

당뇨흰쥐의 콜라겐 감소 및 인간 피부 섬유아세포의 MMP-1 증가에 대한 牡丹皮의 항피부노화 효과

김경진 · 김경준
경원대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

Anti-skin-aging effects of *Paeonia Suffruticosa* Andrews on maintaining skin collagen in STZ-induced diabetic rats and inhibiting MMP-1 synthesis in human skin fibroblasts

Kyung-Jin Kim · Kyung-Jun Kim

Objective : Skin aging is commonly observed in patients with diabetes mellitus, which can be assessed by the amount of skin collagen and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1). In the present study, anti-skin-aging effects of Root Cortex of *Paeonia Suffruticosa* Andrews (PSA), which has been widely used to treat diabetes mellitus, are investigated.

Methods : Streptozotocin (STZ) was intraperitoneally injected to rats to induce diabetes. Body weights, feed intake, organ weights, blood glucose, and other biochemical index are determined in both normal and diabetic rats. In order to study the effect of PSA on skin aging, the amount of skin collagen was measured in diabetic rats after PSA treatments. Also, MMP-1 synthesis in UVB-irradiated human skin fibroblasts was investigated.

- Results :**
1. When PSA was administered to STZ-induced diabetic rats, feed intake was significantly increased and blood glucose and total cholesterol were decreased in a dose-dependent manner. However, there are no differences in individual organ weights, GOT, and GPT.
 2. A decrease of skin collagen in diabetic rats was significantly suppressed when PSA was treated.
 3. PSA also inhibited MMP-1 synthesis in UVB-irradiated normal human skin fibroblasts, similar to retinoid, a well-known effective anti-skin-aging substance.

Conclusion: PSA suppressed a collagen decrease in diabetic rats and inhibited MMP-1 synthesis in UVB-irradiated human skin fibroblasts. Therefore, the treatment of PSA is very effective to slow down the skin aging process.

Key words : *Paeonia Suffruticosa* Andrews, MMP-1, Anti-skin-aging, Collagen

교신저자: 김경준. 서울시 송파구 송파동 20-8
경원대학교 부속 서울한방병원 안이비인후피부과
(Tel : 02-425-3456, E-mail : kkjo215@hanmail.net)

• 접수 2008/02/02 • 수정 2008/03/25 • 채택 2008/04/11

서 론

당뇨병은 인슐린의 절대적 또는 상대적 결핍 및 조직에서의 인슐린의 작용 저하(인슐린 저항성)에 기인한 고혈당 및 이에 수반되는 대사장애를 특징으로 하는 질환군이다¹⁾. 인슐린이 당뇨병 환자의 결합물질 대사에 관련이 있다는 증거는 많이 제시되고 있는데, 당뇨병을 일으킨 실험동물에 인슐린 치료를 하지 않으면 피부조직의 콜라겐 양이 감소하고²⁾, 골조직과 연골조직의 콜라겐 합성도 현저히 저하된다³⁾. 피부의 콜라겐이 감소함에 따라 주름이 깊어지고 탄력이 감소되어 피부가 처지거나 표면이 거칠어지는 피부노화 현상이 나타난다.

피부노화에 대한 연구는 콜라겐의 양과 콜라겐을 분해하는 효소 (Matrix Metalloproteinases; MMPs)의 생합성을 억제하거나 활성을 저해하는 방식 혹은 항산화, 항노화 물질을 이용하여 피부세포를 보호하려는 노력이 이루어지고 있다^{4,5)}.

한의학 임상에서 六味地黃丸 및 그 加減方이 당뇨병에 빈용되고 있으며⁶⁾, 항당뇨효과⁷⁻¹¹⁾와 항산화효과^{12,13)}에 대한 연구가 보고된 바 있다. 六味地黃丸의 성분 중에서 목단피 (Root Cortex of *Paeonia Suffruticosa* Andrews; PSA)는 血熱로 인한 瘀血停滯를 치료하는 효능이 있어서 내외의 화농성 질환 및 피부질환에 응용되고 있다^{14,15)}. 기존의 목단피에 대한 연구는 항염효과¹⁶⁾, 항산화효과^{17,18)} 및 혈당강하효과¹⁹⁾ 등이 있다. 이에 저자는 목단피가 血熱로 인한 瘀血停滯를 치료하는 효능으로 당뇨병으로 나타나는 피부노화현상을 개선하는데 효과를 발휘할 것이라 추정하였다.

