

토사자 에탄올 추출물이 UVB로 유도된 CCD-986Sk cell에서 주름개선 생리지표에 미치는 영향

주인환¹ · 최학주² · 심부용² · 민가을¹ · 김동희^{1,2*}

1 : 대전대학교 한의과대학 병리학교실, 2 : 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터

Effects of *Cuscuta Chinensis* Lamark Ethanol Extract on Wrinkle Improvement Bio-markers by UVB-induced CCD-986Sk Cell

In Hwan Joo¹, Hak Joo Choi², Boo Yong Sim², Ga Yul Min¹, Dong Hee Kim^{1,2*}

1 : Department of Pathology, College of Korean Medicine, 2 : Traditional and Biomedical Research Center(TBRC-RIC), Daejeon University

The purpose of this study was to investigate the effects of *Cuscuta chinensis* Lamark ethanol extract (CL) on wrinkle improvement. *Cuscuta chinensis* Lamark is known to contain dried saccharide, alkaloids, flavonoids, lignans and rein glycoside as major components of dried mature seeds of *Cuscuta japonica* Choisy. In this study, we evaluated the anti-wrinkle effects of CL and investigated bio-markers (e.g ; MMP-1, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, type I procollagen) associated with skin wrinkle improvement. We tested the anti-wrinkle effect of CL using human fibroblast called CCD-986Sk cell. We observed an increase in MMPs, TIMP-1, and type 1 pro-collagen CL in CCD-986Sk cells irradiated with UVB at an intensity of 20 mJ/cm² for 60 seconds. As a result, CL decreased UVB-induced MMPs levels and mRNA expressions in CCD-986Sk cell. The levels and mRNA expressions of type I procollagen and TIMP-1 were increased by CL. These results suggest that CL has activities on improvement of skin wrinkle, which is induced by UVB radiation. Taken together, this study proposed the possibility of developing herbal medicine and functional herbal cosmetic materials with wrinkle-improving effects of *Cuscuta chinensis* Lamark.

keywords : Wrinkle improvement, *Cuscuta chinensis* Lamark, Matrix metalloproteinase, Procollagen, UVB

서 론

최근 인간의 수명이 증가하여 여유롭고 아름다운 삶을 꿈꾸는 현대인들은 외모를 가꾸기 위해 피부에 대한 관심과 투자가 증가하고 있다. 피부노화는 외형적인 변화의 관찰이 용이하여 피부미용에 대한 관심의 대상이 되며, 이러한 외형적 변화들 중 주름생성은 가장 눈에 띄는 변화라고 말할 수 있다¹⁾.

피부는 외부 자극으로부터 피부를 보호하는 표피층과 표피층 아래에 탄력 및 주름을 조절하는 진피층 및 피하지방층으로 구성되어 있다^{2,3)}. 진피층에 분포하는 섬유아세포가 합성하는 collagen은 외부의 충격으로부터 피부를 보호하는 저항성이 있다. 하지만 피부노화가 발생하면 섬유아세포의 기능이 감소하고 collagen의 생성이 저해되며, collagen의 구조변형으로 인해 피부 장력이 감소하게 된다^{4,5)}.

Ultraviolet B (UVB)는 피부세포의 DNA를 손상시켜 항산화 방어체계를 붕괴시키고 산화적 스트레스를 증가시킨다⁶⁾. UVB와 같

은 외부자극을 통해 자극되어진 섬유아세포는 collagen 생성을 억제하고 collagen을 분해하는 효소인 기질금속단백질가수분해효소(Matrix metalloproteinase; MMP)의 활성화와 발현을 증가시킨다고 보고되어 있다^{7,8)}. 활성이 증가된 MMPs는 세포 외 기질의 구성성분인 collagen을 절단하고 구조적 변화를 일으켜 피부탄력 감소와 주름 발생의 원인이 된다^{9,10)}.

菟絲子 (*Cuscuta chinensis* Lamark)는 새삼 종자를 건조한 것으로 주변에서 흔히 찾아볼 수 있다. 한의학에서 토사자는 맛이 맵고 달며, 무독하여 肝腎을 보하고 눈을 밝게 하며 強壯, 止瀉, 止瀉 작용이 우수하여 菟絲子丸, 菟絲子湯을 구성하는 약물로 널리 사용되고 있다¹¹⁾. 《東醫寶鑑》¹²⁾에는 토사자 즙을 반점 및 여드름에 사용한다고 기록되어 있으며, 민간에서는 새삼 즙을 얼굴에 바르면 기미 제거, 여드름 및 주름개선에 대한 미용 효과가 있다고 한다^{13,14)}.

토사자의 주된 성분으로는 saccharide, alkaloids, flavonoids, lignans 및 rein 등이 있다^{15,16)}. 실험적 연구들로는 간 기능¹⁷⁾, 혈

* Corresponding author

Dong-Hee Kim, Department of pathology, college of oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon 300-716, Republic of Korea

E-mail : dhkim@dju.kr · Tel : +82-42-280-2623

Received : 2018/07/10 · Revised : 2018/08/31 · Accepted : 2018/09/11

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

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2018.10.32.5.321

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

압¹⁸⁾, 고지혈증¹⁹⁾, 항산화 효과 및 항 돌연변이 활성에 대한 연구²⁰⁾가 있다.

