

능실 추출물 및 그 분획물의 피부 광노화 억제 효능

남진주·이경은·박지은·문성준·염종경[†]

코스맥스 R&I center

(2014년 6월 10일 접수, 2014년 6월 18일 수정, 2014년 8월 5일 채택)

Inhibitory Effect of Fractionated *Trapa Japonica* Extracts on UVB-induced Skin Photoaging

Jin-Ju Nam, Kyung-Eun Lee, Ji-Eun Park, Seong-Joon Moon, and Jong-Kyung Youm[†]

Cosmax R&I Center, Pangyo innovalley E 603, 255, Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea

(Received June 10, 2014; Revised June 18, 2014; Accepted August 5, 2014)

요약: 자외선은 피부의 구조적, 생리학적 변화를 일으키는 대표적인 외부 환경 인자로서 광노화, 일광화상 및 피부암을 일으키는 원인이 된다. 이러한 자외선은 외부적인 스트레스 자극 인자로 작용하여 피부 세포 내에서 비활성 코르티손을 활성 코르티솔로 전환시키는 효소인 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1)의 발현 및 활성을 증가시킨다. 이에 본 연구에서는 UVB에 의해 증가된 11 β -HSD1의 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 천연 추출물을 발굴하고자 하였다. 사람 섬유아세포에 다양한 천연물을 스크리닝한 결과, 능실 추출물이 유의한 효과가 있음을 확인하고, 능실 추출물을 추가 분획하여 사람 섬유아세포와 3D skin model에서 피부 광노화 억제 소재로서의 가능성을 확인하였다. 능실 추출물 및 분획물은 섬유아세포에서 11 β -HSD1의 발현을 억제함과 동시에 자외선에 의한 matrix metalloproteinase (MMP)-1, 3, 9 및 염증성 사이토카인(IL-6, 8)의 발현 증가를 억제하였다. 또한, 3D skin model을 이용한 평가에서, 능실 추출물은 UVB에 의한 MMP-1 단백질 발현을 억제하였고, UVB에 의한 표피 두께 감소 및 각질형성세포의 증식 감소를 회복시켰다. 따라서, 본 연구 결과로부터 능실 추출물 및 분획물은 UVB에 의한 11 β -HSD1의 발현 증가와 이에 수반하는 광노화를 효과적으로 예방함을 확인하였다.

Abstract: Ultraviolet B (UVB) is a primary environmental factor that induces adverse effects on skin such as photoaging, skin burn and cancer. UVB also increases the expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1), which converts inactive cortisone to active cortisol in response to a variety of stressors in target tissues. Thus, we have screened new herbal extracts that suppress 11 β -HSD1 expression induced by UVB in human dermal fibroblasts. We also investigated whether *Trapa japonica* (TJ) extract and its fractions inhibit UVB-induced photoaging in Hs68 cells and 3D skin model. Results showed that TJ extract inhibited the increase of 11 β -HSD1 expression in UVB-exposed Hs68 cells significantly. TJ extract and its fractions not only inhibited 11 β -HSD1 expression, but also suppressed the increase of matrix metalloproteinases (MMP-1, 3, 9) and proinflammatory cytokines (IL-6, 8) in UVB-irritated Hs68 cells. TJ extract also inhibited MMP-1 expression in UVB-irritated 3D skin model. In addition, TJ extract recovered UVB-induced decreases of epidermal thickness and PCNA-positive cells in 3D skin model. Taken together, these results suggest that TJ extract and its fractions inhibit UVB-induced skin photoaging by interfering with 11 β -HSD1 and MMPs.

Keywords: *Trapa japonica* extract, photoaging, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, ultraviolet B, matrix metalloproteinases

[†] 주 저자 (e-mail: jkyoum@gmail.com)
call: 031)789-3253

1. 서 론

피부 노화는 크게 자연노화와 광노화로 구분할 수 있다. 자연노화는 햇빛에 노출되지 않은 피부에서 관찰되는 노화 현상으로 세월이 흘러감에 따라 피할 수 없으며 내인성 노화라고도 한다[1]. 자연적으로 노화된 피부의 특징으로는 잔주름, 창백한 피부색, 피부건조증, 경미한 탄력감소 등으로 설명될 수 있다[1]. 광노화란 햇빛에 항상 노출되는 얼굴, 목, 손등, 팔의 피부에서 관찰되는 노화 현상을 말한다. 광노화된 피부는 자연적으로 노화된 피부에 비하여 주름살이 굵고, 깊고, 그 수가 많으며, 잔주름도 많이 발생한다. 또한, 오랜 세월 동안 햇빛에 노출된 피부에는 불규칙한 색소침착이 발생하고, 흑자, 기미 등의 색소질환이 흔하게 나타난다[1,2]. 게다가 피부가 매우 거칠고 건조해지며 피부의 탄력성이 심하게 감소하여 피부가 처지는 현상이 관찰될 뿐만 아니라[1,2], 검버섯과 같은 양성종양이나 피부암을 일으키는 빈도도 증가하게 된다[1-3].

피부 노화의 가장 두드러진 특징 중 하나는 주름 생성이다. 주름이 생기는 주요 원인으로는 진피층에 존재하는 콜라겐의 감소 또는 생성 억제에 있다[4,5]. 이중 새로 만들어지는 콜라겐이 없다는 사실은 진피의 구조와 형태유지에 중요하고 피부에 단단한 강도를 제공하는 콜라겐 섬유를 정상 수준으로 유지할 수 없다는 것을 의미한다. 그 결과, 피부 속에서 일어나는 콜라겐의 감소라는 변화가 피부 겉에서는 주름의 형태로 나타나게 된다. 이러한 콜라겐 합성 감소의 대표적인 원인으로 자외선을 들 수 있다. 자외선은 피부 섬유아세포가 콜라겐을 생성하는 것을 막아 피부 노화를 가속화한다[1,3-5]. 또한, 자외선은 콜라겐 분해 효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 증가시켜 콜라겐 섬유를 비롯하여 피부를 구성하는 섬유들의 분해를 촉진한다[1,3-5]. 이러한 현상은 자연 노화된 피부에 비해 자외선에 노출된 피부에서 콜라겐이 더 많이 분해되어 진피의 구조와 형태에 많은 변형과 손상을 초래하고, 결국에는 더 심한 주름이 노출부 피부에 생기게 된다[3,5].

