의 종류에 따라 농도별로 선 처리($0.01, 0.1, 0.5, 1 \text{ mg/ml}$)한 후 24시간 동안 배양한 후 60 mJ/cm^2 를 1회 조사하였다.

4) 유해산소 대사 활성화 측정

(1) Xanthine oxidase(XO) 생성량 변화

XO의 생성량은 Bergmeyer 등(1974)의 방법에 따라 HaCaT cells(human keratinocytes)을 이용하여 수행하였다. HaCaT 세포를 $3 \times 10^5 \text{ cells/well}$ 에 준비한 후 육미지황탕 추출물(YM) 100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 을 선 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 UVB를 60 mJ/cm^2 로 조사하고 15분후에 각 well에 lysis buffer를 넣고 IKA homogenizer (ULTRA-TURRAX)를 이용하여 lysis시켰다. Assay buffer로 lysis한 HaCaT cell lysate내 XO 함량을 측정하기 위해 xanthine oxidase activity assay kit (BioVision Inc., CA, USA)를 사용하였으며, 사용방법은 제조회사의 지시에 따라 시행하였다. 사용한 표준물질은 hydrogen peroxide (H_2O_2)를 사용하였다. Standard는 3차 증류수로 희석하여 0.1 mM 농도로 조제하였다. 조제한 표준물질과 cell lysate를 96 well plate에

각각 50 μl 씩 넣은 후 xanthine oxidase mixture (46 μl assay buffer, 2 μl substrate mix, 2 μl enzyme mix)를 50 μl 처리하여 즉시 microplate reader를 이용해 570 nm에서 측정하였고(T_1 , A_1), 차광하여 30분 후에 다시 측정하였다(T_2 , A_2). XO 생성량은 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{XO Activity} = \frac{B}{(T_2 - T_1) \times V} \times \text{dilution factor} = \text{nmol/min/ml} = \text{mU/ml}$$

B : the amount of H_2O_2 generated by XO from standard curve (in nmol)

T_1 : the time of the first reading (in min)

T_2 : the time of the second reading (in min)

A_1 : the absorbance of the first reading

A_2 : the absorbance of the second reading

V : the pretreated sample volume added into the reaction well (in ml)

(2) Superoxide dismutase(SOD)의 활성 변화

SOD 함량은 Maier and Chan(2002)의 방법에 따라 HaCaT cells을 이용하여 수행하였다. HaCaT 세포주를 3×10^5 cells/well에 준비한 후 육미지황탕 추출물(YM) 100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 을 선 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 UVB를 60 mJ/cm^2 로 조사하고 15분 후에 각 well에 lysis buffer를 넣고 IKA homogenizer(ULTRA-TURRAX)를 이용하여 lysis시켰다. 20 mM HEPES buffer(pH 7.2, containing 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, and 70 mM sucrose)로 lysis한 HaCaT cell lysate 내 SOD 활성을 측정하기 위해 superoxide dismutase assay kit(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI.)를 사용하였으며, 사용방법은 제조

회사의 지시에 따라 시행하였으며, 사용한 표준물질은 bovine erythrocyte SOD(Cu/Zn)를 사용하였다. SOD 활성측정은 96 well plate에 빛을 차광시킨 200 μl 의 radical detector를 넣고 각 well에 standard 용액 또는 HaCaT cell lysate 10 μl 를 넣었다. 그리고 모든 well에는 50 mM Tris-Cl(pH 8.0)로 희석한 xanthine oxidase를 20 μl 를 넣고 수 초간 교반시킨 후 20 분간 실온에서 반응시킨 다음 microplate reader를 사용하여 440 nm에서 460 nm값을 제외한 값을 다음과 같은 식을 이용해 SOD를 계산하였다.

$$\text{SOD(U/ml)} = \frac{\text{sample LR}^{\text{a)}} - \text{y intercept}}{\text{slope}} \times \frac{0.23\text{ml}}{0.01\text{ml}} \times \text{sample dilution}$$

$$\text{a)} \text{sample LR} = \text{Abs Std A} / \text{Abs sample}$$

(3) Catalase의 활성 변화

Catalase 활성도는 Johanson and Borg(1988)와 Wheeler 등(1990)의 방법에 따라 HaCaT cells을 이용하여 수행하였다. HaCaT 세포주를 3×10^5 /well에 준비한 후 육미지황탕 추출물(YM) 100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 을 선처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 UVB를 60 mJ/cm^2 로 조사하고 15분 후에 각 well에 lysis buffer[50 mM potassium phosphate(pH 7.0, containing mM EDTA)]를 넣고 IKA homogenizer(ULTRA-TURRAX)를 이용하여 lysis시켰다. HaCaT cell lysate 내 Catalase 활성을 측정하기 위해 catalase assay kit(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI.)를 사용하였으며, 사용방법은 제조회사의 지시에 따라 시행하였다. 사용한 표준물질은 catalase formaldehyde를 사용하였다. 96 well에 assay buffer(100 mM potassium phosphate, pH 7.0) 100 μl 와 methanol(HPLC-grade) 30 μl 를 넣고 sample buffer(25 mM potassium

phosphate, pH 7.5, containing 1 mM EDTA and 0.1% BSA)로 희석한 standard와 HaCaT cell lysate를 각각 20 μl 씩 첨가한 후 과산화수소를 20 μl 첨가하여 반응을 시켰다. 20분 동안 실온에서 차광상태로 교반하면서 반응시킨 후 30 μl 의 potassium hydroxide를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 그 후 30 μl 의 catalase purpald를 넣고 10 분간 실온에서 교반한 후 catalase potassium periodate를 10 μl 를 첨가하고 실온에서 5분 반응한 후 540 nm에서 측정하였다. YM의 formaldehyde 농도와 catalase 활성은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Formaldehyde } (\mu\text{M}) = \frac{\text{sample absorbance} - (\text{y intercept})}{\text{slope}} \times \frac{0.17 \text{ ml}}{0.02 \text{ ml}}$$

$$\text{Catalase activity} = \frac{\mu\text{M of sample}}{20 \text{ min}} \times \text{dilution factor} = \text{nmol/min/ml}$$

5) 라디칼소거능 측정(DPPH)

육미지황탕의 항산화 활성은 Wang과 Zhang (2003)의 DPPH 법을 이용하여 측정하였다. 실험방법은 96 well microplate에 육미지황탕 10 μl 를 넣고 DPPH solution 190 μl 를 가한 후 실온에서 30분간 반응시켜 각 반응액의 흡광도를 517 nm에서 측정하였다. 양성 대조군으로는 BHT (butylated hydroxytoluene, Sigma, USA)를 양성대조군으로 사용하였으며, DPPH radical을 50% 소거시키는 시료의 농도를 IC_{50} 으로 하였다. 각 시료에 대한 DPPH radical 소거작용을 3회 반복하여 측정하였다. 환원능은 다음과 같이 계산하였다.

$$\% \text{ 억제율} = [(A_0 - A_1) / A_0 \times 100]$$

A₀: 대조군 흡광도

A₁: 실험군 흡광도

6) 세포내 Reactive oxygen species(ROS) 생성 측정

HaCaT cell 내 ROS의 생성은 형광표지자인 2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 사용하여 측정하였다. DCFH-DA는 쉽게 세포막을 뚫고 세포 안으로 확산되어 세포 안의 에스테라아제에 의해 형광을 잃은 DCFH로 가수분해 되고, 이후 ROS가 존재하는 환경에서 높은 형광을 띄는 DCF로 빠르게 산화된다. 따라서 DCF의 형광 강도는 세포 안의 ROS의 양과 비례한다. HaCaT cell을 3×10^5 cells/ml 의 농도로 부유시켜 96-well plate에 분주하여 24시간 동안 incubation 하였다. YM을 농도별로 선 처리(0, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$)한 후 2시간 동안 incubation하였고, H₂O₂와 DCFH-DA를 각각 1 mM, 10 μM 의 농도로 20분 동안 처리한 후 형광도를 측정하였다. DCF 형광도는 excitation 485 nm, emission 530 nm의 파장에서 Wallac 1420 VICTOR3 multilabel counter(PerkinElmer Life Science, Turku, Finland)로 측정하였다.

7) Gelatin zymography assay

MMP-9의 분비를 측정하기 위하여 substrate gel zymography를 시행하였다(Ha et al., 2004). HaCaT 세포를 3×10^5 cell/ml 의 농도로 분주하였다. 실험시작 전 무혈청배지로 교환한 후 육미지황탕(YM)을 농도별로 1시간 동안 선 처리하였다. 이 후 세포를 60 mJ/cm²세기의 UVB를 조사하여

자극시키고 다시 24시간 배양하였다. 배지에 존재하는 분비된 단백질의 양은 세포의 숫자로 가늠하였다. 배지를 62.5 mM Tris - HCl (pH 6.8), 10 % glycerol, 2 % SDS, and 0.00625 % (w/v) bromophenol blue가 함유된 sample buffer에 섞고, 0.1% gelatin이 함유된 7.5 % acrylamide/bisacrylamide (29.2:0.8) separating gel에 loading 한 후 4 °C, 100V에서 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel을 0.25 % Triton X-100에 30분 동안 두 번 담가 SDS를 제거하였다. 3차 증류수로 씻은 후 0.1% (w/v) Coomassie blue R-250 용액에서 30분 간 염색하여 관찰하였다.

또한 MMP-9의 활성을 측정하고자 in vitro gelatinase inhibition assay를 시행하였다. UVB로 자극한 HaCaT 세포를 키운 배지를 sample buffer에 섞고, 전기영동을 시행한 후 위와 동일한 방법으로 gel을 0.25% Triton X-100에 30분 동안 담가 두었다. 각 lane에 따라 gel을 자른 후 각각 다른 농도의 YM이 함유된 탱크에 넣고 50 mM Tris - HCl(pH 7.6), 20 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, and 0.02% Brij-58이 함유된 digestion buffer에서 20시간 동안 37°C에서 배양한 후 염색하여 관찰하였다.

8) 총 RNA의 추출과 RT-PCR

Total RNA는 Trizol reagent(Invitrogen)를 이용하였으며 제조회사의 방법에 준하였다. Spectrophotometer를 이용하여 RNA의 농도를 측량한 후 M-MLV reverse transcriptase(Promega, Madison, WI, USA)에 의하여 cDNA를 합성하였고, specific primer 들을 이용한 PCR방법을 통하여 cDNA를 증폭하였다.

PCR 증폭을 하기 위하여 TaqPCRxDNA polymerase, Recombinant (Invitrogen) 을 사용하였고, 반응조건은 다음과 같이 하였다. 95°C에서 5분간 초기 denaturation 시킨 후 30 cycle을 증폭시켰다. 각각의 cycle은

95℃에서 30초 동안 denaturation, 62 ℃(TNF- α : 59 ℃)에서 30 초 동안 annealing, 72 ℃에서 40 초 동안 extension시켰다. PCR product는 1 % agarose gel에서 전기영동 하였고, ethidium bromide로 염색을 한 후 Gel Doc(Bio-Rad, USA)을 사용하여 관찰하였다. β -actin을 internal control로 사용하여 IL-1 β , TNF- α , human MMP-9, MMP-3의 발현을 상대적으로 평가하였다. PCR에 사용된 primer는 Table 2과 같다.

Table 2. Oligonucleotide primers used for PCR in this study

Target	gene	PCR primer sequence(5' to 3')	Expected size
IL-1 β	sense	GCA CAA GGC ACA ACA GGC TGC	463bp
	antisense	TGC TGT GAG TCC CGG AGC GT	
TNF- α	sense	AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT	434bp
	antisense	CCA AAG TAG ACC TGC CCA GAC	
MMP-9 (human)	sense	GTG CTC CTG GTG CTG GGC TG	325bp
	antisense	GGT GCC ACT TGA GGT CGC CC	
MMP-3 (human)	sense	CTT TCC TGG CAT CCC GAA GT	252bp
	antisense	GCA TAG GCA TGG GCC AAA AC	
β -actin	sense	CAA GAG ATG GCC ACG GCT GCT	247bp
	antisense	TCC TTC TGC ATC CTG TCG GCA	

8. 자료분석

통계적 분석은 SPSS 12.0 for windows(SPSS Inc., USA)를 이용하여 평균과 표준편차를 산출하였으며, 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 적용하였다. 각 군간 차이를 검증하기 위하여 t 검증(paired t-test)을 실시하였고, 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 실시하였다.

IV. 결 과

1. 피부주름의 육안적 관찰소견

SKH-1 hairless mice의 피부주름 양상을 육안적인 광노화 피부의 지표로 사용하여 관찰한 바 N군(정상군)에서는 잔주름이 많이 관찰되었으나 깊고 굵은 주름은 관찰할 수 없었다. 그러나 UVB를 4주간 조사하면서 vehicle을 도포하고 saline을 투여한 C군(대조군)에서는 잔주름이 소실되고 깊고 굵은 주름이 현저하게 관찰되었다. UVB를 4주간 조사하면서 4주간 육미지황탕을 투여한 YM-O군(육미지황투여군)과 육미지황탕을 투여하고 도포한 YM-OA군(육미지황탕 투여 후 도포군)에서는 대조군에 비하여 잔주름의 소실은 감소하였고, 깊고 굵은 주름은 대조군에 비하여 미약하게 관찰되었다(Fig. 1).

