

# 발효홍삼 추출물의 광노화 피부 보호 효과

김호일 · 오미진<sup>1</sup> · 김종석<sup>2</sup> · 이성철<sup>3</sup> · 권진<sup>4</sup> · 이창현\*

우석대학교 한의과대학 해부학교실, 1: 우석대학교 식품생명공학과, 2: 우석대학교 재활학과,  
3: 우석대학교 스포츠의학과, 4: 한국복지대학교 의료보장구과

## Protective Effect of Fermented Red Ginseng Extracts on Photoaging Skin of Induced by UVB in Hairless Mice

Ho IL Kim, MI Jin Oh<sup>1</sup>, Jong Seok Kim<sup>2</sup>, Sung Cheol Lee<sup>3</sup>, Jin Kwon<sup>4</sup>, Chang Hyun Lee\*

Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Woosuk University, 1: College of Food & Biotechnology,  
2: Department of Rehabilitation Studies, Woosuk University, 3: Department of Sports Medicine, Woosuk University,  
4: Department of Prosthetics and Orthotics, Korea National College of Welfare

This study is designed to investigate the protective effects of fermented Red Ginseng (FRG) against photoaging *in vitro* and *in vivo*. UVB was irradiated to the human keratinocyte HaCaT cell and dorsal skin of SKH-1 mice for the induction of photoaging. After treatment of non-fermented red ginseng (NRG), fermented red ginseng (FRG), and fortified fermented red ginseng (FFRG) to the UVB irradiated HaCaT cell, ROS production and activity of MMP-9 were examined by DCFC-DA assay and gelatin zymographic assay respectively. UVB irradiated SKH-1 mice were treated with NRG, FRG, and FFRG via oral(300 mg/Kg B.W./day) and topical(100  $\mu$ l/mouse/day) route. All of NRG, FRG, and FFRG had significantly reduced the intracellular ROS production elicited by UVB, among them FRG slightly more reduced the ROS production than NRG and FFRG. FFRG had slightly more reduced the MMP-9 activity in UVB irradiated HaCaT cells than NRG and FFRG in high dose. Oral and topical treatment of NRG, FRG, and FFRG had decreased the expression of matrix metalloproteinase-2, -3, and -9 in dorsal skin of UVB irradiated mice. Among them, inhibitory effect of FRG on the expression of MMP-2 was apparent. We speculate that FRG has therapeutic potentials on the UVB irradiated photoaging.

keywords : fermented red ginseng, photoaging skin, HaCaT cells, MMP, ROS

### 서론

피부의 노화는 나이가 증가하면서 발생하는 내재적인 노화 (intrinsic aging)와 자외선과 같은 외부물질의 자극에 의한 광노화 (photoaging)로 분류한다<sup>1)</sup>. 내재적인 노화는 피부를 퇴행시켜 피부 건조, 잔주름 형성 및 탄력이 소실되는 임상적인 특징을 일으킨다<sup>2)</sup>. 광노화는 자외선 B(ultraviolet B, UVB)에 의하여 피부주름 조기 형성, 피부 건조, 색소 침착 및, 말초혈관을 확장시키는 임상적인 특징을 나타낸다<sup>3,4)</sup>.

자외선은 진피층내 기질금속 단백질 분해 효소(matrix metalloproteinases, MMPs)의 활성을 증가시켜 아교섬유를 분해하여 피부에 주름을 지게하고 탄력을 감소시켜 노화를 촉진시킨다<sup>5,6)</sup>. 자외선은 사람의 섬유아세포<sup>7)</sup>와 피부의 표피상피<sup>8)</sup>에서 MMP-1, -2,

-3 및 -9를 증가시켜 광노화를 유발하고, 매우 낮은 강도의 UVB에 노출된 피부에서도 MMPs를 증가시키는 노화인자(aging factors)이다<sup>9)</sup>. 자외선에 노출되면 계속된 radical oxygen species(ROS)의 공격에 의하여 방어체계가 무너져 세포내 단백질, 지질 및 DNA의 손상과 같은 산화적 스트레스를 일으킨다<sup>9,10)</sup>.

피부노화에 대한 연구는 새로운 피부노화 억제제나 치료제 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 최근에는 새로운 기능성 물질을 찾기 위하여 한약에 미생물을 결합시킨 발효공법이 이용되고 있다. 발효한약은 의학, 미생물학, 식품학 등이 결합된 형태로서 표준화된 제조법 등에 대한 과학적으로 정형화된 방법은 아직 정립되어 있지 않으나, 단미 한약재, 복합 한약재 또는 전탕된 한약재에 세균, 곰팡이, 효모, 버섯류를 사용하여 호기성 혹은 혐기성 조건에서 발효시키는 다양한 방법이 제시되고 있다<sup>11)</sup>.

\* Corresponding author

Chang-Hyun Lee, Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Woosuk University, 443 Samnye-ro Samnye-eup Wanju-gun Jeollabuk-do 565-701, Korea

E-mail : chlee@woosuk.ac.kr Tel : +82-63-290-1559

Received : 2014/12/10 Revised : 2015/01/23 Accepted : 2015/02/13

© The Korean Society of Oriental Pathology, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.02.29.1.58>

Available online at [http://society.kisti.re.kr/sv/SV\\_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kjoc=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13](http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kjoc=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13)

국내에서 홍삼을 이용한 피부노화 개선에 대한 실험적 연구는 대두와 홍삼 혼합분말을 이용한 피부주름 개선효과와 피부 손상에 대한 치유능력 개선<sup>12)</sup>, 홍삼추출물에 의한 주름형성억제와 아교섬유 분해 억제, MMP-1<sup>13)</sup>, MMP-13과 MMP-9 억제효과 등<sup>14)</sup>에 대하여 보고하였고, 또한 사람에서도 피부의 흥반 억제, 탄력성 개선, 멜라닌 생성을 억제한다고 보고하였다<sup>12)</sup>. 또한 발효 홍삼에 의한 뇌 혈류 개선 효과를 확인함으로써 뇌 혈관 질환 예방 목적으로 유용하게 이용될 수 있다고 보고하였다<sup>15)</sup>.

본 연구에서는 미생물 발효공정에 의하여 사포닌 성분을 강화시킨 발효홍삼 추출물을 이용하여 광노화 피부개선 효과를 hairless mice와 HaCaT cell을 이용하여 관찰하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 7주령, 숫컷, hairless 생쥐 (SKH-1 hairless mice)를 오리엔트바이오에서 분양받아 1주일간 사육실에서 적응시킨 후 항온항습(22±2°C, 65±2% RH)하에서 사육하였고, 사료는 시판하는 고휘사료를 공급하였다. 실험동물은 5개군으로 분류하여 군별로 5마리씩 배정하여 실험에 사용하였다. 실험군은 정상군, 대조군, non-fermented red ginseng extract group (비발효 홍삼, NRG), fermented red ginseng extract group (발효 홍삼, FRG) 및 fortified fermented red ginseng extract group (강화발효홍삼, FFRG)으로 나누었다. 동물실험은 우석대학교 동물실험 윤리위원회의 승인(WS2013-002)을 받아 실시하였다.

