

두릅순 에탄올 추출물의 인간유래 피부각질형성세포와 피부섬유아세포에서의 자외선에 의한 광노화 억제효과*

양지원 · 콧충실†

서울대학교 의과대학 노화고령사회연구소

Inhibitory effect of *Aralia elata* ethanol extract against skin damage in UVB-exposed human keratinocytes and human dermal fibroblasts*

Yang, Jiwon · Kwak, Chungshil†

Institute on Aging, Seoul National University College of Medicine, Seoul 03080, Korea

ABSTRACT

Purpose: Solar ultraviolet (UV) radiation causes inflammation and matrix metalloproteinase (MMP) overexpression and extracellular matrix depletion, leading to skin photoaging such as wrinkle formation, dryness, and sagging. Activation of MMP is influenced by various molecules such as reactive oxygen species (ROS), proinflammatory cytokines, and transient receptor potential vanilloid type (TRPV)-1, which are increased in UV-irradiated skin cells. *Aralia elata* (AE) ethanolic extract was reported to inhibit ROS generation caused by UVB-irradiation in keratinocytes. In this study, we investigated the photoprotective effect of AE ethanolic extract on UVB-irradiated human keratinocytes (HaCaT) and human dermal fibroblasts (HDF). **Methods:** AE was freeze-dried, extracted in 70% ethanol, and concentrated. Skin cells were treated with AE extract for 24 h and then exposed to UVB (55 mJ/cm²). After 48 h of incubation, proinflammatory cytokines, MMP-1, type-1 procollagen, and TRPV-1 levels were measured by ELISA or Western blotting. **Results:** Treatment with AE extract (100 µg/mL) significantly inhibited UVB-induced IL-6, IL-8, and PGE₂ production in HaCaT by 25.6%, 5.3%, and 70.2%, respectively, and also inhibited elevation of MMP-1 and TRPV-1 caused by UVB irradiation by 20.0% and 41.9%, respectively ($p < 0.05$). In HDF, AE extract treatment significantly inhibited both elevation of MMP-1 and reduction of type-1 procollagen caused by UVB irradiation ($p < 0.05$). In addition, type-1 procollagen was elevated by AE extract treatment in normal HDFs ($p < 0.05$). **Conclusion:** AE 70% ethanol extract has photoprotective ability via reduction of proinflammatory mediators, TRPV-1 and MMP-1 production, and elevation of collagen synthesis. Our findings suggest that AE extract might be a good natural material to protect against UVB-induced premature skin aging.

KEY WORDS: *Aralia elata*, MMP-1, type-I procollagen, inflammatory cytokines, ultraviolet B

서 론

노인인구의 증가와 고령화 사회로의 진입으로 인체의 노화에 대응하기 위한 방법들이 모색되고 있다. 노화 현상은 신체의 성장과 발달이 중지되면서 나타나는 피할 수 없는 과정으로서 체성분 및 신체 각 기관의 기능에 변화가 생기는 것을 의미한다.¹ 피부는 이러한 인체의 노화를 잘 보여주는 기관 중 하나이다. 노화된 피부는 주름형성과 처짐,

거칠어짐, 건조함 등의 특징을 나타내며, 이러한 피부의 노화는 나이가 들어감에 따라 나타나지만 외부 요인에 의해서 노화가 촉진되기도 하는데 그 중 자외선이 가장 큰 요인이다.²

적당량의 자외선 (UV) 노출은 인간이 피부에서 비타민 D를 합성하는데 꼭 필요하기 때문에 유용하지만 장기간의 과도한 UV 노출은 피부, 눈, 면역계 등에 해로운 영향을 미친다. 더구나, 최근에는 태양으로부터 오는 UV를 흡수하

Received: November 2, 2016 / Revised: November 22, 2016 / Accepted: November 29, 2016

*This study was supported by a grant of the Ministry of Science, ICT and Future Planning through the National Research Foundation, Republic of Korea (NRF-2014R1A2A2A01-007435), and Seoul National University (2015).

†To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-2-740-8506, e-mail: kwaks@snu.ac.kr

© 2016 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

는 역할을 하는 오존층의 급격한 감소로 인하여 지구표면에 도달하는 UV의 양이 증가하고 있다. UV의 강도는 지역과 시간, 기후 등에 따라 달라지는데 일반적으로 여름이 겨울보다 높고, 고도가 높은 곳이 낮은 곳보다 높으며 하루 중에도 시간에 따라 변한다.³ UV는 UVA (320~400 nm)와 UVB (280~320 nm), UVC (100~280 nm)로 나뉘는데 지구표면에 도달하는 햇빛 자외선의 대부분은 UVA이며 UVB는 대기권에서 대부분 흡수되고 10% 정도만 도달한다. UVA와 UVB 모두 피부손상을 초래하지만 UVA는 피부세포의 DNA에 직접적으로 손상을 주지는 못하는 반면 UVB는 직접적으로 세포의 DNA에 작용함으로써 화상, 광노화, 피부암 등을 유발할 수 있어 UVB가 더 해롭다고 볼 수 있다.⁴ UVB에 의한 피부 손상은 직접적으로 피부세포 내의 DNA의 손상을 초래하는 경로와 간접적으로 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS) 생성으로 인한 세포의 지질막 손상과 세포 염증반응, 피부구성 단백질의 손상 등에 의한 피부 광노화가 있다.⁵ UVB에 의한 피부세포의 산화 스트레스 증가는 matrix metalloproteinase (MMP) 발현을 가속시켜 피부 collagen의 감소로 인한 피부 노화로 이어지는 것으로 알려져 있다.^{6,7}