피부와 관련되어 *Propionibacterium acne* 증식 억제²¹⁾, 화장품 약리 활성²²⁾, melanin 생합성과 tyrosinase 활성²³⁾, 여드름²⁴⁾에 대한 연구가 진행되었으나, 주름개선에 관련된 연구는 아직 미비한 실정이다.

이에 본 연구에서 토사자 에탄올 추출물이 UVB로 유도된 섬유아세포에서 나타나는 주름개선 효능에 대하여 기초적인 자료를 제공하고자 주름과 관련된 바이오마커의 생성량과 유전자 발현량을 측정하여 유의적인 결과를 도출하였기 때문에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용한 菟絲子 (*Cuscuta chinensis* Lamark)는 충북 괴산에서 생산되었고 ㈜옴니허브를 통해 구입하여 대전대학교 TBRC-RIC에서 정선하여 사용하였다.

2. 시약 및 기기

사용된 시약은 ethanol (Duksan, Korea), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL, U.S.A.), fetal bovine serum (FBS : Gibco BRL, U.S.A.), trypsin-EDTA (ThermoFisher, U.S.A.), trypan blue (Sigma, U.S.A.), EZ-Cytox (Daeilab, Korea), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS : Welgene, Korea), Human Matrix Metalloproteinase 1 ELISA Kit (Elabscience, China), Human Matrix Metalloproteinase 3 ELISA Kit (Elabscience, China), Human Matrix Metalloproteinase 9 ELISA Kit (Elabscience, China), Human Tissue Inhibitors of Metalloproteinase 1 ELISA Kit (Elabscience, China), Human Procollagen I ELISA Kit (Elabscience, China), Total RNA prep kit (Intronbio, Korea), AccuPower CycleScript RT PreMix (Bioneer, Korea), AccuPower® HotStart PCR PreMix (Bioneer, Korea) 등을 사용하였으며, 기기는 rotary vacuum evaporator (Buchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), clean bench (Vision scientific, Korea), autoclave (Sanyo, Japan), vortex mixer (Vision scientific, Korea), centrifuge (Hanil, Korea), deep-freezer (Sanyo, Japan), incubator (Sanyo Co., Japan), UV lamp (Vilber Lourmat, France), ice-maker (Vision scientific, Korea), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), micro plate reader (Molecular Devices, U.S.A.), Nanodrop (ThermoFisher, U.S.A.), Alpha Cycler 1 PCRmax (PCRmax, U.K.), electrophoresis system (ADVANCE, Japan), Fusion-SL (Vilber Lourmat., Deutschland) 등을 사용하였다.

3. 시료 추출

토사자 30 g에 80% 에탄올 500 mL를 넣어 3시간 동안 환류추

출을 한 후 여과액을 rotary vacuum evaporator로 50°C에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 얼어낸 분말 (이하, CL로 표기) 8.32 g (수율 27.7%)을 초저온 냉동고 (-80°C)에서 보관하며 실험에 필요한 농도로 증류수에 희석해 사용하였다.

4. 세포배양

CCD-986Sk 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, U.S.A.)에서 구매하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS)가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건이 유지되는 세포배양기에서 배양하였고 3-5일 주기로 계대 배양하여 실험을 진행하였다.

5. 세포독성 측정

CCD-986Sk 세포를 96 well plate에 5×10⁴ cells/well씩 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 실험을 하기 전에 새로운 배양액으로 교체하였고, CL을 각각 1, 10, 100 µg/mL의 농도로 처리하여 다시 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 µL의 EZ-Cytox 용액을 첨가하여 세포배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

6. 바이오마커 생성량 측정

CCD-986Sk 세포를 6 well plate에 2×10⁵ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하여 안정화 시켰다. 안정화 후 배지를 제거하고 PBS로 교체하여 UV lamp를 통해 UVB (20 mJ/cm²)를 60초간 조사하였다. 그 다음 새로운 배양액에 CL을 1, 10, 100 µg/mL의 농도로 처리하여 다시 48시간 동안 배양하였다. 이후, 배양액과 standard를 96 well plate에 100 µL씩 넣고 37°C에서 90분간 반응시킨다. well에 있는 용액을 제거한 후 100 µL의 detection antibody를 넣어 다시 37°C에서 60분간 반응시키고 washing buffer를 이용하여 3회 세척하였다. 세척 후 HRP conjugate를 100 µL씩 넣어 37°C에서 30분간 반응시키고 washing buffer를 이용하여 5회 세척하였다. 이 후 substrate reagent를 90 µL씩 넣어 37°C에서 15분간 반응시키고 50 µL의 stop solution을 추가하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 standard curve를 기준으로 절대 값으로 표시하였다.

7. 유전자 발현량 측정

1) RNA 추출

CCD-986Sk 세포를 6 well plate에 2×10⁵ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하여 안정화 시켰다. 안정화 후 배지를 제거하고 PBS로 교체하여 UV lamp를 통해 UVB (20 mJ/cm²)를 60초간 조사하였다. 그 다음 CL을 1, 10, 100 µg/mL의 농도로 처리하여 다시 48시간 동안 배양하였다. 이후, UVB를 조사한 세포에 cell lysis buffer를 1 mL씩 넣어 혼합 후 chloroform을 200 µL씩 첨가하여 다시 혼합하였다. 이를 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 400 µL의 상층액을 회수하여 binding buffer를 400 µL씩

넣어 혼합하여 column에 주입하고 원심분리 하였다. column에 washing buffer A를 700 µl씩 넣어 원심분리 하고 washing buffer B를 700 µl씩 넣어 원심분리 후 elution buffer 50 µl을 넣고 원심분리 하여 RNA를 추출하였다.

