

천연물로부터의 항노화소재 개발: Triterpenoid계 식물성분인 Oleanolic acid의 항노화 효과

남개원, 이소희, 김승훈, 김수현, 성대석¹, 김수남, 이병곤
태평양기술연구원 피부과학연구소, ¹의약연구소

요 약

전반적인 피부세포의 생리적 기능 저하로 인한 자연노화와 더불어, 여러 피부 스트레스 요인들이 다양하게 작용하여 발생하는 외인성노화를 방지하거나, 개선할 수 있는 항노화소재로서의 개발 가능성을 알아보기 위해, 예로부터 항염활성이 있다고 알려진 oleanolic acid(OA)를 포함한 ursolic acid(UA), betulin, betulinic acid(BA) 등의 triterpenoids가 어떻게 피부에서의 항노화 활성을 나타내는지 알아보았다. 시험 결과, OA는 자외선에 의한 각질형성세포에서의 PGE₂ 생성과, 섬유아세포(NHF)에 의한 matrix metalloproteinase-1(MMP-1) 분비를 억제하였다. 그리고, NHF의 procollagen 생성을 촉진하였으며, 이런 procollagen 생성촉진활성이 *in vivo*에서도 발현되는 것을 무모생쥐의 실험을 통해서 확인하였다. 또한, OA는 각질세포의 증식과 분화를 촉진하여 표피세포로 하여금 세라마이드와 필라그린 생성을 증가시키도록 하는 작용도 있음을 보여주었다. 더불어 실험한 UA, betulin, BA 들은 비록, betulin, BA의 경우 세포독성이 다른 물질 들에 비해 높았고, UA가 각질세포의 분화를 오히려 억제하는 양상을 보이기는 했지만, 대부분의 기능은 OA와 유사하였다.

피부세포보호작용과 진피 기질물질에 대한 작용, 그리고, 표피의 장벽기능과 보습기능에 대해 시험한 본 연구는, 식물성분인 triterpenoids가 피부를 위한 항노화소재로서의 개발 가능성이 있음을 확인하는 계기가 되었고, 그 중에서도 OA가 보다 우수한 항노화 소재가 될 수 있음을 시사하고 있다.

1. 서 론

우리 몸의 최외각에 존재하면서 인체를 외부의 각종 위협으로부터 보호하는 기능을 하는 피부는 항상 다양한 외부자극과 접하기 때문에 다른 장기들에 비해 노화현상이 일어나기 쉬우며, 그 중에서도 얼굴 피부는 자외선, 건조 외기 등에 직접적으로 노출되어 있어, 그렇

지 않은 피부보다 주름 등의 노화현상이 조기에 발생한다. 피부에서 나타나는 노화증상은 그 발생원인에 따라 외인성 노화(광노화, photoaging)와 내인성 노화(자연노화, intrinsic aging, chronological aging)로 나눌 수 있다. 외인성 노화는 피부가 자외선에 노출됨으로써 발생하므로, 피부가 거칠어지거나, 색소침착, 피부의 처짐, 깊은 주름의 발생 등과 같은 증상을 보이며(1,2,3), 내인성 노화는 나이가 들에 따른 생리기능이 약화로 건조피부, 주름, 모공확대 및 피부 회복능의 저하 등의 증상이 발생하는 것을 가리킨다(4,5,6).

피부조직의 노화에 따른 가장 특징적인 조직학적 변화는 피부 기질(matrix)의 변화로서, 내인성 노화에 의해서는 기질의 양이 전반적으로 감소하여 피부의 두께가 얇아지며, 자외선에 많이 노출된 광노화 부위는 교원질(collagen)의 감소와 변성, 탄력질(elastin)의 증가나 변성, glycosaminoglycan (GAG)의 증가 조건이 있다. 궁극적으로는 이러한 기질의 변성이 피부의 탄력을 저하시키며, 나아가 주름의 형성에 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다. 생화학적 측면에서의 광노화된 피부 세포는 여러 성장인자에 대한 반응성이나 세포내 정보전달계의 활성이 저하되고, 산화 스트레스에 의한 손상도나 p53의 변이 등이 모두 내인성 노화 세포에 비해 그 정도가 크게 나타난다는 특징이 있다(7).

이러한 피부노화를 방지하거나 개선하고자 하는 욕구는 전반적인 생활수준의 향상에 비례하여 증가하고 있고, 그에 부응하려는 노력의 한 방편으로 항노화소재를 개발하고자 하는 시도도 활발히 진행되고 있다. 본 연구 역시, 위와 같은 맥락의 일환으로 천연물에서 항노화소재를 개발하고자 하는 일련의 연구로 진행되었으며, 저자 등은 1차 효능검색을 통하여 선정된 식물들의 항노화 활성성분을 찾는 과정에서 triterpenoids 성분의 하나인 oleanolic acid (OA)에 항노화활성이 있음을 발견하고, 그 작용기전을 밝히고자 하였다.

OA는 squalene으로부터 생합성 되는 C₃₀의 지방족 다환상 triterpenoid(그림 1)로서, 항염증, 항종양, 항알러지, 부종억제, 잇몸질환예방, cyclooxygenase 2(COX-2) 저해, 이노 및 면역조절작용 등이 있다고 알려져 있는 물질이다(8). OA는 다수의 식물에서 발견되며

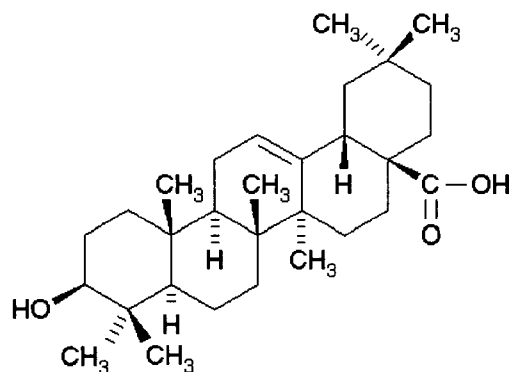


그림 1. Oleanolic acid (MW 456.7)의 구조

정향, 로즈마리(rosemary), 백리향, 라벤더(lavender), 깨꽃(salvia) 등의 식물에 다량 함유되어 있고, 백화사설초, 인삼, 비파엽, 산수유, 더덕 등에도 많이 들어 있는데, 이들 식물 들은 공통적으로 염증과 종양치료에 탁월한 효능이 있다고 알려진 것들이다. 본 연구에서는, OA의 항노화소재로서의 가능성을 파악하고, 그 구조와의 상관성을 알아보기 위해, 같은 triterpenoids 계열인 ursolic acid (UA), betulin, 또는 betulinic acid (BA) 등을 비교물질로 하여 세포보호작용, 교원질 생성촉진작용 및 matrix metalloproteinases (MMPs) 저해작용을 검토하였다. 나아가, 각질세포의 분화와 관련된 지표들에 대한 활성도 검토하였는데, 그러한 과정을 통하여 OA가 항노화소재로서 탁월한 효능이 있음을 확인하였기에 이에 보고한다.

