

한방미용제제(滋陰美丹)의 Hairless mouse model에서의 피부광노화 억제 및 섬유아세포에서의 UVB손상 저해효과

김신영, 안덕균¹⁾, 박성규¹⁾, 이진영, 김완기, 심영철, 이상준

(주)태평양 기술연구원 의학건강연구소
경희대학교 한의과대학¹⁾

Protective Effects of *Jaummi-dan* (*Ciyinmei-dan*) against Skin Photoaging in Hairless Mouse Model and UVB-induced Damage in Human Fibroblasts

Sun-Young Kim, Duk-Kyun Ahn¹⁾, Seong-Kyu Park¹⁾, Jin-Young Lee, Wan-Gi Kim, Young-Chul Sim, Sang-Jun Lee

Pharmaceutical & Health Research Institute, Amore Pacific Corporation/R&D Center, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University¹⁾

Objectives : To investigate the photoprotective effects and efficacy of *Jaummi-dan* (*Ciyinmei-dan*) on UV damage to animal skin/fibroblast cultures.

Methods and Results : Hairless mice were orally administered *Jaummi-dan* (*Ciyinmei-dan*) extract and irradiated with UV for four weeks. In the *Jaummi-dan* (*Ciyinmei-dan*) treated group, a better skin appearance and less wrinkles were observed when compared to the control group. In addition, immunostaining for type 1 pN collagen showed that the amount of collagen deposition was higher in the *Jaummi-dan* (*Ciyinmei-dan*) treated group. The interstitial collagenase was measured in the cultured medium of fibroblasts after UVB irradiation using ELISA for MMP-1. *Jaummi-dan* (*Ciyinmei-dan*) treatment resulted in a significant decrease in MMP-1 secretion compared to the UVB-irradiated, untreated group.

Conclusions : The results of our study indicate that orally administered *Jaummi-dan* (*Ciyinmei-dan*) seems to have photoprotective effects on UV damaged hairless mouse skin partly due to an inhibitory effect on collagen breakdown. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(3):43-53)

Key Words: *Jaummi-dan* (*Ciyinmei-dan*), photoaging, skin, hairless mouse, fibroblasts, type 1 procollagen, collagenase, UV.

서론

인간의 노화 현상중 가장 인지가 빠른 부분중의

하나가 바로 피부의 노화이다. 피부의 노화원인으로 는 내적, 외적 요인이 있는데 그 중 외적요인으로 태양광에 의한 UV 조사가 피부노화에 주요한 역할을 한다. UV조사는 피부노화의 생리학적, 형태학적 변화의 주된 원인이 되는데 피부가 두꺼워지며 탄력성이 줄고 색소 침착이 일어나며 드물게는 피부암을 유발할 수도 있다¹⁾. 이러한 광노화(photoaging)이외에

· 접수 : 2002년 4월 24일 · 채택 : 2002년 5월 28일
· 교신저자 : 이상준, 경기도 용인시 기흥읍 보라리 314-1 태평양 기술연구원 의학건강연구소
(Tel. 031-280-5970, Fax. 031-281-8392, E-mail: leesjun@pacific.co.kr)

도 UV는 광화상(sunburn), 광독성(phototoxicity), 광알러지 등을 유발하기도 한다. 피부에는 UV에 의한 손상을 막기 위해 urocanic acid, 멜라닌색소, glutathioneperoxidase, superoxide dismutase, catalase 와 같은 자체 방어기작이 존재하나 그 한도를 초과 시에는 위에서 언급한 피부손상이 발생한다²⁾.

자의선에 의한 피부손상을 막기 위한 방법으로 UV차단제를 함유한 화장품, 의약품을 피부에 도포하여 UV를 차단하는 것이 일반적이다³⁾. 그러나 이러한 외용제들은 그 효과가 일시적이며 도포한 부위에만 국소적으로 효과가 있는 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하고, 보다 장기적인 예방효과를 위하여 식생활을 통한 영양공급 및 특정 영양성분과 피부와의 연관성에 대한 관심이 증대되고 있다⁴⁾.

한의학에서는 피부의 미용과 관련되어 한약을 내복과 외용하는 방법에 의하여 용모에 손상을 주는 질병 치료 또는 질병 예방, 피부 보호 및 滋陽, 항노쇠효과 등이 미용의 방법으로 활용되어 왔다. 한약을 이용한 미용 치료는 한방 미용의 다양한 치료 방법 중에서 내용이 가장 풍부한 분야이다. 內服法은 전신의 調理를 통하여 국부를 치료하거나 신체를 補益하는 목적을 성취할 수 있다. 심신에 대한 전체적인 건강은 국부적인 美로서 표현되는데, 이것은 治本除根의 치법으로서 전신의 건강과 노쇠를 억제하며 안면의 미용을 유지하는 수단이 된다⁵⁾.