Taganescu 등은 최근 피부 노화가 진행됨에 따라 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11β -HSD1)의 활성 및 발현이 증가되어 있다고 보고하였다[9,10]. 특

히, 자외선에 노출된 부위에서 11β -HSD1의 활성 및 발현의 증가가 두드러졌다[9,10]. 11β -HSD1은 체내 스트레스 호르몬의 활성을 조절하는 효소로서, 다양한 세포 내에서 비활성 글루코코르티코이드를 활성 글루코코르티코이드로 전환시킨다[11]. 이렇게 활성화된 글루코코르티코이드는 체내 스트레스 반응을 일으키는 물질로서 작용하고, 스트레스에 의한 여러 가지 부작용을 일으키는 것으로 알려져 있다[11]. Taganescu 등의 보고에 따르면, 여성의 폐경 후 피부 조직에서 11β -HSD1의 발현이 상당히 증가되어 있고[10], 자외선에 노출된 부위에서는 자외선에 노출되지 않은 부위에 비해 11β -HSD1의 활성이 4배 이상 증가하는 것으로 나타났다[9,10]. 또한, 11β -HSD1 KO 마우스에서는 노화에 따른 진피의 콜라겐 감소가 나타나지 않았고, 상처 후 회복 속도도 매우 빨랐다. 아울러 11β -HSD1 저해제는 노화된 피부에서 상처 후 치유 속도를 증가시켰다[9].

따라서, 본 저자 등은 자외선에 의한 피부 노화의 새로운 원인으로 11β -HSD1에 주목하고, 11β -HSD1의 발현을 억제하는 천연물을 발굴하고자 하였다. 그 결과, 능실 추출물에서 자외선으로 유도한 11β -HSD1의 발현 증가를 현저하게 억제함을 확인하였고, 이를 바탕으로 능실 추출물을 다시 분획하여 각 분획물별로 자외선에 의한 다양한 광노화 반응에 주는 영향을 확인함으로써 광노화 억제능을 갖는 기능성 소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다. 또한, 3D skin model을 이용한 광노화 평가를 수행하여, 이를 활용한 광노화 평가법을 제안하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 능실 추출물의 제조 및 분획

능실 추출물은 건조된 능실을 메탄올에 담가 3 h 동안 초음파 추출하고 이를 3회 반복한 후 감압 농축한 후 건조하여 26.5%의 수율로 얻었다. 또한, 메탄올 추출물(Methanol; M)을 증류수에 현탁시키고 계통학적 분획방법에 따라 동량의 메틸렌 클로라이드(Methylene Chloride; MC), 에틸아세테이트(Ethyl Acetate; EA), 부탄올(n-Butanol; nB)을 각각 3회씩 추출하여 분획한 후 감압 농축하여 메틸렌 클로라이드층, 에틸아세테이트층, 부탄올층을 획득하여 각 MC분획, EA분획,

nB분획으로 하였다. 양성 대조 물질로서 11β-HSD1 특이 억제제인 PF915275 (PF)를 사용하였다.

2.2. 세포 배양

사람 섬유아세포주인 Hs68은 America Type Culture Collection (ATCC)에서 구매하였으며 10%의 Fetal bovine serum (FBS)와 1%의 Antibiotic/antimycotic (AA)을 첨가한 DMEM (Hyclone, USA)을 이용하여 37 °C, 5% CO₂조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 세포 배양 배지는 48 h마다 새로운 배지로 교체하였고, 2 - 3 일 간격으로 계대 배양을 시행하였다.

2.3. MTT 분석을 이용한 세포 생존율 측정

능실 추출물 및 분획물의 Hs68 cell에 대한 독성 평가를 위해 MTT assay를 수행하였다. Hs68 cell은 96-well plate에 4 × 10⁴ cells/well로 분주하여 24 h 후에 혈청제거 배지로 교환한 후, 각각의 추출물과 분획물을 처리하여 24 h 배양하였다. 이후에 0.5 μg/mL 농도의 MTT (Sigma, USA) 용액 20 μL을 각각의 well에 첨가하고 4 h 동안 결정화한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO, sigma, USA)에 용해하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(M: 메탄올 추출물 각 1, 10 μg/mL, MC: 메틸렌 클로라이드 분획물 각 1, 10 μg/mL, EA: 에틸 아세테이트 분획물 각 1, 10 μg/mL, nB: 부탄올 분획물 각 1, 10 μg/mL).

2.4. mRNA 발현 조사(Real time RT-PCR)

사람 섬유아세포인 Hs68을 6well plate에 4 × 10⁵ cells/well 접종하여 10%의 FBS와 1%의 AA가 첨가된 배지를 이용하여 24 h 배양하였다. 그 후 15 mJ/cm²의 UVB와 능실 추출물 및 분획물을 FBS가 첨가되지 않은 배지에 희석한 후 24 h 동안 추가 배양하였다. Total RNA를 추출하기 위해 각 well에 RNA iso (TAKARA, Japan) 1 mL를 첨가하고 얼음 위에서 5 min을 방치하여 세포를 용해시키고 chloroform 200 μL를 첨가하여 14,000 rpm에서 15 min 동안 원심분리하였다. 상층액을 취하여 새로운 tube에 옮기고 같은 양의 isopropanol을 첨가한 후 14,000 rpm에서 10 min 원심분리하여 RNA를 분리하였다. 99% ethanol을 이용하여 7,500 rpm에서 원심분리하여 2회 세척하고 공기 중에서 건조시킨 후 diethylpyrocarbonate (DEPC) water