### 2. 발효홍삼 시료 조제

발효홍삼(FRG)은 원료인 수삼(무주) 2 kg을 세척하여 6시간 건조시킨 다음에 증숙기에 넣고 95°C에서 3시간 증숙하였다. 증숙된 수삼을 3 cm 이하로 절단하여, *Paecilomyces variotii var. brunneolus* 배양액속에 넣고 30°C에서 48시간 발효시켰다. 발효된 수삼을 60°C 건조기에 넣고 10시간, 그리고 50°C에서 10시간 정도 건조시킨 후 수분함량이 14% 이하가 되도록 건조시켰다. 강화발효홍삼(FFRG)은 원료인 수삼 2kg을 세척하여 6시간 건조시킨 다음에 증숙기에 넣고 95°C에서 3시간 증숙하였다. 증숙된 수삼을 3cm 이하로 절단하여, *Paecilomyces variotii var. brunneolus* 배양액속에 넣고 30°C에서 48시간 발효시켰다. 발효된 수삼을 건조기에 넣고 60°C에서 10시간 건조시킨 후, 다시 증숙기에 넣고 95°C에서 3시간 2차 증숙하였다. 증숙된 수삼은 60°C 건조기에서 10시간 그리고 50°C에서 10시간 2차 건조시킨 후 수분함량이 14% 이하가 되도록 건조시켰다.

### 3. 발효홍삼 추출방법

홍삼추출기에 시중에서 판매하는 NRG와 상기 2)에 기술한 방법에 의하여 제조한 FRG 및 FFRG 각각 1kg을 물 5L와 함께 넣고 80°C에서 8시간 중탕해서 1회 추출하고, 90°C에서 8시간 2회 추출 그리고 90°C에서 8시간 3회 추출 혼합하여 각각 15 L씩 만들었다. 각각 회수한 홍삼추출액은 여과하여 감압건조기에서 농축하고 동결

건조하여 최종 수득물을 회수하였다. 회수한 시료의 무게는 NRG는 284 g, FRG는 266 g, FFRG는 268 g이며, 사포닌 함량은 Table 1과 같다.

### 4. 시료 도포 및 투여

정상군은 아무런 처치도 하지 않았으며, 대조군은 UVB를 照射(irradiation)하고 생리식염수를 투여한 후 무시료 도포액인 기본로션(vehicle)만을 도포하였다. NRG군, FRG군, FFRG군은 홍삼 추출물의 동결건조물 300 mg을 10 ml의 증류수에 용해하여 300 mg/Kg B.W. 용량으로 1일 1회 경구 투여하였으며, 도포액은 에탄올, 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 증류수를 각각 30:20:50(v/v/v)의 비율로 혼합한 기본로션에 홍삼추출물들의 동결건조물을 2% 농도로 첨가하여 제조한 후 1일 1회 도포액 100 µl를 hairless 생쥐의 귀에서 등부위 전체에 도포한 후 잘 문질러준 후 1시간 후에 UVB를 등부분에 조사(irradiation)하였다.

### 5. 실험방법

#### 1) 광노화피부 유발 및 시료도포

자외선 조사장치는 실험실에서 자체 제작한 캐비닛 내에 20 W Ultraviolet B(UVB) lamp를 부착한 후 조사한 광원을 UV Light meter로 측정하여 UVB 강도(intensity)가 0.3 mW/cm<sup>2</sup>가 되는 높이에서 조사하였다. 실험동물의 UVB 조사는 아크릴로 제작한 조사틀에 실험군 별로 각각의 생쥐를 가둔 후 생쥐의 등부위가 노출되도록 위쪽은 철망을 부착하였다. UVB 조사량은 최초 1주간은 1 MED(minimal erythema dose)에 해당하는 60 mJ/cm<sup>2</sup>를 1주에 3회(200초)씩 조사하였고, 2주는 120 mJ/cm<sup>2</sup>(400초), 3주는 180 mJ/cm<sup>2</sup>(600초), 4주는 240 mJ/cm<sup>2</sup>(800초)로 1주에 5회씩 조사하여 총 4주간 실시하였다.

#### 2) 피부 최소홍반도 측정

피부 최소홍반도를 측정하기 위하여 20W UVB lamp에서 조사한 자외선 강도가 0.3 mW/cm<sup>2</sup>가 되도록 UV Light meter로 측정하여 조사높이를 정한 후 최소홍반량(minimal erythema dose)을 결정하였다. 이를 위해 hairless 생쥐의 등에 1x1 cm의 넓이로 소구획을 나눈 후 UVB를 30 mJ/cm<sup>2</sup>에서 80 mJ/cm<sup>2</sup>까지의 조사량을 10 mJ/cm<sup>2</sup> 간격으로 조사하였다. UVB 조사 후 24시간이 경과한 후에 경계가 분명하고 네 모서리가 뚜렷한 홍반을 보이는 가장 낮은 광량인 60 mJ/cm<sup>2</sup>를 최소홍반량으로 정하였다.

#### 3) 피부조직의 면역조직화학적 염색

피부 조직내 MMP-2, MMP-3 및 MMP-9에 대한 면역조직화학적 염색의 변화를 관찰하고자 피부조직을 절취한 후 Bouin's solution에 24시간 고정한 후 일반적인 방법으로 파라핀 절편을 제작하였다. 파라핀 절편은 7 µm의 두께로 절단한 후 100% methanol에 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣은 용액에서 endogeneous peroxidase를 제거하였다. 그 후 비특이적인 면역반응을 제거하기 위하여 30분간 정상혈청(normal serum, 1:50)으로 처리하였다. UVB조사 후 변화가 있을 것으로 예상되는 Mouse anti-MMP-2(sc-53630, Santa Cruz, USA), Goat anti-MMP-3(sc-6839, Santa Cruz, USA), Goat

anti-MMP-9(sc-6840, Santa Cruz, USA)를 일차항체로 이용하였다. 일차항체의 희석배율은 구입한 회사에 따라 차이가 있으므로 각각의 항체에 대한 positive control test를 실시하여 적절한 항체 희석 배율을 정한 후 4°C의 moisture chamber에서 24시간 염색하였다. 2차항체는 1차항체 반응 후 5분간 3회 0.1 M PB로 수세과정을 거친 후에 Hsu 등<sup>16)</sup>의 방법에 따라 biotinylated anti-IgG(Vector Laboratories, Inc., CA, USA)를 1:200으로 희석한 후 실온의 moisture chamber에서 30분 동안 반응시켰다. 다시 5분간 3회 0.1 M PB 수세과정을 거친 후 peroxidase가 표지된 ABC 용액에서 30분간 반응시켰다. 그 후 다시 0.1 M PBS로 15분간 2회 수세하고 나서 30 mg의 3-3' diaminobenzidine를 150 ml의 0.1 M PBS에 녹인 용액에서 5분간 반응시킨 후 과산화수소를 0.005% 되게 첨가하여 갈색의 발색반응을 약 15분간 시행하였다. 반응이 끝난 조직들은 통상적인 방법에 따라 탈수와 투명화를 거친 후 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