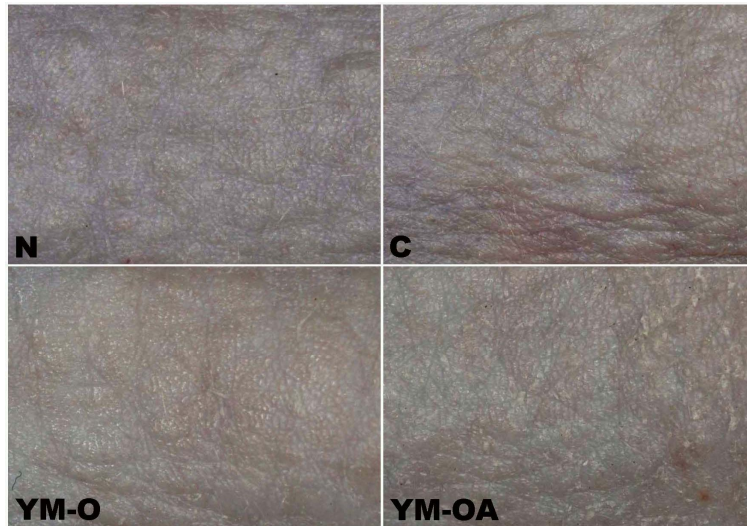


Fig. 1 . Photographs showing skin wrinkles of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O,

YM-OA) and non-irradiated normal group(N). The effects of YM-O and YM-OA treated groups showing mild increased wrinkling and some loss of fine striation on back skin compared to control group(C).

2. 피부의 일반적인 조직학적 변화 관찰

1) H&E stain

SKH-1 hairless mice의 피부조직을 H&E 염색하여 표피세포의 증식과 표피의 두께를 광노화 피부의 지표로 하여 관찰한 결과 UVB를 조사하지 않은 N군의 표피는 2-3층(표피두께 $22.1 \pm 3.6 \mu\text{m}$)의 상피세포로 이루어졌으나 UVB를 4주간 조사한 C군의 표피는 7-8층(표피두께 $63.2 \pm 3.5 \mu\text{m}$)의 상피세포로 증식되었다. UVB를 조사하면서 4주간 육미지황탕을 투여한 YM-O군과 육미지황탕 투여 후 도포한 YM-OA군에서는 대조군에 비하여 상피세포의 층이 감소하여 YM-O군에서는 5-6층(표피두께 $42.5 \pm 2.8 \mu\text{m}$)의 상피세포층으로 이루어졌으나 YM-OA군에서는 3-4층(표피두께 $35.8 \pm 2.7 \mu\text{m}$)의 상피세포층으로 이루어져 육미지황탕 투여와 도포를 병행한 군에서 상피세포층이 현저히 감소하였다(Fig. 2와 3). 진피층내 염증세포의 수도 대조군에 비하여 YM-O군과 YM-OA군에서 현저히 감소하였다(Fig. 4).

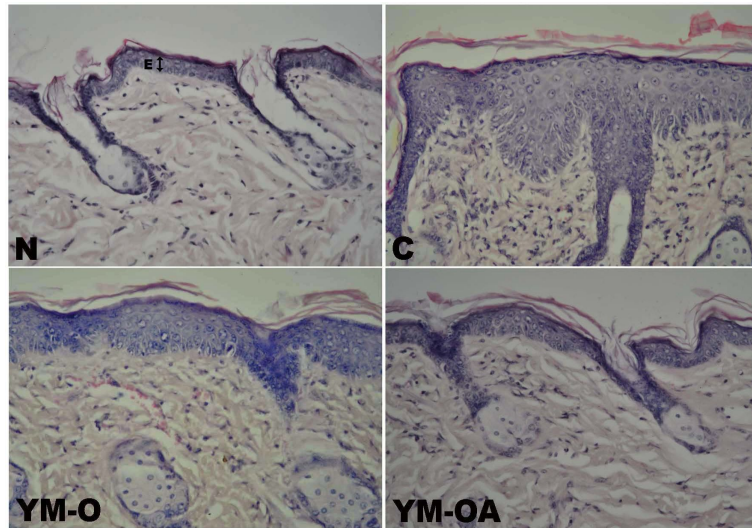


Fig. 2. Histological changes in the skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(H&E stain, x200). The effects of YM-O and YM-OA treated groups showing decreased epithelial cell layers(epidermal thickness) and shrinkage of sebaceous glands compared to control group(C). E, epidermis thickness.

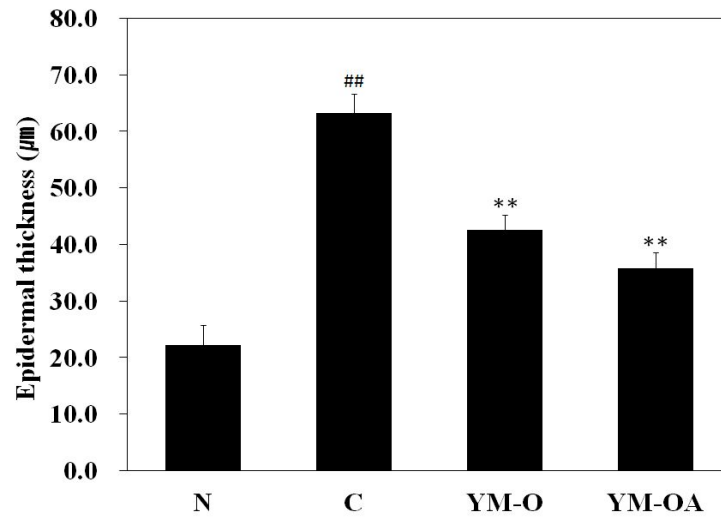


Fig. 3. Changes of epidermal thickness in the skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N). The effects of YM-O and YM-OA treated groups showing decreased epithelial cell layers(epidermal thickness) compared to control group(C). Values are mean \pm SD of 5 mice. ## p<0.01 compared with normal group(N); ** p<0.01 compared with control group(C).

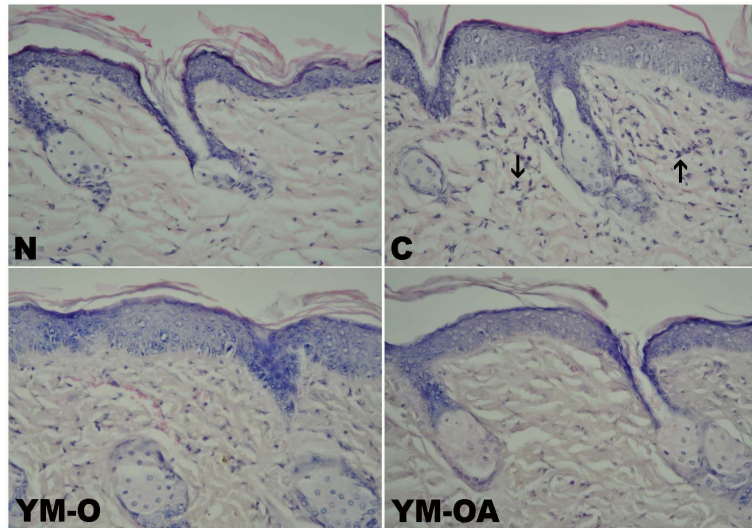


Fig. 4. Histological changes in the skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(H&E stain, x200). The effects of YM-O and YM-OA treated groups showing decreased inflammatory cells within dermis compared to control group(C). Arrows, inflammatory cells.

2) Masson's trichrome stain과 Van Gieson's stain

SKH-1 hairless mice의 피부조직을 Masson's trichrome 염색을 시행하여 표피-진피결합부위 교원섬유(collagen fibers)의 염색정도를 광노화 피부의 지표로 하여 관찰한 결과 UVB를 조사하지 않은 N군의 표피 밑의 진피층(특히 유두층)에는 aniline blue에 강하게 염색된 교원섬유가 관찰되었으나 UVB를 4주간 조사한 C군의 교원섬유는 aniline blue에 미약하게 염색되었다. UVB를 조사하면서 4주간 육미지황탕을 투여한 YM-O군과 육미지황탕을 투여하고 도포한 YM-OA군의 진피의 유두층에서는 대조군에

비하여 aniline blue에 강하게 염색된 교원섬유가 관찰되었다(Fig. 5). Van Gieson's 염색을 시행하여 교원섬유를 관찰한 결과 UVB를 조사하지 않은 N군의 표피 밑의 진피층(특히 유두층)에는 acid fuchsin에 강하게 염색된 교원섬유가 띠모양으로 관찰되었으나 UVB를 4주간 조사한 C군의 교원섬유는 acid fuchsin에 미약하게 염색되었다. UVB를 조사하면서 4주간 육미지황탕을 투여한 YM-O군(육미지황탕투여군)과 육미지황탕을 투여하고 도포한 YM-OA군(육미지황탕 투여후 도포군)의 진피층의 유두층에서는 대조군에 비하여 acid fuchsin에 강하게 염색된 교원섬유가 관찰되었다(Fig. 6).

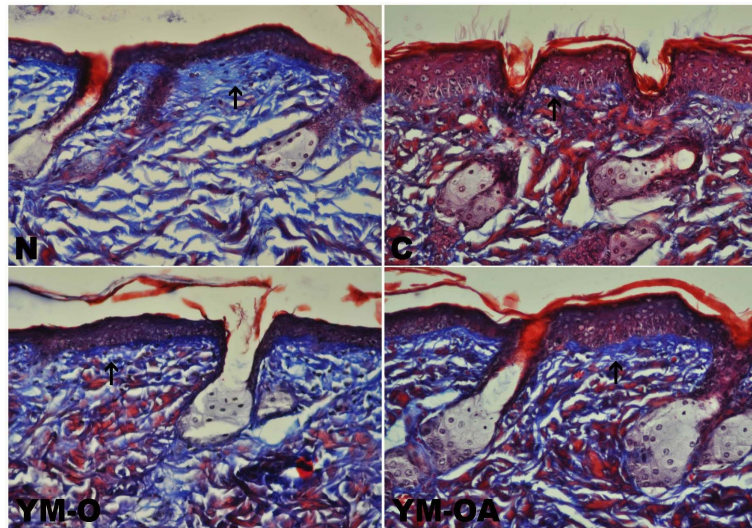


Fig. 5. Histological changes in the skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(Masson's trichrome stain, x200). The effects of YM-O and YM-OA treated groups showing increased collagen fibers within papillary layer of dermis compared to control group(C). Arrows, Aniline blue stained collagen fibers.

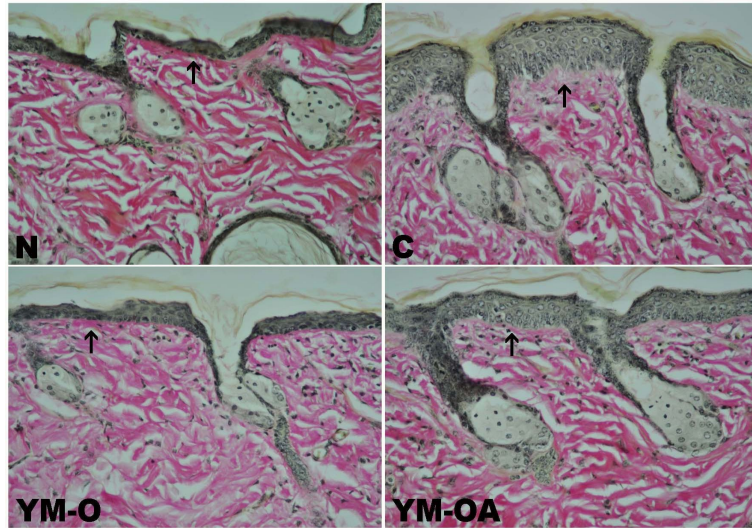


Fig. 6. Histological changes in the skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(Van Giesson's stain, x200). The effects of YM-O and YM-OA treated groups showing increased staining intensity of collagen fibers within papillary layer of dermis compared to control group(C). Arrows, acid fuchsin stained collagen fibers.

3) 피부 비만세포의 수적변화 관찰

SKH-1 hairless mice의 등과 귀의 피부조직을 toluidine blue 염색을 시행하여 비만세포의 수적변화를 관찰한 결과 UVB를 조사하지 않은 N군의 등쪽 피부의 진피층내 비만세포는 19.0 ± 2.1 개가 관찰되었으나 UVB를 4주간 조사한 C군의 진피층내 비만세포는 42.0 ± 3.3 개로 정상군에 비하여 증가하였다. UVB를 조사하면서 4주간 육미지황탕을 투여한 YM-O군과 육미지황탕을 투여하고 도포한 YM-OA군의 진피층내 비만세포는 각각

26.1±3.4개, 24.4±2.2개가 관찰되어 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 7과 8). 특히 귀의 피부조직내 염색된 비만세포의 수도 등쪽 피부의 결과와 유사하게 YM-O군과 YM-OA군에서는 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 9).