2. 연구재료 및 시험방법

연구재료

본 연구에 사용한 HaCaT 세포주는 독일 암연구소(DKFZ)의 Norbert E. Fusenig 박사로부터 분양 받았으며, 사람 섬유아세포(normal human fibroblast; NHF)는 신생아 포피로부터 분리하여 계대 배양한 것을 사용하였다. Prostaglandin E₂ enzyme immuno assay(PEG₂ EIA kit, Cayman Chem. Co.), MMP-1 expression assay EIA(Amersham pharmacia, RPN 2610) 및 procollagen EIA(TaKaRa, MK101) assay에는 시판 kit를 이용했고, procollagen의 면역조직염색은 type I pN procollagen antibody(SP1.D8, Hybridoma Bank Co.)와 broad spectrum Histostatin-plus kit (Zymed Co)를, 그리고, filaggrin의 western blot에는 anti-human filaggrin mouse IgG1(BTI Inc., BT-576)과 HRP-conjugated anti-mouse IgG sheep antibody(Amersham) 및 ECL western blotting detection reagent(Amersham)를 이용하였다. 우태아 혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 배양용 배지는 주로 Gibco-BRL 사의 것을 사용하였고, 그 밖에, [³⁵S]-methionine/cysteine mixture(2 uCi/ml)는 ICN Biomedicals 사의 것을, 그리고, ceramide standard(nonhydroxy ceramides, C2137, hydroxy ceramides, C2512)를 비롯한 MTT{(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide}, OA, UA, sodium dodecyl sulfate(SDS), dithiothreitol(DTT) 같은 대부분의 시약은 Sigma 사의 제품을 사용하였다.

시험방법

자외선에 의한 프로스타글란딘 E₂ (prostaglandin E₂; PGE₂) 생성

사람 유래 각질형성세포주인 HaCaT 세포를 96-well plate에 2×10^4 cells/well 의 밀도로 분주하고, 500 uM의 aspirin을 가한 뒤 2시간 CO₂-incubator에서 배양하여 COX-1을 불활성화 시켰다. PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)로 2회 세척한 다음, 새로운 PBS를 가하고 20 mJ/cm² 용량의 자외선 B(UVB)를 조사하였다. 검색시료가 포함된 0.1% FBS 함유 phenol red-free DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 가하여 24시간 배양한 후에 배지 중으로 분비된 PGE₂의 양을 Cayman 사의 PGE₂ EIA kit를 이용하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 측정하였다.

MMP-1 expression assay

NHF를 48 well-plate에 1×10^4 cells/well의 밀도로 분주하고, 10% FBS, DMEM 배지에서 24 시간 배양한 후에, 혈청이 없는 배지에서 24시간 동안 더 배양한다. PBS로 1회 세척하고, 새로운 PBS를 100 μ l 가한 상태에서 자외선 A(UVA) 15 J/cm²를 조사하였다. PBS를 제거하고, 혈청이 없는 새로운 배지에 시험물질을 처리하여 각 well에 500 μ l 씩 넣어주고, 48 시간 배양한 후, 배지를 회수하여 MMP-1 양을 측정하였다. MMP-1의 측정은 시판되는 MMP-1 expression assay kit를 사용하여 ELISA 방법으로 측정하였으며, 각 배지에 포함된 총 단백질의 양으로 보정하여 MMP-1 발현량을 산정하였다.

Type I pN procollagen EIA assay

NHF를 48 well-plate에 1×10^4 cells/well의 세포농도로 분주하고, 10% FBS, DMEM 배지에서 24시간 배양한 후에, 시험물질과 무혈청 배지를 가하여 48시간 배양하였다. 배양 후에 회수한 배지에서 시판되는 procollagen EIA kit를 이용, ELISA 방법으로 procollagen 양을 측정하였으며, 이 값을 별도로 측정한 배지 중의 단백질 양으로 보정하였다.

in vivo Procollagen assay

신규로 생성되는 procollagen을 측정하기 위해 단기시험 model인 4-day patch assay를 시행하였다. 6-8 주령의 자성, 무모 생쥐(SKH-1-*hrBR*, hairless mouse)의 등에 적절한 기제로 용해 시킨 시료를 2일간 폐쇄 첩포(occlusive patch)하고, 하루 휴식 후에 한 번 더 폐쇄첩포 처치를 하였다. 피부를 생검하여 type I pN procollagen 항체와 Histostatin-plus kit를 사용하여 면역조직염색을 실시하였다.

MTT assay

사람의 각질형성세포주인 HaCaT 세포, 또는 NHF를 96well-plate에 1×10^4 cells/well 씩 분주하여 10% FBS DMEM 배지로 24시간 키운 다음, 새로운 배지와 적정 농도 범위에서,

단계적으로 희석한 시료를 가하고, 다시 24시간 또는 48시간 동안 37°C CO₂-incubator에서 배양하였다. 배양 후, PBS로 1회 세척하고, MTT 용액(0.5mg/ml in PBS) 200 μ l 씩을 각 well에 가한 뒤 4시간 동안 추가 배양하고, 원심분리(1,000 rpm, 10 min) 하여 용액을 버린 후, 다시 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 녹인 뒤 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

각질 형성능 평가(cornified envelope formation assay)

24 well plate에 5.0 x 10⁴/well의 농도로 HaCaT 세포를 분주하고, 10% FBS DMEM에서 1일간 배양한 뒤, 칼슘이 제거된 DMEM으로 교환하고, 시료물질과 [³⁵S]-methionine/cysteine mixture를 첨가하여 2일간 더 배양하였다. 배지를 제거한 후, 2% SDS lysis buffer와 20mM DTT를 첨가하여 세포를 분리하고, sonication 시켜 세포를 분쇄하였다. 단백질 양을 측정하기 위해 일부를 취해 액체섬광계수기(liquid scintillation counter; LSC)로 방사능을 측정하고, 나머지는 95°C 에서 3분간 가열한 후, filter disc를 이용, 여과하여 불용성 단백질 만을 모은 다음 LSC에서 측정하였다.