#### 4) HaCaT cells을 이용한 시험관내 실험(In vitro)

##### (1) 세포배양

Human keratinocyte(HaCaT cells)는 CLS (Cell Lines Service)로부터 분양을 받아 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)(Hyclone; Logan, UT, USA)에 10% FBS, 100U/ml penicillin과 100µg/ml streptomycin (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)를 첨가하여 배양하였다. 세포는 37°C incubator에서 5% CO<sub>2</sub> 상태에서 배양하였다. 배양후 수거한 세포를 trypan blue로 염색하고 세포계수기(Hemocytometry, German)를 이용하여 세포를 계수하여 세포밀도 3x10<sup>5</sup> cells/ml이 되게하여 6 well plate에 배양하였다.

##### (2) Ultraviolet B(UVB) 조사

세포배양 실험의 자외선 조사는 20W Ultraviolet B(UVB) lamp(Sankyo G20T10E, 20W, Japan)에서 조사한 광원을 UV light meter(UV-340, UVA+UVB, Lutron, Taiwan)로 측정후 UVB 강도(intensity)가 0.3 mW/cm<sup>2</sup>가 되는 높이에서 3x10<sup>5</sup>cells/ml의 농도로 DMEM medium에 부유시켜 6 well plate에 분주한 후 비발효 및 발효홍삼 추출물을 실험의 종류에 따라 농도별로 선 처리(0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml)한 후 24시간 동안 배양한 후 60 mJ/cm<sup>2</sup>를 1회 조사하였다.

##### (3) 세포내 Reactive Oxygen Species(ROS) 생성 측정

HaCaT cell 내 ROS의 생성은 형광표지자인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 사용하여 측정하였다. DCFH-DA는 쉽게 세포막을 뚫고 세포 안으로 확산되어 세포 안의 에스테라아제에 의해 형광을 잃은 DCFH로 가수분해 되고, 이후 ROS가 존재하는 환경에서 높은 형광을 띄는 DCF로 빠르게 산화된다. 따라서 DCF의 형광 강도는 세포 안의 ROS의 양과 비례한다. HaCaT cell을 3x10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 부유시켜 96-well plate에 분주하여 24시간 동안 incubation 하였다. 비발효 및 발효홍삼 추출물을 농도별로 선 처리(0, 50, 100, 200, 300 µg/ml)한 후 2시간 동안 incubation하였고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 DCFH-DA를 각각 1 mM, 10 µM의 농도로 20분 동안 처리한 후 형광도를 측정하였다. DCF 형광도

는 excitation 485 nm, emission 530 nm의 파장에서 Wallac 1420 VICTOR3 multilabel counter(PerkinElmer Life Science, Turku, Finland)로 측정하였다.

#### (4) Gelatin zymography assay

MMP-9의 분비를 측정하기 위하여 substrate gel zymography를 시행하였다<sup>17)</sup>. HaCaT 세포를 3x10<sup>5</sup> cell/ml의 농도로 분주하였다. 실험시작 전 무혈청배지로 교환한 후 비발효 및 발효홍삼 추출물(NRG, FRG, FFRG)을 농도별(0, 50, 100, 300 µg/ml)로 1시간 동안 선 처리하였다. 이 후 세포를 60mJ/cm<sup>2</sup>세기의 UVB를 조사하여 자극시키고 다시 24시간 배양하였다. 배지에 존재하는 분비된 단백질의 양은 세포의 숫자로 가능하였다. 배지를 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, and 0.00625% (w/v) bromophenol blue가 함유된 sample buffer에 섞고, 0.1% gelatin이 함유된 7.5% acrylamide/bisacrylamide (29.2:0.8) separating gel에 loading 한 후 4°C, 100V에서 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel을 0.25% Triton X-100에 30분 동안 두 번 담가 SDS를 제거하였다. 3차 증류수로 씻은 후 0.1% (w/v) Coomassie blue R-250 용액에서 30분 간 염색하여 관찰하였다.

또한 MMP-9의 활성을 측정하고자 in vitro gelatinase inhibition assay를 시행하였다. UVB로 자극한 HaCaT 세포를 키운 배지를 sample buffer에 섞고, 전기영동을 시행한 후 위와 동일한 방법으로 gel을 0.25% Triton X-100에 30분 동안 담가 두었다. 각 lane에 따라 gel을 자른 후 각각 다른 농도의 홍삼추출물이 함유된 탱크에 놓고 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 20 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> 및 0.02% Brij-58이 함유된 digestion buffer에서 20시간 동안 37°C에서 배양한 후 염색하여 관찰하였다.

#### 6. 자료분석

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

Table 1. Comparison of saponin contents of non-fermented red ginseng(NRG) and fortified fermented red ginseng(FFRG)

Saponin Items	NRG (mg/100g)	ratio of contents(%)	FFRG (mg/100g)	ratio of contents(%)
Rg1	22.3	12.3	36.9	2.9
Re	4.7	2.6	43.7	3.4
Rf	12.3	6.8	273.3	21.2
Rh1	극미량		55.9	4.3
Rg2	5.6	3.1	41.7	3.2
Rb1	55.3	30.5	175.5	13.6
Rc	32.2	17.7	96.5	7.5
Rb2	25.3	13.9	109.5	8.5
Rb3	12.1	6.7	26.7	2.1
Rd	11.8	6.5	30.5	2.4
Rg3(s)	극미량		63.7	4.9
Rg3	극미량		72.6	5.6
Rk1	극미량		101.6	7.9
Rg5	극미량		161.9	12.6
Total	181.6		1,290	

## 결 과

### 1. 피부의 면역조직화학적 염색의 변화

1) Matrix metalloproteinase(MMP)-2에 대한 면역염색 반응  
 SKH-1 hairless mice의 피부조직의 세포외기질(extracellular matrix) 분해능의 지표로 관찰하기 위하여 MMP-2 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. MMP-2의 발현은 UVB를 조사하지 않은 정상군(N)(Fig. 1, N)의 표피의 상피세포층과 진피층에서는 미약하게 발현되었으나 UVB를 4주간 조사한 대조군(C)(Fig. 1, C)의 표피 상피세포층과 진피층에서는 N군에 비해 비교적 강하게 발현되었다. UVB를 조사하면서 비발효 및 발효홍삼 추출물을 4주간 투여하고 도포한 군의 FFRG군의 표피 상피세포층에서는 다른 실험군인 NRG군과 FRG군 및 대조군(C)에 비해 미약하게 발현되었다(Fig. 1, FFRG).