목단피의 혈당강하효과 및 안정성을 보기 위하여 체중과 식이효율, 장기 무게의 변화, 혈당 및 생화학적 지표를 측정하였다. 피부노화효과를 확인하기 위해 당뇨흰쥐에서의 피부 콜라겐 양의 변화를 측정하였다. 인간 피부 섬유아세포주에서 콜라겐 분해효소인 MMP-1 생성을 억제하는 수준을

조사하였고, 그 효과를 항피부노화 물질로 알려진 레티노이드 (Retinoic acid; RA)와 비교하였다.

실 험

1. 재료

1) 실험 재료 및 시약

실험에 사용한 목단피는 omniherb (Yeongcheon, Korea)에서 구입하였으며, Streptozotocin (STZ)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, HDL, CRE-PS, GPT-PS, GOT-PS kits는 FUJIFILM (Japan)에서 구입하였다.

2) 목단피 추출물의 제조

목단피를 분쇄기를 사용하여 고운 가루가 될 때까지 분쇄한 후 모든 분말을 50 mesh sieve로 통과시켜 일정한 입자의 크기를 얻었다. 그리고 분말화된 시료 100g에다가 시료양의 10배인 1000ml의 80%에탄올을 가하여 Ultra-sonicator (Branson, U.S.A)에서 15분간 3회 추출한 후 여과를 실시하였다. 각 추출한 용액을 혼합한 후 40℃에서 감압농축 (Eyela, Japan)을 하여 에탄올 증발시킨 다음, 동결건조 (Ilshin lab, Korea)하여 동물실험에 사용할 시료 20.5g을 얻었다(수율 20.5%).

2. 방법

1) 실험 동물 및 당뇨 유발

실험 동물은 평균 체중이 200±10g이며 6주령의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐 (Samtako, Korea)를 구입하여 일반 고형사료와 물을 공급하여 먹이면서 사육환경 1주간 환경에 적응시켜 사용하였다. 사육실의 온도는 20-25℃로 유지하였으며, 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등하였다. 실험동물은

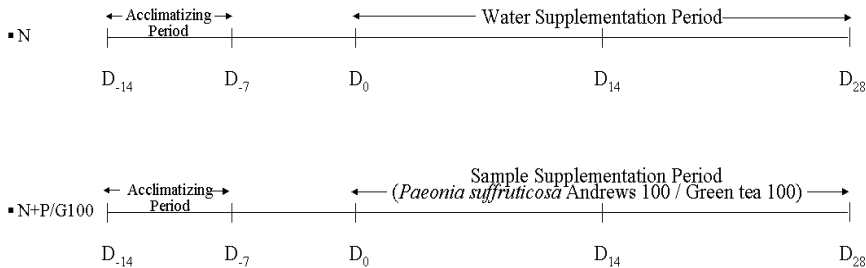
16시간 절식시킨 후 신선한 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 STZ (45mg/kg of rat body weight)를 용해하여 1회 복강에 주사하여 당뇨를 유발하였다. 그리고 STZ를 주사한지 일주일 뒤에 흰쥐의 꼬리에서 혈액을 채취하여 혈당이 250mg/dl 이상

인 동물을 실험에 사용하였다.

2) 동물 실험 설계

흰쥐 60마리를 정상군과 당뇨군으로 분류하였다. 정상군은 (가) 증류수만을 투여한 N군, (나) 목

A. Normal



B. Control

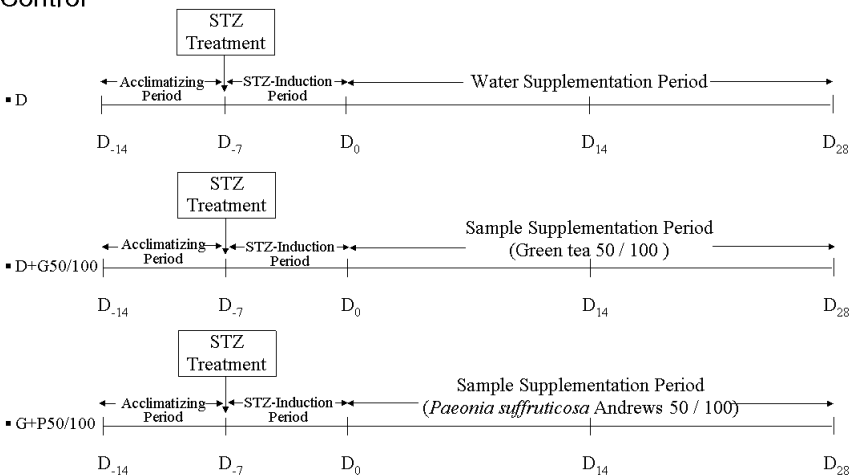


Fig. 1. Experimental designs

Rats were acclimatized for 7 days (D-14 ~ D-7) and randomly allotted into eight groups.