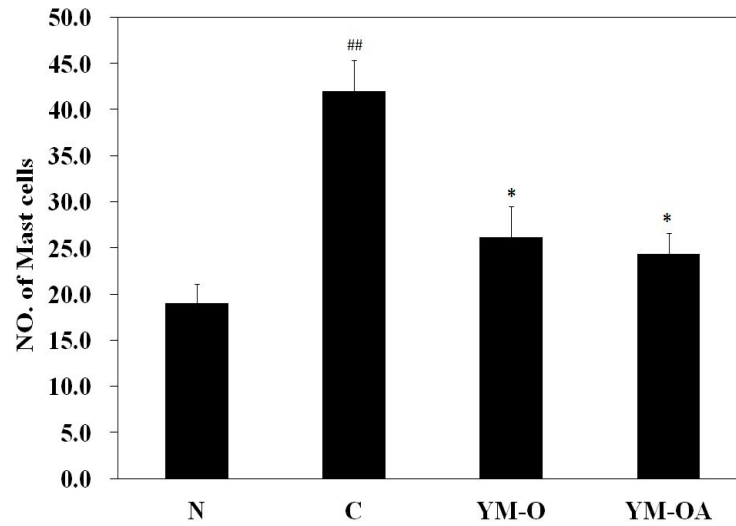


Fig. 7. Numerical changes of mast cells in the dorsal skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N). The effects of YM-O and YM-OA treated groups showing decreased toluidine blue stained mast cells within dermis compared to control group(C). Each values are mean \pm SD of 5 mice. ## $p < 0.01$ compared with normal group(N); * $p < 0.05$ compared with control group(C).

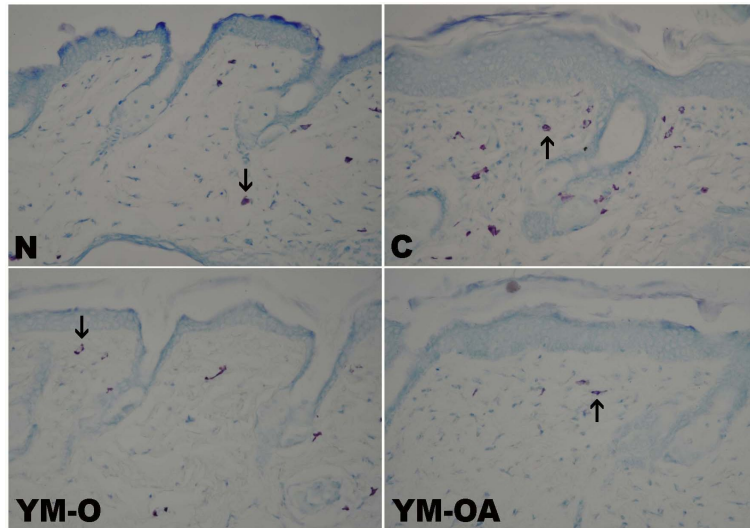


Fig. 8. Histological changes of mast cells in the dorsal skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N) (Toluidine blue stain, x200). The effects of YM-O and YM-OA treated groups showing decreased toluidine blue stained mast cells within dermis compared to control group(C). Arrows, Toluidine blue stained mast cells.

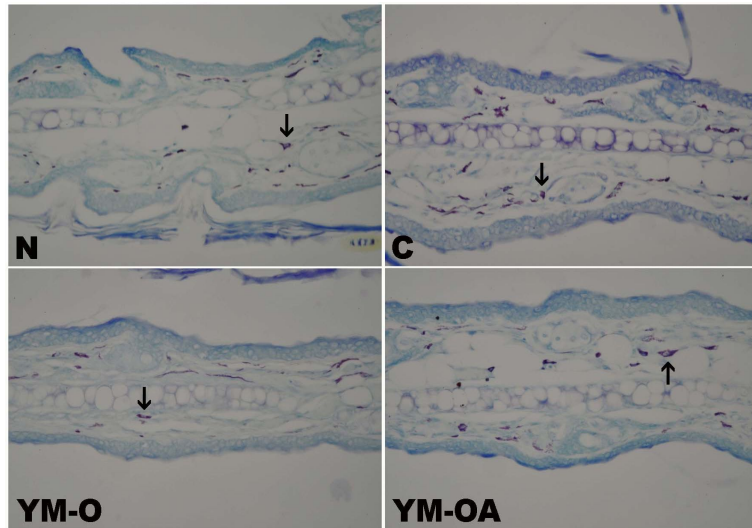


Fig. 9. Histological changes of mast cells in the ear skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(Toluidine blue stain, x200). The effects of YM-O and YM-OA treated groups showing decreased toluidine blue stained mast cells within dermis compared to control group(C). Arrows, Toluidine blue stained mast cells.

3. 피부의 면역조직화학적 변화 관찰

1) Matrix metalloproteinase(MMP)-2와 MMP-3

SKH-1 hairless mice의 피부조직의 세포외기질(extracellular matrix) 분해능의 지표로 관찰하기 위하여 MMP-2와 MMP-3 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. MMP-2의 발현은 UVB를 조사하지 않은 N군의 표피의 상피세포층과 진피층에서는 미약하게 발현되었으나 UVB를 4주간 조사한 C군의 표피 상피세포층과 진피층에서는 N군에 비해 비교적 강하게 발현되었다. YM-O군과 YM-OA군의 표피 상피세포층과 진피층에서는 C군에 비해 미약하게 발현되었으나 YM-OA군이 YM-O군에 비해 미약하게 발현되었다(Fig. 10). MMP-3의 발현은 UVB를 조사하지 않은 N군과 YM-O군의 표피 상피세포층과 진피층에서는 미약하게 발현되었으나 UVB를 4주간 조사한 C군의 표피 상피세포층과 진피층에서는 N군, YM-O군, YM-OA군에 비해 비교적 강하게 발현되었다. UVB를 조사하면서 4주간 육미지황탕을 투여한 YM-O군과 육미지황탕을 투여하고 도포한 YM-OA군의 표피 상피세포층과 진피층에서는 C군에 비해 미약하게 발현되었다(Fig. 11).

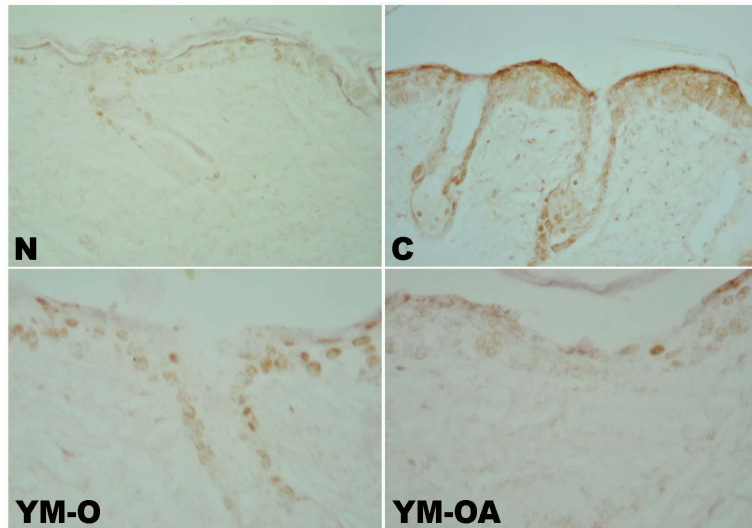


Fig. 10. Immunohistological changes of MMP-2 in skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(MMP-2 immunohistochemical stain, x400). The effects of YM-O and YM-OA treated groups showing reduced MMP-2 expression within skin compared to control group(C).

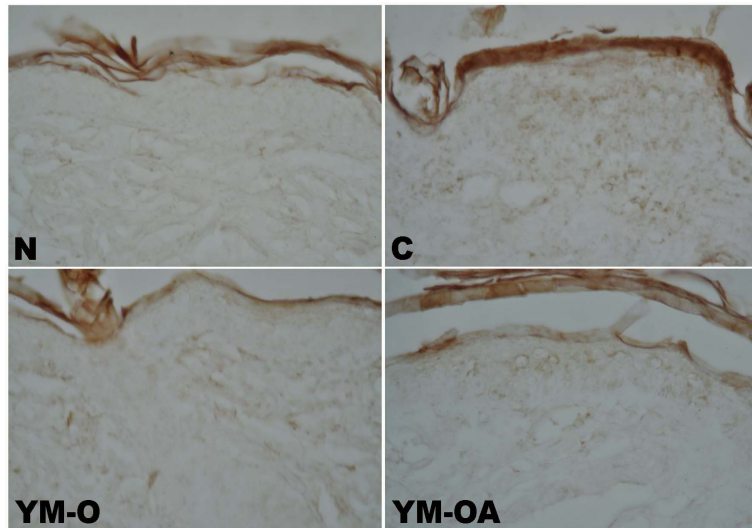


Fig. 11. Immunohistological changes of MMP-3 in skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(MMP-3 immunohistochemical stain, x400). The effects of YM-O and YM-OA treated groups showing reduced MMP-3 expression within skin compared to control group(C).

2) Vascular endothelial growth factor(VEGF)

SKH-1 hairless mice의 피부조직에서 광노화 피부와 관련된 혈관형성의 지표를 관찰하기 위하여 VEGF 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. VEGF의 발현은 UVB를 조사하지 않은 N군의 표피의 상피층에서는 미약하게 발현되었으나 UVB를 4주간 조사한 C군의 표피 상피세포층에서는 N군에 비해 비교적 강하게 발현되었다. UVB를 조사하면서 4주간 육미지황탕을 투여한 YM-O군과 육미지황탕 투여 후 도포한 YM-OA군의 표피 상피세포층에서는 C군에 비해 미약하게 발현되었다(Fig. 12).

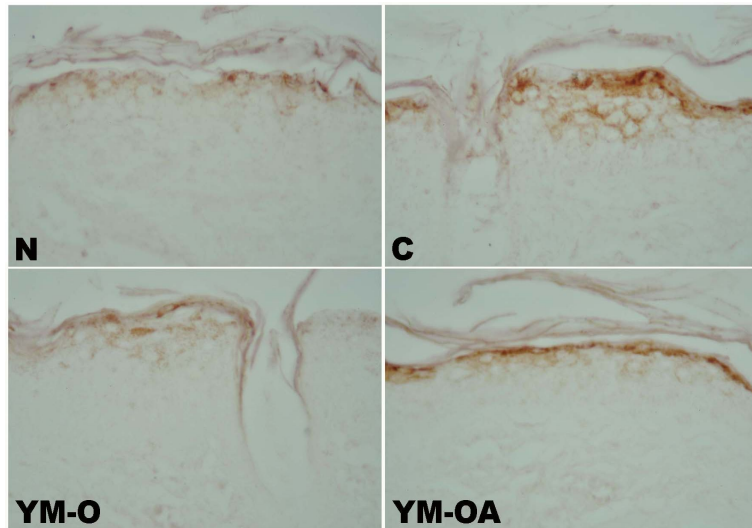


Fig. 12. Immunohistological changes of VEGF in skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(VEGF immunohistochemical stain, x400). The effects of YM-O and YM-OA treated groups showing reduced VEGF expression within epidermis compared to control group(C).

3) Epidermal growth factor(EGF)

SKH-1 hairless mice의 피부조직에서 광노화 피부와 관련된 MAP kinase pathway를 활성화하여 EGF 수용체 관련 유전자 발현 지표를 관찰하기 위하여 EGF 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. EGF의 발현은 UVB를 조사하지 않은 N군의 표피의 상피세포층과 진피층에서는 소수의 염색된 세포를 관찰하였으나 UVB를 4주간 조사한 C군의 표피의 상피세포층과 진피층에서는 N군에 비해 비교적 다수의 강하게 염색된

세포가 관찰되었다. UVB를 조사하면서 4주간 육미지황탕을 투여한 YM-O 군과 육미지황탕을 투여하고 도포한 YM-OA군의 표피의 상피세포층과 진피층에서는 C군에 비해 염색강도는 미약하였으며, 염색된 세포의 수도 C군에 비해 다소 감소하였다(Fig. 13).

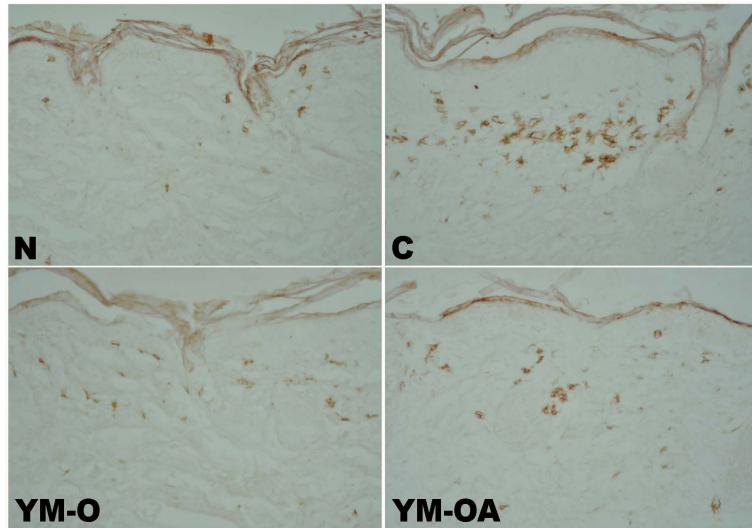


Fig. 13. Immunohistological changes of EGF in skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, YM-O, YM-OA) and non-irradiated normal group(N)(EGF immunohistochemical stain, x200). The effects of YM-O and YM-OA treated groups showing reduced EGF immunostained cells within skin compared to control group(C).

4. 세포생존율에 미치는 효과

육미지황탕(YM)이 HaCaT 세포에 대한 세포독성을 MTT assay를 통하여 측정한 결과 YM은 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 어떠한 세포독성도 나타내지 않았다(Fig. 14).