에 녹였다. Nanodrop 2000 (Thermo, USA)를 이용해 RNA를 정량하였고 total RNA 2 μg을 DEPC와 함께 70 °C에서 5 min 동안 가열시킨 후 Reverse Transcription Premix (ELPIS-Biotech, Korea)에 넣고 최종 부피가 20 μL가 되도록 하였다. 42 °C에서 55 min, 70 °C에서 15 min 동안 반응시켜 cDNA를 합성하여 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다. 얻어진 cDNA로부터 11β-HSD1, MMP-1, 3, 9, IL-6, 8을 증폭시키기 위해 5배 희석시킨 cDNA 2 μL를 primer 1 μL, DEPC 7 μL, SYBR Green master mix (Invitrogen Life Technology, USA) 10 μL와 함께 StepOne Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 PCR을 실시하였다. 반응 조건은 50 °C 2 min, 95 °C 10 min에서 반응 후 95 °C 10 s와 60 °C 1 min을 40회 반복하여 증폭시켰다. 증폭하고자 하는 유전자들의 primer 염기서열은 Table 1과 같다.

2.5. Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA)

사람 섬유아세포인 Hs68을 12well plate에 2 × 10⁵ cells/well 접종하여 10%의 FBS와 1%의 AA가 첨가된 배지를 이용하여 24 h 배양하였다. 그 후 15 mJ/cm²의 UVB를 조사한 뒤, 능실 추출물 및 분획물을 FBS가 첨가되지 않은 배지에 희석한 후 24 h 동안 추가 배양하였다. 배양이 끝난 배지의 상층액을 이용하여 효소 결합 면역결합 흡착법을 MMP-1 ELISA kit (Calbiochem, Germany), Type 1 procollagen EIA kit (Dakara, Japan)의 시료로 사용하여 시행한 후 540 nm에서 측정하였다.

2.6. Western blot

사람 섬유아세포인 Hs68을 6well plate에 4 × 10⁵ cells/well 접종하여 10%의 FBS와 1%의 AA가 첨가된 배지를 이용하여 24 h 동안 배양하였다. 그 후 15 mJ/cm²의 UVB와 능실 추출물 및 분획물을 처리한 FBS가 첨가되지 않은 배지를 사용하여 72 h 동안 추가 배양하였다. 배양한 세포를 회수하여 lipoa buffer를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 Bradford assay 방법에 따라 정량한 후, Sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)하여 분리하였다. 전기영동 후 단백질을 gel에서 PVDF 막으로 transfer한 뒤, 항체를 결합하여 타겟 단백질을 표지하고 사진 촬영하였다.

Table 1. Primers Used for RT-PCR

Gene	Direction	Sequence (5'-3')	Size (bp)
11 β -HSD1	Forward	AAGCAGAGCAATGGAAGCAT	108
	Reverse	GAAGAACCCATCCAAAGCAA	
MMP-1	Forward	AAGCGTGTGACAGTAAGCTA	199
	Reverse	AACCGGACTTCATCTCTG	
MMP-3	Forward	ATTCCATGGAGCCAGGCTTTC	138
	Reverse	CATTTGGGTCAAACCTCAAAGTGTG	
MMP-9	Forward	GCATACTTGTACCGCTATGG	228
	Reverse	TATGATGTTATGATGGTCCC	
IL-6	Forward	TACCCCCAGGAGAAGATTCC	175
	Reverse	TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT	
IL-8	Forward	CCAACACAGAAATTATTGTAAAGC	113
	Reverse	TGAATTCTCAGCCCTCTTCAA	
β -actin	Forward	GGCCATCTCTTGCTCGAAGT	312
	Reverse	GAGACCTTCAACACCCCAGC	

2.7. 3D 인공피부 조직배양

Epidermal tissue (RHE, SkinEthic laboratories, France) 를 growth media에 24 h 동안 안정화한 후 UVB 40 mJ 을 4 h 간격으로 3회 조사한 뒤 배지에 능실 추출물을 첨가하였다. 72 h 동안 배양 후 해당 배지를 회수하여 MMP-1 분비량을 측정하기 위해 효소결합 면역흡착 분석법(ELISA)을 수행하였으며 H&E 염색을 통한 표피두께 및 PCNA 염색을 통한 표피세포 증식을 측정하였다[12,13].

2.8. 통계처리

결과는 means \pm SEM로 나타냈고, 모든 통계분석은 student's *t*-test를 실시하여 평가하였다. 두 군 간의 차이에 의한 통계적 검정 후 *p*값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 의미 있는 차이가 있다고 판단하였다.

3. 결과

3.1. 섬유아세포에 대한 능실 추출물 및 분획물의 영향

능실 M, MC, EA, nB가 섬유아세포에 주는 영향을 보기 위해 UVB 조사 여부에 따른 세포 생존율을 평가하였다.

UVB를 조사하지 않고 능실 M, MC, EA, nB를 섬유아세포에 처리한 경우에 처리 농도 1, 10 μ g/mL에 대해서 어떠한 세포 독성을 나타내지 않았으며, 오히려 농도 의존적으로 섬유아세포의 증식을 활성화시켰다 (Figure 1a). 이어 UVB를 조사한 후 능실 M, MC, EA, nB를 처리하였을 때, 모든 시료에서 UVB에 의해 감소된 세포 활성이 정상적인 수준으로 다시 회복됨을 보였다(Figure 1b).

3.2. 11 β -HSD1 발현 억제 효과

UVB에 의해 증가되는 11 β -HSD1에 대한 조절 효과를 보기 위해, UVB를 조사한 섬유아세포에 능실 M, MC, EA, nB를 처리하여 11 β -HSD1의 발현량을 측정하였다.