- N : Normal group, no STZ injection.
- N+P100 or G100 : Normal group orally fed with PSA or green tea extract (100 mg/kg/day)
- D : Diabetes group
- D+P50 or G50 : Diabetes group orally fed with PSA or green tea extract (50 mg/kg/day).
- D+P100 or G100 : Diabetes group orally fed with PSA or green tea extract (100 mg/kg/day).

Diabetes was induced (D-7) by an intraperitoneal injection of STZ at a dose of 45mg/kg body weight in a 0.1 M fresh cold citrate buffer(pH 4.3). One week (D0) after the STZ injection, glucose from the tail vein was measured in all experimental rats. Blood samples were collected from the tail vein of all animals at 2 weeks interval (D14) during the experiment period. After 4 weeks (D28), all animals were euthanized and liver, kidney, heart and spleen were isolated from each rat, and blood samples were also collected.

단피 추출물 100mg/kg을 투여한 N+P100군, (다) 녹차 추출물 100mg/kg을 투여한 N+G100군으로 나누었다. 목단피의 상대적 효능을 비교할 목적으로 그동안 항산화 및 항당뇨 등 다양한 효과가 보고된 녹차를 실험에 사용하였다^{17,20,21)}.

당뇨군은 (가) 증류수만을 투여한 D군, (나) 목단피를 농도별 (50mg/kg과 100mg/kg)로 투여한 D+P50 과 D+P100군, (다) 녹차를 농도별 (50mg/kg과 100mg/kg)로 투여한 D+G50과 D+G100군으로 나누었다. 실험실 적응기간과 당뇨유발 기간을 거친 후, 각 군별로 시료를 28일간 강제 경구투여하였다(Fig. 1).

3) 혈당 측정 및 혈장 분리

혈당은 흰쥐의 꼬리에서 채혈한 후에 glucometer kit (Accu-Check Active, Roche Diagnostics GmbH, Germany)를 사용하여 측정하였다. 흰쥐의 꼬리에서 채취한 혈액은 즉시 EDTA가 처리된 tube에 넣어 균등질이 되도록 잘 흔든 다음 3000rpm에서 10분간 원심분리를 하여 상등액인 혈장을 얻었으며, 이 시료는 분석 전까지 -70℃에서 보관하였다.

4) 장기 적출

실험 28일 후 실험동물을 에테르 (Duksan Pure Chemical Co. Ltd., Korea)로 마취하였다. 개복한 후 간, 심장, 신장 및 비장의 장기를 적출하여 생리식염수로 씻고 마른 거즈로 물기를 제거한 다음 각각의 장기의 무게를 측정하였다.

5) 혈액의 생화학적 분석

분리된 혈장은 동물전용 생화학분석기(DRI CHEM 3500, FUJI PHOTO FILM, CO., Japan)를 사용하여 total cholesterol, HDL(high density lipoprotein), GOT(glutamic oxaloacetic transaminase), GPT(glutamic pyruvic transaminase),

및 creatinine을 측정하였다.

6) 콜라겐의 측정

총 피부 콜라겐의 측정은 STZ유발 당뇨흰쥐 대조군과 목단피 투여군에서 각각 Schneir 등의 방법²²⁾을 사용하여 측정하였다. In vivo 표식을 위하여 [3H] praline 을 복강에 투여하고 2시간 후 각 동물들을 희생시켰다. 동물의 등 쪽 일부 피부를 Schneir 등이 사용한 방법²³⁾을 이용하여 얻은 후 잘게 썰고 지방을 제거한 다음 10% trichloroacetic acid (TCA)에 넣고 이 중 1.5g의 피부에서 hydroxyproline 및 praline 함량을 측정하였다²⁴⁾.

7) 섬유아세포 배양 및 MMP-1 생성 측정

인간 피부 섬유아세포주인 HS68 세포주 (ATCC CRL 1635)를 American Tissue Culture Collection (Rocville, MD, USA)에서 구입하여 MMP-1을 측정하였다. 세포주는 10% 우태혈청 (Fetal bovine serum, FBS)과 1% antibiotic-antimycotic (Gibco-BRL, NY, USA)이 함유된 DMEM 배양액에서 37℃, 95%의 습도와 5%의 CO₂상태에서 배양하였다. 각각의 세포들은 12-well dish에서 6x10⁴개로 분주하여 배양된 뒤 90%조밀도에서 실험에 사용하였다. 각각의 세포주들은 무처리군, 증류액투여군, 양성대조군으로 항피부노화제로 알려진 레티노이드, 목단피100, 250, 500 및 1000 μl/ml를 투여한 다음 24시간 후에 UVB를 조사하였다. UVB는 EB-160C lamp (312nm, Spectroline, NY, USA)를 광원으로 사용하였다. Collagenase는 enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA)로 측정하였다²⁵⁻²⁷⁾.