*in vitro*에 이어 *in vivo*에서 피부장벽 및 피부분화에 관한 시험을 실시하였다. 손상된 피부장벽회복능(skin barrier recovery), 피부장벽 구성에 필수적인 표피지질인 ceramides의 합성능, 피부분화의 지표이기도 하며, 자연보습인자(natural moisturizing factor; NMF)의 전구체인 필라그린(filaggrin)의 생성능 등을 보기위해 동물시험을 실시하였다. 무모생쥐의 등부위 피부에 1일 1회, 5일 동안 아세톤을 처치해 피부장벽을 파괴한 다음, 경피수분손실(trans-epidermal water loss; TEWL) 값을 측정하였고, 그 중, TEWL이 40g/m²/hr 이상인 실험동물 들만 선택하여 시험에 사용하였다. 적절한 기체에 용해 시킨 시료를 1일 2회, 200 μ l 씩, 등에 도포하면서, 일정 시간 별로 피부장벽회복능과 피부수분보유능을 보고, 시료처치 48시간 후에 피부를 생검하여 세라마이드(ceramide)와 필라그린의 생성량을 측정하였다

TEWL 및 피부수분량 측정

아세톤 처치 후, 시료를 처음 처치한 0, 6, 24, 48시간 후에 장벽이 파괴된 실험동물의 등 피부에서 발산하는 수분의 양과 피부에 존재하는 수분의 양을 Tewameter TM 215와 Corneometer를 이용하여 측정하였다.

세라마이드(ceramide) 생성량 측정

물질도포 및 TEWL, 피부수분량 측정이 끝난 실험 동물의 등 부위 피부를 8mm punch를 이용하여 생검하여, -20°C 냉동고에 보관하면서 표피지질의 분리에 사용하였다. 피부조직을 2.5% Trypsin-EDTA 용액에 담가 표피와 진피를 분리한 다음, 표피에서 총 지질을 추출하고, 이를 고성능 박층크로마토그래피 (high performance thin layer chromatography; HP-TLC)를 이용해 분리한 다음, 발색시키고, densitometer(Camag Co.)를 이용하여 band의 크

기를 측정하였다. 표피에서 지질을 추출하는 조작은 클로르포름과 메탄을 혼합용매의 비율을 바꿔가며 연속 추출하는 Vicanova(9), Both(10) 등의 방법을 약간 변형하여 실시하였으며, HP-TLC는 nonhydroxy ceramides와 hydroxy ceramides를 표준물질로 하여, 전개용매를 극성에서 비극성으로 점진적인 구배를 주면서 전개한 뒤, 인산·황산구리 용액으로 발색시키는 방법을 택해서 시행하였다.

Filaggrin의 Western blot

시간별 TEWL 측정이 끝난 직후 실험동물에서 생검하여 별도로 -20°C 냉동고에 보관한 피부조직을 2.5% Trypsin-EDTA 용액에 담가 4°C 에서 하루 밤 방치하여 표피와 진피를 분리하고, 표피에 존재하는 filaggrin의 정량을 위하여 Svendsen(11)과 Michel(12) 등의 방법을 이용하여 western blot을 실시하였다. 우선, 분리한 표피에 Cell Signaling 사의 lysis buffer를 첨가하여 균질화(homogenization) 하고, 얼음 bath 상에서 sonication 하여 단백질을 분리한 다음, SDS-PAGE와 nitro cellulose membrane transfer를 수행하였다. primary filaggrin antibody와 HRP-conjugated anti-mouse secondary antibodies를 결합시킨 뒤, ECL western blotting detection reagent를 이용하여 film에 감광시켜 band를 확인하였다.

3. 결 과

피부세포 보호효과

OA를 비롯한 triterpenoids의 피부세포 보호효과와 항염증 활성을 보기 위해서, HaCaT 세포에 자외선을 조사하여 자극을 준 뒤, 24시간 동안 분비되는 PGE_2 의 양을 측정하였다. 시험결과, OA와 UA는 0.1ppm의 농도에서 약 50% 정도의 PGE_2 생성억제효과를 나타내, 양성 대조물질로 사용한 aspirin보다도 우수한 효과를 보였으며, betulin의 경우에는 그 억제 효과가 미약하였다(표 1). 이러한 PGE_2 생성억제효과는 OA나 UA가 자외선에 의해 유발되는 피부염증에 강력한 항염증 효과를 발휘할 가능성을 제시하고 있으나, 단, OA나 UA, betulin 모두 1ppm의 농도에서는 PGE_2 생성억제 효과가 0.1ppm 시에 비하여 오히려 떨어져, 이들 물질 자체가 갖는 세포독성이 항염증 활성을 상쇄시킬 가능성도 아울러 시사하고 있다.

진피세포 및 조직에 대한 효과

자외선에 의한 MMP-1 발현 억제효과

OA와 UA, betulin이 섬유아세포에서 UVA에 의한 MMP-1 발현을 억제하는지를 retinoic acid를 양성대조물질로 하여 실험하였다. 세포 배양 과정 중에 배지로 분비된 MMP-1의 농도를 측정하고, 세포를 파쇄하여 정량한 단백질의 양을 기준으로 보정하여 최종 MMP-1 생성량을 구한 다음, 이를 대조군과 비교한 상대적 MMP-1 생성량으로 표시하였다. UA가 MMP-1의 생성을 오히려 촉진하는 양상을 보인데 반하여 OA나 betulin은 양성대조물질인 retinoic acid 보다는 낮지만, 10uM 농도에서 40-50%의 MMP-1 발현억제효과를 보였다(그림 2).

Type I procollagen 생성 촉진효과

Procollagen 합성에 미치는 triterpenoids의 작용을 알아보기 위해 transformation growth factor- β (TGF- β)를 양성대조군으로 하여 NHF에서 시험한 결과, OA, UA, betulin은 10uM의 농도로 처리했을 때, 대조군의 생성량에 비하여 각각 115.3%, 120.7% 및 108.2%의 procollagen 생성량을 나타내(그림 3), 이들 물질이 procollagen 생성촉진효과가 있음을 보여 주었다.

In vivo 에서의 procollagen 합성 촉진효과

in vitro 실험에서 피부기질분해효소인 MMP-1을 억제하고, 또 procollagen 생성을 촉진함으로써 해서 항노화소재로서의 개발 가능성이 확인된 OA를 포함한 triterpenoids 들에 대하여, 그것들이 실제 피부에서도 효능을 발휘하는지를 알아보기 위해 동물시험을 실시하였다. 2일간의 폐쇄접포를 2회 반복하는 방식으로 시험물질을 처리한 무모생쥐의 피부를 생검하여 면역조직학적 방법으로 procollagen 생성량을 조사한 결과, OA를 처리한 군에서 procollagen이 확연히 증가한 것을 관찰할 수 있었다(그림 4). 본 시험의 면역염색에 사용된 SP1.D8 항체는 procollagen에 특이성이 있는 항체로서, procollagen은 collagen 합성의 초기 단계에만 존재하므로, OA가 신규 collagen의 합성을 촉진시키는 기능이 있음을 알 수 있다. 그러나, UA나 betulin 처리군은 대조군에 비해 별다른 차이를 관찰할 수 없었다.