한의학에서는 피부, 특히 여성피부와 관련하여 補血과 滋陰을 위한 다양한 처방이 존재하나 실제로 이러한 한방처방의 피부노화 관련 효능을 증명한 실험 연구는 거의 전무하다. 본 연구에서는 동의보감을 근거로 피부질환 및 여성질환에 주로 사용되는 처방을 조사하여 공통적인 補虛藥 중에서 한약재 14종을 선별, 배합하여 滋陰美丹을 창방후, hairless mouse를 모델로 하여 경구투여후 피부개선효과를 측정하였다. 또한 in vitro 상의 효과를 관찰하기 위하여 섬유아세포(fibroblasts)에 UVB 손상을 가한 후 滋陰美丹의 collagen의 생성촉진능 및 collagenase 합성억제능을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

본 실험을 위하여 체중이 20-25g정도 되는 6~7주령의 암컷 hairless mouse(Skh:HR-1)를 Charles River Laboratories(Wilmington, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 실험쥐들을 일주일동안 동물사육실에서 적응시킨 후 그룹 당 8마리씩 정상군, UV대조군, UV/滋陰美丹복용군으로 나누어 실험기간동안 사육하였다. 23±2℃의 온도와 55±10%의 습도에서 생활하도록 하였으며 명암은 12시간 주기로 조명하였다. 그 외 실험기간동안 먹이와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

2) 약재

본 실험에서 사용된 14가지 약재는 경동한약재 시장에서 구입한 후 경희대학교 방제학교실에서 외부 형태를 비교 조사하여 확인 후 정선하여 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용한 滋陰美丹의 配伍는 補血藥과 補陰藥을 君藥으로 하고, 補血의 대표 방제인 四物湯을 기본방으로 선정하였으며 나머지 약물을 君臣佐使의 원리에 따라 組方하였다. 본 처방의 구성 약물과 한 貼의 분량은 다음과 같다.

2. 방법

1) 약재추출물의 조제

韓藥名	生藥名	重量 (g)
赤何首烏	<i>Polygoni Multiflori Radix</i>	3
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	3
玉竹	<i>Poligonati Odorati Rhizoma</i>	3
熟地黃	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	2
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	2
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	2
蓮子肉	<i>Nelumbinis Semen</i>	1.5
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	1.5
山茱萸	<i>Corni Fructus</i>	1.5
靈芝	<i>Ganoderma</i>	1
白朮	<i>Atractylodis Macrocephalae Rhizoma</i>	1
百合	<i>Lili Bulbus</i>	1
白茯苓	<i>Poria</i>	0.75
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	0.5

상기한 약제들을 처방 내용대로 무게를 달아 혼합하였다. 약제무게의 10배 중량의 물을 첨가하여 autoclave에서 3시간동안 가압 추출한 후 150mesh로 여과하였다. 여과액은 약 5%의 고형분을 함유하였는데 고형분이 30%가 될 때까지 감압농축기(Rotary Vacuum Evaporator, EYELA Co., Japan)를 이용, 60-70℃에서 농축하였다.

2) 추출물의 투여

실험동물은 정상군, UV대조군, UV/滋陰美丹복용군으로 나뉘었다. 정상군과 UV대조군은 0.5ml의 생리식염수를 경구 투여하였고, UV/滋陰美丹복용군은 추출물의 고형분 기준으로 체중 Kg당 500mg의 시료를 0.5ml 식염수에 섞어 액체투여용 주사기를 이용하여 경구 투여하였다. 투여기간은 총 5주로 주 5일 동일한 시간에 투여하였다.

3) UV 조사

Hairless mouse에 1주간 식염수 혹은 滋陰美丹을 경구투여 후 2주부터 5주까지 주 3회 UV를 조사하였다. 이때 UV조사를 위하여 7개의 UVB 램프와 3개의 UVA 램프를 부착하여 태양광과 유사하게 UV를 방출하는 UV 램프(Waldmann UV800, Germany)를 이용하였다. 첫째 주는 50mJ/cm²를, 두 번째 주는 70mJ/cm²를, 셋째, 넷째 주에는 80mJ/cm²씩 주3회 조사하여 실험기간중 총 UV조사량이 600mJ/cm²가 되도록 하였다. 이때 UV조사량은 Waldmann UV meter(Waldmann Lichttechnik GmbH, Germany)를 이용하여 확인하였다. 동물의 피부채취는 즉각적인 UV손상에 의해 실험결과가 영향을 덜 받도록 마지막 UV조사 후 4일이 경과된 후에 실시하였다.

4) 경피수분손실량 (TEWL: Transepidermal Water Loss)

경피수분손실량(TEWL)을 측정하기 위하여 Evaporimeter EPI (Servo-Med, Sweden)를 사용하였다. UV조사 전, UV조사 1주, 2주, 3주, 4주후에 측정하였는데 항온항습실에서 30분간 방치한 후 측정하

였다.

5) 피부주형(replica)의 영상 분석

주름개선 효과의 객관적 판정을 위하여 부검 전 hairless mouse의 등쪽에서 실리콘폴리머(SILFLO impression material, Flexico, England)를 이용하여 피부주형(replica)을 채취하였다. 피부의 주름정도를 분석하기 위하여 SkinVisiometer SV500(Courage+Khazaka Electronic, Koln, Germany)을 이용하여 주름정도를 나타내는 지표인 Rt(depth of roughness), Rm(maximum roughness), Rz (mean depth of roughness), Rp(mean smoothness depth), Ra (mean roughness)를 측정하였다.

6) 병리조직학적 관찰

조직준비를 위해 동물을 희생시킨 후 등쪽피부를 떼어내어 filter paper에 편평하게 부착한 후 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 피부조직내 Type 1 pN collagen 발현정도를 관찰하기 위하여 mice monoclonal IgG1 antibody를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다⁶⁾. 그 외 일반적인 조직상태 관찰과 표피층 두께측정을 위하여 H&E(Hematoxylin & Eosin) 염색을 실시하였다. 피부표피층의 두께는 H&E 염색 슬라이드를 현미경상에서 읽어(100배 확대) 조직당 무작위로 선택한 10군데의 두께를 측정하여 평균치를 계산하였다.

