

# Esculetin을 담지한 ZnO microsphere 외용제의 광노화 차단 상가 효능

이창현 · 한윤봉<sup>1</sup> · 정한솔<sup>2\*</sup>

우석대학교 한의과대학 해부학교실, 1: 전북대학교 반도체화학공학부, 2: 부산대학교 한의학전문대학원 응용의학부

## Additive Anti-photoaging Effect of the ZnO Microsphere Soaked with Esculetin

Chang Hyun Lee, Yoon Bong Hahn<sup>1</sup>, Han-Sol Jeong<sup>2\*</sup>

Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Woosuk University,

1: School of Semiconductor and Chemical Engineering, Nanomaterials Processing Research Center, Chonbuk National University,

2: School of Korean Medicine, Division of Applied Medicine, Pusan National University

This study was aimed to examine the synergetic effects of photochemopreventive external agents composed of inorganic ZnO and esculetin. Zinc oxide (ZnO) is widely used in sunblocks because of its excellent biostability and little toxicity. Esculetin derived from Citrus Peel has an anti-oxidative effect. We made the hollow-shaped ZnO microsphere (MS), soaked it with esculetin (EZnO). We used SKH-1 mice to measure the photodamaging effects of UVB. The mice were divided into five groups as follows: UVB nontreated group (N), vehicle (C), esculetin (E), ZnO MS (ZnO), esculetin + ZnO MS(EZnO) group. Each group of samples was topically applied to the dorsal skins before the UVB irradiation. The changes of collagen fibers in the skin tissues were observed by H & E staining and Van Gieson staining. The expression of mast cells in skin tissue was observed by immunohistochemical staining of tryptase present in the mast cell granules. Expression of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and MMP-9, which plays an essential role in wrinkle formation, was measured by RT-PCR. Interestingly, the composition of collagen fibers was better in the EZnO applied group than in the E or ZnO group. Moreover, mast cell expression and the expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and MMP-9 mRNA were markedly suppressed in the EZnO group, indicating that the synergetic effects of esculetin and ZnO were excellent.

keywords : ZnO microsphere, Esculetin, Anti-oxidative, UVB

### 서 론

피부는 신체에서 가장 큰 기관으로 외부 해로운 환경으로부터 신체를 보호하는 역할을 담당한다. 많은 환경적, 유전적 인자가 피부질환을 일으키지만, 태양광선 중 자외선은 피부손상을 유도하는 대표적인 환경 인자이다. 자외선은 피부의 구조와 기능에 상당한 위험을 줄 수 있다. 자외선에 노출되는 피부의 상태와 자외선의 유형 및 조사량에 따라 피부 화상, 홍반, 부종 등의 국소 염증, 면역억제 및 심할 경우 피부암까지도 유발할 수 있다<sup>1)</sup>. 지속적인 자외선에 대한 노출은 색소침착, 피부 주름, 탄성의 감소, 피부의 상처치유 지연 등을 특징으로 하는 광노화를 초래한다<sup>2,3)</sup>. 자외선으로 인한 다양한 피부 손상 가운데 광노화와 피부암은 가장 큰 관심사이다<sup>4)</sup>.

광노화란 정상적인 노화의 과정에서 나타나는 피부의 변화에 만성적인 자외선에 대한 노출로 인한 손상이 더해진 결과 나타나는

피부의 노화를 말한다. 광노화의 과정을 거친 피부의 결합조직의 변형은 피부의 외관과 기능을 감퇴시킨다.

광노화를 일으키는 기전으로 UV-A(320~400 nm) 및 UV-B(290~320 nm) 노출에 의한 세포 내 활성산소의 발생과, 염증성 전사인자의 활성화로 보고되고 있다. 자외선의 조사는 활성산소를 만들어내고 이들은 세포표면의 다양한 수용체를 활성화시킨다<sup>5)</sup>. 수용체가 활성화되면 세포 내 스트레스 신호가 활성화되고 결국 전사인자를 활성화시켜 염증반응을 촉진하고 세포내 기질을 파괴시키는 금속기질단백분해효소 (matrix metalloproteinase; MMP)와 같은 효소를 생산함으로써 피부결합조직의 손상을 초래한다<sup>6-8)</sup>.