섬유아세포에 대한 UVB 조사가 11 β -HSD1의 mRNA 및 단백질 모두 유의하게 증가시킴을 확인하였다. 이어 각 시료 별로 10 μ g/mL의 농도로 24 h 처리하였을 때, 11 β -HSD1의 mRNA 수준에서는 모든 시료에서, 72 h 처리하였을 때 단백질 수준에서는 능실 MC를 제외한 시료에서 자외선에 의한 발현 증가를 현저히 억제시킴을 보였다(Figure 2a, b). 특히, 능실 M에서 11 β -HSD1 발현 억제 효과가 높게 나타났다. 다만, 능실 MC의 경우 11 β -HSD1의 mRNA 및 단

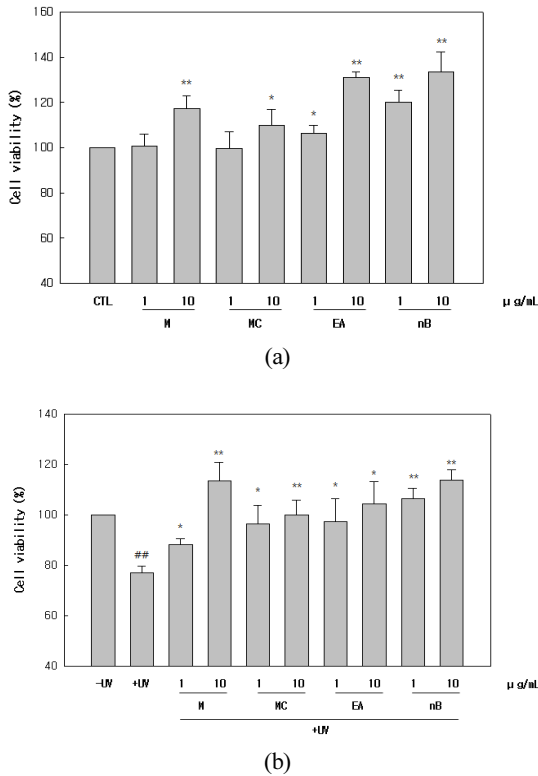


Figure 1. Effect of fractionated TJ extracts on cell proliferation. (a) Hs68 cells were treated with 1, 10 µg/mL of fractionated TJ extracts for 24 h. (b) Hs68 cells were exposed to 15 mJ of UVB before the treatment. The cell viability was measured by MTT assay. M: methanol extract 1, 10 µg/mL, MC: methylene chloride fraction 1, 10 µg/mL, EA: ethyl acetate fraction 1, 10 µg/mL, nB: n-butanol fraction 1, 10 µg/mL. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 indicate a significant difference from the control (a) or UVB-exposed control (b).

백질 발현에 주는 결과가 일치하지 않았다. 이는 능질 MC의 효과가 미약하거나 일시적으로만 작용하여 11β-HSD1 단백질 수준에서는 영향을 주지 못한 것으로 추론된다.

3.3. MMPs 발현 억제 및 type 1 procollagen 생성 회복 효과
다음으로 자외선에 의해 활성화되는 MMPs의 발현에 주는 영향을 보기 위해, UVB를 조사한 섬유아세포에 능질 M, MC, EA, nB를 처리하여 MMP-1, 3, 9에 대한 발현량을 측정하였다.

UVB 조사에 따라 MMP-1, 3, 9 모두에서 현저한

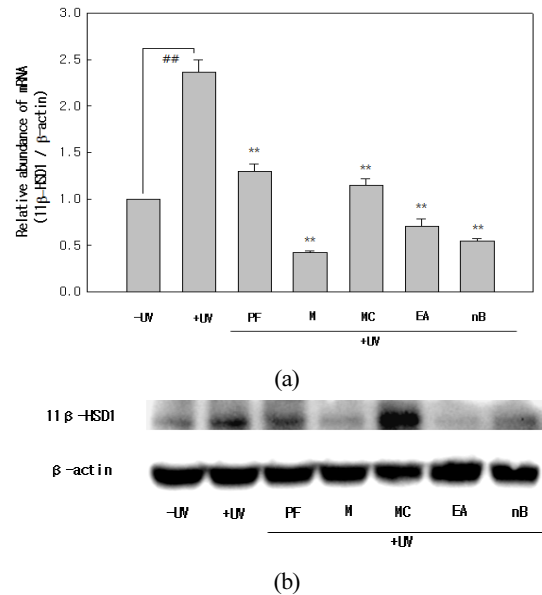


Figure 2. Fractionated TJ extracts inhibited the increase of 11β-HSD1 in UVB-exposed Hs68 cells. (a) mRNA and (b) protein levels of 11β-HSD1 were measured by real-time RT-PCR and western blot respectively. Hs68 cells were treated with 10 µg/mL of fractionated TJ extracts for 24 h, and were exposed to UVB (15 mJ/cm²) before the treatment. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 indicate a significant difference from the UVB-exposed control.

mRNA의 증가를 확인하였고, 각 시료 모두에서 UVB에 의한 MMP-1, 3, 9의 증가를 유의하게 억제시킴을 나타냈다(Figure 3a). 특히 능질 M의 억제 효과가 높게 나타났다.

한편, 자외선에 의한 피부 노화에서 가장 영향이 큰 것으로 알려진 MMP-1[14]과 type 1 procollagen에 대해서 단백질의 발현량을 ELISA법 및 western blot 방법을 통해 추가 평가하였다. 그 결과, 능질 MC를 제외한 능질 M, EA, nB에서 MMP-1 발현 억제 및 type 1 procollagen 분해 억제 효과를 보였다(Figure 3b, c, d).

