

향나무추출물의 광손상으로부터 피부세포 보호와 자극완화 효과에 대한 연구

김진화[†] · 박성민 · 심관섭 · 이범천 · 표형배

한불화장품(주) 기술연구소

Protection of UV-derived Skin Cell Damage and Anti-irritation Effect of *Juniperus chinensis* Xylem Extract

Jin-Hwa Kim[†], Sung-Min Park, Gwan-Sub Sim, Bum-Chun Lee, and Hyeong-Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics Co., 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk 369-834, Korea

요약: 태양광선과 산소는 피부세포에 자유라디칼(free radical)과 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)을 생성시켜 DNA의 손상과 세포막 지질의 과산화물을 유발한다. 또한 콜라겐과 같은 세포 외 기질을 파괴하는데 관여하는 효소(matrix metalloproteinase, MMPs)의 발현에 영향을 주어, 결합조직을 손상시키며, 피부 염증을 유발시켜 조직을 파괴하고 노화를 가속화시킨다. 본 연구는 자외선과 SLS에 의한 피부손상에 대한 향나무추출물의 피부 보호 효과에 대한 것이다. 실험 결과 프리라디칼 및 슈퍼옥사이드 라디칼 소거 효과가 우수하게 나타났으며, 피부 콜라겐과 같은 매트릭스를 분해하는 효소인 MMP-1의 활성 및 발현 저해 효과는 섬유아세포에서 UVA 조사에 의한 실험에서 우수하게 나타났으며, 피부세포 배양액에 대해 zymography를 실시하여 활성이 감소됨을 확인하였다. 피부 각질형성세포에서 자외선에 의해 유도된 염증관련 사이토카인인 인터루킨 6의 발현량 실험에서도 무처리군에 비해 향나무추출물이 인터루킨 6를 30% 정도 저해효과가 나타났으며, 염증반응 중 cyclooxygenase (COX)에 의한 경로에서 생성되는 프로스타글란딘 E₂의 생성량도 감소시켰다. 사람 피부에서 SLS (0.5%)첨포로 유발된 자극성 피부염의 항염증 효과 평가 시 SLS에 의해 유발되는 자극정도가 피검자의 피부상태에 따라 다양하게 나타났으며, 향나무추출물 함유 에멀전 제품 도포 실험에서는 피부 홍반 완화 효과와 피부장벽 회복 효과가 우수하게 나타났다. 따라서 향나무추출물은 자외선 조사 및 SLS에 의한 피부손상에 대한 보호 효과를 가진 화장품에서 우수한 소재로 적용될 수 있다.

Abstract: The human skin is constantly exposed to environmental irritants such as ultraviolet, smoke, chemicals. Free radicals and reactive oxygen species (ROS) caused by these environmental facts play critical roles in cellular damage. These irritants are in themselves damaging to the skin structure but they also participate the immensely complex inflammatory reaction. The purpose of this study was to investigate the skin cell protective effect of *Juniperus chinensis* xylem extract on the UV and SLS-induced skin cell damages. We tested free radical and superoxide scavenging effect *in vitro*. We found that *Juniperus chinensis* xylem extracts had potent radical scavenging effect by 98% at 100 µg/mL. Fluorometric assays of the proteolytic activities of matrix metalloproteinase-1(MMP-1, collagenase) were performed using fluorescent collagen substrates. UVA induced MMP-1 synthesis and activity were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and gelatin-based zymography in skin fibroblasts. The extract of *Juniperus chinensis* showed strong inhibitory effect on MMP-1 activities by 97% at 100 µg/mL and suppressed the UVA induced expression of MMP-1 by 79% at 25 µg/mL. This extract also showed strong inhibition on MMP-2 activity in UVA irradiated fibroblast by zymography. We also examined anti-inflammatory effects by the determination test of proinflammatory cytokine, interleukin 6 in HaCaT keratinocytes. In this test *Juniperus chinensis* decreased expression of interleukin 6 about 30%. Expression of prostaglandin E₂ (PGE₂) after UVB irradiation was measured by competitive enzyme immunoassay (EIA) using PGE₂ monoclonal antibody. At the concentrations of 5~50 µg/mL of the extracts, the production of PGE₂ by HaCaT keratinocytes (24 hours after 10 mJ/cm² UVB irradiation) was significantly inhibited in culture supernatants (p < 0.05). The viability of cultured HaCaT keratinocytes was significantly reduced at the doses of above 10 mJ/cm² of UVB irradiation, but the presence of these extracts improved cell viability comparing to control after UVB irradiation. We also investigated the protective effect of this extract in sodium lauryl sulfate (SLS)-induced irritant skin reactions from 24 hour exposure. Twice a day application of the extract for reducing local inflammation in human skin was done. Irritant reactions were assessed by various aspects of skin condition, that is, erythema (skin color reflectance) and transepidermal water loss (TEWL). After 5 days the extract was found to

[†] 주 저자 (e-mail: jinhwa29@hotmail.com)

reduce SLS-induced skin erythema and improve barrier regeneration when compared to untreated symmetrical test site. In conclusion, our results suggest that *Juniperus chinensis* can be effectively used for the prevention of UV and SLS-induced adverse skin reactions such as radical production, inflammation and skin cell damage.

Keywords: *juniperus chinensis*, skin cell protection, anti-inflammation

1. 서 론

피부의 노화는 두 가지의 요인을 갖는다. 즉, 시간이 지남에 따라 진행되는 자연적인 노화와 외부의 환경 및 자극으로 인한 피부 손상으로 개인에 따라 다르게 나타날 수 있는 외적 노화로 나눌 수 있다. 노화를 유발하는 외부요인 가운데 가장 중요한 인자로 자외선을 들 수 있다. 피부는 항상 산소와 태양광선에 노출되어 있어 이로부터 유발되는 산화적 스트레스는 피부의 주름 생성을 촉진한다.