이러한 UV에 의한 광손상 (photodamage)을 억제하고자 photochemoprotection의 개념이 등장하였다<sup>9)</sup>. 광노화는 현대 피부과학에서 해결되지 못한 문제로 남아 있으며, 광노화의 병리기전과 치료방안에 대한 메타분석 결과 UV와 피부사이의 상호작용에

\* Corresponding author

Han-Sol Jeong, School of Korean Medicine, Pusan National University, 49, Busandaehak-ro, Mulgeum-eup, Yangsan-si, Gyeongsangnam-do, Korea

E-mail : jhsol33@pusan.ac.kr Tel : +82-51-510-8461

Received : 2019/02/01 Revised : 2018/02/20 Accepted : 2018/02/25

© 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.2019.02.33.1.25

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

방, 즉 물리적 보호/ UV로부터 받은 손상 경감 또는 기존의 광노화 증상을 개선하는 방안이 제시되고 있다<sup>10</sup>.

식물이나 한약 추출물 등 천연물을 기반으로 하는 피부노화 및 광노화방지 시장은 지속적으로 성장하고 있다<sup>11</sup>. 물푸레나무 껍질인 秦皮는味が苦하면서 性이 寒하고 澀하여 清熱燥濕하는 가운데 收斂시키는 효능이 있어 風寒濕痺를 치료하며<sup>12</sup>, 東醫寶鑑에서는 肝의 오랜 열기로 두 눈에 피가 지고 부으면서 아픈 것과 바람을 맞으면 눈물이 계속 흐르는 것을 낫게 하며 눈에 생기는 푸른 예막, 흰 예막을 없앤다고 기록되어 있다<sup>13</sup>. 秦皮의 주요 성분인 esculetin 항산화, 항염 효능이 있어 다양한 세포에서 산화적 손상으로부터 세포보호 작용을 하는 것으로 보고되었다<sup>14-17</sup>.

ZnO는 화장품, 제약, 식품첨가물 등 많은 산업에서 사용되는 신소재로서 안전성과 저비용, 생체분자 감지에 유리한 넓은 밴드갭 반도체의 특성을 가지고 있어서 나노의학분야에 높은 관심을 받고 있는 물질이다<sup>18-20</sup>.

본 연구에서는 메타분석 결과 광노화의 예방과 치료에 관한 큰 두 가지 접근, 즉 UV로부터의 물리적 보호와 UV에 의한 피부의 광노화 손상을 경감시키는 전략을 동시에 피하고자, 기존에 자외선 차단제에 응용되고 있는 산화 아연을 microsphere구조로 제조한 후 항산화 및 항염증효능이 있는 진피추출물인 esculetin을 담지시켜 위의 두 가지 효능을 동시에 갖춘 한방 외용제를 만든 후, 광손상 억제 효과와 기전을 실험하여 유의미한 결과를 도출하였기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. ZnO microsphere의 조제와 esculetin의 담지

ZnO microsphere는 가운데 구멍이 있는 나노/마이크로 cage 모양을 갖는 구조로서(Fig. 1) 비표면적이 넓어서 약재코팅과 주입이 가능한 구조이다. 나노 구조 제조방법은 기상법과 용액법이 있는데, 본 연구에서는 기상법과 저온 용액법을 혼용하여 사용하였다. Zinc nitrate hexahydrate [Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O], hexamethylenetetramine [HMTA; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>], sodium citrate tribasic [C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O], ammonia solution [NH<sub>4</sub>OH]는 Sigma Aldrich에서 구입하였다. ZnO sphere구조는 0.02M의 zinc nitrate hexahydrate와 HMTA를 100 ml의 물에 녹인 후 0.005 M의 sodium citrate tribasic을 첨가하여 상온에서 녹였다. 녹인 용액을 환류반응기 Si (100)기판으로 옮기고 80 °C에서 1시간 동안 환류시킨 후 착색된 백색의 착색물을 다음 단계에 사용하였다. ZnO microsphere는 0.01 M의 zinc nitrate hexahydrate와 HMTA를 100 ml의 물에 녹인 후 0.002 의 sodium citrate tribasic을 첨가하여 10분간 녹였다. 녹인 용액을 다시 환류반응기에 옮기고, 80°C에서 15, 30, 45, 60, 75 분간 반응 시간을 다양하게 하였다. 용액의 pH는 NH<sub>4</sub>OH를 이용하여 9로 맞추었다. ZnO microsphere 구조형태는 필드방사주사 전자현미경 (FESEM)과 투과전자현미경 (TEM), 고해상도전자현미경 (HRTEM)에 의하여 관찰하였다. 합성된 ZnO microsphere 결정상은 X선 회절계로 측정하였다. ZnO microsphere에 esculetin을 담지하는 방법은 ZnO microsphere를 esculetin에

넣어서 담지시키는 방법을 사용하였으며, 상압 담지법과 진공 담지법을 이용하였다.