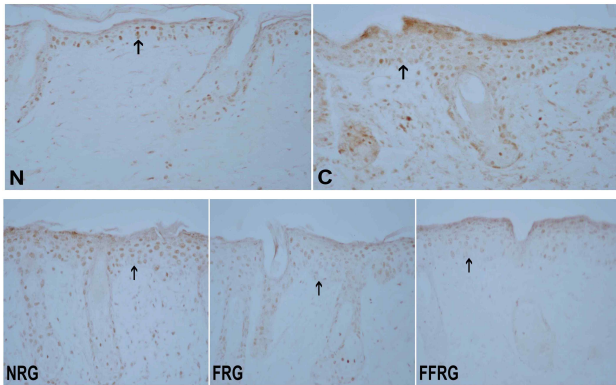


Fig. 1. Immunohistological changes of MMP-2 in skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, NRG, FRG, FFRG) and non-irradiated normal group(N)(MMP-2 immunohistochemical stain, x200). The effects of FFRG treated groups showing reduced MMP-2 expression within skin compared to control(C), NRG and FRG treated groups; Arrows, MMP-2 immunoreacted cells.

### 2) MMP-3에 대한 면역염색 반응

SKH-1 hairless mice의 피부조직의 세포외기질 분해능의 지표로 관찰하기 위하여 MMP-3 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. MMP-3의 발현은 UVB를 조사하지 않은 정상군(N)(Fig. 2, N)의 표피의 상피세포층과 진피층에서는 미약하게 발현되었으나 UVB를 4주간 조사한 대조군(C)(Fig. 2, C)의 표피 상피세포층과 진피층에서는 N군에 비해 비교적 강하게 발현되었다. UVB를 조사하면서 비발효 및 발효홍삼 추출물을 4주간 투여하고 도포한 군의 표피 상피세포층에서는 대조군(C)에 비해 미약하게 발현되었다(Fig. 2, NRG, FRG, FFRG).

### 3) MMP-9에 대한 면역염색반응

SKH-1 hairless mice의 피부조직의 세포외기질 분해능의 지표로 관찰하기 위하여 MMP-9 항체를 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. MMP-9의 발현은 UVB를 조사하지 않은 정상군(N)(Fig. 3, N)의 표피의 상피세포층과 진피층에서는 미약하게 발현되었으나 UVB를 4주간 조사한 대조군(C)(Fig. 3, C)의 표피 상피세포층과 진피층에서는 N군에 비해 비교적 강하게 발현되었다. UVB를 조사하면서 비발효 및 발효홍삼 추출물을 4주간 투여하고 도포한 모든 실험군의 표피 상피세포층에서는 대조군(C)에 비해 미약하게 발현되었다(Fig. 3, NRG, FRG, FFRG).

실험군의 표피 상피세포층에서는 대조군(C)에 비해 미약하게 발현되었다(Fig. 3, NRG, FRG, FFRG).

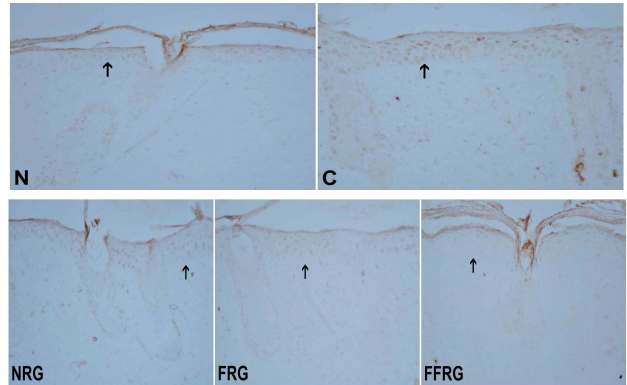


Fig. 2. Immunohistological changes of MMP-3 in skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, NRG, FRG, FFRG) and non-irradiated normal group(N)(MMP-3 immunohistochemical stain, x200). The effects of red ginseng extracts treated groups showing reduced MMP-3 expression within skin compared to control group(C); Arrows, MMP-3 immunoreacted cells.

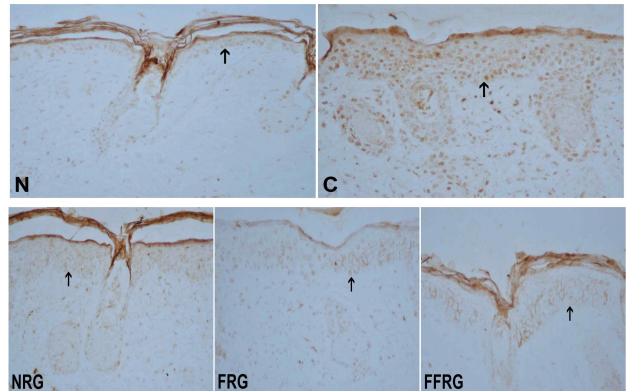


Fig. 3. Immunohistological changes of MMP-9 in skin of SKH-1 mice exposed to 4 weeks of UVB irradiated experimental groups(C, NRG, FRG, FFRG) and non-irradiated normal group(N)(MMP-9 immunohistochemical stain, x200). The effects of red ginseng extracts treated groups showing reduced MMP-9 expression within skin compared to control group(C); Arrows, MMP-9 immunoreacted cells.

### 2. 홍삼 추출물의 세포내 활성산소종(ROS) 생성 억제효과

비발효 및 발효홍삼 추출물이 UVB에 의하여 증가된 세포내 ROS에 미치는 영향을 관찰하고자 DCFH-DA assay를 시행하였다. HaCaT 세포에 60 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 주어 자극하여 12시간을 방치한 후 비발효 및 발효홍삼 추출물을 농도별로 처리함과 아울러 DCFH-DA 시약을 처리하고, 5분 후 형광 흡광도를 측정하였다. Fig 4-6에서 보는 바와 같이 UVB의 자극은 세포 내 ROS의 생성을 유의성있게 현저히 증가시켰으며(2nd column, #, p<0.001), 이러한 ROS의 생성은 비발효홍삼 추출물(NRG)의 처리에 의하여 모든 농도에서 유의성있게 억제되었다(3rd, 4th, 5th, 6th columns; p<0.05, p<0.01)(Fig. 4). 또한 발효홍삼 추출물(FRG)의 처리에 의하여 모든 농도에서 유의성있게 억제되었고(3rd, 4th, 5th, 6th columns; p<0.01, p<0.001)(Fig. 5). 강화발효홍삼 추출물(FFRG)을 처리한 군에서도 모든 농도에서 유의성있게 억제되었다(3rd, 4th,

5th, 6th columns:  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )(Fig. 6). 이러한 실험 결과 다양한 추출조건에 따른 홍삼추출물은 세포 내 ROS의 생성을 억제하는 기능을 수행하는 기능이 있음을 알 수 있었다.