표피세포의 기능에 미치는 효과

각질형성세포에 대한 증식촉진효과 및 세포독성

각질형성세포 증식의 촉진 또는 억제는 표피의 분화와 불가분의 관계에 있기 때문에, 시험

물질 들이 각질형성세포에 미치는 세포증식 촉진효과 또는 직접적인 세포독성을 확인하기 위하여 HaCaT 세포에서 MTT assay를 실시하였다. OA와 UA는 이들 세포의 증식을 촉진 하였으며, 그 활성은 UA가 OA보다 높았다. 그와 반대로 betulin 과 BA는 0.1ppm의 농도 에서도 이들 세포의 증식을 억제하는 작용이 있음을 확연히 보여주었다(그림 5).

각질 형성 (cornified envelope formation)에 미치는 효과

OA와 UA, betulin의 표피에서의 효능을 알아보기 위해 우선적으로 *in vitro*에서 HaCaT 세포의 각질 형성능을 시험하였다. OA와 betulin은 각질형성을 20~30% 촉진시키는 결과를 보였으나, 그에 반하여 UA는 유의한 각질형성촉진 기능이 관찰되지 않아(그림 6), 위에서 시험한 각질형성세포의 증식과는 상반된 작용특성을 보였다.

in vivo 경피수분손실량 (TEWL)과 각질수분량

표피의 가장 중요한 기능중의 하나인 피부장벽 기능과 보습기능에 미치는 시료들의 효과를 알아보기 위해 무모생쥐의 등에 아세톤을 처치하여 피부장벽을 파괴시킨 후, liposome 형태로 제조된 시료를 도포하였다. 장벽기능과 보습기능의 회복력을 보고자 TEWL과 Corneometer value를 측정하였는데, 그림 7은 모든 실험군에서 시료 처치 후 시간대 별로 TEWL 값이 감소하는 것을 보여주고 있다. 또한 시료의 안정적인 피부침투를 위해 시료들의 조제에 사용한 기재인 liposome 기재 자체도 아무 것도 처치하지 않은(non-treat) 것 보다는 장벽회복을 빠르게 진행시키는 것으로 나타났다. 실제로, UA 처치군은 대조군에 비해서 보다 빠른 장벽회복을 나타냈으나, OA는 기재처리군과 거의 같은 수치를 보이고 있어 별다른 장벽회복력이 있지는 않은 것으로 보였다. 다만, 본 시험에 사용한 기재에는 피부친화성이 좋고, 장벽강화력도 있다고 알려진 lecithin이 다량 들어있는 관계로 시험물질과의 효과면에서의 차이가 줄어들었을 가능성은 있다. 이와 별도로 측정한 피부수분량의 경우는 시간이 경과함에 따라 기재 처리군 보다는 높은 Corneometer 치를 보이고는 있으나, 물질 도포 시작 직후에 비하여 모두 낮은 값을 보이는 것으로 나타났다(결과는 제시하지 않음).

세라마이드(ceramide) 생성량 측정

Liposome 형태로 제조된 OA 및 UA를 장벽손상이 일어난 무모 생쥐의 등에 도포한 뒤, 표피에서 생성되는 세라마이드의 양을 HP-TLC로 정량하였다. 그림 8에서 보는 바와 같이 대조군에 비하여 OA나 UA 처리군 둘 다, 모든 ceramides 양을 뚜렷이 증가시켰으며, 특히, total ceramide의 경우는 OA(1%) 처치에 의해서 100%, UA(1%) 처치에 의해서 80%의 세라마이드 생성증가량을 보였다. 본 실험결과는 사람 피부에 있어서 UA가 세라마이드와 교원질의 생성을 촉진시켰다고 보고한 결과와도 부합되며(10,13), OA가 UA와 동등하거나 그 이상의 ceramide 생성 촉진능이 있음을 보여주고 있다.

피부세포 분화 지표인 filaggrin 의 생성 촉진

장벽이 손상된 무모 생쥐의 피부에 시험물질을 도포한 48 시간 후에 피부를 생검하고, 표피를 분리한 다음 단백질을 추출하여 필라그린에 대한 western blot을 수행하였다. 그림 9에서 보는 바와 같이, OA가 대조군에 비해 보다 많은 filaggrin 발현을 보이는데 반하여 UA는 대조군과 유사하였다. UA의 경우, 피부세포의 분화를 억제하여 involucrin이나, keratin 1, 10 같은 분화 표지의 생성을 감소시킨다고 보고되어 있는데(10), 본 연구에서도, UA가 필라그린의 발현을 증가시키지는 못한 것으로 나타났다.

4. 고찰

피부노화증상을 유발하는 생물학적 기전을 분자수준에서부터 밝히고자 하는 연구와 더불어, 피부노화를 유발한다고 알려진 원인들에 대응하는 물질들로부터 항노화소재를 개발하고자 하는 활발한 시도들은 최근 피부노화연구의 중요한 추세를 반영하고 있다. 외용목적의 항노화소재 개발에 있어서 착안점이 되는 노화 기전 상의 중요한 타겟으로는, 광노화의 경우, 자외선, 활성산소종, DNA 손상, Maillard 반응(glycation), cytokines, 효소, 단백질 합성 및 대사활성 등을 들 수 있으며, 자연노화인자로는 free radical, 호르몬, 영양, 수면, 스트레스, 깃연, 생활환경 등을 들 수 있다. 하지만, 이러한 인자들은 단독으로서가 아니라 복합적으로 피부에 작용하기 때문에 노화의 양상은 항상 복잡하게 나타나게 된다. 결국, 위의 요인들이 체내에서 작용할 때, 그들 대다수가 공유하는 어떤 공통적인 기작을 밝혀내기까지는 우선적으로 개별적인 타겟에 대응하든지, 아니면 나아가 여러 타겟에 동시에 대응할 수 있는 다기능적 물질을 찾아 항노화 소재화 하는 것이 바람직한 전략이 아닌가 생각되고 있다.

본 연구에 사용된 OA를 비롯한 triterpenoids 들도 위와 같은 맥락에서 가능성이 큰 항노화소재 후보물질로 선정된 것들로서, OA, UA, betulin, BA, boswellic acid 들은 공통적으로 항염, 항암, 항균작용이 있으며, 이들 성분을 다량 함유한 식물들도 이와 유사한 기능이 있음이 많이 보고되었다. OA를 위시하여 항노화소재로서 개발될 가능성이 큰 이들 triterpenoids가 피부에서는 어떠한 기능을 할 것인지를 종합적으로 검토하고자 하는 것이 본 연구의 목표이었기 때문에, 표피와 진피에 있어서, 노화에 수반하여 변화가 일어나는 다양한 기능들에 대한 작용을 알아보기 위한 방향으로 연구가 진행되었다.