표피세포의 80%를 차지하는 피부각질형성세포 (HaCaT)는 주로 피부 외측에 위치하여 피부각질을 형성하고 장벽의 기능을 담당하는 것으로 알려졌으나, UV에 의한 면역학적 반응을 조절하는 사이토카인 분비와 염증성 인자를 유도하는 생리조절물질을 생성하고 분비하는 역할도 하는 것으로 알려져 있다.⁸ HaCaT 세포에서 UV에 의한 염증반응이 증가할 경우 transient receptor potential vanilloid type (TRPV)-1도 함께 증가하는 것으로 알려져 있는데, TRPV-1은 칼슘 이온 채널로 UV 조사 시 활성화되어 세포 내 칼슘 유입을 증가시켜 염증 반응이 증가되도록 하고 이로 인한 MMP-1의 증가를 가져 오는 것으로 알려져 있다.^{8,9} 실제로 항산화물질들을 섭취함으로써 UVB에 의한 광노화로부터 피부를 보호할 수 있다는 보고들이 있는데, 그 작용기전은 ROS를 직접적으로 제거하거나 스트레스 신호를 조절하거나 UV에 의한 염증반응을 줄이는 것으로 보고되었다. 예를 들어 카로티노이드, 비타민 E, 비타민 C, 폴리페놀과 같은 많은 항산화물질들이 UV로 인하여 발생한 ROS를 줄임으로써 피부 방어에 기여하여 피부 손상을 막아주는 것으로 알려져 있다.¹⁰

자연적 피부 노화는 나이가 들어가면서 시간 경과에 의해 일어나는 불가피한 현상인 반면, UV에 의한 피부 광노화는 어느 정도 예방이 가능하기 때문에 피부 광노화의 예방 및 개선을 위한 기능성 화장품과 다양한 식이 소재의 개발에 대한 관심과 연구가 증가하고 있다. UV 조사와 병행

된 녹차 식이 공급이 무모 생쥐에서 자외선 조사로 증가된 피부 pH를 정상화시켰고,¹¹ 단삼 추출물은 UVB에 의한 섬유아세포의 광노화를 보호하는 효과를 보였다.⁵ 또한, Hwang 등은 무모 생쥐에서 UVB에 의한 피부 광노화를 억제하는 gallic acid의 효과¹²를 보고하는 등 UV에 의한 피부노화 개선과 관련한 식품소재들이 탐색되고 있지만 아직은 그 연구가 부족한 실정이다.

두릅나무 (*Aralia elata* Seem)는 두릅나무과에 속하는 식물로 아시아 전역의 산에 분포하는 식물의 하나로¹³ 예로부터 민간과 한방에서 당뇨병, 신장병, 급만성 간염, 위장질환 개선과 강장제로 이용되어져 왔다. 두릅나무의 약효성분은 사포닌을 비롯하여 올리에놀산, 트리테르핀, 시스토스테롤, 콜린, 헤데라제닌, 알칼로이드, 팔미틴산, 리놀렌산, 메틸아이코사논산, 3,4-디히드록시벤존산 및 헥사코졸 등이 알려져 있다.⁴ 우리나라에서는 두릅나무의 어린잎과 줄기를 식용으로 이용하고 있는데 특유의 향과 약간 쓴맛이 있다.¹⁴ 또한 두릅 순에는 아스코르빈산, 레티놀, 베타카로틴과 같은 비타민과 폴리페놀이 풍부하여 높은 항산화 효능을 가지고 있다.¹⁵ 두릅의 사포닌 성분은 칼슘 조절을 통한 심장 수축을 조절하거나,¹⁶ 당뇨병성 망막병증에서 신경 손상을 예방하는 효과가 있었으며,¹⁷ 유방암세포의 사멸 효과¹⁸도 있었다는 연구보고가 있다.

최근, 본 연구팀은 두릅순 에탄올 추출물이 비교적 높은 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 갖고 있었으며, UVB를 조사한 HaCaT에 처리하였을 때 ROS 생성을 억제시켰고 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2) 항산화 시스템을 활성화시킴으로써 피부의 주요 항산화효소인 superoxide dismutase-1 (SOD-1)의 합성을 증가시켰음을 보고한 바 있다.⁴ 이에 본 연구에서는 두릅순 70% 에탄올 추출물을 전처리한 HaCaT과 피부섬유아세포 (HDF)에 UVB를 조사한 후 염증성 매개인자 및 피부세포의 주요 구성 단백질인 collagen에 영향을 주는 생화학적 지표들의 변화를 측정함으로써 두릅순 추출물이 피부광노화에 대한 방어 효과를 나타내는지 알아보고자 하였다.

연구방법

시료의 준비

본 연구에 사용한 두릅순 추출물은 이전의 연구⁴와 같은 방법으로 준비하였다. 전라북도 순창군에서 4월에 채취한 두릅순을 씻어 물기를 제거한 후 3일 동안 동결건조 (Samwon, Korea) 하였다. 동결건조 한 두릅을 분쇄기로 갈아 분말화 하였고, 분말 시료 50 g에 10배 부피의 70% 에탄올 (Duksan, Korea)을 넣고 24시간씩 2회 교반하여

추출한 다음 추출액을 모아 whatman paper no.2 (GE Healthcare, UK)로 여과하였다. 여과액을 rotary vacuum evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 35°C에서 감압 농축시키고, 24시간 동안 동결건조시켜 분말상태의 에탄올 추출시료를 얻었다.