3.4. Cytokines 발현 억제 효과

자외선에 의한 MMPs의 발현에 영향을 주는 것으로 알려져 있는 사이토카인[6,7]에 대해 능질 M, MC, EA, nB의 조절 효과를 평가하기 위해 UVB를 조사한 섬유아세포에 각 시료를 처리하여 IL-6, 8에 대한 발현량을 측정하였다. UVB 조사에 따라 IL-6, 8에서 뚜렷한 mRNA 증가를 확인하였고, 각 시료 모두에서 UVB에

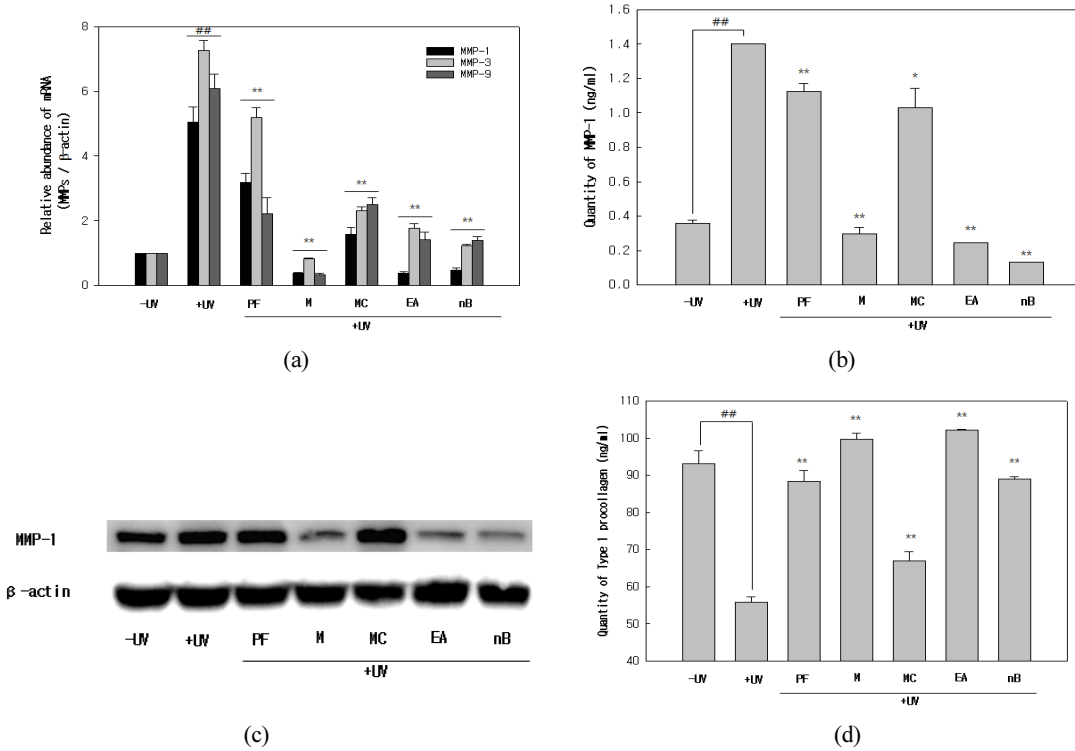


Figure 3. Fractionated TJ extracts inhibited the increase of MMPs and the decrease of type 1 procollagen in UVB-exposed Hs68 cells. (a) MMP-1, 3, 9 were measured by real-time RT-PCR. The protein level of MMP-1 was measured by both (b) western blot and (c) ELISA. Also, the protein level of type 1 procollagen was measured by ELISA. Hs68 cells were treated with each extract (10 μ g/mL) for 24 h, and were exposed to UVB (15 mJ/cm²) before the treatment. * p < 0.05, ** p < 0.01 indicate a significant difference from the UVB-exposed control.

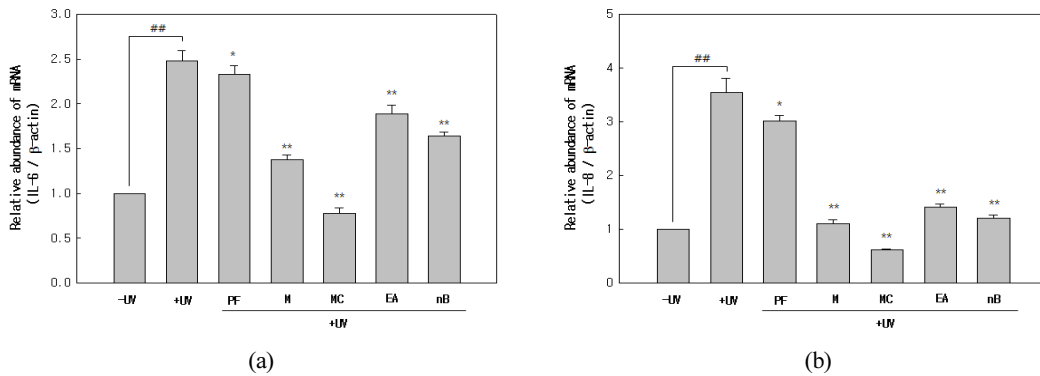


Figure 4. Fractionated TJ extracts inhibited the increase of (a) IL-6 and (b) IL-8 in UVB-exposed Hs68 cells. mRNA levels were measured by real-time RT-PCR. Hs68 cells were treated with each extract (10 μ g/mL) for 24 h, and were exposed to UVB (15 mJ/cm²) before the treatment. * p < 0.05, ** p < 0.01 indicate a significant difference from the UVB-exposed control.

의한 IL-6, 8의 증가를 유의하게 억제시킴을 나타냈다 (Figure 4a, b).