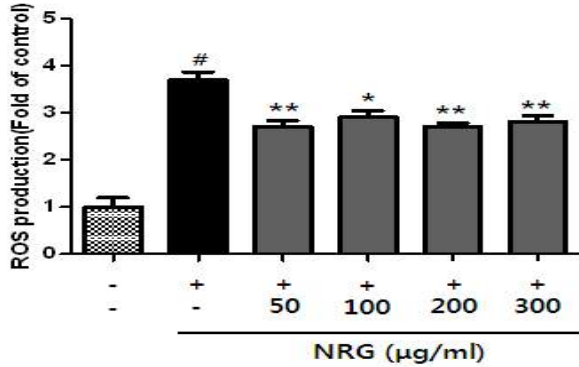


Fig 4. NRG suppresses ROS production. UV radiation increased intracellular ROS production in HaCaT cells. Intracellular ROS production reduced by the treatment of NRG. Shown are mean  $\pm$  SD (n=3). #,  $P < 0.001$ , compared to control(1st column from left); \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , compared to UV stimulated group (2nd column from left).

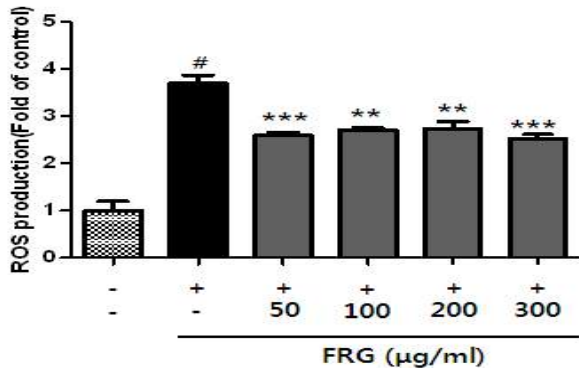


Fig. 5. FRG suppresses ROS production. UV radiation increased intracellular ROS production in HaCaT cells. Intracellular ROS production reduced by the treatment of FRG. Shown are mean  $\pm$  SD (n=3). #,  $P < 0.001$ , compared to control(1st column from left); \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ , compared to UV stimulated group (2nd column from left)

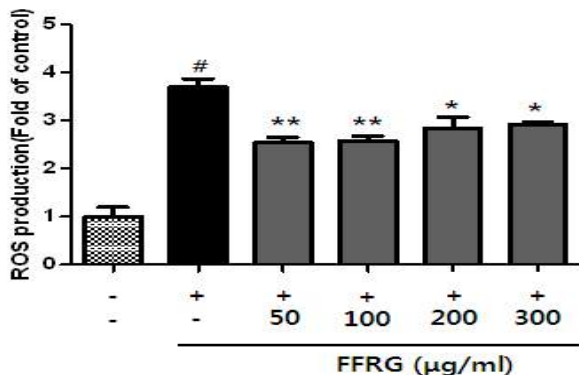


Fig. 6. FFRG suppresses ROS production. UV radiation increased intracellular ROS production in HaCaT cells. Intracellular ROS production reduced by the treatment of FFRG. Shown are mean  $\pm$  SD (n=3). #,  $P < 0.001$ , compared to control(1st column from left); FFRG group was not significant compared to UV stimulated group (2nd column from left).

3. UVB로 자극한 HaCaT 세포에서 MMP-9의 분비에 대한 억제효과

#### 1) 비발효 홍삼(NRG) 추출물

NRG 추출물이 HaCaT 세포에서 MMP-9의 활성화에 대한 효능을 관찰하고자 gelatin zymographic assay를 시행하였다. HaCaT cell은 다양한 농도의 NRG 추출물로 8시간 동안 선처리 하였다. 60 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB로 자극을 하고 20시간 동안 배양한 후 배양액을 전기영동하였다. NRG 추출물은 300ug/ml 농도에서 MMP-9의 활성을 감소시켰다(Fig. 7, NRG).

#### 2) 발효홍삼(FRG) 추출물

FRG 추출물이 HaCaT 세포에서 MMP-9의 활성화에 대한 효능을 관찰하고자 gelatin zymographic assay를 시행하였다. HaCaT cell은 다양한 농도의 FRG 추출물로 8시간 동안 선처리 하였다. 60 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB로 자극을 하고 20시간 동안 배양한 후 배양액을 전기영동하였다. FRG 추출물은 어느 농도에서도 MMP-9의 활성을 감소시키지 못하였다(Fig. 7, FRG).

#### 3) 강화 발효홍삼(FFRG) 추출물

FFRG 추출물이 HaCaT 세포에서 MMP-9의 활성화에 대한 효능을 관찰하고자 gelatin zymographic assay를 시행하였다. HaCaT cell은 다양한 농도의 FFRG 추출물로 8시간 동안 선처리 하였다. 60 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB로 자극을 하고 20시간 동안 배양한 후 배양액을 전기영동하였다. FFRG 추출물은 300 ug/ml의 농도에서 MMP-9의 활성을 감소시켰다(Fig. 7, FFRG).

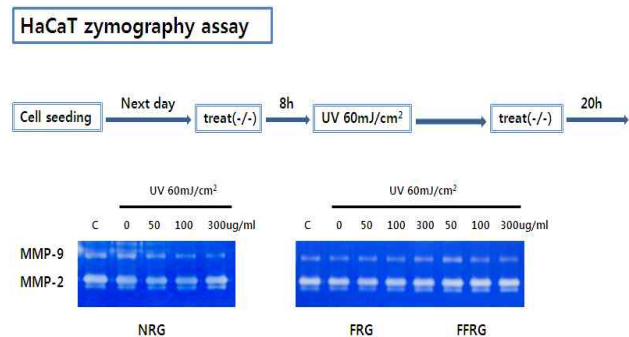


Fig. 7. Inhibitory effect of NRG, FRG and FFRG on MMP-9 expression in UV-stimulated HaCaT cells. HaCaT cells were pre-incubated with the indicated amount of NRG, FRG and FFRG for 8 h and then stimulated with UVB for 20 h. Conditioned media were analyzed by zymography for MMP-9 activity.

## 고 찰

피부노화는 온도, 습도, 매연 및 기계적인 자극과 같은 외부환경 인자에 항상 노출되기 때문에 다른 기관의 노화와는 차이가 있으며, 이들 인자 중 자외선이 피부에 가장 많은 영향을 미치고 있다<sup>18)</sup>.