2) 역전사 반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 RT premix (reverse transcriptase, reaction buffer, dNTPs, dT20 primer, stabilizer)에 total RNA를 1 µg 첨가하고 diethyl pyrocarbonate(DEPC)처리된 증류수를 최종 부피가 20 µl가 되도록 하여 첨가하였다. 이 혼합액을 섞은 후 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하고 45°C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였다. 이를 다시 95°C에서 5분 동안 반응시켜 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 PCR에 사용하였다.

3) PCR

합성이 완료된 cDNA를 증폭시키기 위하여 PCR을 진행하였다. PCR은 PCR premix(DNA polymerase, 250 mM dNTPs mix, PCR buffer)에 cDNA 1 µl와 각 primer 2 µl를 넣고 증류수를 최종 부피가 20 µl가 되도록 하여 첨가하여 다음과 같이 진행하였다. 94°C에서 5분 동안 1 cycle을 진행한 다음 94°C에서 15초, 각 primer의 annealing 온도에서 15초, 72°C에서 30초를 30~35 cycle 진행하였고 마지막으로 72°C에서 5분 후 서서히 온도가 내려가 4°C가 되었을 때 증폭이 완료된 DNA 샘플을 얻었다. 증폭된 DNA는 1% agarose gel에 전기영동 하여 유전자 발현의 여부를 측정하였다. UV로 촬영하여 각 그룹별로 band를 확인하였고 사용된 primer의 sequence와 annealing 온도는 Table 1과 같다.

Table 1. The Sequences of Primers for RT-PCR

Primer	F/R*	Sequences	Annealing Temp. (°C)
GAPDH	F	ACCACAGTCCATGCCATCAC	57.5
	R	TCTAGACGGCAGGTCAAGTC	
MMP-1	F	GATGTGGAGTGCCTGATGTG	57.3
	R	TGCTTGACCTCAGAGACCT	
MMP-3	F	CCCGAGGTTGGACCTACAAG	57.3
	R	CTTCCCCGTACCTCCAATC	
MMP-9	F	CATCCGGCACCTCTATGGTC	55.7
	R	CATCGTCCACCGGACTCAA	
TIMP-1	F	TCGTCATCAGGGCCAAGTTC	56.5
	R	TCCACAAGCAATGAGTGCCA	
Type I procollagen	F	CTGGTCCCAAGGTAACAG	61.7
	R	GCCAGGAGAACCACGTTTC	

8. 통계처리

본 연구에서 얻어진 결과는 3회 이상의 실험을 통해 얻어진 평균±표준편차로 나타내었으며, 각 실험군 사이에 대한 결과는 SPSS 21.0의 unpaired student's t-test를 사용하여 분석하고 p<0.05, p<0.01 및 p<0.001의 수준에서 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 세포 생존율

CCD-986Sk 세포에서 세포생존율을 측정된 결과, 대조군을 100.0±3.0%로 나타냈을 때, 1, 10, 100 µg/ml 농도에서 각각 101.5±2.3%, 101.5±2.3%, 102.9±1.5%로 나타났다(Fig. 1).

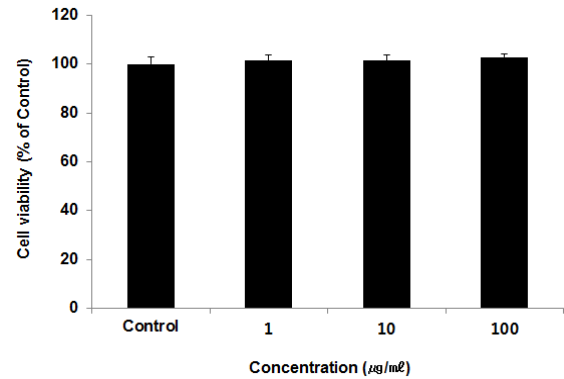


Fig. 1. Cell viability test of CL in CCD-986Sk cells. CCD-986Sk cells were treated by 1, 10, and 100 µg/ml of CL for 48 h. The result was presented as mean ± S.D from three independent experiments.

2. 바이오마커 생성량

1) MMP-1 생성량

MMP-1 생성량을 측정된 결과, 정상군은 31.3±1.3 pg/ml, 대조군은 130.7±4.9 pg/ml로 나타난 반면, 1, 10, 100 µg/ml 농도에서 각각 125.4±5.1 pg/ml, 94.1±2.2 pg/ml, 75.6±3.7 pg/ml로 나타나 10, 100 µg/ml 농도에서 유의성 있는 (**p<0.01, ***p<0.001) 감소가 나타났다(Fig. 2).