7) 섬유아세포(fibroblasts)를 이용한 collagenase 합성억제능 및 type 1 pN collagen 생성촉진능 시험

섬유아세포(fibroblasts) cell line인 Hs68을 이용하여 collagenase 합성억제능과 type 1 pN procollagen 생성능을 비교하였다. 섬유아세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, U.S.A.)으로부터 분주받아 사용하였는데 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, NY, USA)에 10% fetal bovine serum(10%, v/v), antimycotic-antibiotics(1%)를 첨가하여 배양하였다.

48-well plate(Falcon, USA)에 섬유아세포를 5x10⁴/well로 넣고 부착시킨 후에 serum-free DMEM

으로 24시간동안 배양하였다. PBS로 washing 후 PBS(phosphate buffered saline)를 0.5ml 넣은 상태에서 UVB 15 mJ/cm² (Dermlight cube 401 equipped with UVB filters, Uvatec, Inc., Germany)를 조사한 후에 滋陰美丹이 들어있는 serum-free DMEM으로 바꾸어주고 24시간 배양하였다. 이때 양성대조군으로 retinoic acid와 TGF- β 를 사용하였다. 배양 상층액으로부터 collagenase의 일종인 MMP-1(matrix metalloproteinases-1)의 생성량을 MMP-1 ELISA kit(#RPN2610, Apbiotech, Amersham, Sweden)을 이용하여 측정하였다⁷⁾. 그리고 cell은 PBS로 washing 후에 NaOH lysis시켜서 BCA assay kit(#23227, Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 총단백질량을 측정하였다. 측정된 MMP-1 발현양은 총단백질량으로 나누어서 보정하였다.

Type I pN collagen 측정을 위해 섬유아세포를 48-well plate에 5x10⁴/well로 갈아서 부착시킨 후에 滋陰美丹이 들어있는 serum-free DMEM으로 24시간동안 배양하였다. 양성대조군으로 비타민C와 TGF- β 를 이용하였다. 배양 상층액에서 type I procollagen 생성량을 type I pN collagen EIA kit(MK101, TaKaRa, Japan)을 이용하여 측정하였고 cell은 PBS washing 후에 NaOH lysis시켜서 총단백질량을 BCA assay kit를 사용하여 측정하였다. 측정된 type I pN collagen 생성량은 총단백질량으로 나누어서 보정 후 DMEM 처리군의 collagen 생성능을 100%로 기준하여 滋陰美丹처리군과 비교하였다.

8) 통계처리

실험결과는 mean \pm SD으로 나타내었고, 통계적 유의성은 ANOVA와 Student's t-test를 이용하여 검정하였다. 데이터 분석을 위하여 SPSS package (SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하였는데 P<0.05일 경우, 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. 피부변화

실험기간동안 hairless mouse의 무게를 정기적으로 측정하였는데 군간 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 또한, 정기적으로 경피수분손실량(TEWL)을 측정하였는데 UV조사 전 UV대조군의 TEWL값은 6.8 \pm 4.4g/m²hr, UV/滋陰美丹복용군은 7.8 \pm 3.0g/m²hr로 유의한 차이가 없었다. UV조사 후 매주 주기적으로 TEWL을 측정하였는데 UV대조군, UV/滋陰美丹복용군 모두 초기 값에 비해 TEWL 수치가 증가하였으나 UV대조군에 비해 UV/滋陰美丹복용군에서의 TEWL 수치 증가폭이 작았다(Fig. 1). 그러나 군간 통계적 유의성은 없었다.

UV조사기간 중, 육안으로 관찰시 정상군에 비해 UV를 조사한 hairless mouse의 피부주름 증가가 뚜렷하였으나 UV대조군과 UV/滋陰美丹복용군의 차이는 판별하기가 어려웠다. 주름정도를 객관적으로 비교하기 위하여 skin visiometer를 이용하여 피부주름

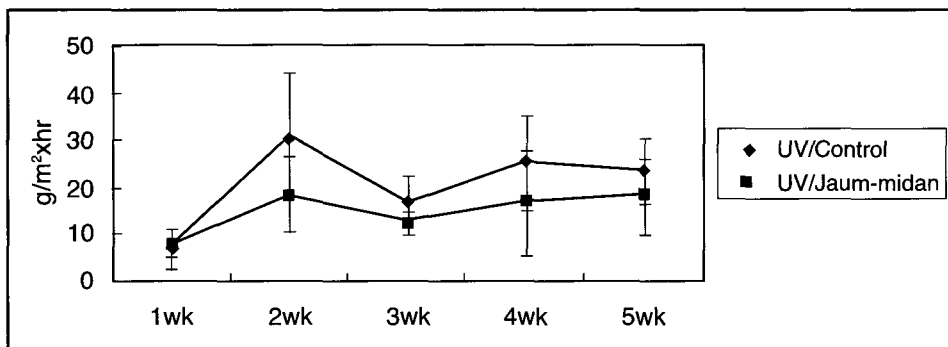


Fig. 1. Effects of Jaummi-dan treatment on TEWL(Transepidermal Water Loss) of hairless mouse skin.

(replica)을 분석하였다(Fig. 2). Figure 3은 군별 주름 정도를 나타내는 지표들의 분석치를 나타낸다 (Rt, Rm, Rz, Rp, Ra). 모든 항목에서 정상군에 비해 UV대조군이 증가하였으며 통계학적으로 Rt, Rm, Rz 분석치가 정상군에 비해 UV대조군에서 각각 36%, 48%, 45%씩 유의하게 증가하였다. 그러나 UV/滋陰美丹복용군의 경우 UV대조군에 비해 Rt, Rm, Rz, Ra가 각각 26%, 32%, 31%, 25%씩 유의하게 감소하였다. 또한 통계학적으로 UV/滋陰美丹복용군은 정상군과 거의 차이가 없을 정도로 피부주름 상태가 양호하였다(Fig. 3).