3.5. 3D skin model에서의 광노화 억제 효과

이상의 *in vitro* 실험 결과를 바탕으로 *in vivo* 평가 모델로서 최근 주목되는 3D skin model을 이용하여 능

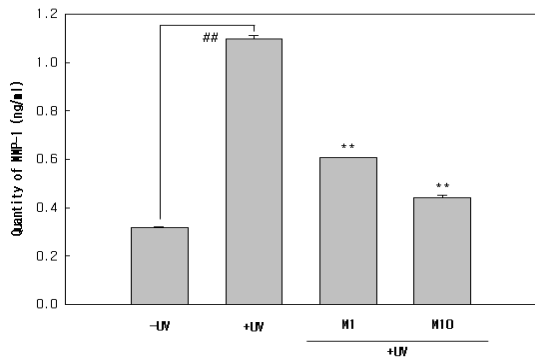


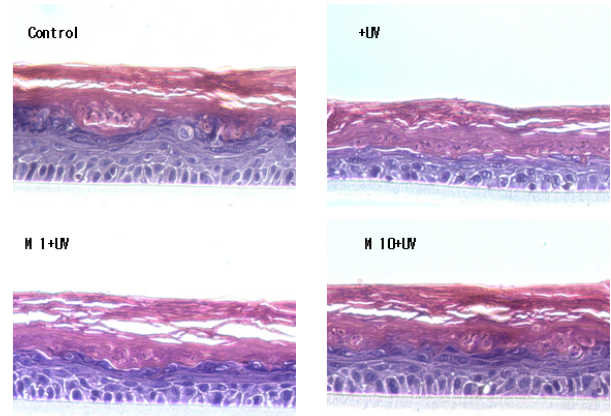
Figure 5. TJ extract suppressed the secretion of MMP-1 in UVB-exposed 3D skin model. The protein level was measured by ELISA. 3D skin was incubated with TJ extract (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 72 h, and was exposed to UVB (40 mJ/cm^2) 3 times every 4 h before the treatment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ indicate a significant difference from the UVB-exposed control.

실 M의 광노화 억제 효과를 확인하였다. 먼저, UVB를 조사한 피부 조직의 배지를 수거하여 표피에서 분비된 MMP-1의 단백질 발현량을 측정하였다. 그 결과, UVB의 조사는 표피의 MMP-1의 분비를 증가시켜 배지 내에 분비된 MMP-1 단백질이 증가됨을 보였고, 능실 M은 이러한 MMP-1의 분비를 농도 의존적으로 억제시킴을 나타냈다(Figure 5).

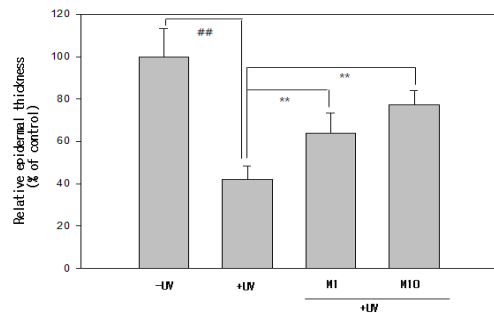
이어 UVB 및 능실 M을 처리한 표피 조직을 채취하여 면역조직화학염색을 실시하였다. UVB를 조사한 표피 조직을 UVB를 조사하지 않은 조직과 비교하여 표피 두께의 감소가 두드러짐을 확인하였고, 능실 M은 이러한 표피 두께의 감소를 유의하게 회복시킴을 나타냈다(Figure 6a, b). 또한, PCNA 염색을 통해 UVB 조사에 따른 표피 세포의 활성 변화를 평가한 결과, UVB 조사는 표피 세포의 증식을 현저히 억제시킨 반면, 능실 M은 이러한 표피 세포의 활성 감소를 유의하게 회복시킴을 나타냈다(Figure 7a, b).

4. 결론 및 고찰

인체 내에서 스트레스 호르몬의 활성을 조절하는 효소로서 11 β -HSD1은 피부뿐만 아니라 체내 항상성과 관련된 다양한 대사 질환에도 영향을 미친다. 피부 노화를 유발하는 대표적인 외부 요인인 자외선은 이



(a)



(b)

Figure 6. Effect of TJ extract on the epidermal thickness in 3D skin model. (a) H&E staining were performed to compare the epidermal thickness. 3D skin was incubated with TJ extract (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 72 h, and was exposed to UVB (40 mJ/cm^2) 3 times every 4 h before the treatment. (b) Epidermal thickness of 3D skin was quantified by photo analysis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ indicate a significant difference from the UVB-exposed control.

러한 스트레스 호르몬의 생성을 촉진시켜 정상적인 피부 조직에 다양한 변화를 일으킨다[15-17]. 최근, 피부에서는 폐경 후 급격히 진행된 내인성 노화나 햇빛에 노출되어 광노화가 진행된 부위에서 11 β -HSD1의 발현량이 증가되어 있음이 밝혀졌다[9,10]. 또한, Skobowiat 등은 UVB를 조사한 피부 조직에서 11 β -HSD1의 활성 및 발현이 현저히 증가함을 확인하였다[21]. 따라서, 자외선이 11 β -HSD1의 발현에 직접적으로 영향을 미친다는 것을 알 수 있으며, 본 저자 등은 광노화의 새로운 원인으로 11 β -HSD1의 증가에 주목하였다. 그 결과, UVB에 노출된 섬유아세포에서 11 β -HSD1의 발현이 증가하였고, 11 β -HSD1 저해제