### 2. 실험동물 및 처치

7주령 수컷 SKH-1 hairless mice는 오리에트바이오에서 구입하여 항온항습 (22 ± 2°C, 65 ± 2%) 조건을 유지하며 1주일간 사육실에서 적응시킨 후 사용하였다. 동물실험은 부산대학교 동물실험윤리위원회의 승인(PNU-2012-0186)을 받아 실시하였다. 군당 3마리의 동물을 배정하여 다음과 같이 5개의 실험군으로 나누어 실험을 진행하였다. 1군: Vehicle (기본로션)도포군/ 2군: Vehicle도포 30분 후 UVB 조사/ 3군: Vehicle+ Esculetin 도포 30분 후 UVB조사 / 4군: Vehicle + ZnO MS 도포 30분 후 UVB조사/ 5군: Vehicle + Esculetin 담지한 ZnO MS 도포 30분 후 UVB조사. Esculetin 및 ZnO MS, EZnO는 각각 1%의 농도로 vehicle에 녹여 사용하였다. 2 - 5군의 동물들의 UVB조사는 avertin으로 마취한 후 눈을 가리고 등 부위에 조사하였고, 최종 조사량은 300 mJ/cm<sup>2</sup>로 하였고, 3일 후 다시 300 mJ/cm<sup>2</sup>, 이어서 3일 후에 최종 400 mJ/cm<sup>2</sup> 를 조사하였고, 3일 후 hairless 생쥐를 희생시킨 후 등 피부조직을 채취하였다. UVB조사 장치는 BLX-254 (VIVER, FRANCE)를 이용하였다.

### 3. 피부조직의 H&E, Van Gieson염색 및 면역조직화학 염색

피부조직은 Bouin solution에 24시간 고정시킨 후 탈수, 파라핀 포매를 거친 후, 7µm의 두께로 자른 후 슬라이드 글라스에서 옅고, xylene으로 파라핀을 제거한 후 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 시행하였다. 또 진피층내 교원질섬유의 변화를 관찰하고자 Van Gieson's 염색 시행하였다. 또한 피부조직내 비만세포의 활성을 관찰하고자 비만세포 과립에 존재하는 tryptase에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다.

### 4. 총 RNA 추출과 RT-PCR

피부조직에서의 RNA의 추출은 Trizol reagent (Invitrogen, CA, USA)를 이용하였다. 추출한 RNA는 spectrophotometer를 이용하여 정량한 후 M-MLV reverse transcriptase (Promega, WI, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, 이후 MMP-9, TNF-α, IL-1β, GAPDH에 대한 primer를 제작한 후 PCR방법으로 증폭하였다. 본 실험에서 이용된 primer는 Table 1과 같다. 증폭된 PCR 결과물은 1.0% agarose gel에 전기영동을 시행한 후 GelDoC Imaging System (UVP, Upland, CA, USA)를 이용하여 저장하였다.

Table 1. List of primers used in this study

Primer	Primer Sequence	Product Size (bp)	Accession No.
MMP-9	F 5-CTCTGCTGCCCTTACCAG-3	281	NM_013599.4
	R 5-AGGTTTGGAAATCGACCCACG-3		
TNF-α	F 5-AGGCACTCCCCAAAAGATG-3	213	NM_001278601.1
	R 5-CCACTTGGTGGTTTGTGAGTG-3		
IL-1β	F 5-GCCACCTTTTGACAGTGATGAG-3	289	NM_008361.4
	R 5-CCATGAGTCACAGAGGATGGG-3		
GAPDH	F 5-CCCTTAAGAGGGATGCTGCC -3	263	NM_001289726.1
	R 5- ACTGTGCCGTTGAATTTGCC -3		

## 결 과

### 1. ZnO microsphere 제조 및 한약추출물 담지

Fig. 1, 2에서 보는 바와 같이 open되어 있는 항아리구조의 ZnO를 제조하고(Fig. 1A, 1B), 한약재 추출물에 담지시켰다(Fig. 1C, 1D). TEM 분석을 통해 ZnO microsphere의 hollow space(Fig. 2A)가 한약재추출물로 완전히 채워져 있음을 확인하였다(Fig. 2B).

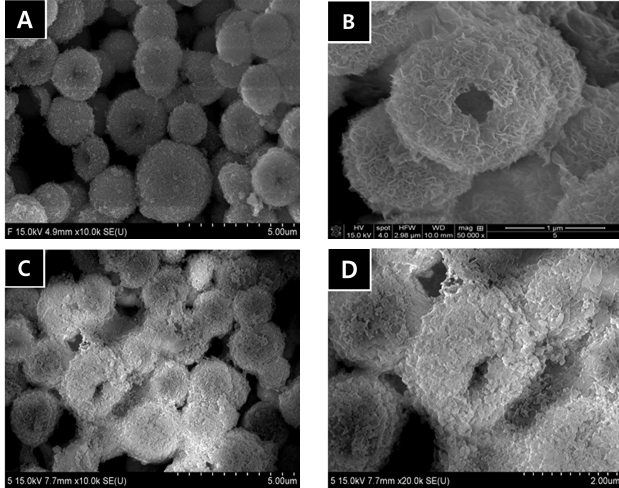


Fig. 1. Field Emission- Scanning Electron Microscope (FE-SEM) images showing the opened ZnO hollow microsphere (MS) (A), (B) and opened ZnO hollow MS soaked with esculetin (C), (D).