우선적으로, 항염증 기전의 피부세포보호활성을 보기 위해 자외선 조사에 의해 피부세포로부터 생성되는 염증매개물질인 PGE₂를 정량하였다. OA, UA는 저농도에서도 PGE₂ 생성을 억제하였으며(표 1), betulin은 억제능이 미미했다. 이런 결과는, OA 등의 triterpenoids가 대식세포(macrophage)에서 COX-2 활성을 억제하여 항염증 작용을 나타낸다는 보고(14)와 더불어, 자외선에 의해 자극받은 피부세포의 COX-2 활성도 억제한다는 것을 본 연구를 통하여 확인함으로써, 이들 물질이 피부 내, 외적의 다양한 자극으로 유발되는 염증을 제어할 수 있는 항염증물질로서 활용될 수 있음을 제시하고 있다. 본 실험에서

betulin이 OA나 UA에 비하여 항염증 활성이 떨어지는 것은 triterpenoid 구조상 5번째 환이 6각형인 물질이 5각형인 물질보다 항염증 활성이 높다는 기존의 보고와 부합된다고 할 수 있으며(15), 역시 5각형인 BA도 항염증 활성이 떨어진다는 것을 별도의 실험을 통하여 확인하였다 (결과는 제시하지 않음).

이들 물질이 진피에 작용하는 항노화 기능을 알아보기 위해, MMP-1과 procollagen 생성에 대한 작용을 *in vitro* 와 *in vivo* 에서 검토하였다 (그림 2,3,4). 세 종류의 실험결과를 종합해 보면, OA는 MMP-1 생성억제, procollagen 생성 촉진, *in vivo* 에서의 procollagen 생성촉진 등의 작용이 확인되었으며, UA는 MMP-1과 procollagen 둘 다 증가시켰고, betulin은 MMP-1 생성억제, 약한 procollagen 생성촉진 기능이 있다고 요약할 수 있다. MMPs와 procollagen은 진피의 기질을 분해하거나 생성시키는 중요한 인자로서, 이번 결과는 적어도 활성측면에서는 OA가 UA나 betulin, 또는 BA에 비해서 항노화소재로서 보다 바람직한 작용특성을 보인다고 할 수 있다.

Triterpenoids 물질들이 표피에 작용하는 기능을 확인하기 위해서 우선 *in vitro* 에서 HaCaT 세포의 증식과 각질형성능을 살펴보았다. OA, UA는 세포증식을 촉진한 반면, betulin과 BA는 오히려 억제하였다. 각질형성에 있어서 OA, betulin은 각질 형성을 촉진하였고, UA는 억제하였다. betulin과 BA의 작용 특성을 PGE₂ 생성억제시험의 결과와 결부시켜 생각해 보면, 이들이 어떤 특별한 기전에 의해 피부각질세포의 증식을 억제한다기 보다는 세포독성(cytotoxicity)이 다른 것들에 비해서 좀 더 크기 때문이 아닌가 생각된다. OA, betulin이 20% 이상 각질형성을 증가시킨데 반하여, UA는 그 기능이 미약한 것으로 보인다. 전술한대로, UA가 피부세포의 분화를 억제하고, 증식을 촉진시킨다는 보고가 있어서(10) 본 연구결과와 일치하기는 하지만, 한편으로, UA, OA가 또 다른 상피세포인 흰쥐의 유선상피세포의 분화를 촉진한다는 보고도 있어(16), 같은 상피세포라 하더라도 세포의 종류에 따라 UA의 작용양상이 다르게 나타나는 것으로 보인다. UA와 달리 OA, betulin, BA 등은 모두 각질형성을 촉진하였으며, 특히 betulin은 각질형성촉진작용 뿐만 아니라, 피부에 있어서 또 다른 분화지표인 transglutaminase-1의 발현도 많이 증가시키는 것으로 추가적인 실험에서 확인되었다(결과는 제시하지 않음).

위와 같이, *in vitro* 에서 triterpenoids가 표피세포의 증식이나 분화를 촉진할 가능성이 보였기 때문에, 이런 활성이 실제 피부의 장벽기능이나 세라마이드의 생성, 그리고 보습기능과 관련된 분화지표성분인 필라그린 생성에 미치는 영향을 확인하고자 무모생쥐에서 *in vivo* 시험을 수행하였다. 대부분의 시험물질 처치군에서 TEWL을 감소시켜서 손상된 피부 장벽의 회복작용이 있다고 할 수도 있으나, 시험물질별로 효과면에서 큰 차이가 없고 또, 기질로 사용한 liposome 제형도 효과를 나타내어(그림 7), 장벽손상의 단기적인 회복에는 본 물질들이 큰 효과를 발휘하지는 못함을 확인할 수 있었다. 그렇지만, 보다 근원적이고 장기적인 관점에서의 피부보습력과 피부장벽기능을 제공하는 필라그린과 세라마이드 생성에 있어서, OA는 두 가지 모두를, UA는 세라마이드 생성을 촉진시키는 기능이 있음을 보여주었다. 나이가 들어감에 따라 표피의 지질성분 중 세라마이드의 양이 특징적으로 감소하고

(17), 이것이 결국 피부장벽 기능의 감소와 피부건조증(xerosis)을 야기함을 감안할 때, OA와 UA 등은 표피의 노화에도 대응할 수 있는 좋은 후보물질이라 할 수 있을 것이다.

이상에서와 같은 일련의 연구를 통하여 저자 등은, triterpenoids 들, 그 중에서도 특히 OA가 진피 뿐만 아니라 표피에서도 다양한 활성을 발휘하는, 복합적인 기능의 뛰어난 피부 노화방지/개선 소재로 개발될 가능성이 있음을 확인하였고, 현재 진행하고 있는 peroxisome proliferator-activated receptors(PPARs)(18)와의 관계구명이 이루어진다면 이들 물질이 피부세포의 분화와 증식, 지질대사, 염증 등에 미치는 작용기전을 보다 구체적으로 밝힐 수 있을 것으로 기대하고 있다.