자외선, 약물, 환경오염물질과 같은 여러 가지 외부 요인 및 그 외의 여러 가지 이유에 의해서 몸 안에 활성산소 종의 양이 크게 늘어 날 경우 생명체는 산화적 스트레스를 받아 세포 사멸, 질병 발생 그리고 세포의 노화를 일으키게 된다. 즉, 활성산소 종의 생성과 세포의 항산화력 간의 균형이 산화적 스트레스를 결정하게 되고, 산화적 스트레스는 세포내 단백질, 지질 및 DNA에 손상을 입히게 된다.

일반적으로 세포는 항상성 유지를 위하여 자체적으로 항산화제의 생산과 산화에 의한 손상의 복구 기작을 가지지만 UV, 흡연, 공해물질, 중금속 등의 물리, 화학적인 외부환경에 의해 세포 내 작용에 이상이 초래하거나 활성산소의 생성이 방어계의 용량을 초과할 정도로 과생성될 경우 산화스트레스가 야기되며, 피부의 노화를 촉진시키게 된다.

태양광선과 산소는 피부세포에 자유라디칼(free radical)과 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)을 생성시켜 DNA의 손상과 세포막 지질의 과산화화를 유발한다. 또한 콜라겐과 엘라스틴과 같은 세포 외 기질을 파괴, 또는 비정상적인 교차결합 유발에 관여하는 효소(matrix metalloproteinase, MMPs)의 발현에 영향을 주어, 결합조직을 손상시킨다[1-6]. 자외선에 의한 피부 광노화 촉진은 피부표면 조직의 파괴와 피부염증 유발, 홍반 등을 수반하며, 일상생활에서 항상 생활 자외선에 노출되어 있는 피부는 이러한 위험 요인과 직면하고 있다. 또한 기능성 화장품의 출현으로 활성성분의 고함량 배합에 따른 피부 이상반응 위험도 증가하고, 도시화에 따른 각종 오염물질, 자외선 등의 외부환경에 의한 스트레스도 심화되고 있어 현대인들은 화장품의 유효성 뿐만 아니라 안전성에 대한 관심이 더 높아져 편안하고 안전한 스킨케어 제품을 선

호하고 있다.

염증은 본래 세포나 조직이 어떠한 원인에 의해 손상을 받으면 그 반응을 최소화하고 손상부위를 원상으로 회복시키려는 일련의 방어 목적으로 나타나는 것이며, 통증, 부종, 발적, 발열 등을 일으켜 기능 장애가 일어나게 된다. 이러한 염증은 일반적인 상태에서는 초기상태가 지난 후 정상으로 돌아오나, 염증을 자극하는 자극제가 없어지지 않거나, 계속 염증 반응이 생기게 되면 세포손상 등 여러가지 부작용이 생기게 된다[7,8]. 항염증제에는 다양한 물질이 있으나, 피부 안전성 면에서나 화장품 배합시 안정성 면에서 부작용이 없는 항염물질이 중요하다. 이에 자외선 및 다양한 위험 요인으로부터 피부를 보호해줄 수 있는 자극완화원료의 중요성이 점점 높아져, 안전하고 효과가 우수한 천연물 유래의 자극완화소재 및 화장품 개발이 증가되고 있다[9].

향나무는 향기가 나는 나무로 예전부터 향나무의 향(香)은 청향(清香)이라 하여 정신을 맑게 하고 부정을 없앤다고 전해지며, 향나무의 맑고 강한 향기 때문에 향료로 사용되어 왔으며 수명이 1000년 이상인 나무도 있다. 향균 작용으로 예로부터 민간에서 사용되었으며, 각종 공해에 견디는 힘이 강하고 내공해성으로 공기를 깨끗하게 해주는 청량기능 효과가 있다. 숙대나무과의 상록 침엽 교목으로 높이는 15~20 m이며 나무껍질은 암갈색이다. 잎은 비늘모양과 송곳모양이 있으며, 꽃은 4~5월에 피고 과실은 홍자색의 콩알만한 것이 이듬해 10월에 핀다. 목부를 향목, 백단, 백전이라 하고 심재를 자단향(*Juniperi Lignum*)이라 한다[10,11].

본 연구는 천연물로부터 자극완화 효과가 우수한 향나무 추출물을 스크리닝 후 몇백년씩 장수하는 향나무 특유의 성분 및 photoprotection 효과를 활용하여 다양한 생리활성 효과와 화장품 응용에 대해 실험하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 기기

향나무는 서울경동시장 약재 구입상가에서 구입하였으며, 건조 및 세절하여 시료로 사용하였다. BHT (butylated hydroxytoluene), Anti-MMP-1 antibody (Ab-5), Anti-Human Interleukin-6, anti-rabbit IgG conjugated with horse radish peroxidase (HRP) and anti-mouse

IgG conjugated with alkaline phosphatase (AP)는 Sigma chemical Co.에서 구입하였으며(St. Louis, MO, USA), Collagenase inhibitory assay kit 및 1,10-phenanthroline 은 molecular probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. PGE₂ 정량은 Cayman chemical (Ann Arbor, MI, USA)의 enzyme immunoassay kit를 사용하였다. 사람 피부에서의 자극유발실험에서는 11 mm large Finn chamber on scanpor tape (Epitest Helsinki, Finland)을 사용하였으며, sodium lauryl sulfate는 Sigma chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2.2. 향나무추출물의 조제

향나무 건고물, 즉 잔가지 부분을 세절하여 95% 에탄올에 2시간 동안 상온에서 침지시킨다(건고물 : 전체의 10%). 침지 후 80°C에서 4시간 동안 추출한다. 상온에서 추출액을 여과하여 evaporator로 농축시켜 향나무추출물을 얻은 후 실험에 사용하였다.