8) 통계분석

실험결과는 SAS 통계프로그램(ver. 8.1)을 이용하여 평균수치와 표준편차로 나타내었으며 각 실험군 간의 결과는 analysis of variance(ANOVA)

통계분석방법을 사용하여 분석하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 Duncan's multiple range test에 의해 사후 검정하였다. 유의성은 95% 수준($p < 0.05$)에서 검정하였다.

結 果

1. STZ로 유발된 당뇨병쥐의 생존율

실험에 사용되는 당뇨병쥐는 STZ의 강한 작용

또는 스트레스에 의해 실험 도중 사망하는 일이 발생하기도 하는데, 본 실험에서도 일부 군에서 실험기간 동안 흰쥐의 치사율이 증가하였다. D군과 비교하였을 때 목단피 투여로 흰쥐의 치사율이 증가하였는데, 특히 D군에서는 흰쥐의 생존율이 100%인데 반해 목단피를 투여한 D+P50과 D+P100군에서는 흰쥐의 생존율이 50%와 75%로 감소하였다. 또한 독성 효과가 없다고 알려진 녹차 처리군(D+G100)에서도 12.5%의 치사율을 나타내었다(Table I).

Table I. The Survival Rate of Experimental SD-rats

Group	Date (days)	No. of rats	No. of Survival	Survival rate (%)
N	7	7	7	100
	14	7	7	100
	28	7	7	100
N+G100	7	7	7	100
	14	7	7	100
	28	7	7	100
N+P100	7	6	6	100
	14	6	6	100
	28	6	6	100
D	7	8	8	100
	14	8	8	100
	28	8	8	100
D+G50	7	8	8	100
	14	8	8	100
	28	8	8	100
D+G100	7	8	7	87.5
	14	7	7	87.5
	28	7	7	87.5
D+P50	7	8	8	100
	14	8	6	75
	28	6	4	50
D+P100	7	8	8	100
	14	8	6	75
	28	6	6	75

· N : Normal group, no STZ injection.

· N+P100 or G100 : Normal group orally fed with PSA or green tea extract (100mg/kg/day).

· D : Diabetes group.

· D+G50, G100 : Diabetes group orally fed with green tea extract (50mg/kg/day, 100mg/kg/day).

· D+P50, P100 : Diabetes group orally fed with PSA extract (50mg/kg/day, 100mg/kg/day).

2. 체중과 식이섭취에 미치는 영향

4주 후 N군과 당뇨군(D, D+P50 및 D+P100)의 체중 변화에 유의적인 차이가 나타났다. 즉, 실험기간 동안 체중이 증가한 N군과는 달리 STZ를 복강에 투여한 D군은 4주 후 체중이 감소하였다. 한편 4주 후 D군의 체중증가(-1.93±21.5)와 비교 시, 목단피 추출물을 투여한 D+P50(17.63±41.15)과 D+P100(21.7±82.05)군 간의 유의적인 차이는

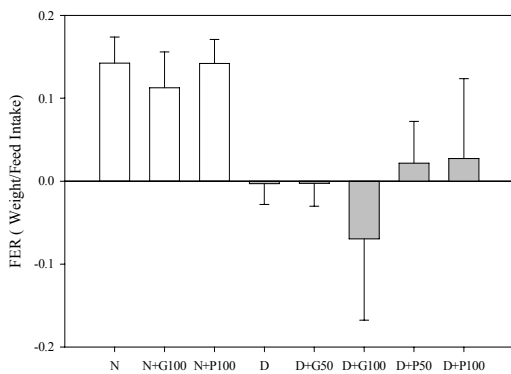


Fig. 2. The effect of PSA extracts on the FER of diabetic rats after 4 weeks

없었지만 목단피 투여에 의해 체중감소를 약간 지연시키는 경향을 나타내었다. 또한 4주간 섭취된 사료에 대한 체중 증가율을 나타낸 FER(식이효율)은, 목단피를 투여한 당뇨군과 D군간의 유의성 있는 차이는 없었지만, 식이효율이 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 반면, 녹차추출물(D+G100)인 경우는 오히려 D군보다 체중감소율이 증가하였다 (Table II, Fig. 2).