자외선은 파장의 종류에 따라 분류하는데 UVB(280-320 nm)는 대체로 표피에서 흡수되므로 표피상피(각질세포)에 영향을 미치며, UVA(320-400 nm)는 보다 심층부위에 침투하므로 표피의 각질세포와 진피의 섬유아세포에 영향을 미친다<sup>19)</sup>. 짧은 파장의 UVB는 홍반, 주름 및 피부암과 같은 광손상을 야기하고, UV에 의한 활성산소종(ROS)을 생성하여 아교질, 탄성질, 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycans)과 같은 세포외기질의 구조적 또는 기능적인



변화를 초래하며, 세포구성 성분인 DNA, 단백질 및 지질의 변성을 초래한다<sup>20)</sup>.

자외선에 노출된 피부는 진피층의 섬유아세포에서 아교질의 생산이 감소하고, 기질단백질 분해효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현이 증가하여 기질 단백질의 분해가 증가된다는 것이 밝혀짐으로써, 자외선이 피부 노화의 주원인으로 알려져 있다<sup>5,6,21)</sup>.

피부노화에 관한 연구는 최근에는 피부노화 억제와 치료를 위한 연구가 진행되고 있으며, 특히 피부에 부작용이 적은 천연소재에서 생리활성 물질을 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 기능이 강화된 홍삼을 개발하기 위한 연구의 일환으로 발효공정을 개선하여 사포닌 성분을 강화시킨 홍삼에서 추출한 추출물들을 이용하여 광노화 피부의 보호 효과를 hairless mice와 HaCaT cell에서 MMP-2, MMP-3, MMP-9의 면역조직화학적 염색성의 변화, 활성산소종 생성 억제효과 및 MMP-9의 분비 억제효과를 관찰하였다.

홍삼은 수삼을 蒸熟한 후에 건조시킨 갈색의 인삼을 말하며, 그 기본 효능은 인삼과 유사하다. 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 *Panax*屬에 속하는 고려인삼을 의미하지만 현재에는 고려인삼 외에도 회기삼(*Panax quiquefolius* L.), 전침삼(*Panax notoginseng* F.H. Chen), 죽절삼(*Panax japonicus* C.A. Meyer), 삼엽삼(*Panax trifolium* L.), 히말라야삼(*Panax pseudoginseng* Wall) 등 五加科(Araliaceae)에 속하는 많은 다년생 초본들에 두루 사용되고 있다<sup>22)</sup>.

인삼의 효능은 한의학적 기미론(氣味論)에 근거하여, 漢代의 神農本草經에서는 甘, 微寒, 唐代의 新修本草에서는 甘, 微寒微溫, 金元時代의 張元素는 微苦, 溫, 明代의 本草綱目에서는 다시 甘, 微寒이라고 하였다<sup>23)</sup>. 인삼의 효능에 대하여 東醫寶鑑에서는 인삼이 오장의 氣가 부족한 것을 다스리며 정신을 안정시키고 눈을 밝게 하며 심규를 열어주고 기억력을 좋게 하며 허손된 곳을 보하여 치료하고 속이 뒤틀려 토하고 딸국질하는 것을 멎게 하며 폐병으로 고름을 뱉는 것을 치료하고 가래를 삭힌다(主五臟氣不足, 安精神, 定魂魄, 明目, 開心益智, 療虛損, 止霍亂嘔噦, 治肺痿吐膿, 消痰)라고 하였다<sup>24)</sup>. 東醫寶鑑이나 기타 의서에 언급된 인삼의 효능을 기미론에 의하여 정리하면 인삼은 補氣, 補陽, 補脾(소화력 강화) 등 甘溫의 성질과 沈靜, 養血, 補陰, 消炎 등 苦微寒의 성질을 두루 갖추고 있다고 볼 수 있다. 인삼의 약리 작용 및 임상 응용분야도 매우 다양하여 고혈압, 협심증 등 심혈관 계통 질환, 만성 위염 등의 소화기 계통 질환, 당뇨병, 우울증과 신경 쇠약 등의 정신신경과 질환, 음위나 정력감퇴 등의 질환에 두루 이용되고 있다<sup>25)</sup>.

홍삼은 사용 기간을 증가시키기 위해 인삼을 찌서 말린 것이지만 성분면에서는 인삼을 홍삼으로 수지하는 과정에서 수삼 또는 백삼과 다른 유효성분이 생성되는 것으로 알려져 있다<sup>26)</sup>. 즉 대표 성분인 인삼사포닌(ginsenoside)의 구성에서 수삼의 경우는 Rb1, Rg1, Re 등이 많이 함유된 반면 홍삼은 증숙과정에서 물리적으로 만들어진 Rh3가 가장 많고 다음이 Rg1과 Rh2의 순서이다<sup>22)</sup>.

홍삼은 인삼과 마찬가지로 고혈압, 당뇨병, 암 및 통증 등에 대한 다양한 효과가 있다고 보고되고 있으며<sup>27)</sup>, 임상적으로는 화농성 아토피 피부염, 화상 및 피부염 등에 사용되어왔다<sup>28)</sup>. 최근에는 김

지에서 분리 배양한 유산균을 이용하여 홍삼을 발효시켜 고분자 사포닌 성분(Rg1, Rh1, Rb1, Rb2)은 감소시키고 저분자의 대사체 사포닌(Rh1, Rg3, Rg5+Rk1 등)을 증강시킨 홍삼 추출물에 대한 연구가 보고되었고<sup>29)</sup>, 특히 저분자화 된 ginsenoside들은 장내 미생물에 의하여 전환되어 장내 흡수율을 높여준다고 하였다<sup>28)</sup>. 본 연구에서는 발효공정을 이용하여 기존의 사포닌 성분을 증강시킨 발효홍삼 추출물들과 미발효 홍삼 추출물을 이용하여 광노화 피부의 보호 효과를 비교 관찰하고자 하였다.

MMPs는 세포외기질의 재구성에 관여하는 Zn 의존성 펩티드내부 가수분해효소(endopeptidase)로서 형태발생, 혈관신생, 관절염, 피부궤양, 종양 침입 및 전이에관여한다<sup>30)</sup>. 현재까지 알려진 MMPs는 collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins 및 membrane-type MMPs 5군으로 알려졌으며, 콜라겐, 단백당, 당단백의 분해에 관여한다<sup>31)</sup>. 이들 MMPs 가운데 gelatinase A(MMP-2 또는 72KDa type IV collagenase)와, gelatinase B(MMP-9 또는 92-KDa type IV collagenase)는 type IV와 type VII collagen을 분해시키고, stromelysin(MMP-3와 MMP-10)은 기저막의 접착성 단백질인 라미닌(laminin)을 분해시킨다<sup>32)</sup>. MMPs는 불활성화 된 zymogen(proMMP)으로 분비되며, 활성화 (active MMP)되어야 그 기능을 발휘한다. proMMP 합성을 자극하는 것은 대체로 성장인자 또는 사이토카인에 의한 전사수준하에서 조절된다<sup>32)</sup>.