2. 병리조직학적 관찰

H&E 염색 슬라이드 상에서 현미경을 이용하여 표피두께를 측정하였다(Fig. 4). UV대조군의 경우 9.77

$\pm 0.68\mu\text{m}$ 이었고, UV/滋陰美丹복용군은 약 30% 감소된 $7.56\pm 0.75\mu\text{m}$ 을 나타내었다. 이에 비해 정상군의 표피두께는 $5.23\pm 0.31\mu\text{m}$ 으로 나타났다.

Figure 5는 UV손상을 입은 hairless mouse의 피부 조직에서 type 1 pN collagen을 면역조직화학 염색한 것인데 정상군에 비해 표피층과 진피층 사이의 type 1 pN collagen이 적게 염색된 것을 볼 수 있다. 그러나 UV/滋陰美丹복용군의 경우에는 표피/진피 경계층에 있는 procollagen의 양이 UV대조군에 비해 많이 염색되어 있다.

3. 섬유아세포(Fibroblasts)의 배양시 collagenase 생성

섬유아세포에 UVB조사 후 MMP-1에 대한 ELISA

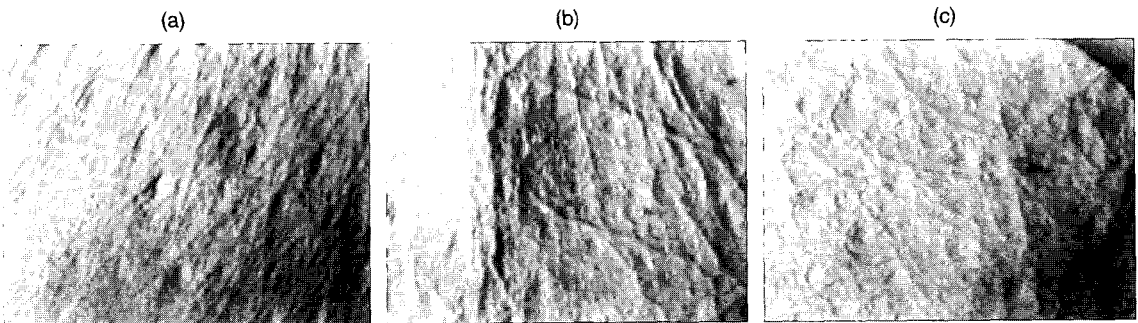


Fig. 2. Skin Replicas for (a) age-matched, normal mouse skin, (b) UV irradiated control mouse skin and (c) UV irradiated mouse skin treated with Jaummi-dan.

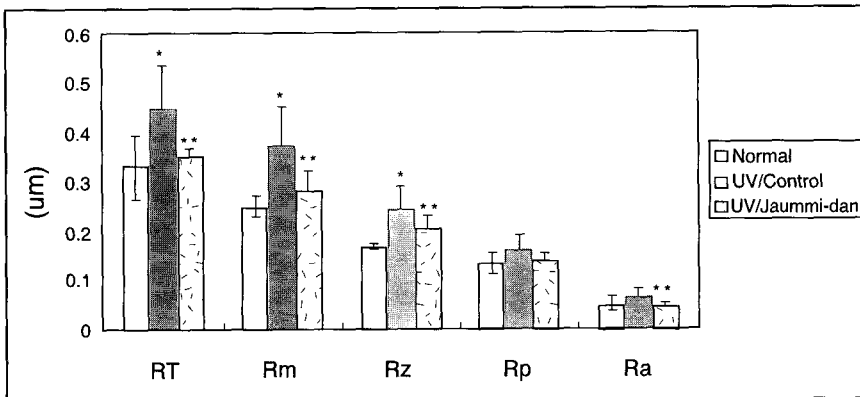


Fig. 3. Evaluation of microrelief of UV-damaged skin in hairless mice and age-matched unirradiated mice. Results are expressed as Mean values \pm SD for parameters Rt(μm), Rm(μm), Rz(μm), Rp(μm) and Ra(μm).

*Significantly different from age-matched, normal mouse skin ($P < 0.05$).

**Significantly different from UV-irradiated control group ($P < 0.05$).

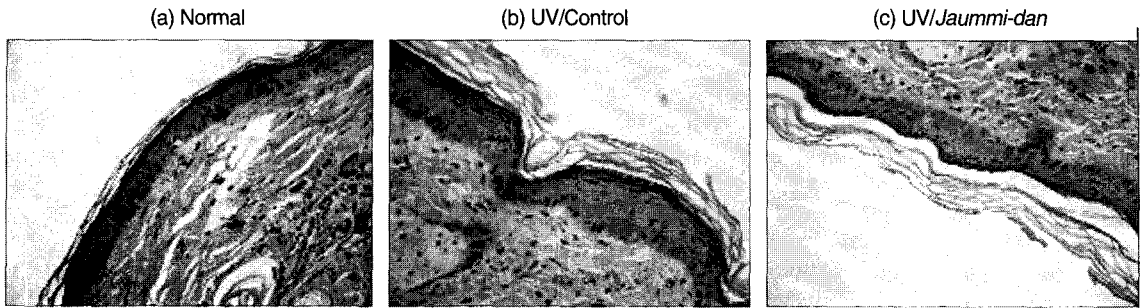


Fig. 4A. Hematoxylin & Eosin (H&E) stain of UV-irradiated mouse skin. (a) age-matched, normal mouse skin, (b) UV irradiated control mouse skin and (c) UV irradiated mouse skin treated with *Jaummi-dan*.