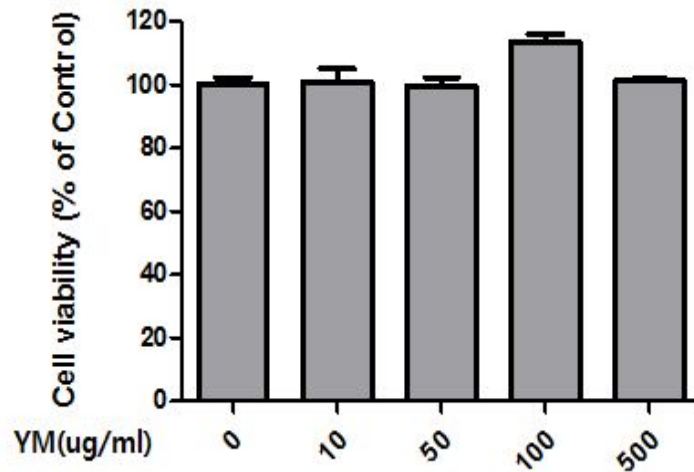


Fig. 14. Cytotoxic effect of Yukmijiwhangtang extracts(YM) on HaCaT cells. To determine the cytotoxicity of YM on HaCaT cells, MTT assay was performed. HaCaT cells were treated with indicated amount of YM for 24 h before the MTT assay. Data represent the mean \pm SD of 3 independent measurements.

5. 시험관내 유해산소 대사활성도 변화

1) 육미지황탕의 xanthine oxidase(XO) 생성량의 변화에 미치는 영향

UVB를 조사한 HaCaT 세포에 육미지황탕 추출물(YM)을 농도별로 첨가한 후 XO의 생성량을 관찰한 결과, 유해산소를 생성하는 효소인 XO는 HaCaT cell lysate에서 대조군에서는 1.670 ± 0.1 mU/ml이었으나 육미지황탕 추출물(YM) $100 \mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 군에서는 0.620 ± 0.06 mU/ml, $500 \mu\text{g/ml}$ 에서는 0.570 ± 0.04 mU/ml, $1000 \mu\text{g/ml}$ 에서는 0.530 ± 0.05 mU/ml로 농도의존적으로 육미지황탕 추출물 투여군에서 유의적인($p < 0.01$) 차이를 보였다(Fig. 15).

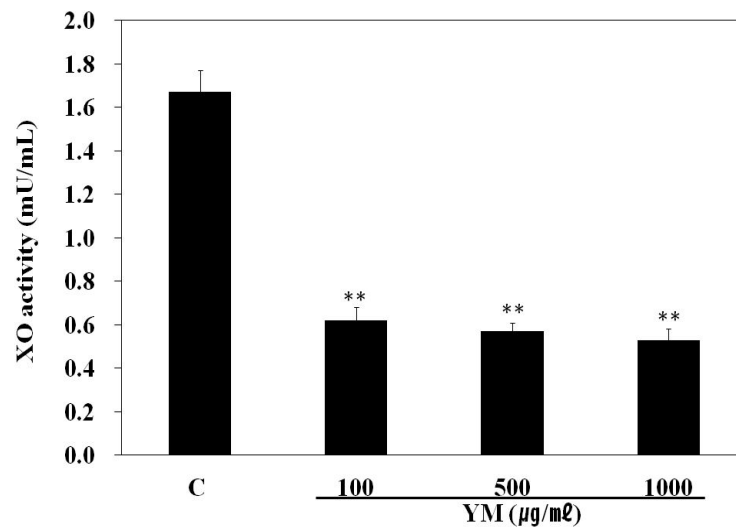


Fig. 15. Inhibitory effects of Yukmijiwhangtang extracts(YM) on the activity of xanthine oxidase(XO) in HaCaT cells induced by UVB irradiation. Each values are mean \pm SD(n=3). ** $p < 0.01$ compared with control group(C).

2) 육미지황탕의 superoxide dismutase(SOD)의 활성화에 미치는 영향

UVB를 조사한 HaCaT 세포에 육미지황탕 추출물(YM)을 농도별로 첨가한 후 SOD의 효과를 관찰한 결과, 유해산소를 제거하는 효소인 SOD는 HaCaT cell lysate에서 대조군에서는 3.4 ± 0.2 U/ml이었으나 육미지황탕 추출물(YM) 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 군에서는 5.2 ± 0.3 U/ml, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 5.4 ± 0.4 U/ml, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 5.8 ± 0.3 U/ml로 농도의존적으로 육미지황탕 추출물 투여군에서 유의적인 차이($P < 0.05$)를 보였다(Fig. 16).

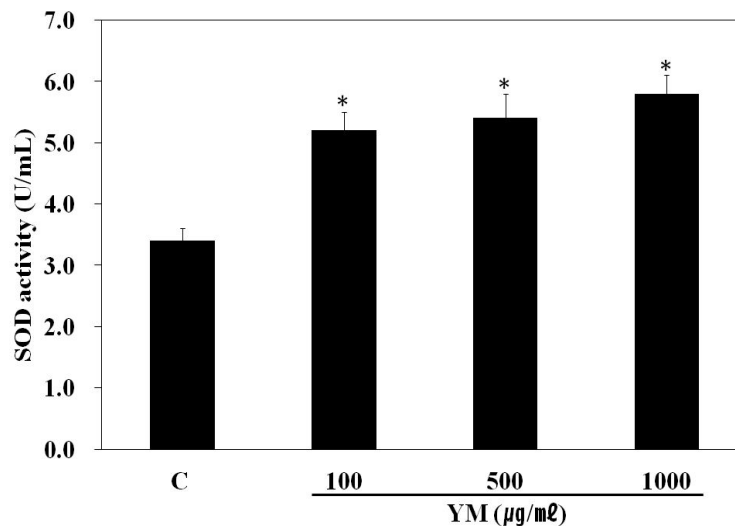


Fig. 16. Effects of Yukmijiwhangtang extracts(YM) on the activity of superoxide dismutase(SOD) in HaCaT cells induced by UVB irradiation. Each values are mean \pm SD(n=3). * $p < 0.05$ compared with control group(C).

3) 육미지황탕의 Catalase의 활성화에 미치는 영향

UVB를 조사한 HaCaT 세포에 육미지황탕 추출물을 농도별로 첨가한 후 catalase의 효과를 관찰한 결과, Catalase는 HaCaT cell lysate에서 대조군에서는 5.41 ± 0.3 nmol/min/ml이었으나 육미지황탕 추출물(YM) $100 \mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 군에서는 8.89 ± 0.4 nmol/min/ml, $500 \mu\text{g/ml}$ 에서는 9.60 ± 0.5 nmol/min/ml, $1000 \mu\text{g/ml}$ 에서는 10.20 ± 0.5 nmol/min/ml로 농도의존적으로 육미지황탕 추출물 투여군에서 유의적인 차이($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$)를 보였다 (Fig. 17).

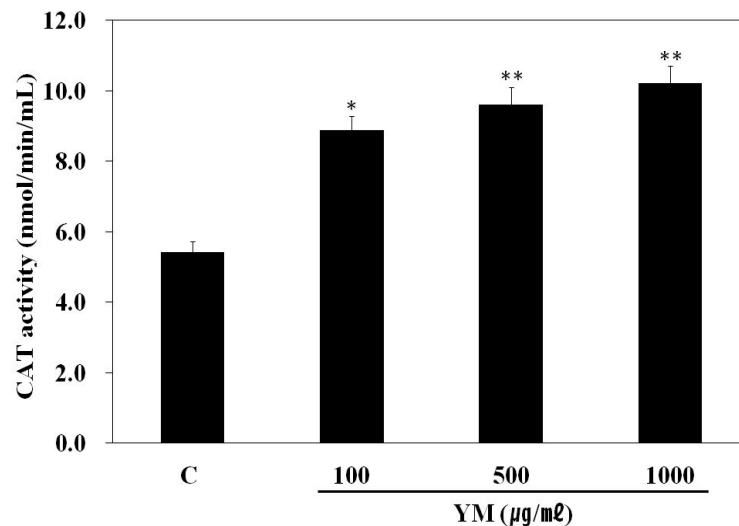


Fig. 17. Effects of Yukmijiwhangtang extracts(YM) on the activity of catalase in HaCaT cells induced by UVB irradiation. Each values are mean \pm SD(n=3). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with control group(C).

6. 자유라디칼 소거능(DPPH assay)

육미지황탕(YM)이 자유라디칼을 소거하는 능력이 있는지 확인하고자 DPPH assay를 시행하였다. 각각의 다른 농도의 YM을 DPPH와 섞은 후 상온에서 30분간 반응시켰다. Fig. 18.에서 보는 바와 같이 500 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 큰 차이가 없었으나, YM의 농도가 증가함에 따라 자유라디칼을 소거하는 활성도가 증가함을 관찰하였다. 활성도의 증가는 양성 대조군인 BHT와 유사하였다(Fig. 18).

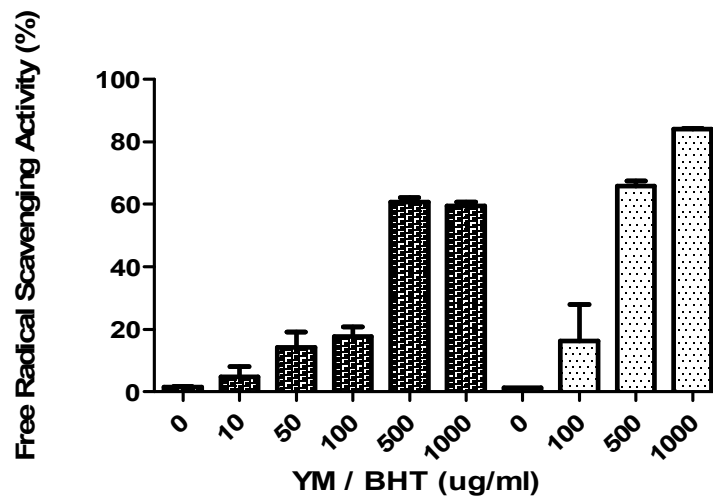


Fig. 18. Yukmijiwhangtang extracts(YM) scavenges free radicals.

A capability of YM that scavenges free radicals was measured by 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) assay. BHT was included as positive controls. Each value represents as the mean \pm SD of quadruplicate.

7. 육미지황탕(YM)의 세포내 활성산소종(ROS) 생성 억제효과

육미지황탕(YM)이 UVB에 의하여 증가된 세포내 ROS에 미치는 영향을 관찰하고자 DCFH-DA assay를 시행하였다. HaCaT 세포에 60 mJ/cm²의 강도로 UVB를 조사하여 12시간을 방치한 후 YM을 농도별로 처리함과 아울러 DCFH-DA 시약을 처리하고, 5분 후 형광 흡광도를 측정하였다. Fig. 19.에서 보는 바와 같이 UVB의 자극은 세포 내 ROS의 생성을 유의성있게 현저히 증가시켰으며(2nd column, # p<0.001), 이러한 ROS의 생성은 YM의 처리에 의하여 농도의존적으로 유의성있게 억제되었다(3rd, 4th, 5th, 6th columns; p<0.05, p<0.01, p<0.001)(Fig. 19). 이러한 결과 YM은 세포 내 ROS의 생성을 억제하는 효능을 수행하는 기능이 있음을 알 수 있었다.

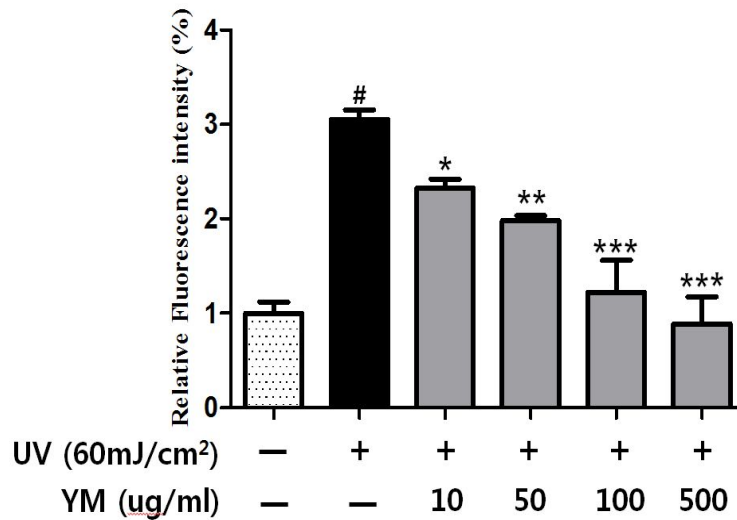


Fig. 19. Yukmijiwhangtang extracts(YM) suppresses intracellular ROS generation.

Treatment of HaCaT cells with YM reduced intracellular ROS produced by UVB irradiation. Shown are mean \pm SD (n=3). #

p<0.001, compared to control(1st column from left); * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, compared to UVB stimulated group (2nd column from left).

8. HaCaT 세포에서 MMP-9의 분비에 대한 억제효과

UVB를 어느 정도 자극했을 때 HaCaT 세포에서 MMP-9의 분비가 가장 많은지 관찰한 결과 60 mJ/cm²의 UVB에서 MMP-9의 분비가 가장 많았다 (Fig. 20A).

육미지황탕(YM)의 HaCaT cell에서의 MMP-9의 분비에 대한 효능을 관찰하고자 gelatin zymographic assay를 시행하였다. HaCaT cell은 다양한 농도의 YM으로 1시간 동안 선처리 하였다. 60 mJ/cm²의 강도로 UVB를 조사하여 24시간 동안 배양한 후 배양액을 전기영동 하였다. UVB는 MMP-9의 분비는 자극하였으나 MMP-2에는 영향을 미치지 않는 않았다. YM은 500 µg/ml의 농도에서 현저하게 MMP-9의 감소를 확인하였다(Fig. 20B). YM이 MMP-9의 활성을 직접적으로 억제하는지 관찰하고자 UVB를 조사한 HaCaT 세포의 배양액을 가지고 in vitro zymography를 시행하였다. 그 결과 MMP-9의 활성은 직접적으로 YM에 의하여 감소되지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 20C).