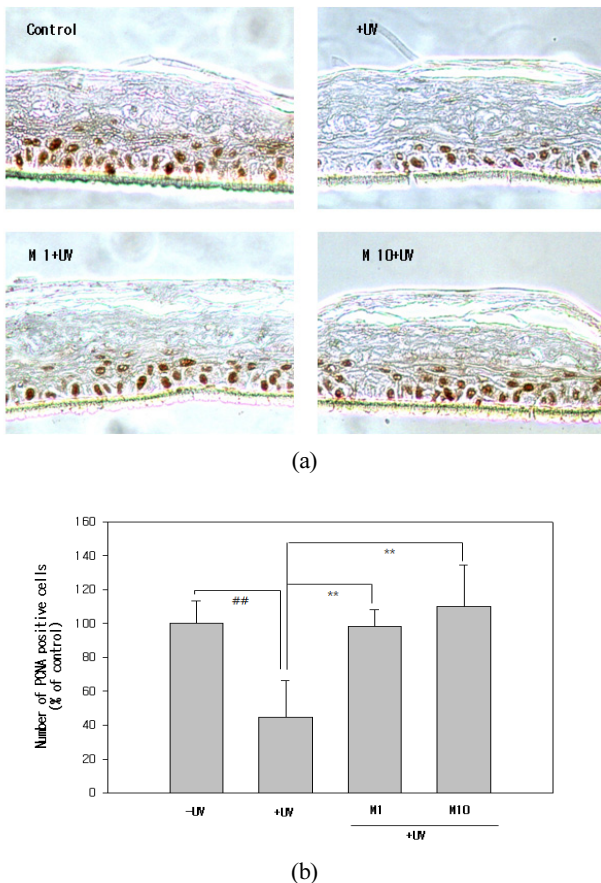


Figure 7. Effect of TJ extract on the epidermal proliferation in 3D skin model. After immunohistochemical staining (a), PCNA-positive cells were counted (b). 3D skin was incubated with TJ extract (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 72 h, and was exposed to UVB (40 mJ/cm^2) 3 times every 4 hours before the treatment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ indicate a significant difference from the UVB-exposed control.

를 처리하였을 때 $11\beta\text{-HSD1}$ 발현이 감소하였을 뿐만 아니라 MMPs와 노화 관련 염증성 사이토카인의 발현도 억제되었다.

이어 본 저자 등은 $11\beta\text{-HSD1}$ 을 타겟으로 이를 조절하는 새로운 항노화 소재를 발굴하고자 하였다. 문헌적으로 피부 노화에 효과가 있는 것으로 보고된 약 50여 종의 천연물 소재를 확보한 후 섬유아세포에서 자외선으로 유발된 $11\beta\text{-HSD1}$ 의 발현을 조절하는 소재를 스크리닝하였다. 그 결과, 능실 메탄올 추출물 (M)에서 UVB로 유도한 $11\beta\text{-HSD1}$ 의 발현 증가를 현저히 억제함을 확인하였다. 따라서, 본 연구에서는 $11\beta\text{-HSD1}$ 억제제로 발굴된 능실 M에 대해 섬유아세포

에서 광노화 반응에 주는 영향을 평가함으로써, 항노화 소재로서 *in vitro* 효능을 확인하고자 하였다. 아울러 능실 M에 대한 methylene chloride (MC), ethyl acetate (EA), n-butanol (nB) 각각의 분획물을 만들어 분획물 별 광노화 반응에 대한 차이를 확인하고자 하였다.

먼저 섬유아세포에 대한 영향을 평가한 결과, 능실 M, MC, EA, nB는 모두 세포 독성 없이 섬유아세포를 활성화시키고, 자외선에 의해 감소된 세포 활성을 회복시킴을 보였다. 이어 자외선으로 $11\beta\text{-HSD1}$ 의 발현을 유도한 경우에 능실 M, EA, nB는 mRNA 및 단백질 수준 모두에서 효과적으로 억제한 반면, 능실 MC는 그 효과가 제한적이거나 미약한 것으로 추론되었다. 다음으로 대표적인 광노화 반응인 MMPs와 procollagen 발현에 주는 영향을 확인한 결과, 능실 M, MC, EA, nB는 모두 자외선에 의한 MMP-1, 3, 9의 증가를 유의하게 억제시킴과 동시에 type 1 procollagen의 생성 저해를 회복시켰다. 다만, 능실 MC는 MMP-1 및 type 1 procollagen의 단백질 발현 조절 효과가 뚜렷하지 않거나 미약한 것으로 나타나, $11\beta\text{-HSD1}$ 의 단백질 조절 효과와 거의 일치하는 경향을 보였다. 한편, 자외선에 의해 유발되는 염증성 사이토카인인 IL-6 및 IL-8[18,19]에 대한 평가에서 능실 M, MC, EA, nB 모두 유의한 발현 억제 효과를 보였다. 다만, 능실 MC에서 가장 높은 효과를 보여, 앞서 $11\beta\text{-HSD1}$ 및 MMPs에 대한 결과와는 다른 경향을 보였다. 이상의 결과를 종합해 보면, 먼저 능실 M 및 그 분획물의 광노화 억제 효과에 대한 차이는 능실 M에서 가장 좋은 효과를 보인 것으로 판단된다. 능실 M은 자외선에 의한 다양한 광노화 반응에서 그 효과가 일관적이고, 가장 높은 효능을 보인 결과가 많았다. 이어 $11\beta\text{-HSD1}$ 의 발현을 조절하는 효과가 높은 능실 M, EA, nB는 MMP-1, 3, 9의 발현을 조절하는 효과와 잘 일치하였고, $11\beta\text{-HSD1}$ 의 조절 효과가 미약한 능실 MC는 염증성 사이토카인인 IL-6 및 IL-8의 조절 효과가 높았다. 따라서, 새로운 항노화 기전으로 $11\beta\text{-HSD1}$ 을 타겟으로 한 소재는 염증성 사이토카인 보다는 MMPs 발현 조절과 밀접한 관련이 있는 것으로 추론된다. 다만, 보다 정확한 분자 기전에 대해서는 추가 연구가 필요하다.

앞서 *in vitro* 결과를 바탕으로 광노화 반응의 저해 효과가 우수한 능실 M에 대해 3D skin model을 이용

한 광노화 억제 효과를 평가하였다. 그 결과, MMP-1의 발현 증가, 표피 두께 감소, PCNA-positive 세포의 감소 등 자외선에 의한 광노화 반응에 대해 능실 M은 농도 의존적으로 모두 유의한 억제 효과를 나타냈다. 3D skin model은 최근 동물실험대체법으로 관심이 매우 높지만, 이를 활용한 효능 연구는 아직 많지 않다. 본 저자 등은 표피로 이루어진 3D skin model에서 자외선 조사 시에 실제 노화된 피부와 유사한 양상을 나타냄을 확인하고, 본 연구에 활용하였다. 노화된 표피에서는 기저층 각질형성세포의 증식이 감소되어 표피 두께의 감소, 세포 분열의 감소 현상이 나타난다[20]. 3D skin model에 자외선을 조사하였을 때 표피 두께의 감소, 증식하는 기저세포의 감소를 나타냈으며, 능실 M은 이러한 노화 반응을 유의하게 억제함을 확인하였다.