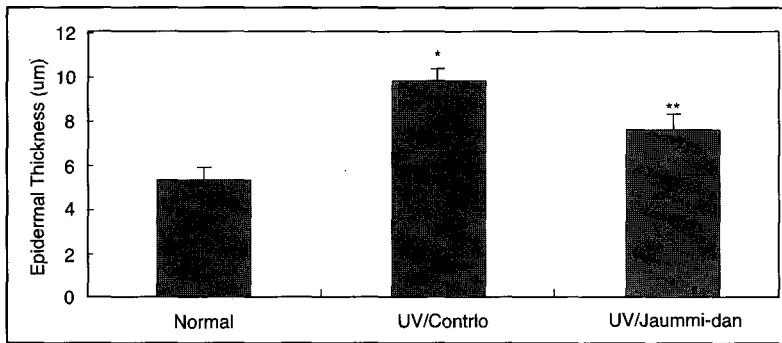


Fig. 4B. Effects of UV irradiation on the epidermal thickness. Mice were UV-irradiated three times per week for 4 weeks as described in the Materials and Methods section. Epidermal thickness was measured on H&E stained sections. Results are expressed as mean \pm SD of thickness in μm .

*Significantly different from age-matched, normal control group ($P < 0.05$).
**Significantly different from UV-irradiated control group ($P < 0.05$).

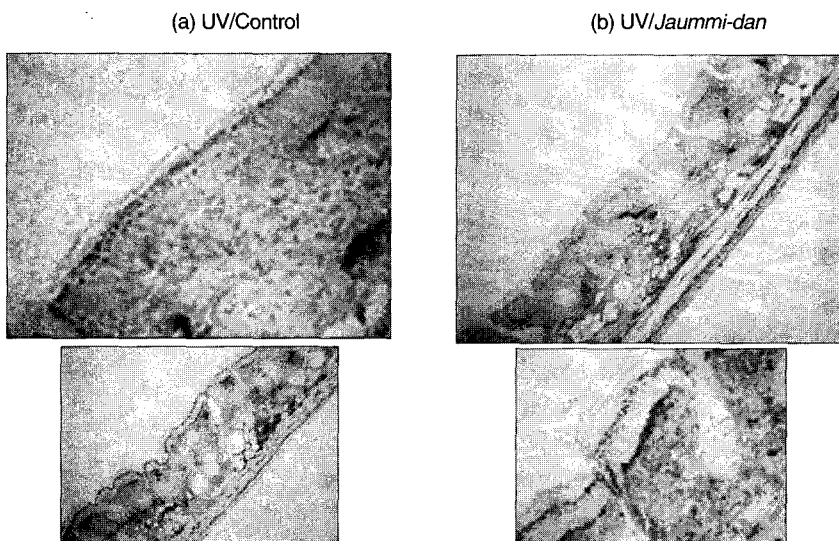


Fig. 5. Immunohistological stains for type 1 pN collagen(x50) (a) UV-irradiated skin, control mouse skin, (b) UV-irradiated, *Jaummi-dan* treated mouse skin.

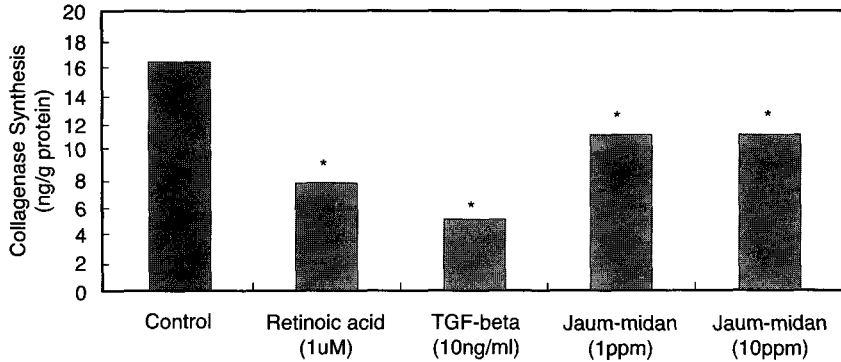


Fig. 6. Inhibition of UVB-induced collagenase secretion by sample in fibroblasts. Cells were irradiated with UVB(15mJ/cm²) and treated with *Jaummi-dan*(1ppm, 10ppm).
*Significantly different from the UVB-irradiated control group as determined by two-tailed t-test (P<0.05).

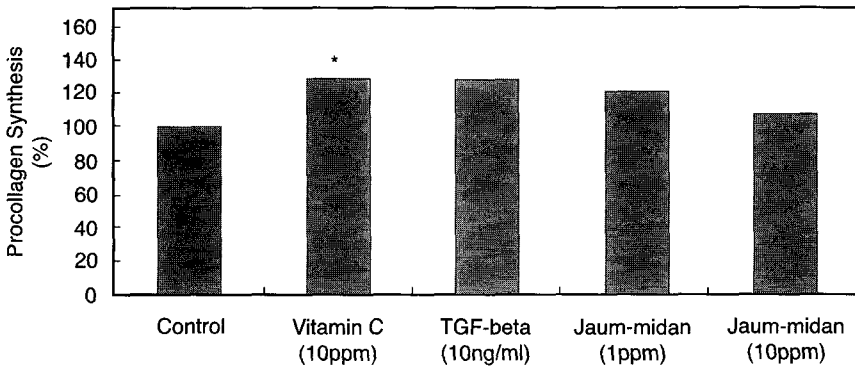


Fig. 7. Type 1 procollagen synthesis by sample in fibroblasts. Cells were irradiated with UVB (15mJ/cm²) and treated with *Jaummi-dan*(1ppm, 10ppm).
*Significantly different from the UVB-irradiated, untreated control group as determined by two-tailed t-test (P<0.05).