2.3. DPPH에 의한 자유라디칼 소거 효과

자유라디칼 소거 효과 측정은 0.1 mM DPPH(2,2-Di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl radical)에 실험원료를 농도별로 동량을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다[12].

2.4. Superoxide radical 소거 효과

Xanthine, xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical를 소거하는 효과를 SOD Test Wako 방법에 의해 측정하였다[13]. 0.05 M Na₂CO₃ buffer (pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 향나무추출물을 가한 후 25°C에서 10분간 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/mL xanthine oxidase를 가하고 25°C에서 25분 동안 반응 후 superoxide radical 소거 효과를 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. Collagenase 활성 저해 효과

Well plate에 완충액과 실험물질을 농도별로 희석하여 첨가하고, 각 well에 적절히 희석한 collagen 분해효소를 40 μL씩 분주하며, DQ-gelatin 용액 20 μL를 well에 분주하여 반응시킨다. DQ gelatin 기질에는 형광이 표식되어 있으며 효소에 의해 기질이 분해되면 형광이 노출되기 때문에 collagenase 효소활성이 증가할수록 형광값이 증가한다. 시간 경과에 따른 형광값 변화를 형광 spectrophotometer (PERKIN ELMER, USA)를 이용하여 형광값을 측정하였다.

2.6. 세포 배양(Cell culture)

각질형성세포(HaCaT)는 American Type Culture Collection으로부터 구입하였고, 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 DMEM, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 신생아의 포피조직에서 분리한 human dermal fibroblast (HDF)는 Modern Tissue Technology (MTT, Korea)로부터 구입하였다. 구입한 HDF를 DMEM/F12 (3:1) 배지에 10% FBS (fetal bovine serum), 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 6~10세대 세포를 실험에 이용하였다.

2.7. 자외선B(UVB)에 대한 세포 보호 효과

각질형성세포 1×10⁵ cells/mL를 well plate에 넣고 배양기에서 24시간 동안 배양 하였다. 배양된 각질형성세포에서 배양배지를 제거하고 인산완충액(phosphated buffered saline, PBS)으로 세척한다. 인산완충액을 500 μL 첨가한 다음 자외선(UVB)을 10 mJ로 조사 후 신선한 세포 배양배지로 교체해준다. 실험원료를 농도별로 처리하여 자외선 조사 후 시료를 처리하지 않은 대조군과 세포생존률을 비교하였다.

2.8. 섬유아세포에서 MMP-1 발현량 저해 효과

Well plate에 5×10⁴ cell/well로 섬유아세포를 분주하고 24시간 동안 안정화시킨 후 세포에 UVA를 4.2 J 조사하고 향나무추출물을 농도별로 처리한다. 시료 처리 후 24시간 동안 37°C CO₂ 배양기에서 배양한다. 세포 배양 배지를 well plate에 일정량 코팅하고, 세척 후, blocking buffer로 37°C에서 2시간 반응시키고, Primary antibody를 37°C에서 90분간 처리한다. 세척 후 secondary antibody인 Goat anti-mouse IgG-Alkaline phosphatase를 37°C에서 90분간 처리한다. 세척 후 substrate solution을 넣고 반응시킨 후 O.D₄₀₅ 값을 측정한다.

2.9. MMP-2 Zymography

자외선 조사 후 향나무추출물을 처리하고 배양 후 배양 상등액을 기질(gelatin)이 중합된 10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔에 loading 후 전기영동 한다. SDS를 제거하기 위해 2.5% triton X-100으로 1시간 동안 세척한 후 37°C에서 12시간 동안 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6, 0.15 NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃)에서 반응시킨다. 효소활성은 0.1% coomassie brilliant blue로 염색하고 탈색한다[14].

2.10. Hyaluronidase 활성 저해 효과

Hyaluronic acid가 hyaluronidase에 의해 분해되어 생

성되는 N-acetylglucosamine을 Morgan-Elson assay를 이용하여 정량하였다[15].

0.1 M Acetate buffer (pH 4.0)에 용해한 Hyaluronidase (EC 3.2.1.35, SIGMA)와 실험원료를 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시킨다. Enzyme activated solution (Compound 48/80 (SIGMA)과 CaCl₂·2H₂O를 acetate buffer에 용해)을 첨가하여 반응시키고, hyaluronic acid를 첨가하여 40분간 반응시킨다. Stop solution을 첨가하고, 95°C에서 3분간 반응시킨 후 p-Dimethylaminobenzaldehyde (DABA) 용액을 혼합하여 반응시키고 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.11. 자외선에 의해 유도된 염증관련 사이토카인(IL-6)의 발현 저해 효과

각질형성세포(1×10⁵ cells/mL)를 자외선 조사기(UVB G15T8E, Sankyo Denki, Japan)로 10 mJ/cm² 세기로 조사한 후 serum free DMEM 배지를 500 μL 첨가하고 향나무추출물 시료를 농도별로 첨가하였다. 24시간 동안 배양 후 배양상층액을 well plate에 4°C에서 코팅한다. 3% BSA로 37°C 2시간 동안 blocking하고 primary antibody (anti-human IL-6) in PBS-T를 첨가하여 37°C 90분 동안 반응시킨다. 세척 후 secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG conjugated with peroxidase)를 첨가하고 90분 동안 37°C 반응시킨 후 o-phenylene diamine이 함유된 기질용액을 첨가하여 발색시켜 490 nm에서 흡광도를 측정하였다[16].