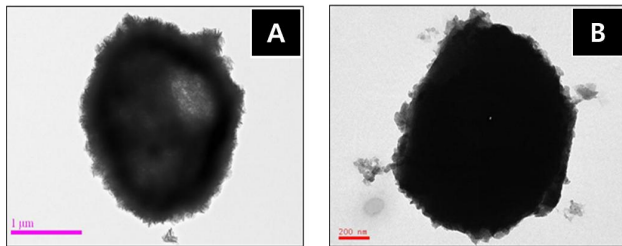


Fig. 2. Transmission electron microscopy (TEM) images showing unsoaked ZnO hollow microsphere (MS) (A), ZnO hollow microsphere (MS) soaked with esculetin (B).

### 2. Esculetin을 담지한 ZnO MS의 UVB로 유도한 Sunburn에 미치는 효능 관찰(In vivo)

UVB로 인한 Sunburn 모델을 만들기 위하여 SKH-1 hairless mice를 사용하였다. SKH-1 mice를 다섯 군으로 나누어 실험을 진행하였다. Olive oil 500ml를 가열하여 50g의 밀납을 섞어 외용 Vehicle을 만들었고, Vehicle에 esculetin, ZnO MS, esculetin을 담지한 ZnO MS를 섞어서 외용제를 제작하였다(1% 농도). 우선 모든 군의 hairless 생쥐는 avertin으로 마취한 후 등에 외용제를 도포하였다. 첫째 군은 Vehicle만을 도포하고 UVB는 조사하지 않았고 (Fig. 3. N), 둘째 군은 Vehicle 도포 후 UVB조사, 셋째 군은 Vehicle + Esculetin도포 후 UVB조사, 넷째 군은 Vehicle + ZnO MS 도포 후 UVB조사, 다섯째 군은 Vehicle+ esculetin 담지한 ZnO MS 도포 후 UVB조사를 하였다(Fig. 3).

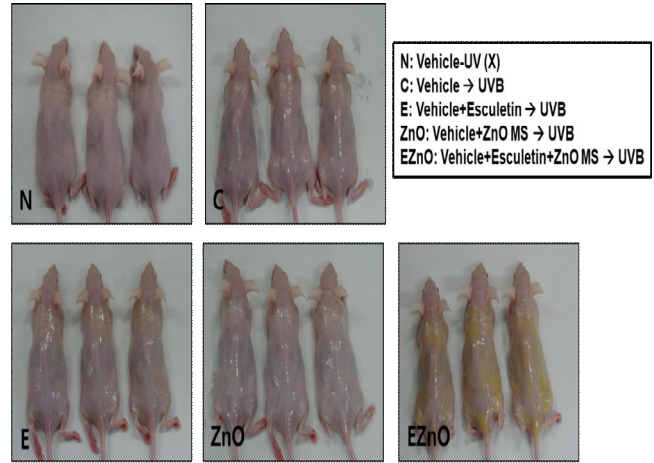


Fig. 3. SKH-1 hairless mice were divided into five groups. The first group of mice was received only vehicle without UVB irradiation(N), second to fifth group of mice was received each sample to their dorsal skin for 30 min, before the UVB irradiation.

### 3. H&E 및 Van Gieson 염색 소견

H&E, Van Gieson 염색을 통해 표피-진피결합부위에서 교원섬유의 변화를 관찰하였다(Fig. 4, 5) UVB를 조사하지 않은 정상군(N)의 표피 밑의 진피층(특히 유두층)에는 교원질 섬유가 촘촘히 띠 모양으로 존재하고 있었고(Fig. 4. N), acid fuchsin에 대한 강하게 염색된 교원섬유가 관찰되었으나(Fig. 5. N) UVB를 조사한 양성 대조군(C)의 교원질 섬유는 현저히 감소되어 있었고(Fig. 4. N), acid fuchsin에 미약하게 염색되었다(Fig. 5. C). 그러나 esculetin, ZnO와 EZnO도포군의 진피 유두층에서는 대조군에 비하여 비교적 온전한 교원질 섬유가 관찰되었고, acid fuchsin에 대하여도 비교적 강한 염색반응이 관찰되었다 (Fig. 4, 5. E, ZnO, EZnO). 이는 esculetin, ZnO와 EZnO가 표피-진피결합부위에서 교원섬유 단백질의 분해를 억제하여 주름생성을 억제할 수 있음을 시사하는 바이다.