세포 및 세포배양

실험에 사용된 세포는 HaCaT과 HDF로 서울대학교 의과대학 피부과에서 제공받았다. 세포배양은 Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Welgene, Korea)에 10% (V/V) fetal bovine serum (FBS, Hyclone, USA)와 1% penicillin-streptomycin solution을 첨가한 후 37°C, 5% CO₂의 배양기 (HERA Cell incubator, Thermo Scientific, USA)에서 배양하였고 2~3일 간격으로 계대배양 하여 유지하였다.¹⁹

추출 시료의 세포독성평가

동결건조 분말 형태의 두릅순 70% 에탄올 추출물을 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, MO, USA)에 먼저 녹인 후 세포 배양 배지에 희석하여 농도별로 처리하였다. 시료의 세포 독성 평가는 Hwang 등¹²의 연구를 참조하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)를 이용한 방법으로 측정하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cell/mL의 농도로 HaCaT 세포 또는 HDF 세포를 분주하여 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 안정화시킨 후 농도별로 두릅순 에탄올 추출물을 처리하여 48시간 배양하였다. 그 후 MTT시약을 처리하고 생존 세포의 효소 작용에 의해 환원되도록 3시간 더 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well에 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 녹인 다음 microplate reader (Power wave XS, BioTek, US)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

추출시료의 처리 및 UVB 조사

UVB 조사를 위해 자체 제작한 UV 조사장치에 UV lamp (TL20W/12RS UV-B, Philips, Netherlands)와 UVC 제거 필터인 TA 401/407 Kodacel filter (Kodak, USA)를 장치한 후 UVX Radiometer (Ultra-Violet Products Ltd., US)로 UVB의 강도를 측정하였다. UVB 조사 강도는 사전 연구결과를 바탕으로 세포 성장률에 영향을 주지 않는 안전한 수준인 55 mJ/cm²로 설정하였다. 세포를 5×10⁵ cells/well의 밀도로 6 well plate에 분주하여 안정화시킨 후 각 well에 AE 추출물을 무혈청 배양액에 녹여 농도별로 처리하여 24시간 배양시킨 후 배지를 제거하고 세포를 살짝 덮을 정도로 PBS를 첨가한 다음 UVB를 조사하였다.

효소면역측정법 (ELISA)에 의한 IL-6, IL-8, PGE₂의 측정

HaCaT 세포에 두릅순 추출물과 UVB를 처리 후 48시간 배양한 다음 배양액을 수거하여 4°C, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 모아 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit (RnD system, Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 prostaglandin (PG) E₂, interleukin (IL)-6, IL-8의 농도를 측정하였다.

단백질 발현 측정 (Western blotting analysis)

MMPs는 세포에서 합성된 후 배지로 분비되기 때문에 배양한 세포의 배지를 수거하여 sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer를 넣어 준비하였고, TRPV-1과 type-I procollagen의 단백질량을 측정하기 위해서는 세포의 배지를 제거한 후 차가운 PBS로 세척한 후 cell lifter (Costar, Corning, USA)로 세포를 긁어모았다. RIPA buffer (iNtRON, Korea)를 넣고 세포를 용해시켜 4°C, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 다음 상층액을 모은 후 BCA 방법으로 kit (Thermo SCIENTIFIC, IL, USA)을 이용하여 단백질 농도를 측정한 다음 sample buffer를 첨가하여 동일 농도의 단백질을 함유하는 시료를 준비하였다. Mini-PROTEIN system (BIO-Rad, USA)를 이용하여 8% SDS polyacrylamide gel의 각 well에 단백질 양이 동일하도록 시료를 넣고 전기영동 후 Amersham Hybond P 0.45 PVDF membranes (GE Healthcare Life Sci., Germany)에 blotting 하여, 5% non-fat milk에서 1시간 동안 blocking 하였다. Type I procollagen과 MMP-1 1차 항체 및 anti-TRPV1 (NOVUS Biological, USA), anti-β-actin (Sigma-Aldrich)을 4°C에서 18시간 반응시킨 다음 2차 항체 (Santa Cruz Biotech, TX, USA)를 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 ECL solution (Pierce, USA)을 뿌려 LAS-4000 Luminescent Image Analyzer (Fujifilm, Japan)을 이용하여 단백질 band를 확인하였다. 해당 band의 intensity는 Multi Gauge Ver. 3.0 (Fujifilm, Japan) image densitometer을 이용하여 정량하였다.

통계분석

모든 실험결과는 IBM SPSS Statistics 22 (IBM, NY, USA) 통계프로그램을 이용하여 분석하였고, 모든 실험은 3회 이상 반복하여 그 결과를 평균과 표준편차 (mean ± SD)로 나타내었다. 각 군 간의 평균값의 비교는 one-way ANOVA로 분석 후 p < 0.05 수준에서 Duncan's multiple range test 또는 t-test로 대조군에 비하여 각 실험군이 통계적으로 유의한가를 평가하였다.

결 과

두릅순 시료의 세포독성평가

HaCaT과 HDF에 두릅순 70% 에탄올 추출물을 각각 48 시간 처리하였을 때 100 µg/mL까지는 세포생장에 영향을 주지 않는 것으로 나타났고 (Fig. 1), 200 µg/mL 이상에서는 세포 생장이 떨어지는 것으로 나타나 이들 세포에 대한 두릅순 70% 에탄올 추출물의 안전범위는 100 µg/mL 이하로 추정되었다. 한편, UVB를 조사하기 전 추출시료를 농도별로 각 세포에 24시간 동안 전처리하고 55 mJ/cm²의 UVB를 조사한 후 48시간 동안 배양한 뒤 측정된 세포 성장률도 100 µg/mL 이하에서 독성이 없는 것으로 나타났다 (Fig. 2).