2.12. PGE₂ assay - 자외선에 의해 유도된 PGE₂ 생성 저해 효과

각질형성세포(HaCaT, keratinocyte)를 well plate에 각각 5×10⁴ cells/mL씩 넣고 24시간 동안 부착하였다. 각 well을 인산완충용액(phosphate buffered saline, PBS)으로 2회 세척 후 500 μL의 인산완충용액(PBS)을 첨가하였다. 이 각질형성세포에 자외선 B를 10 mJ/cm²를 조사한 후, 각질형성세포 배양액 500 μL를 첨가하고 실험원료를 각 실험농도로 처리한 후 배양하였다. 배양상층액에서 프로스타글란딘 E₂ (PGE₂)량을 효소면역분석법을 이용하여 정량 하였다(enzyme immunoassay kit, Cayman chemical, Ann Arbor, MI, USA)[8].

2.13. 사람피부에서 SLS 철폐로 유발된 자극성 피부염에 대한 항염증효과

연구대상은 과거에 알레르기성 질환이나 아토피 피부염 등 질환의 병력이 없는 건강한 성인 남녀 10명을 대상으로 하였다. 검사 전 최소 일주일 동안 경구 부신피질 호르몬제나 항히스타민제, 항염제를 복용하지 않았으며,

검사부위에 국소 부신피질 호르몬제를 바르지 않았다. 연령은 27세에서 38세까지였으며, 평균 연령은 32.1세였다. 연구에 사용된 자극원화 원료는 기존의 *in vitro* 실험에서 항염효과가 우수하게 나타난 원료를 중심으로 하였으며, 향나무추출물을 함유한 O/W 에멀전을 제조하여 피부에 도포하였다.

SLS (0.5%) 인체철폐(human patch test)는 피검자의 양측 상완 내측에 0.5% SLS 용액(w/v in distilled water)을 filter paper disc에 적셔 직경 11 mm large Finn chamber on scanpor tape (Epitest, Helsinki, Finland)에 24시간 부착하여 인위적으로 자극성 피부염을 유발하고 철폐를 제거하였다. 철폐 제거 후 30분, 24시간, 72시간(3일), 120시간(5일) 마다 실험부위의 피부반응 정도를 평가하였다[17,18].

시험물질 함유 에멀전은 SLS 철폐를 제거하고 30분 경과 후 피부상태를 측정된 뒤 시험물질을 각 부위에 도포하였다. 시험물질은 공시료와 향나무추출물을 함유한 O/W 에멀전을 각 실험부위에 5일간 1일 2회씩 도포하였다. 실험부위의 측정은 물질을 도포하기 전인 오전에 측정하였다.

Mexameter MX16 (C+K, Germany)는 reflectance photometer로서 실험부위로부터 반사된 빛의 강도를 측정하여 홍반지수(erythema index, EI)의 값을 2회씩 측정하였다. 측정된 시간대별 홍반지수의 평균값을 구하고, 도포 전과 비교하여 홍반지수의 변화율을 계산하였다.

색차계(SPECTROPHOTOMETER CM 2002, Minolta, Japan)를 이용하여 홍반 정도를 의미하는 a*값을 측정하였다. 대조 부위와 각 실험물질 도포 부위를 도포 전, 도포 1일 후, 도포 3일 후, 도포 5일 후에 각각 측정하였으며, 도포 전과 비교하여 a*값 변화를 비교하였다.

경피수분손실량 측정은 실내온도 20~22°C, 상대습도 40~60% 항온항습 조건에서 Tewameter 210 (C+K, Germany)를 이용하여 측정하였다. 도포 전 및 대조군과 비교하여 경피 수분손실량을 측정하여 피부장벽기능 회복 정도를 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 피부 유해 라디칼 소거 효과

활성산소는 체내 각종 세포들의 여러 대사과정에서 끊임없이 생성되며, 자외선 및 외부환경에 의해서도 세포내에서 발생된다. 활성산소와 지질이 반응하면 과산화 지질이 생성되어 혈관벽이나 세포막의 구조가 파괴되어 조직이 손상된다. 이런 산화반응에서 활성산소에 의해 피부노화가 가속화되며, 활성산소의 프리라디칼에 대한 피부보호 효과를 측정하기 위해 프리라디칼인 DPPH에 대한 라디칼 소거 효과와 xanthine oxidase가 xanthine과 반응하여

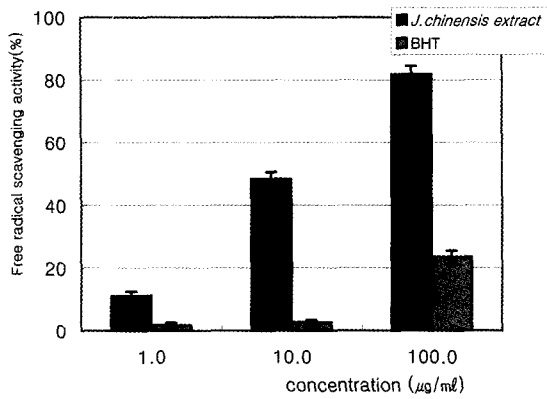


Figure 1. Free radical scavenging activity (DPPH method).