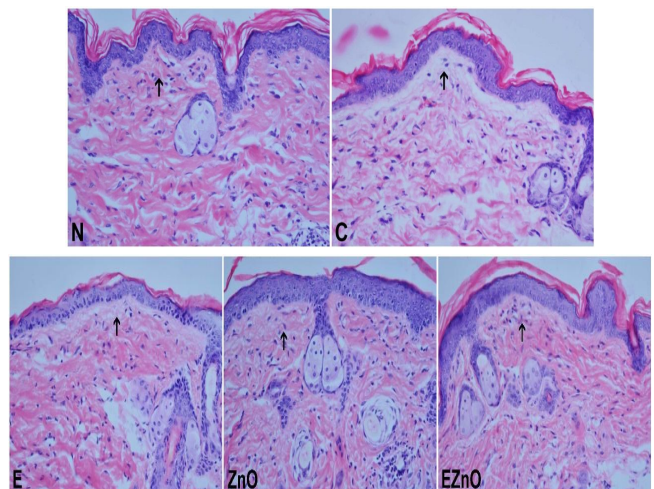


Fig. 4. Histological changes in the dorsal skin of SKH-1 mice exposed to 300mJ/cm<sup>2</sup> UVB irradiated experimental groups(C, E, ZnO, EZnO) and non-irradiated normal group (N)(H&E stain, x200). UVB irradiation resulted in denaturation of collagen fibers in the dermis of the dorsal skin of SKH-1 mice, and esculetin, ZnO, and EZnO application effectively inhibited denaturation of collagen fibers due to UVB.



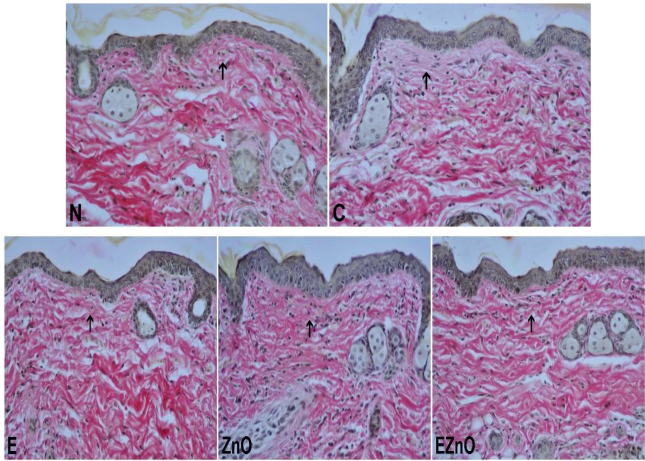


Fig. 5. Histological changes in the skin of SKH-1 mice exposed to 300mJ/cm<sup>2</sup> UVB irradiated experimental groups (C, E, ZnO, EZnO) and non-irradiated normal group (N) (Van Gieson staining, x200). In Van Gieson staining, it was confirmed that the denaturation of collagen fibers induced by UVB was effectively inhibited in E, ZnO and EZnO application groups as in the above H & E staining.