주요 염증성 사이토카인의 변화

HaCaT 세포에서 UVB 조사로 인하여 염증성 매개인자인 IL-6, IL-8, PGE₂의 생성이 크게 증가하였다 ($p < 0.05$). 그러나, 두릅순 추출물을 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 전처리한 경우 50 µg/mL과 100 µg/mL 처리농도에서 UVB에 의해 증가한 IL-6, IL-8, PGE₂ 생성을 모두 유의하게 감소시켰으며, IL-6와 PGE₂는 시료농도가 증가할수록 더 감

소하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 3). 두릅순 추출물을 100 µg/mL로 처리 시 IL-6는 UVB 대조군에 비하여 25.6% 감소하였고, IL-8은 5.3%, PGE₂는 70.2% 감소함으로써 ($p < 0.05$) 특히 PGE₂의 농도는 정상대조군과 비슷한 수준으로 크게 감소됨을 관찰하였다 (Fig. 3).

TRPV-1, MMP-1, type-I procollagen의 단백질량에 미치는 영향

HaCaT에서는 UVB 조사로 인해 세포내 칼슘의 유입을 증가시키는 TRPV-1 단백질이 67.2% 증가하였으며 피부 collagen을 분해하는 효소인 MMP-1의 단백질 발현량도 62.3% 증가하였다 ($p < 0.05$). 그러나, 두릅순 추출물을 전처리한 경우 UVB 대조군에서의 TRPV-1과 MMP-1 단백질 발현량과 비교하여 각각 41.9%와 20.0% 감소하였다 (Fig. 4).

HDF에서도 UVB 조사로 인해 MMP-1 단백질의 발현은 56.5% 증가하였는데, 두릅순 에탄올 추출물을 50 µg/mL과 100 µg/mL 농도로 처리 시 정상대조군과 비슷한 수준으로 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 또한, type-I procollagen 단백질은 UVB 조사 시 단백질 발현량이 23.0% 감소하였

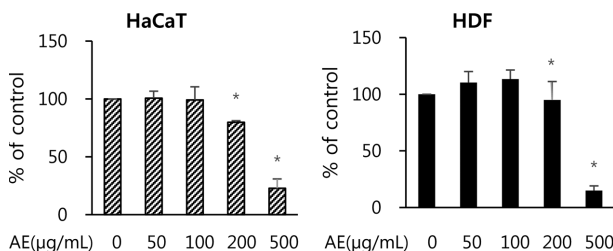


Fig. 1. Cell viability of HaCaT and HDF treated with *Aralia elata* (AE) extract. Cell viability of HaCaT and HDF were measured at 48 h treatment of AE extract. Results were shown as mean \pm SD ($n = 3$). *Significantly different at $p < 0.05$ compared to the control

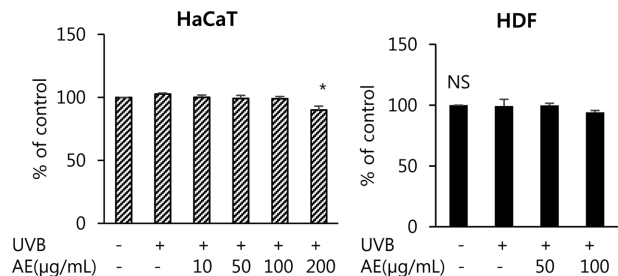


Fig. 2. Viability of HaCaT and HDF cells treated with *Aralia elata* (AE) extract and UVB. Cells were treated with AE extract for 24 h, exposed to UVB (55 mJ/cm²) and cell viability were measured at 48 h incubation. Results were shown as mean \pm SD ($n = 3$). *Significantly different at $p < 0.05$ compared to UVB(-) control. NS: not significant

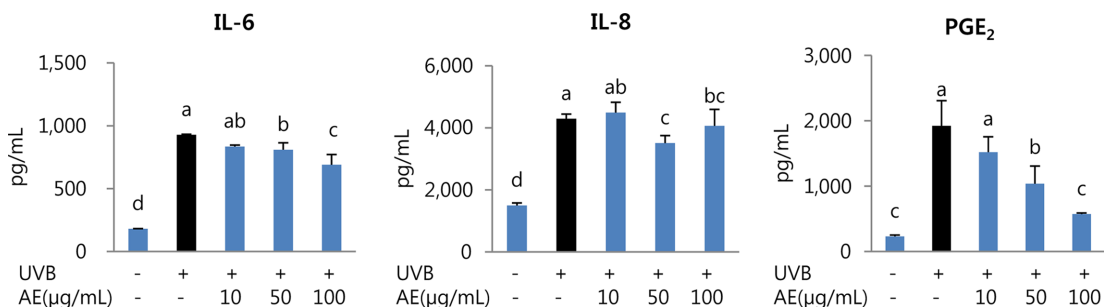


Fig. 3. Effect of *Aralia elata* (AE) extract on proinflammatory mediator secretion in UVB irradiated HaCaT cells. Cells were treated with AE extract for 24 h, exposed to UVB (55 mJ/cm²) and IL-6, IL-8 and PGE₂ concentrations at 48 h incubation were measured in the culture medium by ELISA. Results were shown as mean \pm SD ($n = 3$). Means sharing the same alphabet on the bar are not significantly different at $p < 0.05$ by ANOVA and Duncan's multiple range test.