본 실험의 동물실험에서 MMP-2의 발현은 FFRG군의 표피 상피세포층에서는 다른 실험군인 NRG군과 FFRG군 및 대조군(C)에 비해 미약하게 발현되었고, MMP-3과 MMP-9의 발현은 비발효 및 발효 홍삼 추출물군의 표피 상피세포층에서는 대조군(C)에 비해 미약하게 발현되었다. UVB로 자극한 HaCaT 세포에서 MMP-9의 분비에 대한 억제효과는 NRG 추출물과 FFRG 추출물 300ug/ml 농도에서 MMP-9의 활성을 감소시켜 비발효 및 발효홍삼 추출물 투여 및 도포는 자외선에 대한 광노화 피부를 억제시킬 것으로 사료되었다.

Lee 등<sup>33)</sup>은 인삼추출물은 사람의 진피 섬유아세포에서 Smad signaling의 활성을 통하여 아교섬유(type I)의 합성을 일으킨다 하였고, 홍삼추출물에 의하여 MMP-1<sup>33)</sup> 또는 MMP-13과 MMP-9<sup>14)</sup>의 발현이 감소되어 아교섬유분해를 억제함으로써 주름형성을 억제한다고 하였다. Kim 등<sup>34)</sup>도 홍삼에서 추출한 ginsenoside Rb1은 MMP 발현을 억제함으로써 아교섬유 합성을 촉진하여 광노화 피부를 보호한다고 하였다. Kim 등<sup>35)</sup>은 사람의 섬유아세포에서 홍삼추출물은 MMP-1의 활성 억제 및 항산화 기능에 의하여 피부의 주름 생성을 억제한다고 하였는데 이는 홍삼의 사포닌 성분 중 ginsenoside-Rb1에 의한 것이라고 하였다. 본 실험에서는 Table 1에 나타난 바와 같이 총 사포닌 함량이 NRG에 비해 FFRG에서 7배 이상 증가하였고, 또한 발효에 의하여 사포닌 종류도 다양하게 증가함으로써 MMP-2, MMP-3 및 MMP-9의 발현을 감소시켜 주름형성을 억제시켰을 것으로 사료된다.

활성산소종(ROS)은 고에너지 복사선, 광증감반응 및 일부 효소반응과 같은 과정을 거쳐 세포와 조직에서 생성되는데, 생체내에서 과잉의 활성산소는 염증, 돌연변이, 세포살해, 발암, 피부노화 등이 나타난다. 많은 양의 자외선에 노출되면 피부에는 높은 농도의 활성

산소종이 생성된다. 계속 된 활성산소의 공격은 피부의 항산화 방어 시스템을 파괴시켜 DNA, RNA, 효소 및 세포막에 손상을 일으켜 세포를 사멸시키거나 유전자 발현양식의 변화에 의한 피부암, 광독성 및 광노화를 유발시킨다<sup>36)</sup>. 자외선에 의하여 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 hydroxy radical과 같은 free radical은 피부노화, 피부암, 염증, 허혈 등의 원인이 되며<sup>37)</sup>, 이러한 산소 자유기는 전사인자인 NF(nuclear factor)-κB, AP(activator protein)-1의 binding activity를 증가시켜 기질 단백질인 아교질과 일레스틴 등을 분해하는 MMPs의 발현을 증가시켜 피부 기질 단백질 손상에 의하여 피부 주름을 유발한다고 알려졌다<sup>38)</sup>.

본 실험에서 ROS의 생성은 비발효 및 발효홍삼 추출물 처리에 의하여 농도의존적으로 유의성있게 억제됨으로써 홍삼추출물은 세포 내 ROS의 생성을 억제하는 기능을 수행하여 광노화 피부를 개선하는 효과가 있을 것으로 사료되었다.

이상의 실험 결과로 비발효 및 발효 홍삼추출물들은 UVB에 의한 광노화 피부의 개선에 효과가 있을 것으로 사료되었고, 미발효 홍삼에 비해 발효와 강화발효 홍삼 추출물이 더욱 효과적인 것으로 사료되었다. 이 후에는 사포닌 성분에 따른 광노화피부 개선 효과를 심층적으로 연구하여야 할 것으로 사료되었다.

## 결 론

발효에 의하여 사포닌 성분을 강화시킨 발효홍삼 추출물들을 이용하여 UVB에 의한 광노화 피부의 개선 효과를 관찰하기 위하여 hairless mice에 투여하고 도포한 후 광노화 피부억제와 관련된 MMP-2, MMP-3, MMP-9에 미치는 영향과 human keratinocyte 인 HaCaT cell을 이용하여 활성산소종 및 MMP-9의 활성에 대한 효능을 관찰하고자 gelatin zymographic assay를 시행한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

피부조직의 세포외기질(extracellular matrix) 분해능의 지표로 관찰하기 위하여 MMP-2, MMP-3 및 MMP-9의 발현을 관찰한 바 MMP-2는 FRG군의 표피 상피세포층에서 미약하게 발현되었으며, MMP-3과 MMP-9는 NRG군, FRG군, FFRG군의 표피 상피세포층에서는 대조군에 비해 미약하게 발현되었다. 세포내 ROS는 NRG(p<0.05, p<0.01), FRG(p<0.01, p<0.001) 및 FFRG군(p<0.05, p<0.01)에서 농도의존적으로 유의성있게 억제되었고, MMP-9의 분비를 억제하는 효과는 NRG 추출물과 FFRG 추출물 300ug/ml 농도에서 MMP-9의 활성을 감소시켰다.