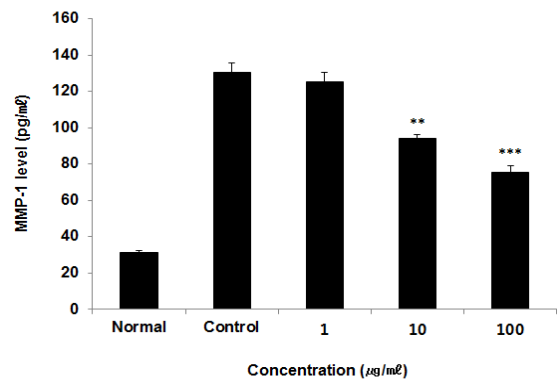


Fig. 2. Effect of CL on MMP-1 level in CCD-986Sk cells. After UVB irradiation CCD-986Sk cells were treated with 1, 10, and 100 µg/ml of CL for 48 h. The result was presented as mean ± S.D from three independent experiments (Significance of results, **p<0.01, ***p<0.001 compared to control).

2) MMP-3 생성량

MMP-3 생성량을 측정된 결과, 정상군은 25.4±2.4 pg/ml, 대조군은 119.7±4.9 pg/ml로 나타난 반면, 1, 10, 100 µg/ml 농도에서 각각 116.6±5.5 pg/ml, 76.5±1.3 pg/ml, 42.8±2.7 pg/ml로 나타나 10, 100 µg/ml 농도에서 유의성 있는 (**p<0.01, ***p<0.001) 감소가 나타났다(Fig. 3).

3) MMP-9 생성량

MMP-9 생성량을 측정된 결과, 정상군은 18.7±1.8 pg/ml, 대

조군은 67.6 ± 5.1 pg/ml로 나타낸 반면, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 60.4 ± 4.8 pg/ml, 51.5 ± 3.4 pg/ml, 38.2 ± 1.6 pg/ml로 나타나 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 ($*p < 0.05$, $***p < 0.001$) 감소가 나타났다(Fig. 4).

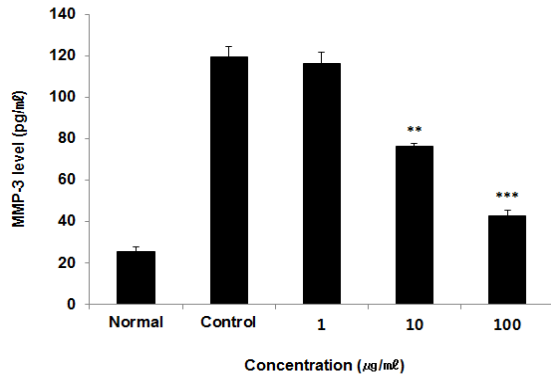


Fig. 3. Effect of CL on MMP-3 level in CCD-986Sk cells. After UVB irradiation CCD-986Sk cells were treated with 1, 10, and 100 $\mu\text{g/ml}$ of CL for 48 h. The result was presented as mean \pm S.D from three independent experiments (Significance of results, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ compared to control).

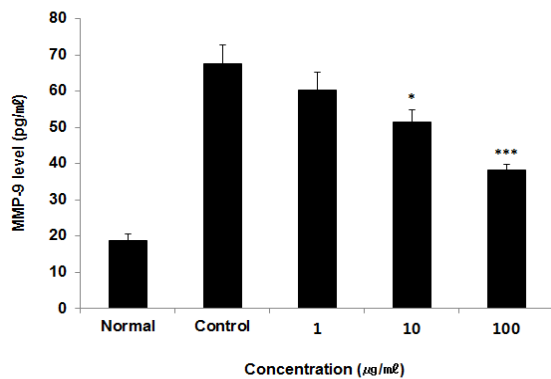


Fig. 4. Effect of CL on MMP-9 level in CCD-986Sk cells. After UVB irradiation CCD-986Sk cells were treated with 1, 10, and 100 $\mu\text{g/ml}$ of CL for 48 h. The result was presented as mean \pm S.D from three independent experiments (Significance of results, $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ compared to control).

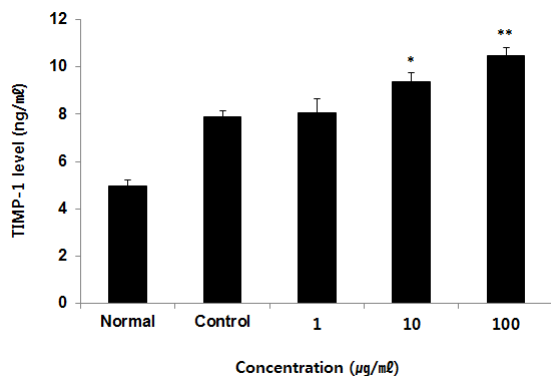


Fig. 5. Effect of CL on TIMP-1 level in CCD-986Sk cells. After UVB irradiation CCD-986Sk cells were treated with 1, 10, and 100 $\mu\text{g/ml}$ of CL for 48 h. The result was presented as mean \pm S.D from three independent experiments (Significance of results, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ compared to control).

4) TIMP-1 생성량

TIMP-1 생성량을 측정한 결과, 정상군은 5.0 ± 0.3 ng/ml, 대조군은 7.9 ± 0.3 ng/ml로 나타낸 반면, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 8.0 ± 0.6 ng/ml, 9.4 ± 0.4 ng/ml, 10.5 ± 0.3 ng/ml로 나타나 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$) 증가가 나타났다(Fig. 5).