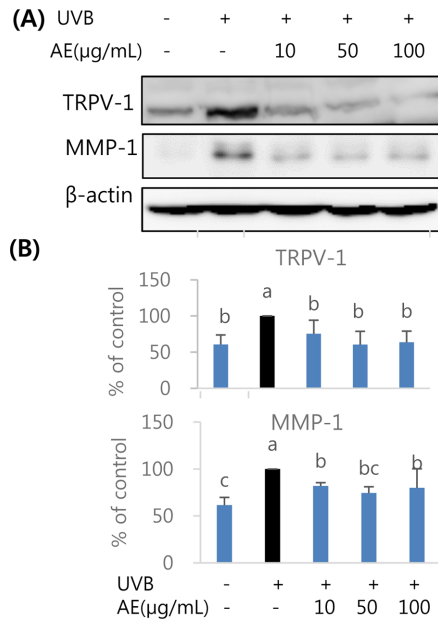


Fig. 4. Effect of *Aralia elata* (AE) extract on TRPV-1 and MMP-1 protein levels in UVB-irradiated HaCaT cells. Cells were treated with AE extract for 24 h, exposed to UVB (55 mJ/cm²) and the culture medium and the cells were collected at 48 h incubation. Protein level of MMP-1 (medium), TRPV-1 and β-actin (cell) determined by western blotting (A) and quantified (B). Results were shown as mean ± SD (n = 4). Means sharing the same alphabet on the bar are not significantly different at $p < 0.05$ by ANOVA and Duncan's multiple range test.

으나 ($p < 0.05$) 두릅순 추출물을 전처리한 경우 감소하지 않고 정상대조군 수준을 유지하였다 (Fig. 5). UVB를 조사하지 않은 정상 HDF에 두릅순 추출물을 50 μg/mL과 100 μg/mL 농도로 처리하였을 때에도 type-I procollagen 단백질 발현량이 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). 따라서, 두릅순 추출물은 UVB에 노출된 피부세포에서 UVB에 의한 collagen 손상을 억제하는 동시에 정상 피부세포에서도 collagen의 생성을 촉진하는 효과가 있었다.

고 찰

피부는 장시간에 걸쳐 UV에 노출되면 홍반이나 열감 등의 임상적 증상을 느낄 수 있으나 세포 수준에서는 UV에 의한 피부세포의 즉각적인 반응을 확인할 수 없다. 따라서, 본 연구에서는 HaCaT과 HDF에서 두릅순 70% 에탄올 추출물의 전처리가 UVB 조사에 의한 피부 광노화 관련 인자에 어떤 영향을 미치는지 분석하였다. 본 실험에 앞서 적절한 UVB 강도를 결정하기 위하여 0~100 mJ/cm² 범위로 세포에 UVB를 조사하고 48시간 배양한 후에 세포 성장률을 측정한 결과 75 mJ/cm²까지는 세포의 성장률에 영향

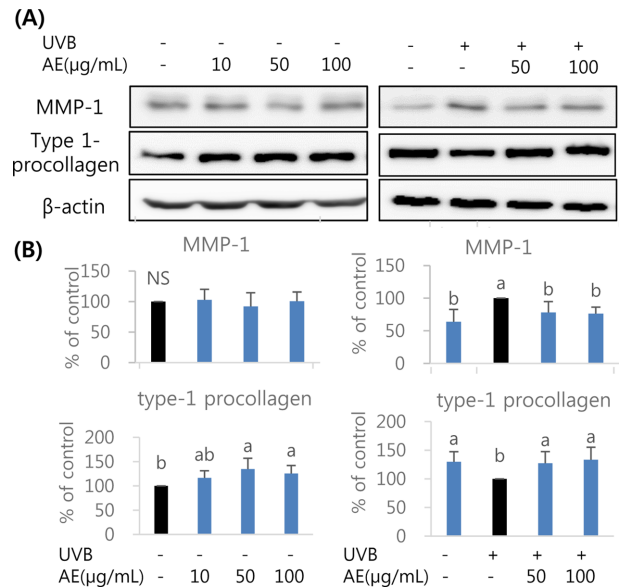


Fig. 5. Effect of *Aralia elata* (AE) extract on MMP-1 and type I procollagen protein levels in normal HDFs or UVB-irradiated HDFs. Cells were treated with AE extract for 24 h, exposed to UVB (55 mJ/cm²) and the culture medium and the cells were collected at 48 h incubation. The protein level of MMP-1 (medium), type I procollagen and β-actin (cell) determined by western blotting (A) and quantified (B). Results were shown as mean ± SD (n = 3~8). Means sharing the same alphabet on the bar are not significantly different at $p < 0.05$ by ANOVA and Duncan's multiple range test. NS: not significant

을 주지 않았기 때문에 보다 안전한 수준인 55 mJ/cm²로 모든 실험을 시행하였다. 또한, 두릅순 추출물의 처리농도도 세포독성이 나타나지 않는 100 μg/mL 이하에서 수행하였다.