를 실시하여 배양액 내에 생성된 MMP-1의 양을 측정하였다. 이때 retinoic acid와 TGF-β를 양성대조군으로 사용하였는데 retinoic acid(1μM)와 TGF-(10ng/ml)는 MMP-1 농도를 각각 52.5%, 68.8% 감소시켰다. 滋陰美丹처리군은 10ppm 농도에서 MMP-1이 무처리군에 비해 32% 유의적인 감소를 보였다. 그리고 1ppm에서도 31.5%의 감소를 보였다(Fig. 6).

Type 1 procollagen 생성능 촉진 시험에서는 positive control로 사용한 비타민 C(10ppm)의 경우 procollagen 합성능이 28.7%, TGF-β(10ng/ml)는 27.4% 증가하였고 滋陰美丹처리군은 1ppm, 10ppm

에서 각각 20.2%, 7.8%의 증가를 보였으나 통계적으로 유의한 결과는 아니다(Fig. 7).

고찰

한의학에서는 인체의 毛髮, 顔面, 皮膚와 五臟, 經絡, 陰陽, 氣血, 津液 등이 상호 연관되어 기능을 나타낸다⁹⁾. 《素問·六節藏象論》에서 “心者, …其華在面; 肺者, …其華在毛, 其充在皮; 腎者, …其華在髮, 其充在骨; 肝者, …其華在爪, 其充在筋; 脾胃大腸小腸者, …其華在唇, 其充在肌”라 하여, 오장육부와 안면, 모

발의 관계를 밝히고 있다⁸⁾. 피부노화는 노화에 미치는 요인에 따라 크게 내인성 노화와 외인성 노화로 구분할 수 있다. 내인성 노화(intrinsic aging)는 피부의 구조와 생리적 기능이 나이를 먹으면서 계속적인 감퇴를 일으키는 것이고, 외인성 노화(extrinsic aging)는 태양광선, 스트레스, 공해등 외부환경에 대한 노출에 기인하는데 특히 광에 의한 피부노화를 광노화(photoaging)라 한다¹⁾.

피부노화시 나타나는 주요한 변화로서 표피, 진피 및 피하지방의 두께가 얇아지고 변이된 elastin이 증가하여 피부 탄력이 감소하며 피부 단백질의 cross-linking이 증가하여 피부는 거칠어지게 된다⁹⁾. 또한 collagenase, gelatinase와 같은 matrix metalloproteases가 UV에 의해 증가되어 collagen이 분해되고 UV에 영향을 받아 섬유아세포의 collagen 생합성 능력이 저하되어 피부의 주름이 생성된다¹⁰⁾. 이러한 피부노화 현상을 예방내지 지연시키기 위한 목적으로 내적, 외적 요소로부터 노화를 막아주는 물질과 방법에 대한 연구가 폭넓게 진행되고 있다. 그 외 피부 내에서의 collagen 생합성을 증가시켜 주름생성을 막아주고 피부탄력을 유지시켜주는 방법에 대한 연구 또한 많은 관심을 끌고 있다.

최근에는 섭취하는 음식과 피부를 포함한 전반적인 건강상태와의 연관성에 대한 관심이 크게 증가하고 있는데 피부상태와 영양상태는 밀접한 관계가 있다는 것은 잘 알려진 사실이다⁴⁾. 《素問·五臟生成篇》에서 “心合脈也, 其容色也, …肺之合皮也, 其榮毛也, …肝之合筋也, 其榮爪也, …脾之合肉也, 其榮唇也, …腎之合骨也, 其榮髮也”라 하여, 五臟과 밀접한 관계가 있는 筋脈肉皮膚에 대하여 기록이 남아 있다⁸⁾. 이는 특정 영양소 결핍으로 유발된 五臟의 질병이 피부의 색에도 그 영향이 미쳐 病色이 나타나는 것을 보아도 알 수 있다. 靑赤黃白黑의五色은 肝心脾肺腎의 五臟에서 주관하게 되는데 “靑如翠羽, 赤如鷄冠, 黃如蟹腹, 白如豕膏, 黑如烏羽”등 정상 피부색은 전신 오장의 건강 상태를 반영하는 것이다¹¹⁾.

현재 여러 가지 영양소가 피부에 미치는 긍정적인 효과에 대한 연구가 있어 비타민 A, C, E를 비롯한

항산화 성분 복용시 UV에 의한 피부손상 억제효과가 있고 불포화지방산 섭취가 아토피성 피부염을 개선시킨다는 보고도 있다^{4,12,13)}. 그 외 녹차를 비롯한 특정 허브 추출물을 복용시 사람이나 동물에서 일부 광독성 억제 효과가 보고되고 있다¹⁴⁾. 실제로 영양부족이나 결핍시 피부에도 그 영향을 미침은 여러 연구에서도 이미 밝혀졌다. 이러한 의미에서 식품이 가지는 피부노화 억제 효과는 관심의 대상이 되고 있으나, 실제로 복용으로 인한 피부개선을 측정할만한 적절한 동물모델을 찾는 것이 쉽지 않다.