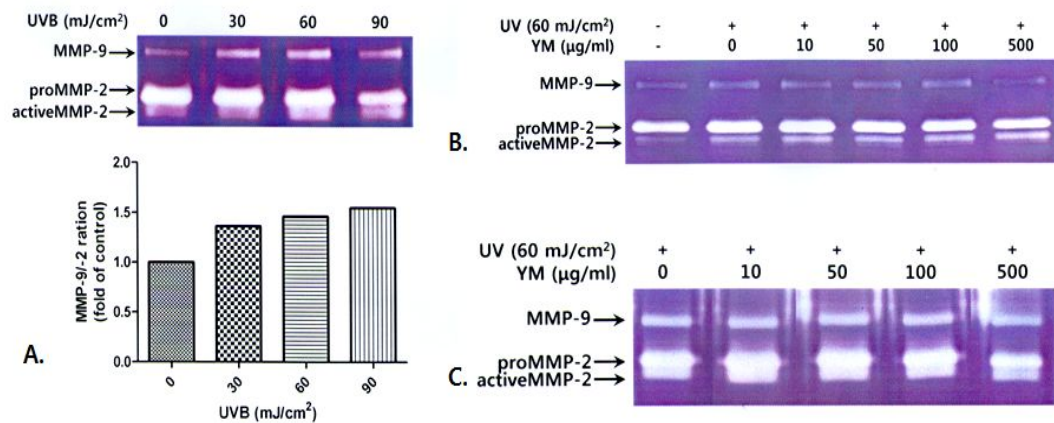


Fig. 20. Inhibitory effect of YM on MMP-9 expression in UVB-stimulated HaCaT cells. (A) To identify accurate dose of UVB that upregulate MMP-9 activity, various amount of UVB (30, 60, 90 mJ/cm²) were treated on the HaCaT cells. Among them, MMP-9 activity was most prominent in the 60 mJ/cm² UVB treated cells. (B) HaCaT cells were pre-incubated with the indicated amount of YM for 1 h and then stimulated with UVB for 24 h. Conditioned media were analyzed by zymography for MMP-9 activity. (C) To exclude the possibility of direct enzymatic inhibition, in vitro zymography was performed using the conditioned media of UVB-stimulated cells as a source of enzymes.

9. HaCaT 세포에서 염증 및 주름과 연관된 인자의 mRNA 발현에 미치는 영향

HaCaT 세포에 다양한 농도의 육미지황탕을 2시간 선 처리하고, UVB로 자극한 후 24시간 배양하였다. 전체 RNA를 세포에서 추출하였고, 염증 및 주름과 연관된 유전자의 발현은 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. Fig. 21.에서 보는 바와 같이 UVB는 HaCaT 세포에서 MMP-9의 발현을 현저히 증가시켰고 YM은 농도의존적으로 MMP-9의 발현을 감소시켰다. 그러나 MMP-3의 발현에는 별 영향을 미치지 않았다. 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 에 있어서 UVB는 HaCaT 세포에서 이들 유전자의 발현을 증가시켰으며, YM은 고농도에서 이들의 발현을 감소시켰으나 그 효과는 현저하지 않았다.(Fig. 21).

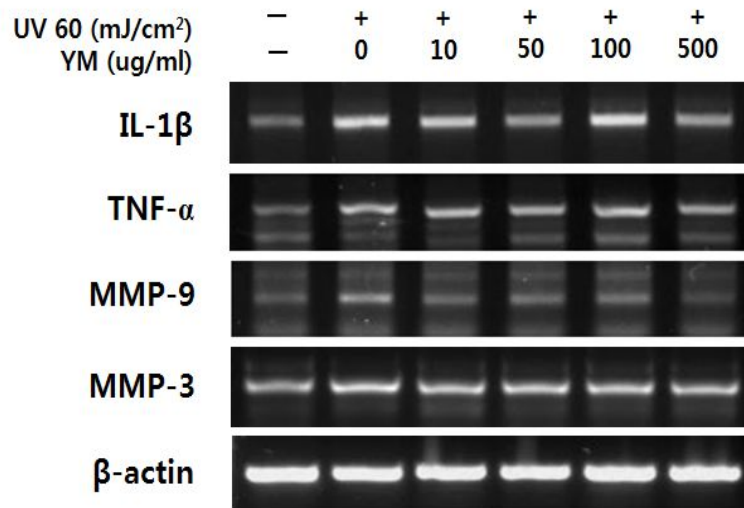


Fig. 21. YM down-regulates the expression of various inflammatory and wrinkle associated genes. Total RNA was extracted from

HaCaT cells differentially treated with YM and UVB, and analyzed by semiquantitative RT-PCR for IL-1 β , TNF- α , MMP-9, MMP-3. Relative expression of each mRNA was also shown against the message of β -actin, and internal control.

V. 고찰

최근에는 인체의 건강이나 피부미용에 대한 관심이 크게 높아지면서 내적 요인뿐 아니라 자외선 등 외적요인에 의한 피부 노화 억제 또는 노화 개선을 위하여 화장품, 식품, 의약품을 비롯한 다양한 분야에서 항 노화 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 또한 웰빙의 열풍으로 인해 실내 활동의 증가, 생명의 연장, 많은 여가 생활 등 자외선으로부터 피부를 보호하고 유지하려는 노력이 증가하는 추세이므로 광노화 피부에 대한 연구는 향후 더욱 관심의 대상이 되고 있다.

피부는 표피와 진피로 나누며, 표피는 피부의 제일 바깥층으로서 피부를 보호하는 상피층이며, 표피 밑에 있는 진피는 표피를 기계적으로 지지하는 지지층으로서 결합조직으로 구성되어있다. 진피의 세포외기질에는 주로 type I collagen이 존재하여 피부에 장력과 탄력을 제공하며, 일부 type III collagen, 엘라스틴, 단백당 및 fibronectin으로 구성되어있다(Uitto et al., 1993).

피부의 노화는 내재적인 노화(intrinsic ageing)와 광노화(photoageing) 2가지 유형으로 나누며, 내재적인 노화(intrinsic ageing)는 모든 생물체에 서 기본적 또는 공통적으로 일어나는 생물학적인 기전으로서 나이가 증가함에 따라 피부의 구조와 기능이 더욱 악화되어 표피가 위축되고, 표피-진피 결합부위가 편평해지며, 비정상적으로 엘라스틴이 많이 침착되는 특징(elastogenesis)을 나타낸다(Lavker, 1979). 광노화(photoageing)는 태양 광선에 장기간 노출되어 피부에 주름을 형성하고, 거칠거칠해지며, 피부색이 좋지 않으며, 색소침착이 변화하고, 모세혈관확장증(telangiectasis) 및 종양 형성 등과 같은 여러 가지 임상적인 특징을 나타낸다(Gilchrest, 1989; Griffiths, 1992).

광노화를 유발하는 자외선은 파장의 종류에 따라 피부에 침투하는 부위에 차이가 있어 UVB(280-320nm)는 대체로 표피에서 흡수되므로 표피상피(각질세포)에 영향을 미치며, UVA(320-400nm)는 보다 심층부위에 침투하므로 표피의 각질세포와 진피의 섬유아세포에 영향을 미친다(Berneburg et al., 2000).

최근에는 피부노화의 기전에 대한 연구가 활발하여 새로운 피부노화 억제제나 치료제 개발을 위한 연구가 많이 진행되고 있으나 유기합성에 의한 비타민 유도체가 많이 사용되고 있다(박창민 등, 2008). 실험적인 연구로는 hairless mice나 인체 피부세포를 이용하여 피부내 부작용이 적은 천연 식물소재에서 피부노화 억제와 관련된 기능성 물질을 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으므로(Lee et al., 2012; Kim et al, 2009), 본 연구에서는 임상적 또는 실험적으로 다양한 분야에 활용되고 있는 처방인 육미지황탕이 광노화 피부 억제와 관련된 인자들에 미치는 변화를 형태학적으로 관찰하여 광노화 피부와 관련된 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 과학적으로 검증하고자 하였다.

육미지황탕은 숙지황, 산수유, 산약, 택사, 목단피, 복령으로 구성되며, 약물의 효능은 熟地黄은 滋陰補血, 益精填髓하고 山茱萸는 補益肝腎, 澀精固脫하고 山藥은 健脾, 補肺, 固腎, 益精하고 澤瀉는 利水滲濕, 腎中瀉火하며 熟地黃의 滋膩를 방지하고 牡丹皮는 清熱涼肝, 瀉陰中之伏火하고 茯苓은 山藥을 助하여 補脾하고 澤瀉를 助하여 利水한다고 하였다(한외과대학 방제학교실, 2003). 육미지황탕의 실험적 연구로는 다양하게 여러 분야에서 진행되어 왔으나, 본 실험의 광노화 피부와 관련된 실험적 연구로는 면역기능(정다영 등, 2010), 아토피피부염(조재훈과 김윤범, 2009), 항염작용(이귀희와 유동열, 2012) 등에 대하여 보고하였고, 또한 노화 흰쥐에서 과산화지질의 생성억제와 대사효소계에 긍정적인 영향을 미친다는 보고(윤철호, 1995; 윤일지, 1998)와 활성산소 분해계 효소활성 증가(정지천, 1996)에 의한 항산

화 기능이 있다고 보고하였으므로 광노화 피부와 관련된 실험적 연구에 활용 될 수 있을 것으로 사료되어 본 실험에 활용하였다.

본 실험에서 피부주름 양상을 육안적인 광노화 피부의 지표로 사용하여 관찰한 바 UVB를 4주간 조사하면서 vehicle을 도포하고 생리식염수를 투여한 C군(대조군)에서는 잔주름이 소실되고 깊고 굽은 주름이 현저하게 관찰되었으나 UVB를 조사하면서 육미지황탕을 투여한 YM-O군(육미지황투여군)과 육미지황탕을 투여하고 도포한 YM-OA군(육미지황탕 투여 후 도포군)에서는 대조군에 비하여 잔주름의 소실은 감소하였고, 깊고 굽은 주름은 대조군에 비하여 미약하게 관찰되었다. 또한 표피세포의 증식과 표피의 두께를 광노화 피부의 지표로 사용하여 관찰한 바 UVB를 4주간 조사한 C군의 표피두께는 $56.8 \pm 5.5 \mu\text{m}$ 로 과증식되었으나 UVB를 조사하면서 육미지황탕을 투여한 YM-O군과 육미지황탕을 투여하고 도포한 YM-OA군에서는 대조군에 비하여 상피세포의 층과 염증세포의 수를 현저히 감소시켜 육미지황탕의 광노화 피부의 항염작용 및 표피 상피세포의 증식을 억제할 것으로 사료된다.

광노화 피부에 대한 병태생리학적 연구는 광범위하게 진행되고 있으며, 태양광선에 노출된 피부에서는 세포이형성(cellular atypical)과 세포극성의 소실과 같은 조직학적인 특징을 나타낸다(Lavker, 1979; Kligman et al., 1986). 형태학적인 연구에 의하면 자외선에 의한 표피의 변화는 미미하게 발생하나, 대조적으로 진피의 결합조직층에서는 교원원섬유가 손상되어 비조직화되고 비정상적인 형태의 탄성물질이 많이 축적되는 일광탄력섬유증(solar elastosis)이 일어난다(Quan et al., 2009). 태양광선에 의하여 손상되어 화상을 입은 피부에서는 호중구(neutrophils)가 많이 관찰되며(McGregor and Hawk, 1999), 호중구에서는 neutrophil elastase(Doring, 1994; Shapiro, 2002), MMP-8 및 MMP-9와 같은 다양한 단백질 분해물질(Ford Bainton, 1999)을 분비한다.

본 실험에서 Masson's trichrome 염색과 Van Gieson's 염색을 시행하여 표피-진피결합부위 교원섬유의 변화를 관찰하면 UVB를 조사하지 않은 N군의 표피 밑의 진피층(특히 유두층)에는 aniline blue와 acid fuschin에 강하게 염색된 교원섬유가 관찰되었으나 UVB를 4주간 조사한 C군의 교원섬유는 aniline blue와 acid fuschin에 미약하게 염색되었다. 그러나 UVB를 조사하면서 육미지황탕을 투여한 YM-O군과 육미지황탕을 투여하고 도포한 YM-OA군의 진피의 유두층에서는 대조군에 비하여 aniline blue와 acid fuschin에 강하게 염색된 교원섬유가 관찰되어 육미지황탕에 의한 단백질 분해물질 억제에 의한 것으로 사료된다.

피부 진피층의 결합조직에 가장 풍부한 구조적 단백질은 type I 콜라겐(진피의 세포외기질의 약 90%를 차지)으로서 피부에 장력과 탄성을 제공한다(Gelse et al., 2003). Type I 콜라겐은 주로 진피의 섬유아세포에서 분비된 용해성 전구체인 type I procollagen으로부터 합성되어 단백질분해에 의하여 불용성의 아교섬유가 된다. 자외선에 손상된 피부에서는 세포외기질인 콜라겐의 구조적 완전성(통합)이 소실되어 피부주름이 형성되며, UV 조사에 의하여 피부내 콜라겐을 용해하는 기질금속 단백질분해효소(MMPs)의 합성을 유도하는데, 특히 정상적인 사람의 표피에서는 MMP-1, -3, -9의 과발현을 유발한다(Fisher et al., 1996).