피부가 장시간에 걸쳐 UV에 노출되어 일어나는 피부 광노화의 경우 조직학적 변화로는 각질형성세포가 불규칙적으로 변하고, 섬유모세포와 염증세포는 증가하고 혈관벽은 얇아지며 진피부분의 type I과 III collagen의 감소가 가속화 된다.²⁰ 피부 collagen의 파괴는 주로 상피의 각질세포와 피부섬유아세포에서 분비하는 MMPs에 의해 일어나는데 MMPs 수준은 자외선, 산화적 스트레스, 사이토카인들을 비롯하여 다양한 자극에 의해서 증가한다. MMPs는 피부의 extracellular matrix를 분해시키는 효소로 염증반응, 암 전이, 피부 노화 등에서 그 역할이 중요한 것으로 알려져 있다.⁹ UV 조사에 의해 생성된 ROS는 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 경로를 활성화시키고 이는 다시 전사인자인 AP-1 (activator protein-1)을 활성화시킨다.²¹ AP-1은 핵 안으로 들어가 collagenase (MMP-1)와 stromelysin (MMP-3), 그리고 gelatinase (MMP-9)의 발현을 유도한다. MMP-1이 콜라겐 분해를 시작되게 되면,

이어서 MMP-3와 MMP-9에 의한 연쇄 반응이 계속적으로 일어난다고 보고되었다.²²

UV에 의한 피부세포에서의 ROS 증가는 피부 광노화를 촉진시키는 요인으로 잘 알려져 있기 때문에 자연식물의 추출물을 이용하여 UV에 의한 피부세포에서의 ROS 증가를 낮추기 위한 다양한 연구보고가 있었다. 곽향 잎 (*Agastache rugosa* leaf) 추출물은 항산화 효소인 글루타치온과 SOD를 증가시켜 피부각질세포에서 UVB에 의해 증가된 ROS를 낮추어 피부를 광노화로부터 보호하는 효과가 있음이 보고되었다.²³ 다량의 폴리페놀과 안토시아닌을 함유한 빌베리 (*Vaccinium myrtillus*) 추출물은 피부 각질세포에서 UVB에 의한 세포독성과 DNA에 손상을 주는 유전독성을 감소시켰고 피부세포에서의 산화 스트레스를 낮추어 세포막의 지방산 과산화화를 막아주는 피부 광노화 효과가 있음이 보고되었다.²⁴ 또한 야생국화 에탄올 추출물은 HaCaT 세포에서 UVB 노출로 인하여 발생한 ROS를 제거함으로써 p38 MAPK의 인산화를 저해하고 피부 collagen을 분해하는 MMP의 증가를 저해하는 효과를 보였다.²⁵ Ham 등은 강향 (*Dalbergia odorifera*) 에탄올 추출물의 HaCaT에서 UVB에 의해 의한 ROS 생성의 감소가 세포 노화현상 (senescence)과 관련한 유전자인 p53, p21의 발현의 증가를 막아 세포 노화를 막음으로써 피부 광노화 효과가 있음을 보고하였다.²⁶ 이들 식물추출물의 항산화 효능은 비타민 C, E 등의 영양성분과 식물의 녹황색 색소 성분인 카로티노이드, 그리고 안토시아닌 색소 등이 포함된 다양한 폴리페놀 등으로부터 온 것으로 추정 된다.¹⁰ 두릅순은 Lee 등의 연구¹⁵와 Kwak과 Yang의 이전 연구⁴에서 항산화 효능을 가진 폴리페놀 성분을 다량 함유하고 있는 것으로 나타났다. 특히 두릅 70% 에탄올 추출물이 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능과 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium sulfate (ABTS) 라디칼 소거능, Fe^{+++} 에서 Fe^{++} 로의 환원력을 측정하는 ferric reducing antioxidant power (FRAP) 등이 우수하였고, HaCaT에서 두릅순 에탄올 추출물이 UVB에 의한 ROS 생성을 감소시키는 효과를 확인된 바 있다. 따라서 본 연구에서 두릅순 추출물이 HaCaT과 HDF 세포에서 UVB에 의한 광노화 관련 인자의 증가를 억제시키는 효과는 그 안에 함유되어 있는 항산화효과를 갖는 폴리페놀의 작용에 의한 것이 크다고 생각된다.

UV 노출로 인한 피부 손상 기전의 하나는 염증 반응이다. UV와 같은 외부 자극은 피부각질형성세포에서 IL-1 β , IL-6, IL-8과 PGs와 같은 다양한 사이토카인과 염증반응 매개 물질을 분비하여 면역반응과 염증반응을 조절하는

데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁸ 본 연구에서도 HaCaT 세포에 UVB 조사로 인해 염증성 사이토카인인 IL-6과 IL-8이 증가하였는데 이들 염증성 사이토카인은 PGE₂와 nitric oxide (NO)의 생성을 촉진함으로써 통증, 부종, 기능장애, 홍반 및 발열 등의 염증반응을 유발하고, 염증유발부위로 면역세포의 이동을 활성화하는 것으로 알려져 있다.²⁷ Lee 등은 두릅 추출물이 대식세포에서 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도된 inducible nitric oxide synthesis (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 합성을 억제함으로써 염증관련 인자는 NO와 PGE₂의 생성을 저해하고, 이로 인해 증가된 IL-1 β 와 IL-6 염증성 사이토카인을 거의 정상수준으로 떨어뜨렸다고 하였다.¹³ Suh 등은 두릅의 사포닌 성분이 염증반응에서 활성화되는 nuclear factor kappa-light chain enhancer of activated B cells (NF- κ B) 경로를 저해하여 대식세포에서의 염증반응을 억제하는 효과가 있었다고 하였다.²⁸ 본 연구에서도 두릅순 추출물의 전처리 HaCaT에서 UVB 조사로 인하여 증가하는 IL-6와 IL-8을 유의하게 감소시켰으며, 특히 PGE₂는 거의 정상 수준과 가깝게 감소되었다. 또한, IL-6와 IL-8은 피부세포에서 특히 MMPs의 생성을 촉진시켜 피부를 구성하는 주요 단백질인 collagen 감소를 가속시키는 인자로도 잘 알려져 있기 때문에²⁹ 본 연구에서 두릅순 추출물이 IL-6와 IL-8의 합성을 억제시킨 것이 MMP-1의 생성을 감소시키는데 기여한 것으로 생각된다.