3. 각 장기의 무게 변화에 미치는 영향

흰쥐에게 STZ로 당뇨를 유발한 다음 목단피 추출물 투여 전후의 장기 무게 변화를 조사하였다. STZ로 유발된 모든 당뇨흰쥐에서 비장을 제외한 장기의 무게는 N군에 비해 증가하였으며, 대조군으로 사용된 녹차 급여 당뇨흰쥐의 경우 신장에서 사료를 급여하지 않은 D군보다 유의성 있는 증가를 나타내었다. 반면 목단피를 투여한 D+P50과 D+P100군은 D군에 비해 모든 장기의 무게에 대해서 유의성 있는 차이를 나타내지 않았지만, 무게

Table II. Changes in Body Weight Gains, Feed Intake and Feed Efficiency Ratios (FER) of PSA

	Weight gain(g)	Feed intake(g)	FER ^{***}
N (n=4)	78,50±16,94	648,50±130,81	0,14±0,03 ^a
N+G (n=6)	86,17±33,07	594,50±47,38	0,11±0,04 ^a
N+P100 (n=6)	77,08±15,61	531,50±17,68	0,14±0,03 ^a
D (n=7)	-1,93±21,50	887,00±72,12	0±0,03 ^{bc}
D+G50 (n=6)	-2,25±23,37	858,50±26,16	0±0,03 ^{bc}
D+G100 (n=5)	-58,60±85,00	826,50±54,45	-0,07±0,1 ^c
D+P50 (n=4)	17,63±41,15	737,50±108,19	0,02±0,05 ^b
D+P100 (n=5)	21,70±82,05	809,00±62,23	0,03±0,1 ^b

FER = weight gain / feed intake.

All values are mean±SD.

*** represents that groups within same letters are significantly different at $p < 0.05$ by ANOVA.

Different alphabet in the same letter means significantly different value at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

를 감소시키는 경향을 나타내었다. 각 처리군의 흰 쥐 체중 100g 당 장기의 상대적인 무게 (ex. Liver index)를 나타낸 그림에서 볼 수 있듯이 모

든 장기에서 목단피 추출물 처리군과 당뇨그룹 간의 유의성 있는 차이는 확인되지 않았다(Table III, Fig. 3).

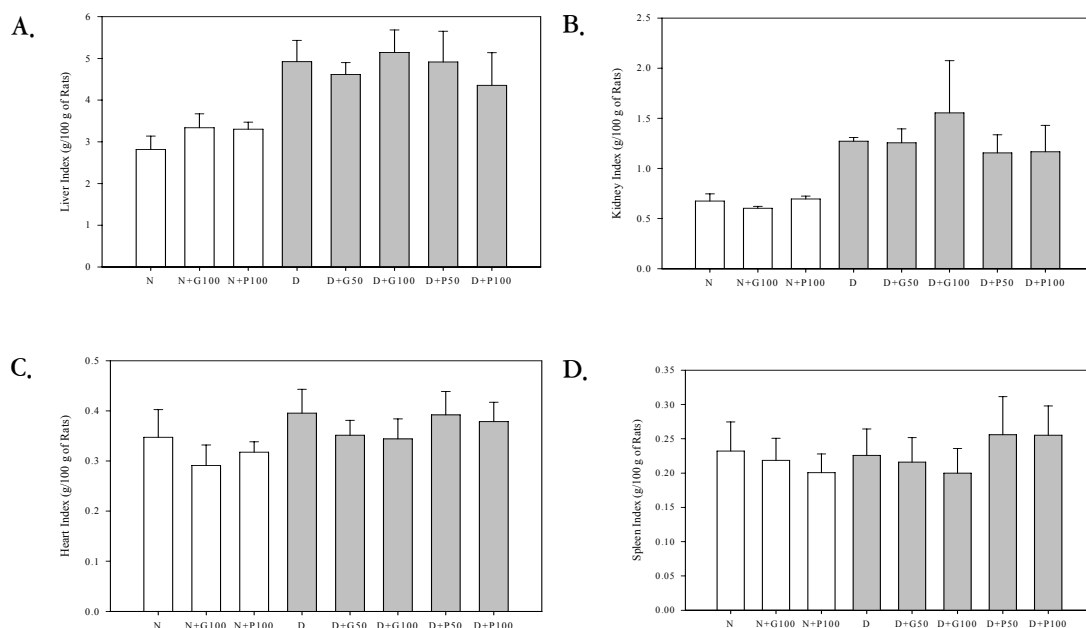


Fig. 3. Effects of PSA extract on liver, kidney, spleen and heart index (g/100g of body weight) in STZ-induced diabetic rats Each bar represents the mean \pm SD.