참고문헌

1. Sams WM, Smith J. The histochemistry of chronically sun damaged skin. *J Invest Dermatol* 37:447-452, 1961
2. Kligman AM. Early destructive effect of sunlight on human skin. *JAMA* 210:2377-2380, 1969
3. Uitto J, Fazio MJ, Olsen DR. Molecular mechanisms of cutaneous aging. *J Am Acad Dermatol* 21:614-622, 1989
4. Uitto J, Bernstein EF. Molecular mechanisms of cutaneous aging: Connective tissue alterations in the dermis. *J Invest Dermatol Symp Proc* 3:41-44, 1998
5. Dzubow L. The aging face. In: Coleman WP, Hanke WC, Alt TH, Asken S, eds. *Cosmetic surgery of the skin*. Philadelphia, PA: B.C. Decker Inc., 1-12, 1991
6. El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, Ahmad H, Uitto J. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *J Exp Dermatol* 11(5):398-405, 2002
7. Yaar M and Gilchrist BA. Aging versus photoaging: postulated mechanisms and effectors. *J Invest Dermatology. Symp. Proc* 3:47-51, 1998
8. Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 1:49(2), 57-68, 1995
9. Vicanova J, Weerheim AM, Kempernaar JA, Ponec M. Incorporation of linoleic acid by cultured human keratinocytes, *Arch Dermatol Res* 291:405-412, 1999
10. Both DM, Goodtzova K, Yarosh DB, Brown DA. Liposome-encapsulated ursolic acid increases ceramides and collagen in human skin cells, *Arch Dermatol Res*, 293:569-575, 2002
11. Svendsen ML, Daneels G, Geysen J, Binderup L, Kragballe K. Proliferation and differentiation of cultured human keratinocytes is modulated by 1,25(OH)₂D₃ and synthetic vitamin D₃ analogues in a cell density-, calcium- and serum-dependent manner. *Pharmacol Toxicol* 80:49-56, 1997
12. Michel S, Courseaux A, Miquel C, Bernardon JM, Schmidt R, Shroot B, Thacher SM, and Reichert U. Determination of retinoid activity by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Biochem* 192:232-236, 1991
13. Yarosh, DB, Both D, Brown D. Liposomal ursolic acid (Merotaine) increases ceramides and collagen in human skin. *Horm Res* 54:318-321, 2000
14. Suh N, Honda T, Finlay HJ, Barchowsky A, Williams C, Benoit NE, Xie QW, Nathan C, Gribble GW, Sporn MB. Novel triterpenoids suppress inducible nitric

- oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res* 15:58(4):717-23, 1998
15. Manez S, Recio MC, Giner RM, Rios JL. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *Eur J Pharmacol* 334(1):103-105, 1997
 16. Paik KJ, Jeon SS, Chung HY, Lee KH, Kim KW, Chung JK, Kim ND. Induction of differentiation of the cultured rat mammary epithelial cells by triterpene acids. *Arch Pharm Res* 21(4):398-405, 1998
 17. Rogers J, Harding C, Mayo A, Banks J, Rawlings A. Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Arch Dermatol Res* 288:765-770, 1996
 18. Wahli W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med Wkly* 132(7-8):83-91, 2002.

표 1. 자외선을 조사한 HaCat 세포에서 Triterpenoids에 의한 PGE₂ 생성 억제효과

	처리 농도 ($\mu\text{g/ml}$)	PGE ₂ 생성량 ($\mu\text{g/ml}$)
UVB (-)	ethanol 0.1%	2.41 \pm 0.45
UVB (+)	ethanol 0.1%	15.5 \pm 5.66
Aspirin	1.0	8.48 \pm 3.39
	10.0	4.62 \pm 1.86
Oleanolic acid	0.1	8.62 \pm 1.56
	1.0	11.7 \pm 4.17
Ursolic acid	0.1	7.63 \pm 2.31
	1.0	20.9 \pm 8.99
Betulin	0.1	14.2 \pm 0.76
	1.0	19.7 \pm 5.65

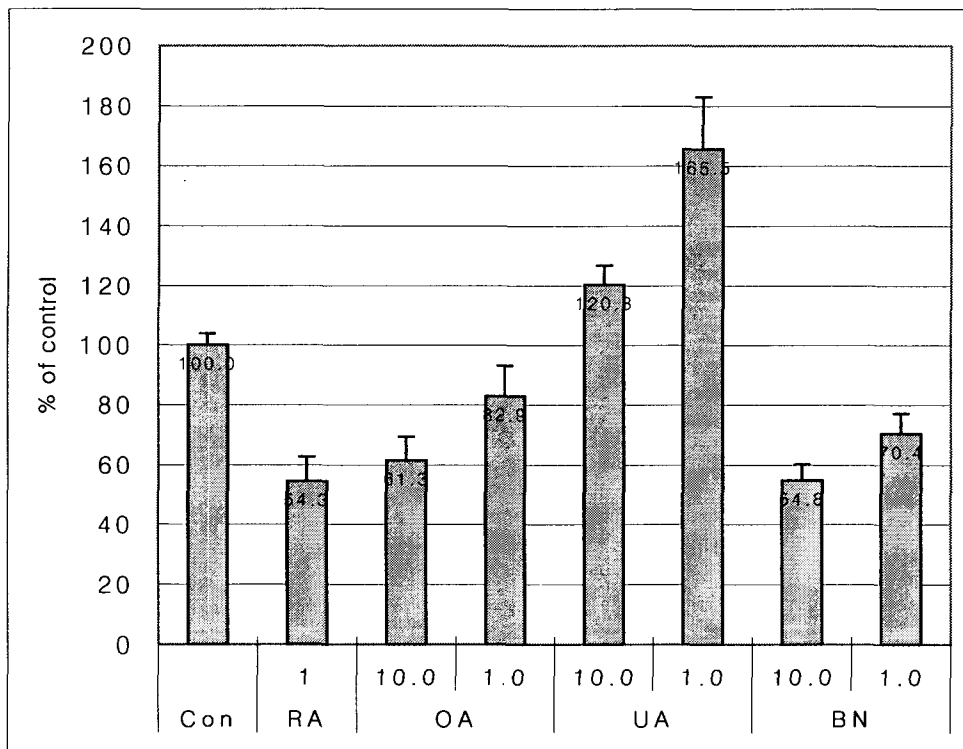


그림 2. Oleanolic acid를 포함한 triterpenoids의 MMP-1 발현억제효과. RA; retinoic acid, OA; oleanolic acid, UA; ursolic acid, BN; betulin, 농도는 uM. 데이터는 대조군에 대한 MMP-1 발현의 정도를 백분율로 표시한 것이며, 오차막대는 표준편차를 나타냄.