사람에서 UVB를 suberythral dose(홍반하용량)로 조사하면 3 종류의 기질금속 단백질분해효소(MMPs)인 콜라겐 분해효소(MMP-1), 젤라틴 분해효소(MMP-9) 및 stromelysin-1(MMP-3)이 피부의 각질세포와 섬유아세포에서 분비되어 이러한 효소들의 상호작용에 의하여 피부 콜라겐을 파괴하여 노화를 촉진시킨다(Rijken et al., 2005).

UVB(290-320nm) 조사 후 화상이 일어나기 시작할 때 나타나는 부종 및 홍반과 같은 급성염증은 피부 비만세포에서 분비하는 히스타민이 중요한 매개 기능을 한다(Gilchrest et al., 1981). 사람의 피부에 자외선을 노출한

후 1시간째에는 비만세포 탈과립과 관련된 정맥주위의 부종들이 나타나기 시작하며, 조사 후 3-4시간째에는 홍반(erythema)이 일어나기 시작한다(Hart et al., 2000). UVB 조사량의 10% 이하 정도가 진피에 전달되어 피부의 비만세포가 간접적으로 UVB에 자극받아 탈과립되며, 또한 표피에 있는 UVB 광수용체에서 면역억제 신호가 개시된다고 하였다(Hart et al., 2000).

비만세포 탈과립에 의하여 방출된 히스타민은 피부 비만세포의 주요 생체 아민(biogenic amines)으로서 홍반반응시 중요한 기능을 하며(Pentland et al., 1990), 히스타민은 UVB에 의한 전신성 면역조절을 개시하기위한 경로에서 결정적인 역할을 한다(Hart et al., 1998).

본 실험에서 등과 귀의 피부조직내 비만세포는 UVB를 조사하지 않은 N군의 등쪽 피부의 진피층내 비만세포는 27.4 ± 6.6 개가 관찰되었으나 UVB를 4주간 조사한 C군의 진피층내 비만세포는 35.0 ± 8.6 개로 정상군에 비하여 증가하였다. UVB를 조사하면서 육미지황탕을 투여한 YM-O군과 육미지황탕을 투여하고 도포한 YM-OA군의 진피층내 비만세포는 각각 26.1 ± 6.8 개, 24.4 ± 2.2 개가 관찰되어 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었고, 특히 귀의 피부조직내 염색된 비만세포의 수도 등쪽 피부의 결과와 유사하게 YM-O군과 YM-OA군에서는 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내어 육미지황탕에 의한 항염작용을 억제하여 비만세포의 수적 감소를 일으켰을 것으로 사료된다.

UVB 조사에 의한 비만세포 활성화는 미리 형성된 많은 양의 TNF- α 를 방출하게하여 2시간내에 피하 내피세포에 대한 CD54와 CD62E 부착분자를 유도한다(Walsh, 1995). 진피에 있는 혈관의 활성화와 함께, 조사된 피부로 염증세포의 이동을 증가시켜 태양광선으로 인한 화상에 반응한다. 또한 TNF- α 는 UV 조사된 피부에서 림프절로 랑거한스세포(Langerhans cells)의 이주를 조절한다(Moodycliffe et al., 1994).

히스타민은 각질세포에 영향을 미칠 뿐만 아니라 직접 UV가 조사된 부위 (Laberge et al., 1995) 또는 인접한 림프절로 면역세포를 이동시켜 림프구 증식과 여러 가지 사이토카인의 방출을 조절한다(Lagier et al., 1997).

Xanthine oxidase는 체내 유리기 생성계의 비특이적인 효소로 주로 purine체의 대사산물인 hypoxanthine을 xanthine으로 산화시켜 uric acid를 생성하는 과정에서 superoxide radical을 생성하는 효소이다(Duke et al., 1973). 본 실험에서는 UVB를 조사한 HaCaT 세포에 육미지황탕 추출물(YM)을 농도별로 첨가한 바 대조군에서는 1.670 ± 0.1 mU/ml 이었으나 육미지황탕 추출물(YM) $100 \mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 군에서는 농도의존적으로 육미지황탕 추출물 투여군에서 유의적인($p < 0.01$) 차이를 보여 육미지황탕이 UVB에 의한 체내 유해 활성산소 생성기인 XO 저해작용을 야기시킨 것으로 사료된다.

Oxygen free radical은 불완전한 분자구조로 산소이용력이 떨어져 보다 안정된 상태를 유지하기 위하여 체내의 조직에서 전자를 가져오는 과정에서 여러가지 세포들의 변형과 손상을 야기한다. Superoxide dismutase(SOD)는 2개의 superoxide radical을 제거하여 체내 축적을 막아준다. 한 개의 superoxide radical은 산화하여 전자(e^-)가 방출되고, 나머지 하나는 환원되어 H_2O_2 로 변화시키는 항산화제이다. 2개의 superoxide radical이 1개의 과산화수소로 바뀌는 속도는 SOD가 있을 때 약 만배 정도 빨라진다. 제2항산화제인 catalase는 SOD와 서로 균형을 이루어 상호협력하며, 이러한 균형이 깨져 H_2O_2 를 제거하는 catalase에 비해 H_2O_2 를 산물로 만들어내는 SOD작용이 더 크면 세포손상을 일으켜 질병을 유발시킨다. 세포방어에 관여하는 catalase는 H_2O_2 를 물과 산소로 분해시켜 oxygen radical 생성을 제어하는 강력한 효소이다. 본 실험에서 UVB를 조사한 HaCaT 세포에 육미지황탕 추출물(YM)을 농도별로 첨가한 바 유해산소를 제거하는 효소인 SOD는 HaCaT cell lysate에서 대조군에서는 3.4 ± 0.2 U/ml 이었으나 육미지

황탕 추출물(YM) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 군에서는 5.2 ± 0.3 U/ml, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 5.4 ± 0.4 U/ml, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 5.8 ± 0.3 U/ml로 농도의존적으로 육미지황탕 추출물 투여군에서 유의적인 차이($p<0.05$)를 보였다. 또한 UVB를 조사한 HaCaT 세포에 육미지황탕 추출물을 농도별로 첨가하면 Catalase는 HaCaT cell lysate에서 대조군에서는 5.41 ± 0.3 nmol/min/ml 이었으나 육미지황탕 추출물(YM) 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 군에서는 8.89 ± 0.4 nmol/min/ml, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 9.60 ± 0.5 nmol/min/ml, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 10.20 ± 0.5 nmol/min/ml로 농도의존적으로 육미지황탕 추출물 투여군에서 유의적인 차이($p<0.01$ 또는 $p<0.05$)를 보여 육미지황탕은 UVB 조사에 의하여 피부에 생성된 oxygen free radical을 소거하려는 생리적인 적응현상으로 SOD가 활성화된 것으로 사료되고, UVB 광노화에 의한 지방과 유기물의 자동산화에 의하여 발생한 H_2O_2 를 분해하기 위하여 육미지황탕 추출물에 의한 catalase의 활성이 증가한 것으로 사료되었다. 또한 육미지황탕의 항산화 기능에 대하여 윤철호(1995)와 윤일지(1998)는 과산화지질의 생성억제와 대사효소계에 긍정적인 영향을 미친다고 보고하였고, 정지천(1996)은 육미지황탕이 활성산소 분해효소를 활성화시킨다는 연구결과가 본 실험의 결과를 뒷받침하고 있다.

활성산소는 생체내외의 산화-환원 반응, 자외선 및 방사선 등에 의해 생성되며, 지방산화, DNA 손상 및 단백질 변성 등을 초래하여 암, 동맥경화, 심혈관 질환 등을 유발하는 것으로 알려졌다(Miquel et al., 1989). 본 실험에서는 UVB를 조사한 HaCaT 세포에 육미지황탕 추출물(YM)을 농도별로 첨가한 후 유해산소를 생성하는 효소인 XO의 생성량을 관찰한 바 육미지황탕 추출물의 농도에 의존하여 유의성있게 감소하였고($p<0.01$), 유해산소를 제거하는 효소인 SOD는 육미지황탕 추출물 투여군이 대조군에 비해 농도의존적으로 유의성있게($p<0.05$) 증가하였다 또한 catalase도 대조군에 비해 농도 의존적으로 육미지황탕 추출물 투여군에서 유의성있게($p<0.01$ 또는

p<0.05) 증가하여 유해 활성산소 생성계 효소(XO)의 활성도를 억제하였고, 또한 유해 활성산소 제거계 효소(SOD와 catalase)의 활성도를 증가시킴을 알 수 있었다.

또한 육미지황탕의 항산화 활성을 DPPH 라디칼 소거능에 의하여 관찰하였다. DPPH 라디칼은 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 라디칼로서 항산화 성분에 의해 환원되면 짙은 자색이 탈색되어지는데, 특히 토코페롤, 아스코르빈산 및 방향족 아민류 등에 의해 환원력이 큰 것으로 알려졌다(Blois, 1958). DPPH 시약에 대해 육미지황탕을 10, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하였을 때 10-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 진보라색을 탈색시켜 YM의 농도가 증가함에 따라 자유라디칼을 소거하는 활성도가 증가함을 관찰하였다. 또한 농도의존적으로 더욱 높은 활성을 보여 육미지황탕에는 항산화 활성을 갖는 유용한 성분들이 함유되어 있음을 확인할 수 있었고, 이러한 육미지황탕의 항산화 활성은 세포내에서 염증발현 시 증가되는 산화적 스트레스에 대해 효과적으로 방어하는 것으로 사료된다.

본 실험에서 자외선에 의한 피부조직의 세포외기질(extracellular matrix) 분해능의 지표로서 MMP-2와 MMP-3의 발현 정도를 관찰하면 UVB를 조사하지 않은 N(normal group)군의 표피의 상피세포층과 진피층에서는 미약하게 발현되었으나 UVB를 4주간 조사한 C군의 표피 상피세포층과 진피층에서는 N군에 비해 비교적 강하게 발현되었다. UVB를 조사하면서 육미지황탕을 투여한 YM-O군과 육미지황탕을 투여하고 도포한 YM-OA군의 표피 상피세포층과 진피층에서는 C군에 비해 미약하게 발현되었고, YM-OA군이 YM-O군에 비해 미약하게 발현되어 육미지황탕은 광노화 피부에 대한 MMP-2와 MMP-3의 발현을 억제할 것으로 사료된다.

MMPs는 세포외기질의 재구성에 관여하는 Zn 의존성 펩티드내부가수분해효소(endopeptidase)로서 형태발생, 혈관신생, 관절염, 피부궤양, 종양 침입 및 전이에 관여한다(Birkedal-Hansen, 1995). 현재까지 알려진 MMPs

는 collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins 및 membrane-type MMPs 5군으로 알려졌으며, 콜라겐, 단백질, 당단백의 분해에 관여한다(Kligman et al., 1986). 이들 MMPs 가운데 gelatinase A(MMP-2 또는 72KDa type IV collagenase)와, gelatinase B(MMP-9 또는 92-KDa type IV collagenase)는 type IV와 type VII collagen을 분해시키고, stromelysin(MMP-3와 MMP-10)은 기저막의 접착성 단백질인 라미닌(laminin)을 분해시킨다(Reynolds, 1996).

MMPs는 불활성화 된 zymogen(proMMP)으로 분비되는데 제 기능을 하기 위해서는 활성화 (active MMP) 되어야한다. proMMP 합성을 자극하는 것은 대체로 성장인자 또는 사이토카인에 의한 전사수준하에서 조절된다(Reynolds, 1996). MMPs는 사람의 섬유아세포(Herrmann et al., 1993; Kawaguchi et al., 1996; Brenneisen et al., 1998)와 사람의 피부(Koivukangas et al., 1994; Fisher et al., 1996)에 자외선을 조사하면 MMP-1, -2, -3 및 -9가 증가하기 때문에 광노화와 관계가 있다고 하였다. 특히 Fisher et al.(1996) 등은 매우 낮은 강도의 UVB에 노출된 사람의 피부에서 MMPs가 증가한다고 하여 MMPs는 UV에 유발된 노화인자라고 하였다. 콜라겐을 분해하는 MMP-1, 3, 9는 주로 표피에서 유발되지만 분비된 효소는 진피에 확산되어 콜라겐을 분해한다(Quan et al., 2009). 이러한 확산은 직접 MMP가 콜라겐의 세포외기질에 결합하여 확산을 도와준다(Knauper et al., 1997; Overall, 2001).

이러한 연구결과는 태양의 자외선이 사람의 피부에 노출되면 표피의 각질 세포가 반응하여 MMP를 분비한다. 그러나 진피세포는 간접적으로 방분비기전(paracrine mechanism)을 통한 성장인자 또는 사이토카인을 방출하여 표피 각질세포에서 MMPs의 생성에 관여한다(Quan et al., 2009).