Table III. Effects of PSA Extract on each Organ in STZ-induced Diabetic Rats

	Kidney ^{***}	Spleen	Heart [*]	Liver ^{***}
N (n=3)	0.67 \pm 0.07 ^c	0.23 \pm 0.04	0.35 \pm 0.06 ^{ab}	2.82 \pm 0.32 ^c
N+G100 (n=5)	0.60 \pm 0.02 ^c	0.22 \pm 0.03	0.29 \pm 0.04 ^b	3.34 \pm 0.33 ^c
N+P100 (n=6)	0.69 \pm 0.03 ^c	0.20 \pm 0.03	0.32 \pm 0.02 ^b	3.30 \pm 0.17 ^c
D (n=6)	1.27 \pm 0.04 ^b	0.23 \pm 0.04	0.40 \pm 0.05 ^a	4.92 \pm 0.51 ^{ab}
D+G50 (n=6)	1.26 \pm 0.14 ^b	0.22 \pm 0.04	0.35 \pm 0.03 ^{ab}	4.62 \pm 0.28 ^{ab}
D+G100 (n=3)	1.55 \pm 0.52 ^a	0.20 \pm 0.04	0.34 \pm 0.04 ^{ab}	5.14 \pm 0.54 ^a
D+P50 (n=3)	1.15 \pm 0.18 ^b	0.26 \pm 0.06	0.39 \pm 0.05 ^a	4.91 \pm 0.74 ^{ab}
D+P100 (n=5)	1.17 \pm 0.26 ^b	0.26 \pm 0.04	0.38 \pm 0.04 ^a	4.36 \pm 0.78 ^b

All values are mean \pm SD.

*** represents that groups within same letters are significantly different at $p < 0.05$ by ANOVA.

Different alphabet in the same letter means significantly different value at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

4. 혈당에 미치는 영향

당뇨를 유발하지 않은 대조군에서는 목단피 추출물의 투여가 혈당에 어떠한 영향도 미치지 않는 것으로 확인되었다. 반면, 당뇨가 유발된 흰쥐인

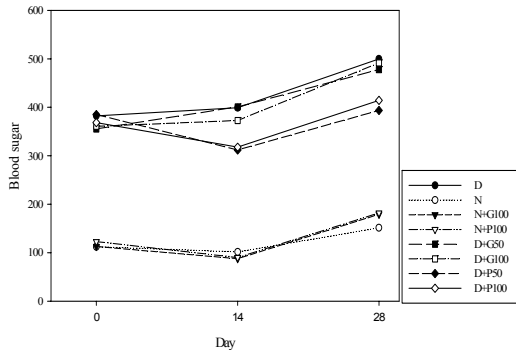


Fig. 4. Changes in the blood glucose level (mg/dl) of PSA extract supplemented rats

●, Diabetes group; ○, Normal group; ▼, Normal group orally fed with green tea extract (100mg/kg/day); ▽, Normal group orally fed with PSA extract (100mg/kg/day); ■, Diabetes group orally fed with green tea extract (50mg/kg/day); □, Diabetes group orally fed with green tea extract (100mg/kg/day); ◆, Diabetes group orally fed with PSA extract (50mg/kg/day); ◇, Diabetes group orally fed with PSA extract (100mg/kg/day).

경우는 실험기간 4주 후 정상군에 비해 혈당이 유의성 있게 증가하였다($p < 0.05$). 대조군으로 사용된 녹차추출물 투여군은 당뇨 유발된 흰쥐의 혈당 감소에 효과적이지 못하였다. 목단피 추출물 투여군은 당뇨흰쥐의 혈당을 유의성 있게 감소시키지는 못하였지만 약간 감소하는 경향을 나타내었다 (Table IV, Fig. 4).