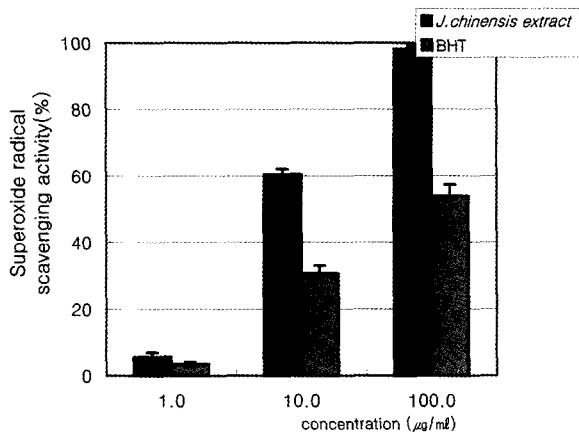


Figure 2. Superoxide scavenging activity (NBT method).

uric acid로 전환되고 이때 생성되는 O_2^- (superoxide radical)를 소거하는 효과를 평가하였다[19,20].

향나무추출물의 농도별 라디칼 소거 효과 측정 시 100 µg/mL 실험 농도에서 82%의 우수한 프리라디칼 소거 효과를 나타내었다(Figure 1). 또한, 향나무추출물은 100 µg/mL 농도에서 98% 정도의 우수한 항산화 효과를 나타내었으며, 독성이 강한 라디칼인 O_2^- 소거 효과도 BHT (butylated hydroxytoluene)보다 우수하게 나타났다(Figure 2).

3.2. Collagenase 활성 저해 효과

MMP-1 (Matrix methaloproteinase-1, collagenase) 저해 활성을 가진 물질은 콜라겐을 보호하여 피부조직의 기계적 특성을 유지시켜 탄력과 피부가 늘어지는 것을 방지한다. 향나무추출물을 농도별로 MMP 활성 저해 효과를 측정 결과 100 µg/mL 이상의 농도에서 95% 이상 저해되었다(Figure 3).

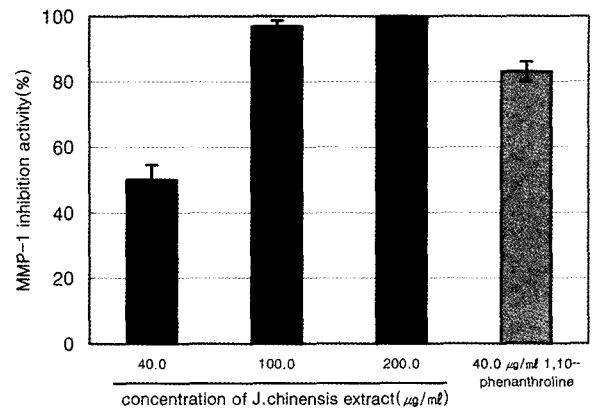


Figure 3. MMP-1 inhibition activity.

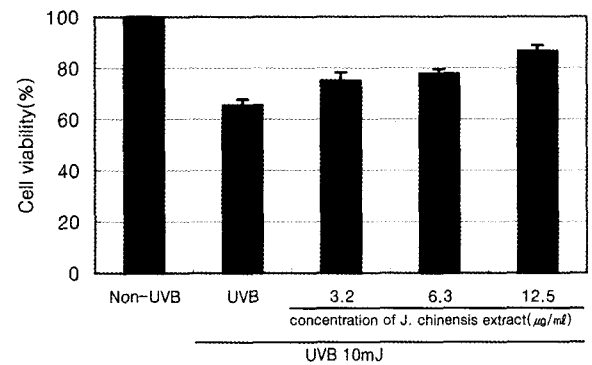


Figure 4. Protection of cell viability after UVB irradiation.

3.3. 자외선(UVB) 조사에 의한 세포독성 완화 효과

자외선에 대한 피부보호 작용을 평가하기 위해 세포독성 완화 효과 실험을 실시하였다[21]. 자외선(UVB)을 10 mJ로 조사 후 시료를 농도별로 처리하여 자외선 조사 후 시료를 처리하지 않은 대조군과 세포생존율을 비교하였다. 향나무추출물을 농도별로 처리 후 각질형성세포를 24 시간 배양하여 세포생존율 측정 결과 시료를 처리하지 않은 대조군보다 35% 정도의 세포 생존율을 증가시켜 매우 우수한 세포 독성 완화 효과를 나타내었다(Figure 4).

3.4. 섬유아세포에서 자외선 조사에 의한 MMP 발현량 저해 효과

MMP (Matrix methaloproteinase)는 자외선에 의해 발현이 촉진되며, 피부의 노화와 광손상에 관련되어 있다 [22,23]. 향나무추출물의 UVA 조사에 의해 유도된 MMP의 발현 억제 효과를 평가하기 위하여 효소면역분석법으로 배양 배지에서의 MMP-1 (collagenase)을 정량하였다. 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 향나무추출물의 MMP-1 발현 저해 효과는 50 µg/mL 농도에서 98%의 저해 효과를 나타내었다(Figure 5).

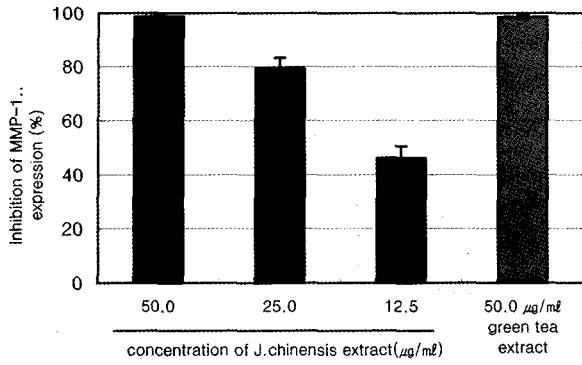


Figure 5. Inhibition of MMP-1 expression.