5) Type I procollagen 생성량

Type I procollagen 생성량을 측정한 결과, 정상군은 76.9 ± 3.4 pg/ml, 대조군은 36.0 ± 2.3 pg/ml로 나타낸 반면, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 42.3 ± 2.4 pg/ml, 59.4 ± 2.4 pg/ml, 65.6 ± 2.3 pg/ml로 나타나 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는 ($**p < 0.01$, $***p < 0.001$) 증가가 나타났다(Fig. 6).

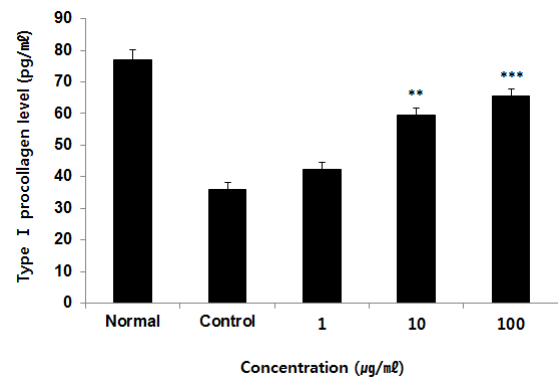


Fig. 6. Effect of CL on type I procollagen level in CCD-986Sk cells. After UVB irradiation CCD-986Sk cells were treated with 1, 10, and 100 $\mu\text{g/ml}$ of CL for 48 h. The result was presented as mean \pm S.D from three independent experiments (Significance of results, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ compared to control).

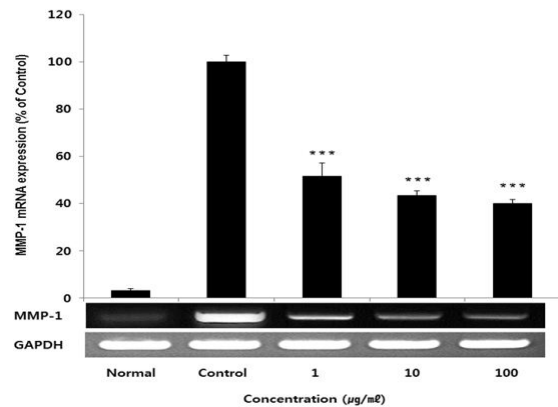


Fig. 7. Effect of CL on MMP-1 mRNA expression in CCD-986Sk cells. After UVB irradiation CCD-986Sk cells were treated with 1, 10, and 100 $\mu\text{g/ml}$ of CL for 48 h. The result was presented as mean \pm S.D from three independent experiments (Significance of results, $***p < 0.001$ compared to control).

3. 유전자 발현량

1) MMP-1 유전자 발현량

MMP-1 유전자 발현량을 측정한 결과, 정상군을 $3.1 \pm 0.9\%$, 대조군을 $100.0 \pm 2.9\%$ 으로 나타냈을 때, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 $51.6 \pm 5.5\%$, $43.4 \pm 2.1\%$, $40.1 \pm 1.7\%$ 로 나타나 1, 10,

100 µg/ml 농도에서 유의성 있는 (**p<0.001) 감소가 나타났다 (Fig. 7).

2) MMP-3 유전자 발현량

MMP-3 유전자 발현량을 측정한 결과, 정상군을 22.6±1.1%, 대조군을 100.0±6.1%으로 나타냈을 때, 1, 10, 100 µg/ml 농도에서 각각 98.7±3.3%, 25.4±4.1%, 23.1±2.2%로 나타나 10, 100 µg/ml 농도에서 유의성 있는 (**p<0.001) 감소가 나타났다(Fig. 8).

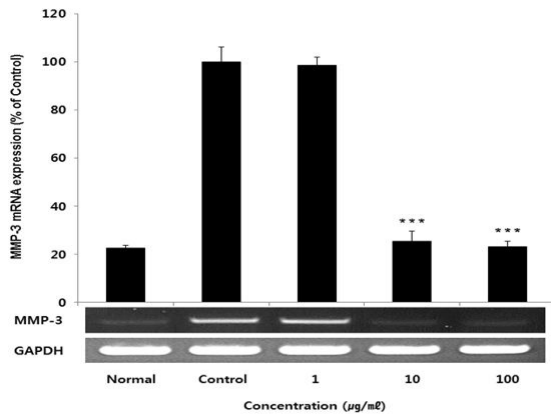


Fig. 8. Effect of CL on MMP-3 mRNA expression in CCD-986Sk cells. After UVB irradiation CCD-986Sk cells were treated with 1, 10, and 100 µg/ml of CL for 48 h. The result was presented as mean ± S.D from three independent experiments (Significance of results, **p<0.001 compared to control).

3) MMP-9 유전자 발현량

MMP-9 유전자 발현량을 측정한 결과, 정상군을 33.1±2.9%, 대조군을 100.0±3.3%으로 나타냈을 때, 1, 10, 100 µg/ml 농도에서 각각 81.5±2.0%, 80.1±2.4%, 35.7±1.7%로 나타나 1, 10, 100 µg/ml 농도에서 유의성 있는 (*p<0.05, **p<0.001) 감소가 나타났다(Fig. 9).