피부관련 동물모델중에서 UV조사에 의한 피부변화를 측정하기 위한 실험에서는 hairless mouse가 폭넓게 사용되고 있다¹⁵⁾. Hairless mouse에 UV를 조사하여 인위적으로 피부광노화를 유발시 mouse의 피부두께가 증가하고, 피부내 collagen이 감소하며, collagenase와 GAGs(glucosaminoglycans)가 증가하며 변형된 elastin의 증가가 관찰되는 등 사람에게서 일어나는 광노화 현상과 비슷한 변화양상을 보인다¹⁶⁾. 또한 경피수분손실량(TEWL)도 사람과 마찬가지로 증가하는 등 훌륭한 실험모델로 평가받고 있다. 따라서 본 실험에서는 경구투여시 나타나는 피부개선 효과 측정을 위하여 피부연구 분야에서 널리 이용되고 있는 광노화 hairless mouse 모델을 이용하였다.

한의학에서는 “血盛則形盛, 血弱則形衰”라 하여, 피부의 좋고 나쁨은 신체 전반적인 건강상태와 매우 밀접한 관계가 있으며 특히 혈액과 관련이 많다고 여긴다¹¹⁾. 여성을 대상으로 하며 보혈기능과 자음을 하는 여러 처방을 검토하여 공통적으로 많이 사용하는 한약재중 일반적인 식품소재로 사용가능한 14종의 한약재를 선별, 추출하여 시료(滋陰美丹)로 사용하였다. 본 실험에 사용한 滋陰美丹의 配伍는 補血藥과 補陰藥을 君藥으로 하고, 補血의 대표 방제인 四物湯을 기본방으로 선정하였으며 나머지 약물을 君臣佐使의 원리에 따라 組方하였다. 본 실험에서는 약 5주간 滋陰美丹을 hairless mouse에 경구투여하면서 4주간에 걸쳐 주3회씩 UV를 조사하였다. 이미 알려진 바대로 UV조사는 정상군에 비해 hairless mouse의 외관 주름을 증가시켰다¹⁶⁾. 그러나 滋陰美丹복용

군은 UV대조군에 비해 피부주형(replica)상의 주름도 적었을 뿐만 아니라 skin visiometer로 분석 시에도 더 양호한 피부 상태를 보였는데 분석치인 Rt, Rm, Rz, Ra 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 또한 UV조사로 인한 광노화는 일반노화와는 달리 피부표피 두께를 증가시키는 것으로 알려져 있는데, 본 실험에서도 UV대조군은 정상군에 비해 피부표피 두께가 약 80%가 증가하였다. 그러나 UV/滋陰美丹 복용군은 UV대조군에 비해 약 30% 표피두께가 감소하였다. UV, 특히 UVB조사에 의해 표피가 두꺼워지는 현상은 정확한 메커니즘은 아직 밝혀지지 않았으나 일종의 피부방어기작의 하나로 이해되고 있다¹⁷⁾. 또한, UV조사는 피부진피내의 collagen의 구성과 조직 등을 변화시킨다고 알려져 있는데 이러한 collagen의 변형은 피부외관 주름의 주요 원인으로 작용하고 있다¹⁸⁾. 본 실험에서 실시된 면역조직화학 염색에 의하면 UV대조군은 정상군에 비해 피부진피내 procollagen양이 UV조사에 의해 감소하였음을 볼 수 있었다. 그러나 UV/滋陰美丹복용군은 UV대조군에 비해 피부진피내 procollagen 양이 상대적으로 많이 존재하였다.

UV조사시 type 1 collagen의 합성은 감소하고 MMP-1의 발현은 증가하는데 이에 의해 type 1 pN collagen의 발현이 영향을 받는 것은 주지의 사실이다¹⁹⁾. 본 연구의 결과들을 살펴볼 때 실험에 사용된 滋陰美丹은 collagen 합성을 증진시키거나 혹은 MMP-1 생성을 억제하여 procollagen의 분해를 억제하는 것으로 추정되어진다. 좀더 자세한 연구를 위하여 섬유아세포에 UVB를 조사 후 滋陰美丹을 처리하여 collagen 합성 및 MMP-1 생성을 관찰하였다. 그 결과, collagen 합성을 약간 증가시키나 통계적으로 유의한 수준은 아니고 오히려 MMP-1 생성을 억제하는 효과가 큰 것을 알 수 있었는데 1ppm 농도에서 약 30%정도 MMP-1 생성을 억제하였다. 이러한 결과들을 종합해볼 때 UV/滋陰美丹복용군에서의 collagen 합성증가는 滋陰美丹이 가지는 collagen 분해억제능에 상당부분 기인하는 것으로 판단된다.

한편으로 UV조사는 피부에 활성산소 유도체를 생

성하며 생성된 산소라디칼은 초기단계에서 metalloproteinases(MMPs)의 합성을 유도하는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾. MMPs는 뼈와 결합조직(connective tissue)에서 collagen, elastin 및 기타 단백질을 분해하는 효소이다. MMPs의 전사(轉寫)는 주로 transcription factor activation protein1(AP-1)과 NF-KB에 의존하는데 AP-1과 NF-KB는 UV조사에 의해 활성화가 가능하다²⁰⁾. 이러한 맥락에서 보면 한약제제가 가지는 항산화 효과가 MMPs 형성을 저해하여 일부 광노화억제 효과를 나타낸다고 추정 가능하다²¹⁾. 기존에 행해진 연구를 살펴보면 본 실험에서 사용된 한약재중 당귀, 작약을 비롯하여 상당수가 항산화 효과를 가짐을 알 수 있다^{22,23)}. 본 연구는 한약제제의 복용으로 인한 피부개선효과를 측정할 연구로는 처음 시도된 점에 의의가 있는 것으로 사료된다. 앞으로 한약재의 피부관련 효과를 좀더 과학적으로 증명하기 위해서는 메커니즘과 관련된 심도 있는 연구가 수행되어야 할 것이다.