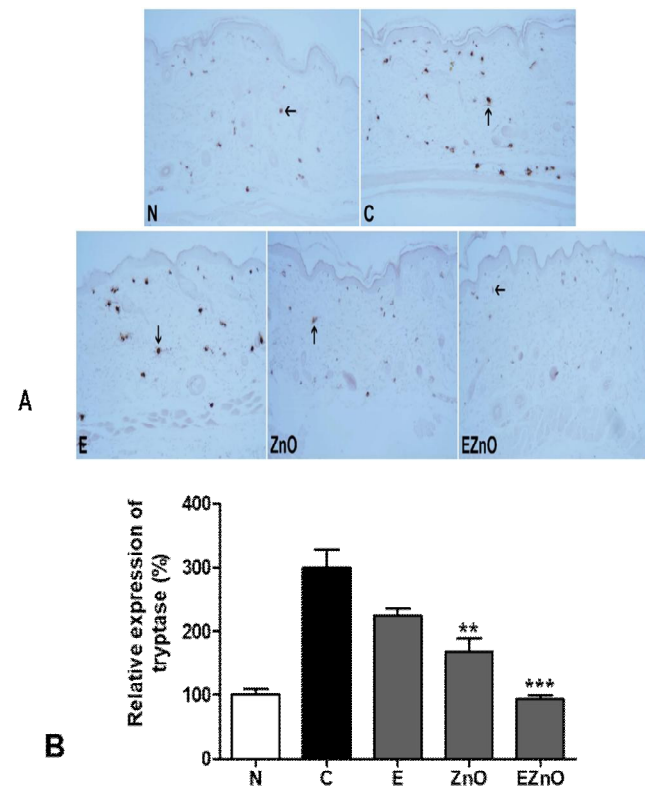


Fig. 6. Immunohistological changes of mast cell tryptase in dorsal skin of SKH-1 mice exposed to UVB irradiated experimental groups (C, E, ZnO, EZnO) and non-irradiated normal group (N)(mast cell tryptase immunohistochemical stain, x200) (A). ZnO and EZnO treatment significantly suppressed the expression of mast cells in the dermis elicited by UV irradiation (B). Values are represented as the mean  $\pm$  SD. \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.05 indicates significant differences from the control group.

#### 4. Mast cell tryptase에 대한 면역염색반응

SKH-1 hairless mice의 피부조직내 진피층의 비만세포내 분

비과립을 관찰하기 위하여 mast cell 과립에 존재하는 tryptase에 대한 면역조직화학 염색을 시행하였다. Mast cell tryptase 양성 비만 세포는 UVB를 조사하지 않은 정상군의 진피층에서는 미약하게 발현되었으나(Fig. 6, N), UVB를 조사한 양성 대조군의 진피층에서는 N군에 비해 다수의 세포들이 관찰되었다(Fig. 6, C). 실험군에서는 대조군보다는 tryptase양성 세포들이 적었으며, 특히 EZnO 도포군에서 Mast cell tryptase에 대한 면역염색 반응이 가장 두드러지게 감소하였다(Fig. 6, EZnO).

#### 5. UVB로 유도한 염증성 사이토카인, 기질단백분해효소의 mRNA 발현 억제

ZnO MS에 담지한 esculetin 외용제의 보호기전을 관찰하고자, 다섯 군의 hairless mouse의 등피부에서 전체 RNA를 추출하였다. 정량 후 역전사효소를 이용하여 cDNA를 만든 후 MMP-9, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 에 대한 primer를 이용하여 PCR 반응을 하였다. 내부 대조 유전자로는 GAPDH를 이용하였다. RT-PCR을 시행한 결과 기질단백분해효소 MMP-9과 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 의 발현은 ZnO MS에 담지한 esculetin을 도포한 군의 등 피부에서 가장 적었으나, IL-1 $\beta$ 는 ZnO MS 자체의 효과가 더 우수하였다 (Fig. 7).

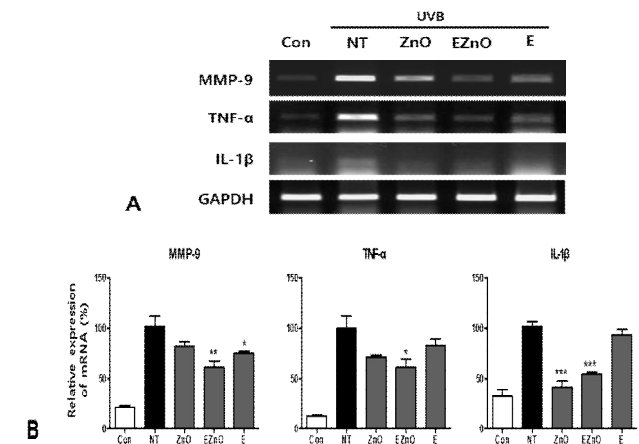


Fig. 7. EZnO's effects on the mRNA expression of MMP-9, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ . EZnO treatment markedly inhibited the mRNA expression of MMP-9, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  (A). Each sample was typically applied to the dorsal skin of hairless mice 30 min before the irradiation of UVB (300 mJ/cm<sup>2</sup>). The bar graphs show the percentages of the band intensities normalized to GAPDH for individual samples. Values are represented as the mean  $\pm$  SD. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 indicate significant difference from the NT group; statistical analyses were by ANOVA (B).

## 고찰

야외활동의 증가와 환경의 변화로 인하여 자외선에 노출되는 양이 늘어남에 따라 피부노화와 피부암의 발생 또한 증가하고 있다. 자외선에 만성적인 노출은 피부화상, 백내장, 피부의 광노화, 면역억제, 피부암 발생에 이르기까지 인체의 피부에 방대한 손상을 유발한다. 다양한 손상 가운데 피부광노화와 피부암의 발생은 가장 큰 관심사이다. 자외선에 대한 차단은 자외선에 대한 보호대책 가운데 가장 우선적으로 고려하는 전략이다. 자외선에 의한 광노화의

억제하려면 자외선에 대한 노출을 최소화해야 하며, 자외선에 노출된 이후의 이차 반응인 산화적 손상을 억제해야 한다. Photochemoprevention은 한약이나 천연물에 존재하는 항산화물질을 복용하거나 피부에 도포함으로써 피부의 광노화와 피부암을 줄이기 위한 방안으로 주목받고 있다.