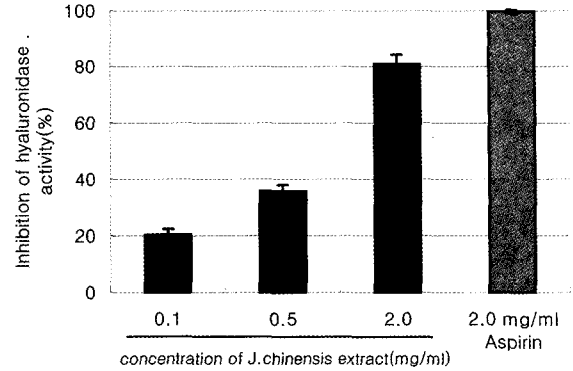


Figure 7. Inhibition of hyaluronidase activity.

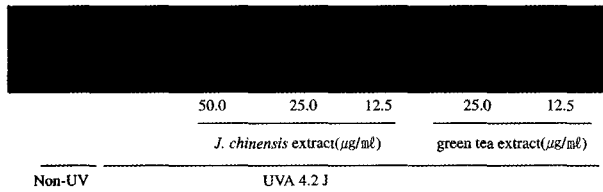


Figure 6. Inhibition of MMP-2 in human dermal fibroblast (MMP zymography).

또한, 향나무 추출물이 UVA 조사에 의해 유도된 MMP-2 (gelatinase)의 발현 억제 효과를 평가하기 위해 zymography를 실시하였다. 실험 결과 향나무추출물은 농도 의존적으로 뚜렷한 활성 변화가 관찰되어 MMP-2 활성 저해 효과가 우수함을 확인할 수 있었다(Figure 6).

따라서, 향나무추출물은 자외선에 의해 유도되는 MMP-1과 MMP-2의 발현을 농도 의존적으로 저해하는 것으로 나타나 자외선에 대한 피부세포 보호 효과가 우수한 것으로 나타났다.

3.5. Hyaluronidase 활성 저해 효과

Hyaluronidase는 mucopolysaccharide-splitting 효소 중의 하나로 hyaluronic acid의 glucuronic acid와 N-acetylglucosamine의 (1-4) 결합을 가수분해하는 효소로 혈관투과 과정에 관여하며, 염증반응에 의해 과잉 생산된 히스타민에 의해 활성화되어 염증반응에 관여하는 것으로 알려져 있다[24]. 따라서 피부염증 억제 효과를 평가하기 위해 향나무추출물의 hyaluronidase 저해 활성을 측정된 결과 2 mg/mL 농도에서 81%의 효과를 나타내었다(Figure 7).

3.6. 자외선에 의해 유도된 염증관련 사이토카인(IL-6)의 발현 저해 효과

피부 이상 반응의 유발인자에는 화학물질, 세정제, 자외선 등 여러 가지가 있으며, 이에 대한 피부보호 작용을 평가하기 위해 자외선(UVB)에 의해 유도된 염증관련 사이

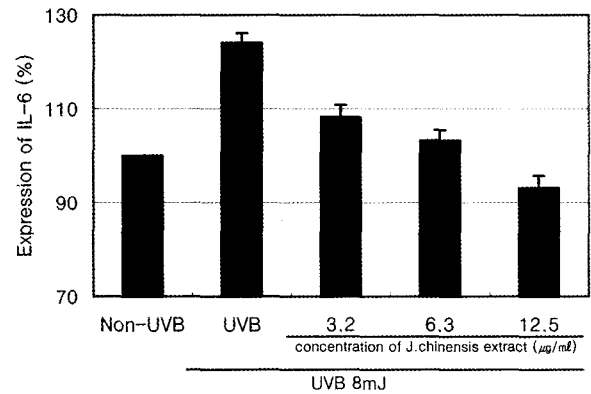


Figure 8. Inhibition of UVB-induced IL-6 expression.

토카인인 IL-6의 생성량을 측정된 결과, UVB에 의해 유발된 염증관련 사이토카인인 IL-6의 생성물은 향나무추출물에 의해 30% 정도 감소되는 것으로 나타났다(Figure 8).

3.7. PGE₂ assay - 자외선에 의해 유도된 PGE₂ 생성 저해 효과

Prostaglandin E₂ (PGE₂)는 cyclooxygenase (COX)와 관련된 염증반응 경로에 관여하는 대표적인 물질 중에 하나로 자외선이나 외부 오염물질에 의해 염증이 발생하게 되면 생성이 촉진된다[25,26]. 각질형성세포에서 UVB 조사 실험을 실시한 결과, 조사량에 따라 PGE₂ 량이 유의하게 증가하였으며, UVB 10 mJ에서 60 ng/mL 정도의 PGE₂가 생성되었다. 자외선 조사 후 향나무추출물을 처리하면 농도 의존적으로 PGE₂ 생성량이 줄어들었으며, 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 약 50%의 생성 저해 효과가 나타나 전체적으로 항염 및 자외선에 대한 피부 보호 효과가 우수한 것으로 나타났다. 따라서 향나무추출물은 염증성 사이토카인의 억제와 염증발생 경로 중 cyclooxygenase (COX)에 의한 경로에서 억제 효과가 있는 것으로 생각된다(Figure 9).

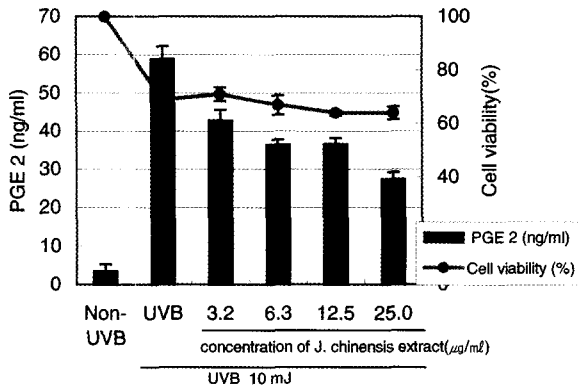


Figure 9. Inhibition of PGE₂ (prostaglandin E₂) expression after UVB irradiation.