결론

본 연구는 hairless mouse를 model로 하여 UV를 조사함으로 인위적인 광노화를 유발시켰으며 UV 조사기간동안 꾸준히 滋陰美丹 추출물을 경구 투여하여 광노화 억제효과를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 주름정도를 객관적으로 비교하기 위하여 skin visiometer를 이용하여 피부주형(replica)을 분석하였다. UV/滋陰美丹복용군의 경우 UV대조군에 비해 Rt, Rm, Rz, Rp, Ra가 각각 26%, 32%, 31%, 19%, 25% 감소하였다. 또한 통계학적으로 UV/滋陰美丹복용군은 정상군과 거의 차이가 없을 정도로 피부주름상태가 양호하였다.

2. H&E 염색 슬라이드 상에서 현미경을 이용하여 표피두께를 측정하였다. UV대조군에 비해 UV/滋陰美丹복용군은 약 30% 감소된 $7.56 \pm 0.75 \mu\text{m}$ 을 나타내었다. type1 pN collagen을 면역조직화학 염색한 결과 UV/

滋陰美丹복용군의 경우에는 표피/진피 경계층에 있는 procollagen의 양이 UV대조군에 비해 증가되었다.

3. 섬유아세포에 UVB조사 후 MMP-1에 대한 ELISA를 실시하여 배양액 내에 생성된 MMP-1의 양을 측정 한 결과, 滋陰美丹처리군은 1ppm 농도에서 무처리군에 비해 MMP-1가 32% 유의적인 감소를 보였다. Type 1 procollagen 생성능 촉진 시험에서 procollagen 합성능에 대하여 滋陰美丹처리군은 1ppm, 10ppm에서 각각 20.2%, 7.8%의 증가를 보였으나 통계적으로 유의한 결과는 아니다.

본 연구의 결과 한약제제 추출물(滋陰美丹)의 복용을 통하여 hairless mouse에서 광노화 억제효과가 확인되었으며, 이러한 효과는 procollagen의 분해작용을 하는 collagenase의 합성을 저해하는데 일부 기인하는 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Kaminer MS. Photodamage: Magnitude of the problem. In: Gilchrest BA, eds. Photodamage. Blackwell Science, Inc. 1995:1-11.
2. Shindo Y, Witt E, Packer L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J Invest Dermatol.* 1993;100:260-265.
3. Lowe NJ, Friedlander J. Prevention of photodamage with sunprotection and sunscreens. In: Gilchrest BA, eds. Photodamage. Blackwell Science, Inc. 1995:201-220.
4. Boelsma E, Hendriks H, Roza L. Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 2001;73:853-864.
5. 黃霏莉. 미용중의학. 북경:과학출판사. 1999:79-89.
6. Foellmer HG, Kawahara K, Madri JA, Furthmayr H, Timpl R, Tuderman LA. Monoclonal antibody specific for the amino-terminal cleavage site of procollagen type I. *Eur J Biochem.* 1983;134:183-189.
7. Zhang J, Fujimoto N, Iwata K, Sakai T, Okada Y, Hayakawa T. A one-step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) using monoclonal antibodies. *Clinica Chemica Acta.* 1993;219:1-14.
8. 劉大有, 貢濟宇. 실용미용중약. 북경:인민위생출판사. 1998:1-14.
9. Contet-Audonneau JL, Jeanmaire C, Pauly G. A histological study of human wrinkle structures: comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas. *Br J Dermatol.* 1999;140:1038-1047.
10. Varani J, Spearman D, Perone P, Fligel SE, Datta SC, Wang ZQ, Shao Y, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am J Pathol.* 2001;158:931-942.
11. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:남산당. 1974:106-107, 139-147, 284.
12. Stahl W, Heinrich U, Jungmann H, Sies H, Tronnier H. Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:795-798.
13. Eberlein-Konig B, Placzek M, Przybilla B. Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and d-alpha-tocopherol (vitamin E). *J Am Acad Dermatol.* 1998;38:45-48.
14. Katiyar SK, Ahmad N. Green Tea and Skin. *Arch dermatol.* 2000;36:989-994.
15. Bisset DL, Hannon DP, Orr TV. An Animal model of solar-aged skin: histological, physical and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem Photobiol.* 1987;46:367-378.
16. Moloney SJ, Edmonds SH, Giddens LD, Learn DB. The hairless mouse model of photoaging: evaluation of the relationship between dermal elastin, collagen, skin thickness and wrinkles. *Photochem Photobiol.*

- 1992;56:505-511.
17. Yaar M, Gilchrest BA. Biochemical and molecular changes in photoaged skin. In: Gilchrest BA, eds. Photodamage. Blackwell Science, Inc. 1995:168-184.
 18. Takema Y, Hattori M, Aizawa K. The relationship between quantitative changes in collagen and formation of wrinkles on hairless mouse skin after chronic UV irradiation. *J Derm Sci.* 1996;12:56-63.
 19. Miyachi Y. Photoaging from an oxidative standpoint. *J Dermatol Sci.* 1995;9:79-86.
 20. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature.* 1996;379:335-339.
 21. Steenvoorden DP, Henegouwen GM. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photoch Photobio B.* 1997;41:1-10.
 22. 김윤선, 임영희, 왕수경, 윤숙자, 박춘란. 사물질편의 이화학적 품질특성 및 항산화 효과. *한국식품영양과학회지.* 1999;28(5):990-996.
 23. 김미혜, 김명철, 박종석, 김종욱, 이종욱. 다류원료 식물류 물 추출물의 항산화 효과. *한국식품과학회지.* 2001;33(1):12-18.