자외선 차단제로 널리 사용되는 미네랄인 산화아연(zinc oxide; ZnO)은 자외선 손상을 효율적으로 차단하며, 피부자극이 없어 과민반응을 초래하지 않는 장점이 있다<sup>21)</sup>. 진피의 성분인 esculetin은 항산화효능으로 잘 알려져 있으며<sup>14)</sup>, 인간의 진피 섬유모세포에서 UVB로 유도한 자유라디칼을 강력하게 억제하는 효능이 있다<sup>15)</sup>.

본 연구는 안전성이 우수한 산화아연 미립구 (nano or micro sized microsphere)에 항염 및 항산화활성을 가진 한약 추출 물질인 esculetin을 함유한 외용제를 제작하여, UV를 차단함과 동시에 UV로 인한 염증세포의 침윤, 염증성 사이토카인 분비, 활성산소를 제거하는 이중효과를 통하여 광노화를 억제하는 효과를 확인하고자 하였다.

본 연구에서는 산화아연 미립구에 esculetin을 담지하여 만든 외용제를 hairless mouse의 등피부에 바르고 30분 후, UVB를 조사하여 이들이 UVB로 인한 피부의 광노화를 효율적으로 방어하는지에 대한 synergy effect를 조사하였다. 광노화예방에 대한 효능을 관찰하고자 UVB로 인한 피부에서의 주름형성에 핵심 진단 표적 인 진피의 교원질 섬유의 변화를 피부조직검사를 통하여 확인하였다(Fig. 4, 5). H&E 염색과 Van Gieson 염색을 통하여 Esculetin만을 도포한 군 (E)과, ZnO MS만을 도포한 군 (ZnO), ZnO MS에 esculetin을 담지하여 도포한 군 (EZnO)의 피부조직의 교원질 섬유의 변화를 비교한 결과 세 군에서 모두 UVB로 인한 교원질 섬유 파괴가 억제되어 있음을 확인할 수 있었으나, esculetin보다는 ZnO, EZnO를 도포한 군에서의 교원질 섬유 파괴 억제가 조금 더 우수함을 확인할 수 있었다(Fig. 4, 5 E, ZnO, EZnO).

우리는 이어서 같은 피부조직에서 피부홍반과 염증반응에 중요한 역할을 담당하는 진피조직 내 비만세포의 활성을 면역조직화학염색을 통하여 관찰하였다. H&E 염색과 Van Gieson 염색을 통한 관찰과 같이 esculetin 도포군보다는 ZnO, EZnO를 도포한 군에서 비만세포의 발현이 감소되어 있었으며, 흥미롭게도 ZnO 도포군보다 EZnO 도포군에서 비만세포의 발현이 두드러지게 감소되어 있음을 확인하였다(Fig. 6A). 이에 UVB로 인한 피부염증 반응에서 나타나는 급성 염증성 사이토카인인 TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ <sup>22)</sup>와 피부주름형성에서 있어서 교원질을 분해함으로써 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려진 기질단백분해효소 MMP-9<sup>23)</sup>의 mRNA발현을 hairless mouse의 등피부조직을 떼어내어 RT-PCR기법으로 관찰하였다. 관찰한 결과 Fig. 6의 결과와 같이 UVB로 증가된 피부조직내 TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  그리고 MMP-9의 mRNA의 발현은 EZnO 도포군에서 가장 적었다(Fig. 7). 이는 esculetin을 ZnO MS에 담지하였을 때 UVB에 대한 피부손상의 방어에 시너지 효과가 있음을 시사한다.