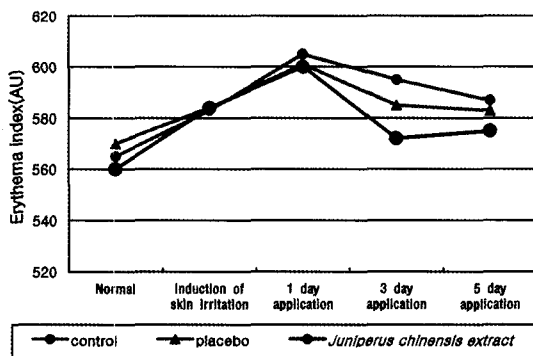


Figure 10. Changes in the mexameter (C+K, Germany) measurement score (erythema index) of erythema by SLS (0.5%) after applying the product.

3.8. 사람피부에서 SLS 철포로 유발된 자극성 피부염에 대한 항염증 효과

Sodium lauryl sulfate (SLS)는 피부의 장벽기능에 영향을 주고 염증을 유발하는 자극성이 강한 대표적인 계면활성제로서, 이를 이용한 철포시험은 자극성 피부반응 연구에 대표적인 방법이다[27-30].

SLS (0.5%)철포로 유발된 자극성 피부염의 항염증 효과 평가 시 SLS에 의해 유발되는 자극정도가 피검자의 피부상태에 따라 다양하게 나타났으며, 자극완화 물질 도포에 따른 피부 회복력에도 차이가 있었다. 향나무추출물 함유 제품에서 비교적 우수한 자극완화 효과를 나타내었으나, 공시료(Placebo)의 경우는 별다른 효과가 나타나지 않았다.

Mexameter는 피부에 침착된 피부 홍반의 정도를 수치로 표시하여 측정하는 기기로 SLS에 의해 홍반을 유발시킨 후 실험물질의 자극완화 효과를 측정한 결과 향나무추출물을 함유한 에멀전 도포 실험에서 도포 5일 후 우수한 홍반량 감소 효과가 나타났다(Figure 10).

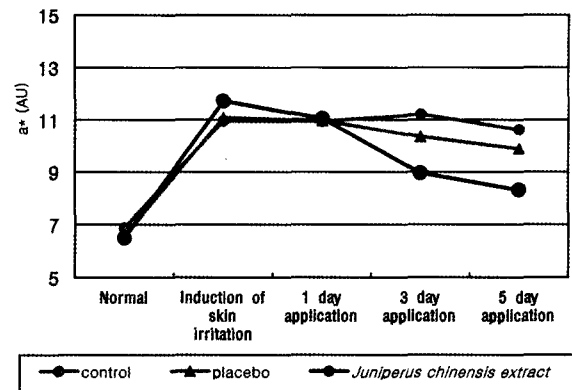


Figure 11. Changes in the a* values of spectrophotometer (Minolta, Japan) after inducing irritant contact dermatitis caused by SLS.

색차계를 이용하여 홍반정도를 나타내는 a* 값을 측정 한 결과 SLS에 의해 유발된 홍반유발 실험에서 lactic acid의 경우 오히려 홍반지수가 높아지는 경향이 있었으며, 향나무추출물 함유제품 도포 시 공시료에 비해 홍반지수가 감소한 것으로 나타났다(Figure 11).

경피 수분 증발량(transdermal water loss, TEWL)은 향나무추출물을 함유한 에멀전 제품 도포 시 향나무추출물 함유 제품 도포 3일 후와 도포 5일 후 공시료에 비해 피부수분손실량이 줄어들어 우수한 피부 장벽 회복 효과가 있는 것으로 나타났다(Figure 12).

4. 결 론

화장품은 피부에 일상적으로 사용되는 것으로 다양한 주위환경 인자와 스트레스로 인해 피부의 이상반응을 초래할 수 있기 때문에 자극완화 및 저 자극성 제품에 대한 관심과 필요성이 증가하고 있다. 이에 향나무추출물의 외부 자극원에 대한 피부세포 보호효과를 *in vitro*와 *in vivo* 사람피부에서 실험을 실시하였다. 프리라디칼 및 superoxide 소거 효과도 우수하게 나타났으며, 피부세포(섬유아세포, 각질형성세포)에서 자외선에 대한 향나무추출물의 세포보호작용 실험을 실시한 결과 자외선에 의한 세포독성 완화와 MMP 생성 저해 효과가 매우 우수하게 나타났다.

자외선에 의해 유발되는 염증관련 싸이토카인인 IL-6의 생성 억제 효과도 나타났으며, PGE₂ 생성 저해 효과도 우수하게 나타났다.

또한, 사람피부에 0.5% SLS로 자극을 유발한 후 향나무추출물 함유 제품에서 피부 홍반 완화 효과와 피부장벽 회복 효과가 우수하게 나타났다. 따라서 향나무추출물은 자외선 및 외부자극물질에 의해서 발생할 수 있는 피

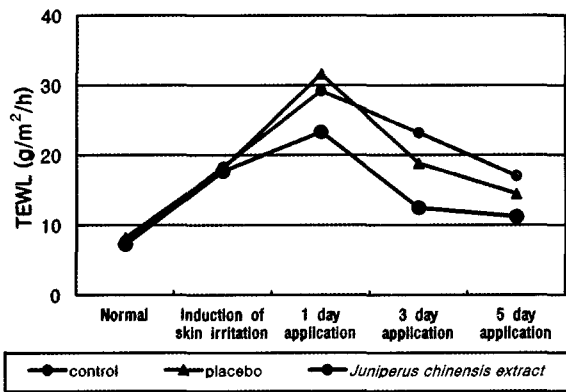


Figure 12. The effect of skin barrier recovery after applying *Juniperus chinensis* xylem extracts on the SLS-induced irritant contact dermatitis measured by Tewameter (C+K, Germany).