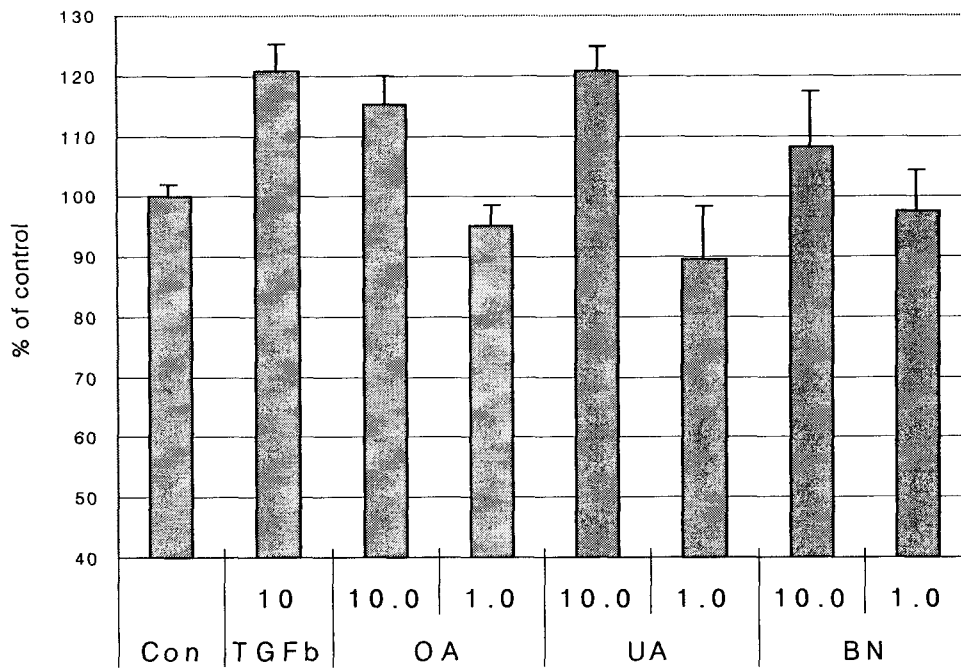


그림 3. Oleanolic acid를 포함한 triterpenoids의 procollagen 생성촉진 효과. TGF- β 의 농도 10 ng/ml을 제외한 모든 시료는 uM임. 데이터는 대조군의 procollagen 생성량에 대한 백분율로 표시함.

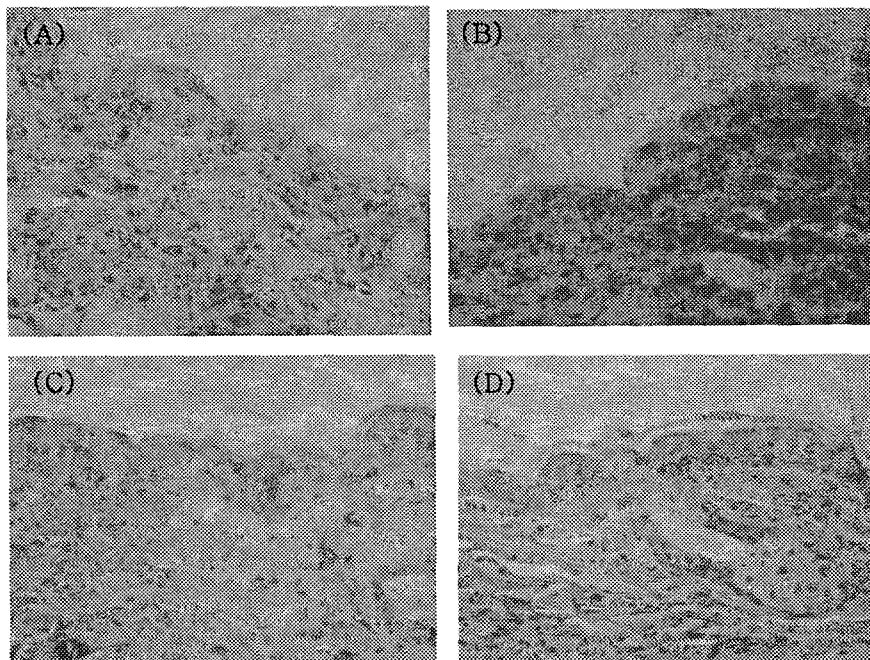


그림 4. Oleanolic acid의 무모 생쥐 피부 procollagen 생성 촉진효과. (A): 대조군, (B): oleanolic acid, (C): ursolic acid, (D): betulin, 새로 합성된 procollagen의 양이 많을수록 붉은색이 짙어짐.

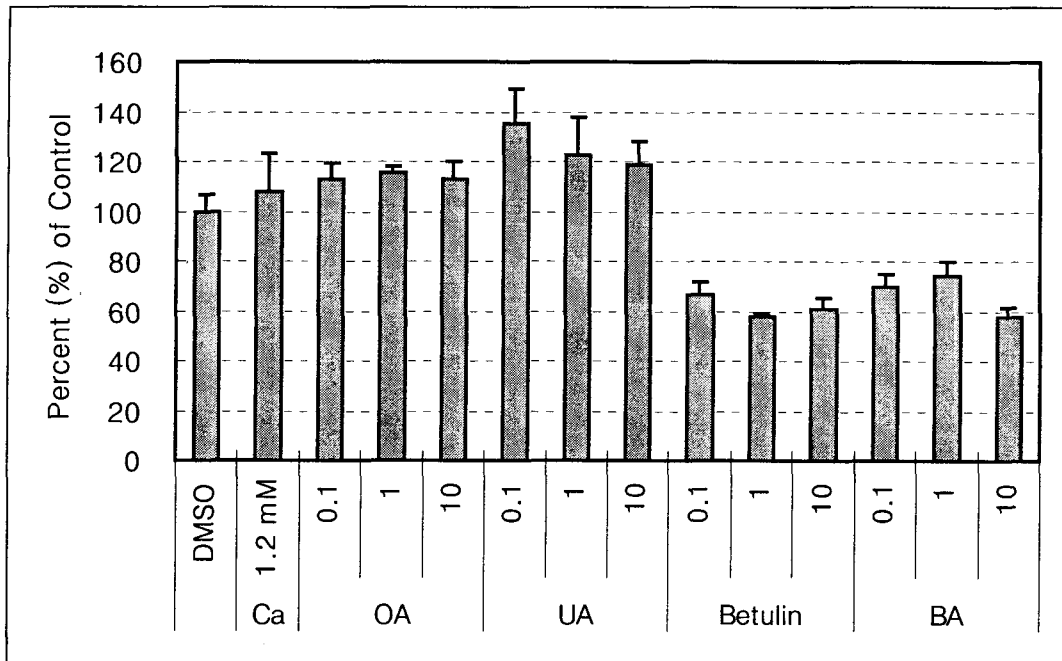


그림 5. Oleanolic acid, ursolic acid, betulin이 표피세포의 증식에 미치는 영향. OA; oleanolic acid, UA; ursolic acid, BA; betulinic acid, 대조군은 1.2 mM의 calcium ion 첨가군이며, 각 시료 농도의 단위는 ppm 임. Data는 평균치와 표준편차를 표시하였다.