피부에서의 혈관형성은 여러 가지 생리학적 및 병리학적인 상황에서 일어나고 있으며, 이러한 VEGF의 농도는 균형된 피부 혈관형성을 유지하는데

중요한 지표로서 혈관형성 인자인 VEGF의 발현은 자외선에 노출된 피부에서 증가하고 있다(Yano et al., 2004). Yano 등(2002)은 피부에서의 혈관형성은 광노화를 일으키는 중요한 기능을 하며, 혈관형성을 억제함으로써 자외선에 의한 주름형성을 감소시킨다. 본 실험에서 광노화와 관련된 혈관형성의 지표와 관련된 VEGF의 발현은 UVB를 4주간 조사한 C군의 표피 상피세포층에서는 N군에 비해 비교적 강하게 발현되었으나, UVB를 조사하면서 4주간 육미지황탕을 투여한 YM-O군과 육미지황탕을 투여하고 도포한 YM-OA군의 표피 상피세포층에서는 C군에 비해 미약하게 발현되었고, 광노화와 관련된 MAP kinase pathway를 활성화하여 EGF 수용체 관련 유전자 발현 지표는 UVB를 조사하면서 4주간 육미지황탕을 투여한 YM-O군과 육미지황탕을 투여하고 도포한 YM-OA군의 표피 상피세포와 진피층에서는 C군에 비해 염색강도는 미약하였고, 염색된 세포의 수도 C군에 비해 다소 감소하여 육미지황탕이 광노화에 의한 혈관형성 지표인 VEGF의 발현을 억제한 것으로 사료된다.

본 실험에서 HaCaT cell에 다양한 농도의 YM으로 1시간 동안 선처리 한 후 60 mJ/cm^2 의 강도로 UVB를 조사한 후 24시간 동안 배양한 후 배양액을 전기영동하여 관찰한 바 UVB는 MMP-9의 분비는 자극하였으나 MMP-2에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 특히 YM은 $500 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 현저하게 MMP-9를 감소시켰음을 확인하였다. HaCaT 세포를 이용하여 염증 및 주름과 연관된 유전자의 발현을 RT-PCR을 이용하여 분석한 바 UVB는 HaCaT 세포에서 MMP-9의 발현은 현저히 증가시켰으며 육미지황탕(YM)은 농도의존적으로 MMP-9의 발현을 감소시켰다. 그러나 MMP-3의 발현에는 별 영향을 미치지 않았다. 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 에 있어서 UVB는 HaCaT 세포에서 이들 유전자의 발현을 증가시켰으며, YM은 고농도에서 이들의 발현을 감소시켰으나 그 효과는 현저하지 않았다.

결론적으로 본 연구에서는 육미지황탕의 광노화에 대한 피부의 형태학적 변화에서 주름형성 억제, 표피 상피세포층의 현저한 감소, 진피층내 염증세포의 수 및 비만세포의 수를 감소시켰다. 또한 유해 활성산소 생성계 효소인 XO의 활성도를 억제시켰고, 유해 활성산소 제거계 효소인 SOD와 catalase의 활성도를 증가시켰다. 또한 DPPH 라디칼 소거능과 ROS와 같은 산소유래 자유라디칼에 대한 제거능력이 현저하였다. 면역조직화학적 관찰에 의하면 광노화에 의한 피부내 세포외기질(extracellular matrix)의 분해능과 혈관형성지표인 MMP-2, MMP-3, VEGF 및 EGF의 발현을 억제하였다. 육미지황탕의 염증 및 주름과 연관된 유전자의 발현은 육미지황탕의 농도에 비례하여 MMP-9의 발현을 감소시켰고, 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 의 발현은 현저히 감소시키지는 않았다.

이상의 실험 결과로 육미지황탕은 UVB에 의한 피부 광노화를 억제시킬 것으로 사료되었으며, 자외선 손상에 의한 광노화 피부에서 육미지황탕의 개별 약재에 대한 심도있는 연구가 추후에 이루어져야 할 것으로 생각된다.

VI. 결 론

보습제의 대표적인 처방이며, 항산화, 아토피피부염 관련 제반 증상 완화 및 면역조절을 통한 항염증 효과 등에 효과가 있다고 보고된 육미지황탕의 광노화 억제효과를 관찰하기 위하여 UVB를 4주간 반복적으로 조사한 SKH-1 hairless 마우스에 육미지황탕 추출물을 투여하거나 도포한 후 피부노화 억제와 관련된 인자들에 미치는 변화를 형태학적으로 관찰하고, HaCaT cell을 이용하여 생화학적 및 분자생물학적으로 관찰하여 광노화 피부 억제와 관련된 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 과학적으로 검증한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

육미지황탕 투여군(YM-O)군과 육미지황탕 투여후 도포군(YM-OA)에서의 육안적인 관찰소견은 대조군에 비하여 잔주름의 소실이 감소하였고, 깊고 굵은 주름도 대조군에 비하여 미약하게 관찰되었다. YM-O군과 YM-OA군에서의 조직학적 관찰은 대조군에 비해 상피세포층이 현저히 감소하였으며, 진피층내 염증세포의 수도 대조군에 비해 현저히 감소하였다. YM-O군과 YM-OA군의 진피의 유두층에서는 대조군에 비해 aniline blue와 acid fuchsin에 강하게 염색된 교원섬유가 띠모양으로 관찰되었다. YM-O군과 YM-OA군의 등쪽과 귀의 피부의 진피층내 비만세포는 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다. YM-O군과 YM-OA군의 MMP-2, MMP-3의 발현은 표피 상피세포층과 진피층에서 대조군에 비해 미약하게 발현되었으며, VEGF와 EGF도 각각 피부 상피세포층과 진피층에서 대조군에 비해 미약하게 관찰되었다.

UVB를 조사한 HaCaT 세포에 육미지황탕 추출물을 농도별로 첨가한 후 유해 활성산소 생성계 활성XO의 생성을 관찰한 결과 XO는 육미지황탕 추출물 투여군이 대조군에 비해 농도의존적으로 유의성있게($p < 0.01$) 감소하

였다. SOD는 HaCaT cell lysate에서 육미지황탕 추출물 투여군이 대조군에 비해 농도의존적으로 유의성있게($p < 0.05$) 증가하였고, catalase는 HaCaT cell lysate에서 대조군에 비해 농도의존적으로 육미지황탕 추출물 투여군에서 유의성있게($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 증가하였다.

육미지황탕(YM)의 자유라디칼 소거능력은 10-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 활성도가 증가하였으며, 활성산소종(ROS)의 생성도 육미지황탕의 농도에 비례하여 농도 의존적으로 유의성 있게 억제되었다($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$). 육미지황탕(YM)의 HaCaT 세포에서의 MMP-9의 분비에 대한 효능은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 현저하게 감소함을 확인하였고, MMP-9의 활성은 직접적으로 육미지황탕에 의하여 감소하지 않음을 확인할 수 있었다.

육미지황탕의 염증 및 주름과 연관된 유전자의 발현은 육미지황탕의 농도에 비례하여 MMP-9의 발현은 감소시켰으나, 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-1 β 의 발현은 현저히 감소시키지는 않았다.

이상의 실험 결과로 육미지황탕은 자외선에 의한 광노화피부를 야기하는 여러 가지 인자들의 활성을 억제 할 것으로 사료되어 광노화에 의한 피부손상을 예방할 수 있는 생리활성이 있는 기능성 화장품소재로서 활용이 가능할 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Meinhard W, Iiana TB, Lale N, Wenjian M, Lars AS, Ziba RW, Jutta S and Karin SK. (2001) Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem and Photobiology* 63, 41-51
2. Cooper KD, Oberhelman L, Hamilton TA, Baadsgaard O, Terhune M, LeVee G, Anderson T and Koren H. (1992) UV exposure reduces immunization rates and promotes tolerance to epicutaneous antigens in humans: relationship to dose, CD1a-DR epidermal macrophage induction, and Langerhans cell depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 8497-8501
3. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S and Voorhees JJ. (1997) Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 337(20), 1419-1428
4. Gilchrest BA and Yaar M. (1992) Ageing and photoageing of the skin: observations at the cellular and molecular level. *Br J Dermatol* 127 (Suppl 41), 25-30
5. Lavker RM. (1995) Cutaneous aging: chronologic versus photoaging. In: Gilchrest BA, ed. *Photoaging*. Cambridge, Mass.:Blackwell Science, 123-135
6. Berneburg M, Plettenberg H and Krutmann J. (2000) Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16, 239-244

7. Afaq F, Syed DN, Malki A, Hadi N, Sarfaraz S, Kweon MH, Khan N, Zaid MA and Mukhtar H. (2007) Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB mediated oxidative stress and apoptosis. *J Invest Dermatol* 127, 222-232
8. Park K and Lee JH. (2008) Protective effects of resveratrol on UVB-irradiated HaCaT cells through attenuation of the caspase pathway. *Oncol Rep* 19, 413-417
9. Gilchrest BA and Rogers G. (1993) Photoaging. In: Lim H, Soter N, eds. *Clinical Photomedicine*. New York: Marcel Dekker, pp. 95-111
10. Lavker RM. (1979) Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. *J Invest Dermatol* 73, 59-66
11. Kligman AM, Grove GL, Hirose R and Leyden JJ. (1986) Topical tretinoin for photoaged skin. *J Am Acad Dermatol* 15, 836-859
12. Kligman AM. (1969) Early destructive effects of sunlight on human skin. *JAMA* 210, 2377-2380
13. Smith JG, Davidson EA, Sams WM and Clark RD. (1962) Alterations in human dermal connective tissue with age and chronic sun damage. *J Invest Dermatol* 39, 347-350
14. Mitchell RE. (1967) Chronic solar elastosis: A light and electron

- microscopic study of the dermis. *J Invest Dermatol* 48, 203-220
15. Chen VL, Fleischmajer R, Schwartz E, Palaia M and Timpl R. (1986) Immunochemistry of elastotic material in sun-damaged skin. *J Invest Dermatol* 87, 334-337
 16. 박창민, 이순영, 정민석, 최종완. (2008) 3-O-cetyl-L-ascorbic acid의 주름 개선 효과. *대한화장품학회지* 34(4), 303-309
 17. Wyss R. (1995) Chromatographic and electrophoretic analysis of biomedically important retinoids. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 671, 381-425
 18. Weiss JS, Ellis CN, Headington JT and Voorhees JJ. (1988) Topical tretinoin in the treatment of aging skin. *J Am Acad Dermatol* 19, 169-175
 19. Gary JF, Kang SW, Varani J, Zsuzsanna BC, Wan Y, Datta S and Voorhees JJ. (2002) Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 138, 1462-1470
 20. Kim YG, Sumiyoshi M, Sakanaka M and Kimura Y. (2009) Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice. *Eur J Pharm* 602, 148-156
 21. 전대레사, 최소영, 김영철, 장병수. (2011) 홍차 열수추출물의 피부노화 개선효과. *대한미용학회지* 7(4), 441-447
 22. Lee SJ, Cho SW, Kwon YY, Kwon HS and Shin WC. (2012) Inhibitory effects of ethanol extracts from *Nuruk* on oxidative

stress, melanogenesis, and photo-aging. *Mycobiology* 40(2), 117-123

23. 이희경, 비타민나무 열매로부터 분리한 Quercetin 3 - glucoside - 7 - rhamnoside의 항산화 및 주름개선 효과. *Kor J Aesthet Cosmetol* 10(3), 731-736, 2012
24. 오수정, 모정희. (2011) 함초와 발효함초 추출물의 화장품 소재로서 생리 활성 비교연구. *대한피부미용학회지* 9(4), 305-312
25. 오경동, 김호철. (2011) 구기자 다당류(LBP)에 관한 항노화 연구 진전. *대한피부미용학회지* 9(4), 363-367
26. 정다영, 하혜경, 이호영, 이진아, 이준경, 황대선, 신현규. (2010) 대표적인 補陰之劑의 면역 활성화 비교 연구 - 육미지황탕, 자음강화탕, 쌍화탕. *대한한의학회지* 31(5), 112-123
27. 조재훈, 김윤범. (2009) 六味地黃湯이 아토피피부염을 유발한 NC/Nga mouse에 미치는 영향. *한방안이비인후피부과학회지* 22(1), 120-132
28. 이귀희, 유동열. (2012) 추출방법에 따른 육미지황탕의 항염증 작용 평가. *대한한방부인과학회지* 25(2), 89-107
29. 윤철호. (1995) 좌귀음과 우귀음이 노화 rat의 간 과산화지질 생성 및 활성효소생성계 효소활성에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 16, 62-70
30. 윤일지. (1998) 육미지황탕이 노화 rat의 간내 과산화지질 및 대사효소계에 미치는 영향. 대전대학교 대학원 석사학위 논문

31. 정지천. (1996) 좌귀음과 우귀음에 의한 활성효소류의 소거작용과 항산화 효소계의 활성증가효과에 대한 연구. 대한한의학회지 17, 145-165
32. Uitto J. (1993) Collagen. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, eds. *Dermatology in general medicine*. 4th ed. Vol. 1. New York: McGraw-Hill, pp. 299-314
33. Bernstein EF and Uitto J. (1996) The Effect of Photodamage on Dermal Extracellular Matrix. *Clin Dermatol* 14, 143-151
34. Gilchrest BA. (1989) Skin aging and photoaging: an overview. *J Am Acad Dermatol* 21, 610-613
35. Griffiths CE. (1992) The clinical identification and quantification of photodamage. *Br J Dermatol* 127(Suppl. 41), 37-42
36. Röck K and Fischer JW. (2011) Role of the extracellular matrix in extrinsic skin aging. *Hautarzt* 62, 591-597
37. Barry H. (1987) Oxidants and human disease; Some new concept. *FASEB J* 1, 358-364
38. Kehrer JP. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *CRC Crit Rev Toxicol* 23, 21-8
39. Pillai S, Oresajo C and Hayward J. (2005) Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int J Cosmet Sci* 27, 17-34