5. 혈액 생화학적 지표에 미치는 영향

목단피 추출물의 투여가 STZ로 유발된 당뇨흰쥐에서 혈액 중의 생화학적 지표물질 함량에 미치는 영향을 측정하였다. 혈액 중 총 콜레스테롤 농도를 측정한 결과 N군은 81.5022.69인 반면 D군은 106.7118.77로 유의성 있는 증가를 나타내었다. 한편 목단피 추출물을 투여한 D+P50과 D+P100군은 4주 후 총 콜레스테롤 함량이 117.7516.80와 84.0027.74로 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았지만, D+P100군의 경우 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 혈장 HDL-cholesterol 함량은 비당뇨군에 비해 당뇨대조군과 당뇨실험군이 유의성 있게 높았으며($p < 0.05$), 당뇨대조군과

Table IV. The Blood Glucose Level of PSA Extract supplemented Rats

	D7 ^{***}	D14 ^{***}	D28 ^{***}
N	112.25±21.41	101.50±22.35	151.25±48.86
N+G100	112.67±19.12	87.50±13.81	179.00±38.62
N+P100	122.83±15.84 ^b	90.00±14.88 ^b	182.00±49.83 ^b
D	382.29±98.16 ^a	399.00±37.47 ^a	500.00±34.22 ^a
D+G50	355.50±105.31 ^b	400.83±113.70 ^a	477.83±74.97 ^a
D+G100	360.71±49.74 ^b	372.71±117.24 ^a	491.50±41.25 ^a
D+P50	385.13±67.46 ^a	312.00±129.03 ^a	393.50±183.78 ^a
D+P100	368.43±83.76 ^a	317.80±156.13 ^a	414.40±154.17 ^a

All values are mean±SD.

*** represents that groups within same letters are significantly different at $p < 0.05$ by ANOVA.

Different alphabet in the same letter means significantly different value at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

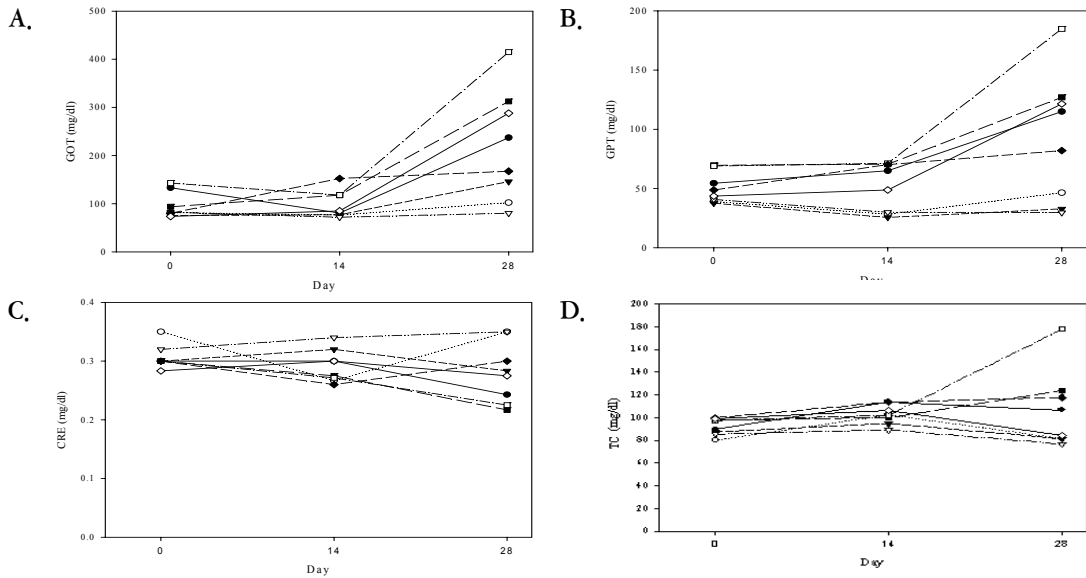


Fig. 5. Changes in GOT, GPT, CRE and total cholesterol (TC) of PSA extract supplemented rats

●, Diabetes group; ○, Normal group; ▼, Normal group orally fed with green tea extract (100mg/kg/day); ▽, Normal group orally fed with PSA extract (100mg/kg/day); ■, Diabetes group orally fed with green tea extract (50mg/kg/day); □, Diabetes group orally fed with green tea extract (100mg/kg/day); ◆, Diabetes group orally fed with PSA extract (50mg/kg/day); ◇, Diabetes group orally fed with PSA extract (100mg/kg/day).