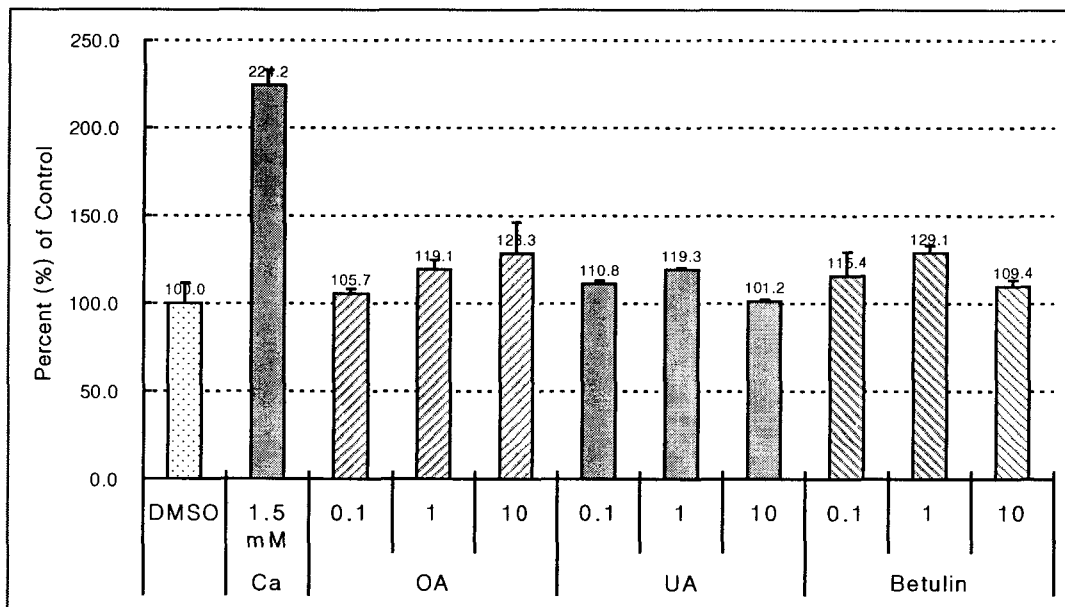


그림 6. Oleanolic acid, ursolic acid, betulin의 각질형성 촉진효과. OA; oleanolic acid, UA; ursolic acid, 1.5 mM의 calcium ion은 양성 대조군으로 사용하였으며, 각 시료 농도의 단위는 ppm 임. Data는 평균치와 표준편차를 표시하였다.

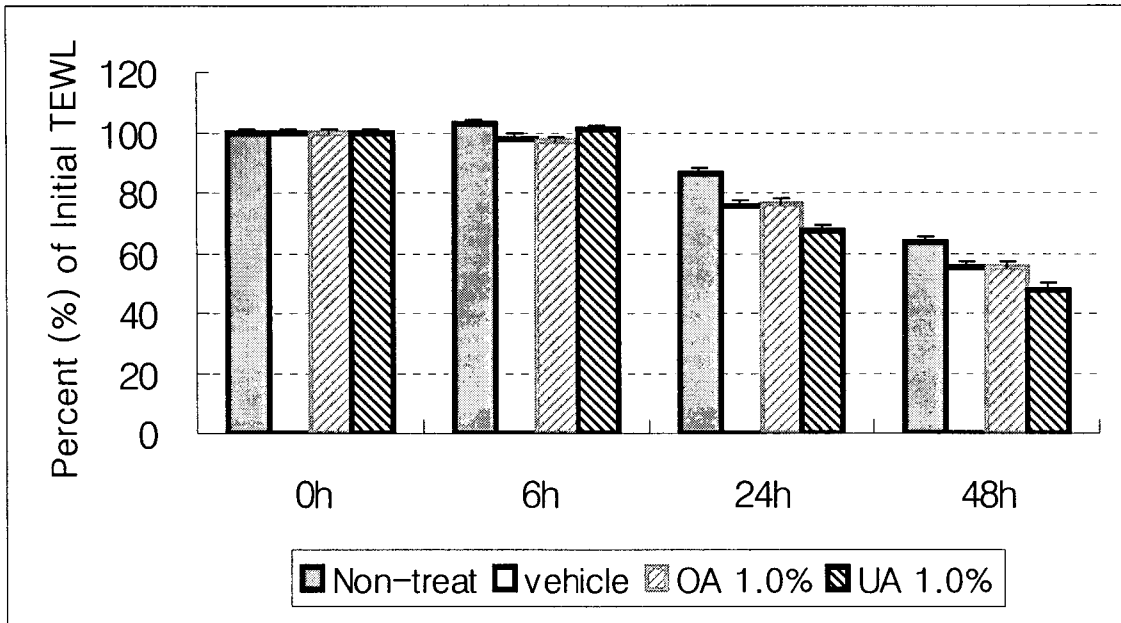


그림 7. 아세톤 처치에 의한 피부장벽 손상 회복능. Vehicle; liposome base 1%, OA; oleanolic acid 1.0%, UA; ursolic acid 1.0%

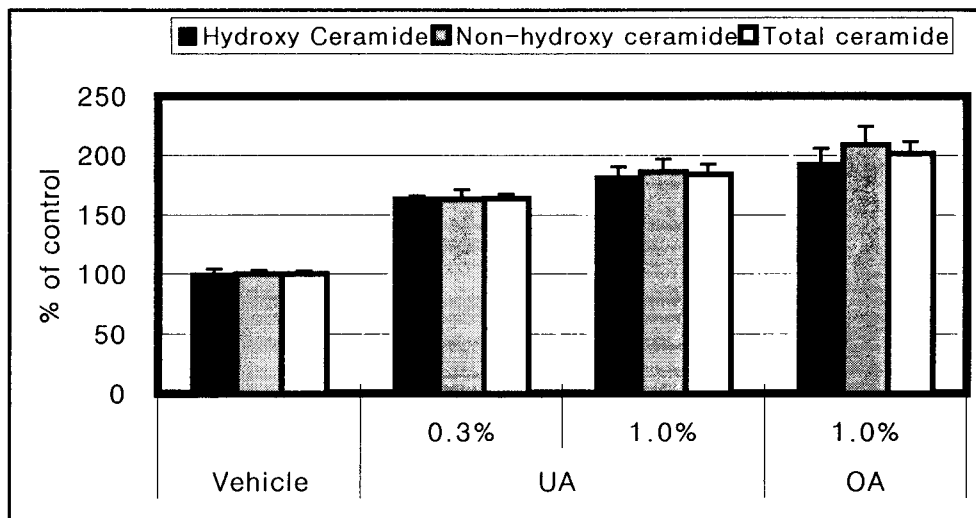


그림 8. Oleanolic acid와 ursolic acid 처치에 의한 무모생쥐 표피에서의 세라마이드 생성촉진효과. Vehicle; liposome base 1%. UA; ursolic acid, OA; oleanolic acid, Standard: NHC(non-hydroxy ceramide), HC(hydroxy ceramide)

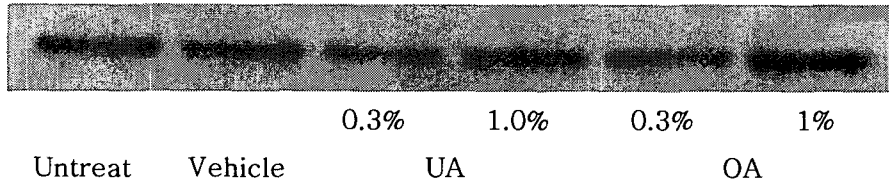


그림 9. Oleanolic acid와 ursolic acid 처치에 의한 무모생쥐 표피에서의 filaggrin 발현 (western blot). Vehicle; liposome base 1%. UA; ursolic acid, OA; oleanolic acid