부손상에 대하여 효과적으로 보호할 수 있는 우수한 자극완화소재로 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 제품화과제(02-PJ1-PG4-PT05-0003)의 지원에 의하여 수행하였으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. S. Claude, K. Manabu, M. Laura, and P. Lester, Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line, *Free radical Biol & Med.*, **26**, 174 (1999).
2. A. Naqui, B. Chance, and E. Cadenas, Reactive oxygen intermediate in biochemistry, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 137 (1986).
3. E. Cadenas, Biochemistry of oxygen toxicity, *Ann. Rev. Biochem.*, **58**, 79 (1989).
4. K. J. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radicals, *J. Biol. Chem.*, **262**, 9895 (1987).
5. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cos. Sci. Kor.*, **23**, 75 (1997).
6. M. Yaar and B. A. Gilchrist, Aging versus photo-aging: postulated mechanisms and effectors, *J. Investing. Dermatol. Symp. Proc.*, **3**, 47 (1998).
7. G. Dannhardt and W. Kiefer, Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects, *Eur. J. Med. Chem.*, **36**, 109 (2001).
8. S. M. Ann, H. Y. Yoon, B. G. Lee, K. C. Park, J. H. Chung, C. H. Moon, and S. H. Lee, Fructose-1,6-diphosphate attenuates prostaglandin E₂ production and cyclooxygenase-2 expression in UVB-irradiated HACAT keratinocyte, *British journal of pharmacology*, **137**, 497 (2002).
9. S. J. Jeong, Y. S. Ko, N. H. Ahn, and Y. C. Kim, Hyaluronidase inhibitor from *Uncariae ramulus et Uncus*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **29**, 169 (1998).
10. 장준근, *몸에 좋은 산야초*, 넥서스 (2000).
11. 한대석 외, *생약학*, 동명사 (1996).
12. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
13. K. Furuno, T. Akasako, and N. Sugihara, The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids, *Boil. Pharm. Bull.*, **25**, 19 (2002).
14. M. Demeule, M. Brossard, M. Page, D. Gingras, and R. Beliveau, Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins, *Biochemica et Biophysica Acta*, **1478**, 51 (2000).
15. Y. S. Kim, Y. K. Noh, G. I. Lee, and Y. K. Kim, Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity, *Korean J. Pharmacology*, **26**(3), 265 (1995).
16. B. Tebbe, S. Wu, C. C. Geilen, J. Eberls, V. Kodelja, and C. E. Orfanos, L-ascorbic acid inhibits UVA-induced lipid peroxidation and secretion of IL-1 alpha and IL-6 in cultured human keratinocytes *in vitro*, *J. Invest. Derm.*, Vol. **108**, 302 (1997).
17. A. M. Kligman, The SLS provocative patch test in allergic contact sensitization, *J. Invest. Dermatol.*, **36**, 573 (1996).
18. 윤상응 등, 녹차추출물을 함유한 보습제의 항염증 효과 평가, *대한피부과학회지*, **41**(1), 15 (2003).
19. H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai, Active oxygen scavenging activity of plant extracts, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 162 (1995).
20. P. Kuppusamy and J. L. Zweier, Characterization of free radical generation by xanthine oxidase, *J. Biol. Chem.*, **264**, 9880 (1989).
21. Y. W. Ryoo, S. I. Suh, K. C. Mun, B. C. Kim, and K. S. Lee, The effects of the melatonin on ultraviolet-B irradiated cultured dermal fibroblasts, *J. Dermatol. Science*, **27**, 162 (2001).
22. J. H. Chun, S. W. Kang, J. Varani, J. Lin, G. J.

- Fisher, and J. J. Voorhees, Decreased extracellular-signal regulated kinase and increased stress-activated MAP kinase activities in aged human skin in vivo, *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 177 (2000).
23. J. Y. Seo, G. E. Rhie, and J. H. Chung, The effect of ultraviolet irradiation on the expression of type I procollagen and MMP-1 in human dermal fibroblast and human skin *in vivo*, *Kor. J. Invest. Dermatol.*, **8**, 116 (2001).
24. S. I. Choi, Y. M. Lee, and T. R. Heo, Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity in vitro of traditional herbal medicine extracts, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, Vol. **18**(4), 282 (2003).
25. L. L. Hruza and A. P. Pentland, Mechanisms of UV-induced inflammation, *J. Invest. Dermatol.*, **100**, 35S (1993).
26. K. Isoherranen, K. Punnonen, C. Jansen, and P. Uotilas, Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes, *British J. Dermatol.*, **140**, 1017 (1999).
27. C. H. Lee and H. I. Maibach, The sodium lauryl sulfate model:an overview, *Contact Dermatitis*, **33**, 1 (1995).
28. E. Held, H. Lund, and T. Agner, Effects of different moisturizers on SLS-irritated human skin, *Contact Dermatitis*, **44**, 229 (2000).
29. J. W. Fluhr, O. Kuss, T. Diepgen, S. Lazzarini, A. Pelosi, M. Gloor, and E. Berardesca, Testing for irritation with a multifactorial approach: comparison of eight non-invasive measuring techniques on five different irritation types, *Br. J. Dermatol.*, **145**, 696 (2001).
30. L. Marie, H. Olsson, T. Axell, and Y. W. Linde, Friction, capacitance and transepidermal water loss (TEWL) in dry atopic and normal skin, *Br. J. Dermatol.*, **126**, 137 (1992).