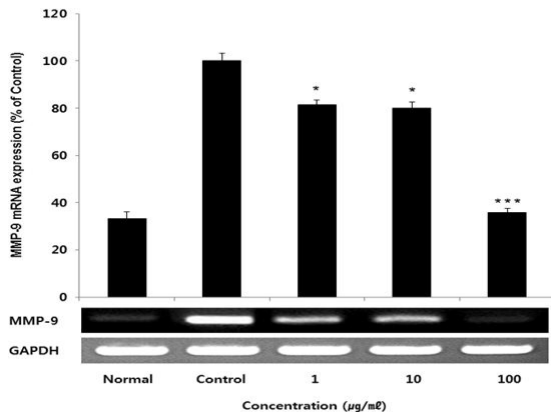


Fig. 9. Effect of CL on MMP-9 mRNA expression in CCD-986Sk cells. After UVB irradiation CCD-986Sk cells were treated with 1, 10, and 100 µg/ml of CL for 48 h. The result was presented as mean ± S.D from three independent experiments (Significance of results, *p<0.05, **p<0.001 compared to control).

4) TIMP-1 유전자 발현량

TIMP-1 유전자 발현량을 측정한 결과, 정상군을 251.6±2.5%,

대조군을 100.0±2.2%으로 나타냈을 때, 1, 10, 100 µg/ml 농도에서 각각 100.6±1.8%, 243.1±3.7%, 255.7±5.1%로 나타나 10, 100 µg/ml 농도에서 유의성 있는 (**p<0.001) 증가가 나타났다 (Fig. 10).

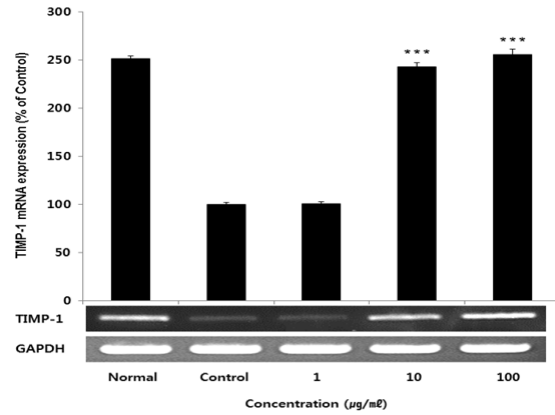


Fig. 10. Effect of CL on TIMP-1 mRNA expression in CCD-986Sk cells. After UVB irradiation CCD-986Sk cells were treated with 1, 10, and 100 µg/ml of CL for 48 h. The result was presented as mean ± S.D from three independent experiments (Significance of results, **p<0.001 compared to control).

5) Type I procollagen 유전자 발현량

Type I procollagen 유전자 발현량을 측정한 결과, 정상군을 211.6±0.8%, 대조군을 100.0±2.2%으로 나타냈을 때, 1, 10, 100 µg/ml 농도에서 각각 167.6±1.7%, 183.4±3.1%, 201.6±2.5%로 나타나 1, 10, 100 µg/ml 농도에서 유의성 있는 (**p<0.001) 증가가 나타났다(Fig. 11).

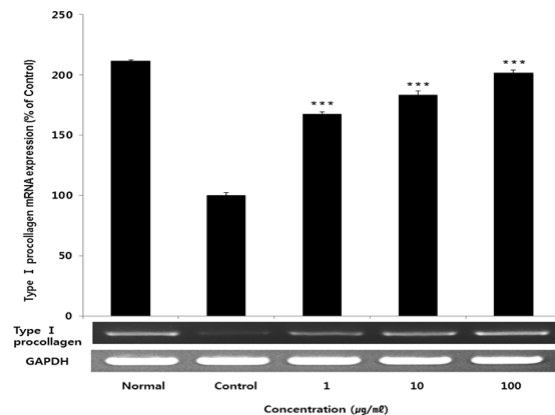


Fig. 11. Effect of CL on Type I procollagen mRNA expression in CCD-986Sk cells. After UVB irradiation CCD-986Sk cells were treated with 1, 10, and 100 µg/ml of CL for 48 h. The result was presented as mean ± S.D from three independent experiments (Significance of results, **p<0.001 compared to control).

고찰

우리 몸을 외부의 자극으로부터 보호하는 방어막인 피부를 자극하는 다양한 물질 중 UVB에 장시간 노출된 피부는 ROS를 다량 생성하여 체내 항산화 방어체계를 붕괴시키고 MMPs 활성을 증가

시켜 collagen의 분해를 촉진시킨다²⁵). 이를 통해 피부는 구조적 변화가 발생하고 생리적 기능이 감소하여 주름이 발생한다⁵).

천연물을 주름개선 효능을 평가한 실험^{26,27})들은 섬유아세포에 UVB를 처리하여 MMPs 생성량 및 발현량을 증가시키고 type I collagen 합성을 감소시킨 후, 다양한 천연물을 처리하여 유의적인 효능이 있음을 보고하였으며, Park MA 등²⁸)은 일당귀뿌리 에탄올 추출물의 MMP-1 발현량 감소와 TIMP-1 발현량 증가를 보고하였다. 마지막으로 Kang KS 등²⁹)은 여러 한약재의 열수 추출물에 대하여 항산화 효과, collagen 합성, MMP-1 활성 저해를 통해 화장품 원료로서의 사용 가능성을 검토하였는데, 여러 한약재 중 토사자가 다른 약재들과 비교하였을 때 뛰어난 효능을 나타내어 기능성 화장품 소재로써 활용 가능성을 시사하였다.