이상의 실험 결과로 발효홍삼 및 강화발효 홍삼추출물은 미발효 홍삼추출물에 비하여 UVB에 의한 피부노화 인자들의 활성을 더욱 억제 할 것으로 사료되었으므로 광노화에 의한 피부손상을 예방하는 생리활성을 이용한 기능성 소재로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

## References

1. Meinhard, W., Iiana, T.B., Lale, N., Wenjian, M., Lars, A.S., Ziba, R.W., Jutta, S., Karin, S.K. Solar UV

- irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol* 63: 41-51, 2001.
2. Lavker, R.M. Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. *J Invest Dermatol* 73: 59-66, 1979.
3. Gilchrist, B.A. Skin aging and photoaging: an overview. *J Am Acad Dermatol* 989(21):610-613, 1989.
4. Griffiths, C.E.M. The clinical identification and quantification of photodamage. *Br J Dermatol* 127(Suppl. 41):37-42, 1992.
5. Chung, J.H., Seo, J.Y., Choi, H.R., Lee, M.K., Youn, C.S., Rhie, G., Cho, K.H., Kim, K.H., Park, K.C., Eun, H.C. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 117: 1218-1224, 2001.
6. Gilchrist, B.A. A review of skin ageing and its medical therapy. *Br J Dermatol* 135: 867-875, 1996.
7. Herrmann, G., Wlaschek, M., Lange, T.S., Prenzel, K. Goerz, G., Scharffetter-Kochanek, K. UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases(MMPs) in cultured human fibroblasts. *Exp Dermatol* 2: 92-97, 1993.
8. Koivukangas, V., Kallioinen, M., Autio-Harmainen, H., Oikarinen, A. UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta Derm Venereol* 74: 279-282, 1994.
9. Kehrer, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *CRC Crit Rev Toxicol* 23: 21-28, 1993.
10. Aruoma, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidant. *Food Chem Toxicol* 62: 671-683, 1994.
11. Choi, Y.K., Su, J.U., Park, S.K., Yu, S.N., Kim, S.H., Rhee, M.S., Ahn, S.C., Shin, M.S. Research trends of fermented medicinal herbs - Based on their clinical efficacy and safety assessment. *J Life Science* 22: 1729-1739, 2012.
12. Lee, J.H., Lee, B.S., Yang, M.S., Byun B.S., Kim, W.G., Kim, B.H., Lee, S.J. Prevention of photoaging and wrinkle formation in Hairless mice dorsal skin by APB-03. *Food Science and Biotechnology* 37(6):989-996, 2005.
13. Kang, T.H., Park, H.M., Kim, Y.B., Kim, H.A., Kim, N.M., Do, J.H., Kang, C.H., Cho, Y.H., Kim, S.Y. Effects of red ginseng extract on UVB irradiation-induced skin aging in hairless mice. *J Ethnopharmacol* 123: 446-451, 2009.
14. Lee, M.J., Won, C.H., Lee, S.R., Kim, J.S., Oh, I.G., Hwang, E.I., Kim, N.M., Kang, B.C., Chung, J.H. Oral administration of KTNG0345 prepared from red ginseng extracts reduces UVB-induced skin wrinkle formation in hairless mice. *J Ginseng Res* 32(1):48-56, 2008.
15. Jeong, D.W., Hong, J.W., Shin, W.J., Park, Y.M., Jung, J.H., Kim, C.H., Min, I.K., Park, S.U., Jung, W.S., Park, J.M., Go, C.N., Cho, K.H., Moon, S.K. Effects of Korean

- ginseng, Korean red ginseng and fermented Korean red ginseng on cerebral blood flow, cerebrovascular reactivity, systemic blood pressure and pulse rate in humans. *J Korean Orient Med* 27: 38-50, 2006.
16. Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody(PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981.
  17. Ha, K.T., Kim, J.K., Lee, Y.C., Kim, C.H. Inhibitory effect of Daesungki-Tang on the invasiveness potential of hepatocellular carcinoma through inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities. *Toxicol Appl Pharmacol* 200(1):1-6. 2004.
  18. Landau, M. Exogenous factors in skin aging. *Curr Probl Dermatol* 35:1-13, 2007.
  19. Berneburg, M., Plettenberg, H., Krutmann, J. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16: 239-244, 2000.
  20. Sander, C.S., Chang, H., Salzmann, S., Müller, C.S., Ekanayake-Mudiyanselage, S., Elsner, P., Thiele, J.J. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 118(4):618-625, 2002.
  21. Kiss, I., Chen, S., Trampusch, K.M. The effect of high and low ultraviolet-B dose exposure on the degree of hairless mouse skin wrinkling. *Photochem Photobiol* 53: 109-112, 1991.
  22. Kim, D.H. *Ginseng and health*. Hyoil, 2005.
  23. Ann, D.K. Effects of Ginseng by properties-flavours theory. *J Herbology* 7(1):27-32, 1992.
  24. Noh, S.H. Effects of Ginseng. *J Herbology* 7(1):53-60, 1992.
  25. Kim, C.H., Shin, M.K., Ann, D.K., Lee, K.S. *Dictionary of chinese herbal medicine*, Chungdam, 1997.
  26. Kong, B.M., Park, M.J., Min, J.W., Kim, H.B., Kim, S.H., Kim, S.Y., Yang, D.C. Physico-chemical characteristics of white fermented and red ginseng extracts. *J Ginseng Res* 32: 238-243, 2008.
  27. Jin, Y.R., Yu, J.Y., Lee, J.J., You, S.H., Chung, J.H., Noh, J.Y., Im, J.H., Han, X.H., Kim, T.J., Shin, K.S., Wee, J.J., Yun, Y.P. Antithrombotic and antiplatelet activities of Korean red ginseng extract. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 100: 170-175, 2007.
  28. Odani, T., Tanizawa, H., Takino, Y. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. II. The absorption, distribution and excretion of ginsenoside Rg1 in the rat. *Chem Pharm Bull* 31: 292-298, 1983.
  29. Shin, Y.S. Fermentation of Red Ginseng using CKDHC0801 and CKDHC0802. *Korean J Food Cookery Sci* 26: 469-474, 2010.
  30. Birkedal-Hansen, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 7: 728-735, 1995.
  31. Kligman, A.M., Grove, G.L., Hirose, R., Leyden, J.J. Topical tretinoin for photoaged skin. *J Am Acad Dermatol* 15: 836-859, 1986.
  32. Reynolds, J.J. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis* 2: 70-76, 1996.
  33. Lee, J., Jung, E., Lee, J., Sungran, H., Kim, J., Park, M., So, J., Ham, Y., Jung, K., Hyun, C.G., Kim, Y.S., Park, D., Panax ginseng induces human type I collagen synthesis through activation of Smad signaling. *J Ethnopharmacol* 109: 29-34, 2007.
  34. Kim, Y.G., Sumiyoshi, M., Sakanaka, M., Kimura, Y.. Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice. *Eur J Pharm* 602:148-156, 2009.
  35. Kim, N.M., Koo, B.S., Lee, S.K., Hwang, E.I., So, S.H., Do, J.H. Effect of Korea red ginseng on collagen biosynthesis and MMP-1 activity in human dermal fibroblast. *J Ginseng Res* 31(2):86-92, 2007.
  36. Shindo, Y., Witt, E., Packer, L. Antioxidants defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. *J Invest Dermatol* 100: 260-265, 1993.
  37. Masak, H., Atsumi, T., Sakurai, H. Detection of hydroxygen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 474-479, 1995.
  38. Pinkus, R., Weiner, L.M., Daniel, V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- $\kappa$ B, and glutathione S-transferase gene expression. *Biol Chem* 271(23):13422-13429, 1996.