한편, 피부세포가 UV를 받으면 칼슘이 세포 안으로 유입되는데 세포 내 칼슘수준이 증가하면 NF- κ B 경로가 활성화되어 염증반응 및 MMP의 증가가 유도된다고 보고되었다.⁸ 그런데, TRPV-1은 HaCaT 세포에 있는 주요 칼슘 유입 채널로서 접촉성 피부염이나 염증반응이 증가할 경우 TRPV-1의 발현이 증가하는 것으로 알려져 있다.⁸ 본 연구에서도 UVB를 조사한 세포에서 TRPV-1 단백질의 증가가 IL-6, IL-8, PGE₂ 및 MMP-1 증가와 함께 나타났기 때문에 TRPV-1의 증가가 UVB에 의한 염증반응 및 collagen 감소와 관계가 있을 것으로 보인다. HaCaT 세포에서 UVB에 의해 민감하게 증가하는 것으로 알려진 TRPV-1⁹이 두릅순 추출물 처리에 의하여 감소함으로써 UVB에 의한 염증반응 감소 및 피부 collagen의 손상으로부터 보호하는 효과를 유도할 것으로 사료된다. 덧붙여, 두릅순 추출물은 UVB를 조사한 HDF에서 type-I procollagen의 감소를 억제할 뿐 아니라 UVB를 조사하지 않은 정상세포에서도 type-I procollagen 단백질 발현을 증가시켰는데 이는 두릅순 추출물 자체가 피부세포에서 collagen 생성을 촉진한다는 것을 의미한다. 본 연구 결과들에 의하면 두릅순 에탄올 추출물은 UVB에 의해 초래되는 피부 광노화로부터

보호하는 효과가 있는 것으로 기대되며 앞으로 심도 있는 작용기전에 대한 후속 연구와 유효물질을 확인하는 연구가 필요하다고 본다.

요 약

본 연구에서는 피부의 표피와 진피에 분포하는 HaCaT 세포와 HDF 세포를 이용하여 항산화효과가 우수한 두릅순 추출물의 처리가 UVB에 의한 피부광노화를 억제할 수 있는지 알아보기 위하여 피부 염증반응과 관련한 사이토카인과 피부의 주요 구성 단백질인 collagen에 영향을 미칠 수 있는 MMP-1, type-I procollagen, TRPV-1 등의 단백질 발현에 미치는 영향을 분석하였다. HaCaT에 두릅순 추출물을 24시간 전처리한 경우 UVB (55 mJ/cm²) 노출로 인해 증가한 염증매개인자인 IL-6, IL-8, PGE₂를 유의하게 감소시켰다. 또한, 피부 collagen의 정상적인 구조 및 양에 영향을 미치는 단백질들의 발현을 측정된 결과 HaCaT에서는 UVB 조사로 인해 증가한 TRPV-1과 MMP-1 단백질의 발현이 두릅순 에탄올 추출물의 전처리로 모두 감소하였고, HDF에서는 UVB를 조사한 대조군에 비하여 두릅순 추출물 처리가 MMP-1 단백질 발현을 감소시키는 동시에 collagen의 전구체인 type-I procollagen의 발현을 증가시키는 효과를 보였다. 이들 결과들로부터 항산화효과가 우수한 두릅순 70% 에탄올 추출물은 피부세포에서 UVB에 의한 염증반응을 억제시키는 동시에 피부 collagen의 감소를 억제시킴으로써 피부 광노화를 예방할 수 있는 천연 소재로 이용될 수 있다고 본다.