따라서 본 연구에서는 Kang KS 등²⁹)의 결과를 바탕으로 효능이 우수한 토사자를 에탄올로 추출한 후 UVB를 조사한 섬유아세포에서 주름개선에 대한 영향을 평가하기 위하여 이와 관련된 다양한 바이오마커를 측정하였다.

MMPs는 domain에 의해 28개(MMP-1~28)로 분류되고 그 중 MMP-1과 3은 collagen, proteoglycan, fibronectin, laminin 등의 기질단백질을 분해하며, MMP-9은 collagen을 분해한다³⁰). UVB 및 외부자극에 의해 MMPs의 발현 증가와 활성이 유도되어지고 이들의 발현과 활성은 광노화가 진행되는 피부에서 더욱 증가되어 나타난다³¹). 토사자 에탄올 추출물은 UVB에 의해 발현과 활성이 증가되어 세포 내 collagen을 분해하는 MMP-1, 3, 9 생성량을 10, 100 µg/ml 농도에서 감소시켰으며(Fig. 2-4), MMP-1, 9 유전자 발현량을 1, 10, 100 µg/ml 농도에서, MMP-3는 10, 100 µg/ml 농도에서 감소시켰다(Fig. 7-9). 따라서 UVB 조사로 증가된 MMPs에 대한 토사자 에탄올 추출물의 유의적인 감소 효능은 피부 탄력을 유지하는 collagen 분해를 억제하여 주름생성을 방어할 수 있을 것이라 사료된다.

3개의 pro-alpha 폴리펩티드사슬이 연결되어 전구체인 procollagen을 형성한 후, collagen의 합성이 시작되고 여러 collagen과 교차결합이 이루어져 아미노산 구조와 함께 피부장력 및 피부탄력을 증가시킨다³²). 이러한 collagen은 MMPs에 의해 분해와 합성이 지속적으로 이루어지며, MMPs의 활성의 증가를 억제하기 위해 TIMP-1 단백질을 통해 피부탄력 대한 항상성을 유지하고 있다³³). 토사자 에탄올 추출물은 증가된 MMPs의 활성을 억제하여 항상성을 유지하는 TIMP-1의 생성량과 유전자 발현량을 10, 100 µg/ml 농도에서 증가시켰으며(Fig. 5, 10), 피부조직에 탄력을 제공하는 collagen의 전구체인 type I procollagen의 생성량은 10, 100 µg/ml 농도에서, 유전자 발현량은 1, 10, 100 µg/ml 농도에서 증가시켰다(Fig. 6, 11). 따라서 UVB 조사로 감소된 TIMP-1과 type I procollagen에 대한 토사자 에탄올 추출물의 유의적인 증가 효능은 UVB로 인해 증가된 MMPs를 억제하고 collagen 합성을 증가시켜 주름생성을 방어할 수 있을 것이라 사료된다.

이상의 결과를 종합해보면 토사자 에탄올 추출물은 UVB를 조사한 인간 섬유아세포에서 주름개선 관련 생리표지들을 개선시켰다. 따라서 피부노화와 주름개선에 대한 추가적인 연구결과가 뒷받침 된다면 UVB에 대해 보호효과를 나타내는 천연물 및 한방 기능

성화장품 소재로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

결론

본 연구에서는 토사자 에탄올 추출물의 주름개선 효과를 객관적으로 평가하기 위하여 인간 섬유아세포인 CCD-986Sk 세포에 UVB를 조사하여 피부노화를 유도한 후, 다양한 바이오마커를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

토사자 에탄올 추출물은 피부노화의 주요 원인인 MMPs 생성량 및 발현량을 유의적으로 감소시켰으며, 이러한 MMPs를 조절하여 항상성을 유지하는 TIMP-1 생성량 및 발현량은 유의적으로 증가시켰다. 또한, 세포 외 기질을 구성하는 collagen의 전구체인 type I procollagen 생성량 및 발현량 역시 유의적으로 증가시켰으므로 주름과 관련된 바이오마커들의 조절을 통해 주름개선 효능이 객관적으로 증명되었다.

이에 준하여 향후 다양한 용매 분획물을 이용한 추가적인 실험결과가 보완된다면 주름개선과 관련된 천연물 및 한방 기능성 화장품 소재로의 개발 가능성이 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구 지역혁신센터의 지원에 의한 것입니다.