이상의 결과를 통해 능실 추출물 및 분획물은 11β-HSD1의 발현을 억제함과 동시에 자외선에 의한 광노화 반응을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다. 아울러 11β-HSD1의 조절이 피부 광노화에 대한 새로운 타겟이 될 수 있음을 확인하였다. 따라서, 능실 추출물 및 분획물은 11β-HSD1 조절을 통해 피부 광노화를 억제하는 기능성 소재로서 활용 가능성이 높다고 생각된다.

Acknowledgement

본 연구는 보건복지부 글로벌코스메틱연구개발 사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다(과제 고유번호: A103017).

Reference

1. G. Rhie, M. H. Shin, J. Y. Seo, W. W. Choi, K. H. Cho, K. H. Kim, K. C. Park, H. C. Eun, and J. H. Chung, Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and noenzyme antioxidants in the epidermis and dermis of human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **117**(5), 1212 (2001).
2. E. C. Naylor, R. E. B. Watson, and M. J. Sherratt, Molecular aspects of skin aging, *Maturitas*, **69**(3), 249 (2011).

3. J. Y. Seo, E. K. Kim, S. H. Lee, K. C. Park, K. H. Kim, H. C. Eun, and J. H. Chung, Enhanced expression of cyclooxygenase-2 by UV in aged human skin *in vivo*, *Mech. Ageing Dev.*, **124**(8-9), 903 (2003).
4. J. M. Waller and H. I. Maibach, Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure, *Skin Res. Technol.*, **12**(3), 145 (2006).
5. M. Yaar and B. A. Gilchrist, Photoaging: mechanism, prevention and therapy, *Br. J. Dermatol.*, **157**(5), 874 (2007).
6. M. Ichihashi, M. Ueda, A. Budiyanto, T. Bitto, M. Oka, M. Fukunaga, K. Tsuru, and T. Horikawa, UV-induced skin damage, *Toxicology*, **189**(1-2), 21 (2003).
7. F. Afraq, V. M. Adhami, and H. Mukhtar, Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis, *Mutat. Res.*, **571**(1-2), 153 (2005).
8. P. Brenneisen, J. Wenk, L. O. Klotz, M. Wlascheck, K. Briviba, T. Krieg, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Central role of ferrous/ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA level in cultured human dermal fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **273**(9), 5279 (1998).
9. A. Tiganescu, A. A. Tahrani, S. A. Morgan, and M. Otranto, A. Desmouliere, L. Abrahams, Z. Hassan-Smith, E. A. Walker, E. H. Rabbit, M. S. Cooper, K. Amrein, G. G. Lavery, and P. M. Stewart, 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase blockade prevents age-induced skin structure and function defects, *J. Clin. Invest.*, **123**(7), 3051 (2013).
10. A. Tiganescu, E. A. Walker, R. S. Hardy, A. E. Mayes, and P. M. Stewart, Localization, age- and site-dependent expression, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in skin, *J. Invest. Dermatol.*, **131**(1), 30 (2011).

11. M. Wamil and J. R. Seckl, Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a promising therapeutic target, *Drug Discov. Today*, **12**(13-14), 504 (2007).
12. J. F. Michelet, C. Olive, E. Rieux, D. Fagot, L. Simonetti, J. B. Galey, M. Dalko-Csiba, B. A. Bernard, and R. Pereira, The anti-ageing potential of a new jasmonic acid derivative (LR2412): *in vitro* evaluation using reconstructed epidermis episkinTM, *Exp. Dermatol.*, **21**(5), 398 (2012).
13. M. Demerjian, E. H. Choi, M. Q. Man, S. Chang, P. M. Elias, and K. R. Feingold, Activators of PPARs and LXR decrease the daverse effects of exogenous glucocorticoids on the epidermis, *Exp. Dermatol.*, **18**(7), 643 (2009).
14. A. Paldo and M. Selman, MMP-1: the elder of the family, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**(2), 283 (2005).
15. J. S. Scott, F. W. Goldberg, and A. V. Turnbull, Medicinal chemistry of inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1), *J. Med. Chem.*, **57**(11), 4466 (2014).
16. M. Terao, H. Murota, A. Kimura, A. Kato, A. Ishikawa, K. Igawa, E. Miyoshi, and I. Katayama, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-1 is a novel regulator of skin homeostasis and a candidate target for promoting tissue repair, *PLoS ONE*, **6**(9), e25039 (2011).
17. H. Y. Lim, N. Muller, M. J. Herold, J. Brandt, and H. M. Reichardt, Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration, *Immunology*, **122**(1), 47 (2007).
18. M. R. K. Dasu, R. E. Barrow, M. Spies, and D. N. Herndon, Matrix metalloproteinase expression in cytokine stimulated human dermal fibroblasts, *Burns*, **29**(6), 527 (2003).
19. L. R. Luckette and R. M. Gallucci, Interleukin-6 (IL-6) modulates migration and matrix metalloproteinase function in dermal fibroblasts from IL-6KO mice, *Br. J. Dermatol.*, **156**(6), 1163 (2007).
20. M. A. Farage, K. W. Miller, P. Elsner, and H. I. Maibach, Characteristics of the aging skin, *Adv. Wound Care*, **2**(1), 5 (2013).
21. C. Skobowiat, R. M. Sayre, J. C. Dowdy, and A. T. Slominski, Ultraviolet radiation regulates cortisol activity in a waveband-dependent manner in human skin *ex vivo*, *Br. J. Dermatol.*, **168**(3), 595 (2012).