References

1. Lee JH, Jung JH, Kim HS. Modulation of immune parameters by aging process. *Korean J Nutr* 2010; 43(2): 152-160.
2. Jin XJ, Kim EJ, Oh IK, Kim YK, Park CH, Chung JH. Prevention of UV-induced skin damages by 11,14,17-eicosatrienoic acid in hairless mice in vivo. *J Korean Med Sci* 2010; 25(6): 930-937.
3. World Health Organization. Ultraviolet radiation and the INTER-SUN program: health effects of UV radiation [Internet]. Geneva: World Health Organization; [cited 2016 Nov 25]. Available from: <http://www.who.int/uv/health/en>.
4. Kwak CS, Yang J. Suppressive effects of ethanol extract of *Aralia elata* on UVB-induced oxidative stress in human keratinocytes. *J Nutr Health* 2016; 49(3): 135-143.
5. Sun Z, Park SY, Hwang E, Zhang M, Jin F, Zhang B, Yi TH. Salvianolic acid B protects normal human dermal fibroblasts against ultraviolet B irradiation-induced photoaging through mitogen-activated protein kinase and activator protein-1 pathways. *Photochem Photobiol* 2015; 91(4): 879-886.
6. Oh MC, Kim KC, Ko C, Ahn YS, Hyun JW. Peptides-derived from scales of *Branchiostegus japonicus* inhibit ultraviolet B-induced oxidative damage and photo-aging in skin cells. *J Life Sci* 2015; 25(3): 269-275.
7. Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech Ageing Dev* 2002; 123(7): 801-810.
8. Huang J, Qiu L, Ding L, Wang S, Wang J, Zhu Q, Song F, Hu J. Ginsenoside Rb1 and paeoniflorin inhibit transient receptor potential vanilloid-1-activated IL-8 and PGE₂ production in a human keratinocyte cell line HaCaT. *Int Immunopharmacol* 2010; 10(10): 1279-1283.
9. Lee YM, Kang SM, Chung JH. The role of TRPV1 channel in aged human skin. *J Dermatol Sci* 2012; 65(2): 81-85.
10. Fernández-García E. Skin protection against UV light by dietary antioxidants. *Food Funct* 2014; 5(9): 1994-2003.
11. Lee B, Kim J, Hwang J, Cho Y. Dietary effect of green tea extract on epidermal levels of skin pH related factors, lactate dehydrogenase protein expression and activity in UV-irradiated hairless mice. *J Nutr Health* 2016; 49(2): 63-71.
12. Hwang E, Park SY, Lee HJ, Lee TY, Sun ZW, Yi TH. Gallic acid regulates skin photoaging in UVB-exposed fibroblast and hairless mice. *Phytother Res* 2014; 28(12): 1778-1788.
13. Lee JH, Jeong CS. Suppressive effects on the biosynthesis of inflammatory mediators by *Aralia elata* extract fractions in macrophage cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2009; 28(3): 333-341.
14. Cha JY, Ahn HY, Eom KE, Park BK, Jun BS, Cho YS. Antioxidative activity of *Aralia elata* shoot and leaf extracts. *J Life Sci* 2009; 19(5): 652-658.
15. Lee YJ, Lee SW, Lee SC, Park EJ. Antioxidant activities and antigenotoxic effect of ethanol extracts of *Acorus gramineus*, bud of *Aralia elata* Seem, *Capsella bursa-pastoris*, and *Taraxacum officinale*. *J Basic Sci* 2014; 31: 45-58.
16. Wang M, Xu X, Xu H, Wen F, Zhang X, Sun H, Yao F, Sun G, Sun X. Effect of the total saponins of *Aralia elata* (Miq) Seem on cardiac contractile function and intracellular calcium cycling regulation. *J Ethnopharmacol* 2014; 155(1): 240-247.
17. Kim SJ, Yoo WS, Kim H, Kwon JE, Hong EK, Choi M, Han Y, Chung I, Seo S, Park J, Yoo JM, Choi WS. *Aralia elata* prevents neuronal death by downregulating tonic response element binding protein in diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res* 2015; 54(2): 85-95.
18. Ryu MJ, Chung HS. Effect of *Aralia elata* on apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food Eng Prog* 2015; 19(3): 235-242.
19. Hwang E, Park SY, Lee HJ, Sun ZW, Lee TY, Song HG, Shin HS, Yi TH. *Vigna angularis* water extracts protect against ultraviolet B-exposed skin aging in vitro and in vivo. *J Med Food* 2014; 17(12): 1339-1349.
20. Robert L, Labat-Robert J, Robert AM. Physiology of skin aging. *Pathol Biol (Paris)* 2009; 57(4): 336-341.
21. Kim M, Park YG, Lee HJ, Lim SJ, Nho CW. Youngiasides A and C isolated from *Youngia denticulata* inhibit UVB-induced MMP expression and promote type I procollagen production via repression of MAPK/AP-1/NF- κ B and activation of AMPK/Nrf2 in HaCat cells and human dermal fibroblasts. *J Agric Food Chem* 2015; 63(22): 5428-5438.
22. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17(1): 463-516.

23. Oh Y, Lim HW, Huang YH, Kwon HS, Jin CD, Kim K, Lim CJ. Attenuating properties of *Agastache rugosa* leaf extract against ultraviolet-B-induced photoaging via up-regulating glutathione and superoxide dismutase in a human keratinocyte cell line. *J Photochem Photobiol B* 2016; 163: 170-176.
24. Calò R, Marabini L. Protective effect of *Vaccinium myrtillus* extract against UVA- and UVB-induced damage in a human keratinocyte cell line (HaCaT cells). *J Photochem Photobiol B* 2014; 132: 27-35.
25. Sun S, Jiang P, Su W, Xiang Y, Li J, Zeng L, Yang S. Wild chrysanthemum extract prevents UVB radiation-induced acute cell death and photoaging. *Cytotechnology* 2016; 68(2): 229-240.
26. Ham SA, Hwang JS, Kang ES, Yoo T, Lim HH, Lee WJ, Paek KS, Seo HG. Ethanol extract of *Dalbergia odorifera* protects skin keratinocytes against ultraviolet B-induced photoaging by suppressing production of reactive oxygen species. *Biosci Biotechnol Biochem* 2015; 79(5): 760-766.
27. Nam JH, Seo JT, Kim YH, Kim KD, Yoo DL, Lee JN, Hong SY, Kim SJ, Sohn HB, Kim HS, Kim BS, Lee KT, Park HJ. Inhibitory effects of extracts from *Smilacina japonica* on lipopolysaccharide induced nitric oxide and prostaglandin E2 production in RAW264.7 macrophages. *Korean J Plant Biotechnol* 2014; 41(4): 201-205.
28. Suh SJ, Jin UH, Kim KW, Son JK, Lee SH, Son KH, Chang HW, Lee YC, Kim CH. Triterpenoid saponin, oleanolic acid 3-O-beta-d-glucopyranosyl(1-->3)-alpha-l-rhamnopyranosyl(1-->2)-alpha-l-arabinopyranoside (OA) from *Aralia elata* inhibits LPS-induced nitric oxide production by down-regulated NF-κB in raw 264.7 cells. *Arch Biochem Biophys* 2007; 467(2): 227-233.
29. Imokawa G, Nakajima H, Ishida K. Biological mechanisms underlying the ultraviolet radiation-induced formation of skin wrinkling and sagging II: over-expression of neprilysin plays an essential role. *Int J Mol Sci* 2015; 16(4): 7776-7795.