References

1. Lee KM, Lim SC, Kim JS, Lee BH. A clinical study on facial wrinkles treated with miso facial acupuncture-measured by the facial skin photographing system. *Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 2010;27(1):101-7.
2. Kim YJ, Yoon YM. Regulation of CollA1 and MMP1 expression by taurine, major component of oyster, in human dermal fibroblasts. *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetics Society*. 2013;11(2):393-7.
3. Yoon YM, Choi SJ, Park WJ, Eom SY, Lee SK, et al. The Protective Effect of Extracts of *Bifidobacterium longum* against ultraviolet B in human dermal fibroblasts. *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetics Society*. 2012;10(4):887-91.
4. Seite S, Zucchi H, Septier D, Igondjo-Tchen S, Senni K, et al. Elastin changes during chronological and photo ageing: the important role of lysozyme. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2006;20(8):980-7.
5. Wlaschek M, Tancheva-Poór I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *Journal of Photochemistry and Photobiology*

- B: Biology. 2001;63(1-3):41-51.
6. Kim YA, Kim DH, Kim YA, Yu JM, Park BJ, et al. Anti-aging effects of casuarictin on UVB-induced CCD-986sk cell. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 2017;60(1):13-7.
 7. Vile GF, Tyrrell RM. UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins in vitro and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995;18(4):721-30.
 8. So SH, Lee SK, Hwang EI, Koo BS, Han GH, et al. Mechanisms of Korean red ginseng and herb extracts (KTNG0345) for anti-wrinkle activity. *Journal of Ginseng Research*. 2008;32(1):39-47.
 9. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, et al. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature*. 1996;379(6563):335.
 10. Kwon SB. Effects of Phytosphingosine-1-phosphate and Epidermal Growth Factor on Skin Wrinkles and Elasticity Improvement. Graduate School of Konkuk University. 2014.
 11. Jin SS. Study on the Effect of Semen Cuscutae. Graduate School of Wonkwang University. 2001.
 12. Heo, J. DongEuiBoGam. DongEuiBoGamBooks. 2006:2025-6.
 13. Kim HH. A study of medicinal herbs available for a skin beauty treatment and the efficacy. Graduate School of Catholic University. 2003.
 14. Song JS. Oriental skin beauty. Hyorim, 1993.
 15. Hongzhu, G., Jiashi, L. Study on constituents of the seed from *Cuscuta australis*. *Beijing University of Traditional Chinese Medicine*. 2000;23(3):20-2.
 16. MIYAHARA K, Du XM, WATAMABE M, Sugimura C, Yahara S, Nohara T. Resin glycosides. XXIII. Two novel acylated trisaccharides related to resin glycoside from the seeds of *Cuscuta chinensis*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1996;44(3):481-5.
 17. Lee MY, Jeon SJ. Effect of *Cuscutae* extract on experimentally induced liver damage in rabbits. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 1989;18:333-7.
 18. Han JW. Effects of semen *cuscutae* aqua-acupuncture on the blood pressure in spontaneously hypertensive rats. Graduate School of Wooseok University. 1998.
 19. Kim EJ. Anti-hyperlipidemic effects of *Cuscutae* Semen. Graduate School of Sookmyung Women's University. 1996.
 20. Jeon YH, Kim MH, Kim MR. Antioxidative and Antimutagenic Activity of Ethanol Extracts from *Cuscutae* Semen *Korean Journal of Food & Cookery Science*. 2008;24:46-51.
 21. Lee SH. Studies on the Growth-Inhibitory Effects of *Cuscuta japonica* Choisy's Extracts against *Propionibacterium acnes*. Graduate School of Catholic University. 2002.
 22. Joe WA, Cheon SJ, Jang MJ, Sung JY, Jung SH, et al. Study of the Cosmeceutical Activities of *Cuscuta japonica* Choisy. *The Korea journal of herbology*. 2006;21:103-8.
 23. Chang SJ, Suk KD. Inhibitory Effects on Melanin Biosynthesis and Tyrosinase Activity, Cytotoxicity in Clone M-3 and Antioxidant Activity by *Cuscuta japonica*, *C. australis*, and *C. chinensis* Extracts. *Yakhak Hoeji*. 2006;50:421-8.
 24. Kim SE, Li SH. The Effect of Semen *cuscutae* Extracts on the Acne Skin. *Korean Journal of Aesthetics and Cosmetics Society*. 2012;10(3):493-501.
 25. Ichihashi M, Ueda M, Budiyo A, Bito T, Oka M, et al. UV-induced skin damage. *Toxicology*. 2003;189(1-2):21-39.
 26. Lee H, Bae SK, Pyo M, Heo Y, Kim CG, Kang C, Kim E. Anti-wrinkle effect of PLA2-free bee venom against UVB-irradiated human skin cells. *Journal of Agriculture and Life Science*. 2015;49(1):125-35.
 27. Joo DH, Yoo DH, Lee JY. A Study on the Anti-wrinkle Activities of *Sesamum indicum* L. Ethanol Extracts on CCD-986sk. *Journal of the society of cosmetic scientists of korea*. 2016;42(4):377-85.
 28. Park MA, Sim MJ, Kim YC. Anti-photoaging effects of *Angelica acutiloba* root ethanol extract in human dermal fibroblasts. *Toxicological research*. 2017;33(2):125.
 29. Kang KS, Kim ID, Kwon RH, Heo YY, Oh SH, et al. The evaluation of anti-wrinkle effects in oriental herb extract. *Journal of Life Science*. 2007;17(8):1147-51.
 30. Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. *Textbook of dermatology*. Blackwell. 2004:49:32-49.
 31. Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, Meewes C, Wlaschek M. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Experimental gerontology*. 2000;35(3):307-16.
 32. Ahn SY. An opening step of cosmetic dermatology. *Shinheung MedScience*. 2003.
 33. Yamamoto T, Eckes B, Mauch C, Hartmann K, Krieg T. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 α loop. *The Journal of Immunology*. 2000;164(12):6174-9.