ZnO는 UV를 잘 흡수하여 UV 차단제로 응용되고 있다. 광노화에 대한 피부손상이 UVB와 피부와의 접촉에서부터 시작하여 UVB에서 발생하는 ROS로부터 피부조직의 손상이 진행되는 과정

임을 확인하고, 이를 이중적으로 차단하는 전략으로 ZnO MS를 만든 후 여기에 진피의 성분인 esculetin을 담지하여 외용제를 만들었다. ZnO MS가 UVB의 조사를 받게 되면 불안정해지게 되고, 이에 ZnO MS 속에 담지된 esculetin이 불안정한 ZnO MS 밖으로 나와 UVB로 인한 피부손상의 방어를 하고자 하는 의도였다. Esculetin을 ZnO MS에 담지한 군에서 더 우수한 방어효능을 확인한 실험 결과로부터 이중으로 광노화의 발생을 억제하고자 하는 실험 전략이 작용하고 있음을 시사하고 있다. 향후 ZnO MS에 담지한 esculetin의 추출의 속도나 시간을 향후 측정하여 심화연구를 진행해 갈 수 있을 것으로 기대되며, 나노기술을 응용한 새로운 한방외용제의 개발은 한의학의 산업화에 양호한 기여를 할 수 있을 것으로 본다.

## 감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No.2014R1A5A2009936).

## References

1. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharm.* 2004;195(3):298-308.
2. Kligman LH. Photoaging. Manifestations, prevention, and treatment. *Dermatol Clin.* 1986;4(3):517-28.
3. Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;973:31-43.
4. Ahmad N, Mukhtar H. Cutaneous photochemoprotection by green tea: A brief review. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001;14(2):69-76.
5. Xu Y, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Oxidative inhibition of receptor-type protein-tyrosine phosphatase kappa by ultraviolet irradiation activates epidermal growth factor receptor in human keratinocytes. *J Biol Chem.* 2006;281(37):27389-97.
6. Fisher GJ, Talwar HS, Lin JY, Lin PP, McPhillips F, Wang ZQ, et al. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *J Clin Invest.* 1998;101(6):1432-40.
7. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol.* 2002;138(11):1462-70.
8. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J,

- Kang S, et al. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature*. 1996;379(6563):335-9.
9. Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res*. 2005;571(1-2):153-73.
  10. Kostyuk V, Potapovich A, Albuhaydar AR, Mayer W, De Luca C, Korkina L. Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics. *Rejuvenation Res*. 2018;21(2):91-101.
  11. Cavinato M, Waltenberger B, Baraldo G, Grade CVC, Stuppner H, Jansen-Dürr P. Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. *Biogerontology*. 2017;18(4):499-516.
  12. Joo YS. *Ungok Herbology*. Woosuk publishing company. 2013.
  13. Heo J. *Treasured Mirror of Eastern Medicine - Dongeuibogam - External Bodily Elements*, Volume 1. 1613.
  14. Kim SH, Kang KA, Zhang R, Piao MJ, Ko DO, Wang ZH, et al. Protective effect of esculetin against oxidative stress-induced cell damage via scavenging reactive oxygen species. *Acta Pharmacol Sin*. 2008;29(11):1319-26.
  15. Lee BC, Lee SY, Lee HJ, Sim GS, Kim JH, Kim JH, et al. Anti-oxidative and photo-protective effects of coumarins isolated from *Fraxinus chinensis*. *Arch Pharm Res*. 2007;30(10):1293-301.
  16. Subramaniam SR, Ellis EM. Esculetin-induced protection of human hepatoma HepG2 cells against hydrogen peroxide is associated with the Nrf2-dependent induction of the NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 gene. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;250(2):130-6.
  17. Han MH, Park C, Lee DS, Hong SH, Choi IW, Kim GY, et al. Cytoprotective effects of esculetin against oxidative stress are associated with the upregulation of Nrf2-mediated NQO1 expression via the activation of the ERK pathway. *Int J Mol Med*. 2017;39(2):380-6.
  18. Crabtree HG. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J*. 1929;23(3):536-45.
  19. Steele A, Bayer I, Loth E. Inherently superoleophobic nanocomposite coatings by spray atomization. *Nano Lett*. 2009;9(1):501-5.
  20. Rincker MJ, Hill GM, Link JE, Meyer AM, Rowntree JE. Effects of dietary zinc and iron supplementation on mineral excretion, body composition, and mineral status of nursery pigs. *J Anim Sci*. 2005;83(12):2762-74.
  21. Monteiro-Riviere NA, Wiench K, Landsiedel R, Schulte S, Inman AO, Riviere JE. Safety Evaluation of Sunscreen Formulations Containing Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in UVB Sunburned Skin: An In Vitro and In Vivo Study. *Toxicol Sci*. 2011;123(1):264-80.
  22. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and Proinflammatory Cytokines Synergistically Activate TNF-alpha Production in Keratinocytes through Enhanced Gene Transcription. *J Invest Dermatol*. 2009;129(4):994-1001.
  23. Kim HS, Song JH, Youn UJ, Hyun JW, Jeong WS, Lee MY, et al. Inhibition of UVB-induced wrinkle formation and MMP-9 expression by mangiferin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*. *Eur J Pharmacol*. 2012;689(1-3):38-44.