40. Aruoma OI. (1994) Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidant. *Food Chem Toxicol* 62, 671-83
41. Fiers W, Bevaert R, Declercq W and Vandenabeele P. (1999) More than one way to die: Apoptosis and necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18, 7719-7730.
42. Record IR. and Dreosti IE, Konstantinopoulos M and Buckley RA. (1991) The influence of topical and systemic vitamin E on ultraviolet light-induced skin damage in hairless mice. *Nutr Cancer* 16, 219-226
43. Kawaguchi Y, Tanaka H, Okada T, Konishi H, Takahashi M, Ito M and Asai J. (1996) The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 288, 39-44
44. Chung JH, Seo JY, Choi HR, Lee MK, Youn CS, Rhie G, Cho KH, Kim KH, Park KC and Eun HC. (2001) Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 117, 1218-1224
45. Gilchrest BA. (1996) A review of skin ageing and its medical therapy. *Br J Dermatol* 135, 867-875
46. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S and Voorhees JJ. (1996) Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature*

379(6563), 335-339

47. Kiss I, Chen S and Tramposch KM. (1991) The effect of high and low ultraviolet-B dose exposure on the degree of hairless mouse skin wrinkling. *Photochem Photobiol* 53, 109-112.
48. Birkedal-Hansen H.(1995) Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 7, 728-35
49. Herrmann G, Wlaschek M, Lange TS, Prenzel K, Goerz G and Scharffetter-Kochanek K. (1993) UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. *Exp Dermatol* 2, 92-97
50. Kawaguchi Y, Tanaka H, Okada T, Konishi H, Takahashi M, Ito M and Asai J. (1996) The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 288, 39-44
51. Brenneisen P, Wenk J, Klotz LO, Wlaschek M, Briviba K, Krieg T, Sies H and Scharffetter-Kochanek K. (1998) Central role of ferrous/ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase [matrix-degrading metalloproteinase (MMP)-1] and stromelysin -1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 273, 5279-5287
52. Koivukangas V, Kallioinen M, Autio-Harmainen H and

- Oikarinen A. (1994) UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta Derm Venereol* 74, 279-282
53. Reynolds JJ. (1996) Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis* 2, 70-76
54. Gilchrest BA, Soter NA, Stoff JS and Mihm MC Jr. (1981) The human sunburn reaction: histologic and biochemical studies. *J Am Acad Dermatol* 5, 411-422
55. Hart PH, Grimbaldston MA and Finlay-Jones JJ. (2000) Mast cells in UV-B-induced immunosuppression. *J Photochem Photobiol B: Biol* 55, 81-87
56. Pentland AP, Mahoney M, Jacobs SC and Holtzman MJ. (1990) Enhanced prostaglandin synthesis after ultraviolet injury is mediated by endogenous histamine stimulation. A mechanism for irradiation erythema. *J Clin Invest* 86, 566-574
57. Hart PH, Grimbaldston MA, Swift GJ, Jaksic A, Noonan FP and Finlay-Jones JJ. (1998) Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice. *J Exp Med* 187, 2045-2053
58. Walsh LJ. (1995) Ultraviolet B irradiation of skin induces mast

cell degranulation and release of tumour necrosis factor- α .
Immunol Cell Biol 73, 226-233

59. Moodycliffe AM, Kimber I and Norval M. (1994) Role of tumour necrosis factor- α in ultraviolet B light-induced dendritic cell migration and suppression of contact hypersensitivity. Immunology 81, 79-84
60. Laberge S, Cruikshank WW, Kornfield H and Center DM. (1995) Histamine induced secretion of lymphocyte chemoattractant factor from CD8 α T cells is independent of transcription and translation. Evidence for constitutive protein synthesis and storage. J Immunol 155, 2902-2910.
61. Lagier B, Lebel B, Bousquet J and Pene J. (1997) Different modulation by histamine of IL-4 and interferon- γ (IFN- γ) release according to the phenotype of human Th0, Th1 and Th2 clones. Clin Exp Immunol 108, 545-551
62. 양규환. (1997) 녹차 polyphenol 성분에 의한 피부광노화 억제 효과. 한국식품과학회 국제심포지움 4, 57-65
63. 정진호. (2001) 사람의 피부에서 녹차 EGCG의 자외선에 의한 피부손상 및 노화억제 효과. 한국식품과학회 국제심포지움 6, 3-10
64. 박성규, 이종찬, 안수미, 이진영, 김연준, 황재성, 이병곤, 장이섭. (2005) 적송엽이 피부의 노화에 미치는 영향. 대한본초학회지 20(4), 1-10
65. 염명훈, 이진영, 김지성, 박찬웅, 김덕희, 김한곤. (2010) 인삼열매의 피부

노화 억제 효과. 생약학회지 41(1), 26-30

66. 형순희. (2008) Hairless 마우스에서 치자 추출물이 피부노화 억제에 미치는 효과. 계명대학교 대학원 박사학위논문
67. 박시향, 조득문, 최병대, 최영준, 최진호. (2008) 자외선 조사 무모쥐 피부에 도포한 애엽(Mugwort) 추출물의 항산화 효과. 한국식품영양과학회지 37(1), 20-26
68. 배인순. (2008) 황백 열수추출물의 피부노화 억제 효과 및 화장품 소재 활용에 관한 연구. 계명대학교 대학원 박사학위논문
69. Quan T, Qin Z, Xia W, Shao Y, Voorhees, JJ and Fisher GJ. (2009) Matrix-degrading metalloproteinases in Photoaging. J Investig Dermatol Symp Proc 14(1), 20-24
70. Wen KC, Fan PC, Tsai SY, Shin IC and Chiang HM. (2012) *Ixora parviflora* protects against UVB-induced photoaging by inhibiting the expression of MMPs, MAP kinases, and COX-2 and by promoting type I procollagen synthesis. Evid Based Complement Alternat Med 2012, 1-11
71. Pallea R, Yoon NY and Kim SK. (2010) Anti-photoaging and photoprotective compounds derived from marine organisms. Mar Drugs 8, 1189-1202
72. Valko M, Leibfritzm D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M and Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 39, 44-84

73. 허준. (1983) 동의보감, 남산당, 서울, p. 449
74. 생약학교수협의회. (1994) 본초학, 대한약사회, p. 784
75. 한의과대학 방제학교실. (2003) 방제학, 영림사, 서울. p. 298
76. 錢乙. (1983) 小兒藥證直訣, 江蘇科學技術出版社, 江蘇, p. 47
77. 서은실, 임종필. (2000) 육미지황탕이 카드뮴 중독된 흰쥐의 간장 약물 대사기능에 미치는 영향. 약학회지 44(6), 552-557
78. 정다영, 하혜경, 이호영, 이진아, 이준경, 황대선, 신현규. (2010) 대표적 인 보음지제의 면역 활성화 비교 연구. 대한한의학회지 31(5), 112-123
79. 전진오, 정현우. (2000) 육미지황탕이 면역세포에 미치는 실험적 효과. 대한한방내과학회지 21(2), 243-250
80. 문성식, 김병수, 강정수. (2003) 육미지황탕의 항산화작용에 관한 연구. 동의생리병리학회지 17(2), 436-442
81. 홍원식편. (1981) 정교황제내경. 동양의학연구소, 서울, pp. 19-20, 111, 246, 301
82. 신재용 편저. (1984) 방약합편해설. 정보사, 서울, p. 44
83. Hsu SM, Raine L and Fanger H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) procedures. J Histochem Cytochem 29, 577-580
84. Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.

J Immunol Methods 65(1 - 2), 55-63

85. Bergmeyer HU, Gawehn K and Grassl M. (1974) In methods of enzymatic analysis. 2nd ed. New York: Academic Press Inc. 1, pp. 521-522
86. Maier CM and Chan PH. (2002) Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 8(4), 323-334
87. Johanson LH and Borg LA. (1988) A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 174, 331-336
88. Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST and Korte Jr DW. (1990) Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem* 184, 193-199
89. Wang LF and Zhang HY. (2003) A theoretical investigation on DPPH radical-scavenging mechanism of edaravone. *Bioorg. Med Chem Lett* 13, 3789-3792
90. Ha KT, Kim JK, Lee YC and Kim CH. (2004) Inhibitory effect of Daesungki-Tang on the invasiveness potential of hepatocellular carcinoma inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities. *Toxicol Appl Pharmacol* 200(1), 1-6
91. McGregor JM and Hawk JLM. (1999) Acute effects of ultraviolet radiation on the skin. In: *Fitzpatrick's Dermatology*

in General Medicine (Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K et al., eds), 5th ed. New York: McGraw-Hill, pp. 1555-1561

92. Doring G. (1994) The role of neutrophil elastase in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 50, S114-117
93. Shapiro SD. (2002) Neutrophil elastase: path clearer, pathogen killer, or just pathologic *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 266-268
94. Ford Bainton D. (1999) Developmental biology of neutrophils and eosinophils. In: *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates* (Gallin JI, Snyderman R, eds), 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 13-34
95. Gelse K, Pöschl E and Aigner T. (2003) Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55(12), 1531-1546
96. Pentland AP, Mahoney M, Jacobs SC and Holtzman MJ. (1990) Enhanced prostaglandin synthesis after ultraviolet injury is mediated by endogenous histamine stimulation. A mechanism for irradiation erythema. *J Clin Invest* 86, 566-574
97. Walsh LJ. (1995) Ultraviolet B irradiation of skin induces mast cell degranulation and release of tumour necrosis factor- α . *Immunol Cell Biol* 73, 226-233
98. Moodycliffe AM, Kimber I and Norval M. (1994) Role of tumour necrosis factor- α in ultraviolet B light-induced dendritic cell

migration and suppression of contact hypersensitivity.
Immunology 81, 79-84

99. Laberge S, Cruikshank WW, Kornfield H and Center DM. (1995) Histamine induced secretion of lymphocyte chemoattractant factor from CD8⁺ T cells is independent of transcription and translation. Evidence for constitutive protein synthesis and storage. *J Immunol* 155, 2902-2910
100. Duke EJ, Joyce P and Ryan JP. (1973) Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *Biochem J* 131(2), 187-190
101. Miquel J, Quintaniha AT and Weber H. (1989) Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. CRC Press, Vol I, p. 223
102. Blois MS. (1958) Antioxidant determination by the use a stable free radicals. *Nature* 26, 1191-1204
103. Birkedal-Hansen H. (1995) Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 7, 728-735
104. Reynolds JJ. (1996) Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis* 2, 70-76
105. Knäuper V, Cowell S, Smith B, López-Otin C, O'Shea M, Morris H, Zardi L and Murphy G. (1997) The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the a

ctivation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinases interaction. *J Biol Chem* 272, 7608-7616

106. Overall CM. (2001) Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies. *Methods Mol Biol* 151, 79-120
107. Yano K, Kajiya K, Ishiwata M, Hong YK, Miyakawa T and Detmar M. (2004) Ultraviolet B-induced skin angiogenesis is associated with a switch in the balance of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression. *J Invest Dermatol* 122, 201-208
108. Yano K, Oura H and Detmar M. (2002) Targeted overexpression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in the epidermis of transgenic mice prevents ultraviolet-B-induced angiogenesis and cutaneous photo - damage. *J Invest Dermatol* 118, 800-805

ABSTRACT

Experimental Studies on the Inhibitory Effects of Yukmijiwhangtang on Photoaging Skin Induced by UVB Irradiation in SKH-1 Mice

Jeon, Hye-Sook

Department of Food & Nutrition,
The Graduate School,
Sungshin Women's University

Chronic ultraviolet-B(UVB) irradiation of the skin results in epidermal hyperplasia, degradation of extracellular matrix, and formation of wrinkles. To investigate the anti-photoaging effect of extract of Yukmijiwhangtang (YM) in SKH-1 mice. We observed the effects of YM on skin wrinkles formation, histological changes related to epidermal thickness, collagen fibers, elastic fibers and mast cells, and immunohistochemical changes related to cytokines and enzymes in photoaging skin caused by UVB irradiation of SKH-1 mice.

The oral administration and topical application of extract of

YM(YM-OA) decreased wrinkle formation and the epidermal thickness compared to control group. Furthermore, YM-OA prevented the disruption of collagen fibers within papillary layer of dermis, and decreased number of mast cells in the dorsal and ear skins induced by UVB irradiation. Treatment with YM-O and YM-OA decreased immunohistochemical density of matrix metalloproteinases(MMP)-2, -3 related to degradation of extracellular matrix, and vascular endothelial growth factor(VEGF) expression related to angiogenesis in the epidermis. Treatment with YM-O and YM-OA reduced number of epidermal growth factor(EGF) immunostained cells related to activation of MAP kinase pathways involving upregulation of EGF receptor in the photoaging skin.

On the effects of oxidative stress and antioxidant function on the treatment with YM, The activity of xanthine oxidase(XO) was significantly decreased by treatment of YM in all the concentrations($p < 0.01$). The activity of superoxide dismutase(SOD) and catalase(CAT) was significantly increased by treatment of YM in a dose dependent manner($p < 0.05$ and $p < 0.01$). DPPH radical was erased by treatment of YM in a dose dependent manner. Treatment of HaCaT cells with YM had also significantly reduced intracellular ROS produced by UVB irradiation in a dose dependent manner($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$).

Gelatin zymography assay revealed that YM had inhibitory effect on MMP-9 expression in UVB-stimulated HaCaT cells. RT-PCR analysis revealed that YM down-regulates the expression of various

inflammatory associated gens(TNF- α 와 IL-1 β) and wrinkle associated genes(MMP-9).

Our study suggests that Yukmijiwhangtang extracts participates in inhibitory effects in the biochemical, morphological and molecular processes related to photoaging skin on UVB irradiated SKH-1 mice.