Table V. Effects of PSA Extract on Total Cholesterol, HDL, GOT, GPT and CRE in STZ-induced Diabetic Rats

		N	N+G100	N+P100	D	D+G50	D+G100	D+P50	D+P100
TC	D7	80,00±4,24	87,40±15,22	85,40±12,6	89,50±4,43	97,33±20,84	97,50±17,55	99,71±23,16	98,83±14,15
	D14	102,33±27,47	94,80±41,27	89,20±12,07	114,00±15,56	100,00±9,63	102,14±18,11	113,40±29,59	106,40±18,50
	D28**	81,50±22,69 ^b	81,33±5,16 ^b	76,67±8,43 ^b	106,71±18,77 ^b	123,67±16,24 ^b	177,75±104,82 ^a	117,75±16,8 ^b	84,00±27,74 ^b
HDL	D14***	54,33±6,81 ^b	43,17±6,08 ^b	50,00±10,42 ^b	88,50±9,19 ^a	80,00±2,45 ^a	89,71±14,29 ^a	30,14±36,18 ^a	77,20±21,56 ^a
	D28***	54,00±30,04 ^b	50,33±2,8 ^b	49,83±9,79 ^b	84,57±17,45 ^a	86,50±18,74 ^a	90,25±14,45 ^a	75,20±8,38 ^a	71,50±37,93 ^{ab}
GOT	D7	81,50±7,78	75,40±8,82	82,20±7,09	133,00±48,91	93,67±11,37	142,83±99,01	80,14±17,68	73,67±23,48
	D14	76,67±7,02	77,00±18,93	71,80±4,82	80,50±7,78	117,75±40,02	117,86±73,33	152,40±69,29	85,00±14,46
	D28*	102,25±31,06 ^{bc}	145,83±67,43 ^{bc}	80,17±23,3 ^c	237,14±149,22 ^{abc}	312,50±199,33 ^{ab}	415,00±235,17 ^a	167,50±124,04 ^{bc}	288,00±254,46 ^{abc}
GPT	D7	39,00±7,07	37,60±4,56	40,80±13,14	54,50±14,46	69,67±2,31	69,00±35,00	48,71±14,1	43,67±13,88
	D14**	28,33±10,12 ^b	25,60±10,97 ^b	30,00±5,48 ^b	65,00±5,66 ^a	70,50±22,25 ^a	71,29±32,37 ^a	70,20±32,7 ^a	48,80±19,08 ^{ab}
	D28***	46,50±37,06 ^{cd}	32,83±4,62 ^d	29,67±7,81 ^d	115,00±47,59 ^{abc}	127,00±57,39 ^{ab}	184,75±104,1 ^a	82,00±25,73 ^{bcd}	121,50±96,62 ^{abc}
CRE	D7	0,35±0,07	0,30±0	0,32±0,04	0,30±0	0,30±0	0,30±0	0,30±0	0,28±0,04
	D14	0,27±0,06	0,32±0,04	0,34±0,05	0,30±0	0,28±0,05	0,27±0,05	0,26±0,05	0,30±0
	D28**	0,35±0,1 ^a	0,28±0,04 ^{ab}	0,35±0,05 ^a	0,24±0,05 ^b	0,22±0,04 ^b	0,23±0,05 ^b	0,30±0 ^{ab}	0,28±0,1 ^{ab}

TC: total cholesterol, CRE: creatinine

All values are mean±SD.

*** represents that groups within same letters are significantly different at p<0.05 by ANOVA.

Different alphabet in the same letter means significantly different value at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

당뇨실험군간에는 유의성 있는 차이는 없었지만, 목단피를 투여한 군의 경우 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 간 세포의 손상이 진행되면서 GOT와 GPT가 혈액으로 다량 분비되는데, 비당뇨군과 비교해서 당뇨군은 실험 종료 4주 후 GOT와 GPT의 농도가 증가하는 경향을 나타내었지만 유의성 있는 차이는 없었다. 실험 종료 후 목단피를 투여한 D+P50군은 GOT와 GPT가 각각 167.50 ± 124.04 와 82.25 ± 25.73 으로 D군의 GOT(237.14 ± 149.22)와 GPT(115.00 ± 47.59)와는 유의적인 차이는 없으나 감소하는 경향을 나타내었다. 또한, 신장의 장애를 나타내는 creatinine의 혈중 농도를 측정된 결과 실험 종료 후 비당뇨군이 0.35 ± 0.10 수치를 나타내었지만 D군은 0.24 ± 0.05 로 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 목단피를 투여한 처리군인 D+P50과 D+P100군은 각각 0.30 ± 0.05 와 0.28 ± 0.10 으로 당뇨 대조군과는 유의적인 차이는 없으나 역시 정상군에 비해 감소하였다(Table V, Fig. 5).

6. 피부 콜라겐 양에 미치는 영향

STZ를 처리하여 당뇨를 유발한 흰쥐를 28일간 관찰했을때 체중은 증가하지 않았는데, 이는 피부 콜라겐 양의 감소와 관계있다. 피부 콜라겐의 양은 28일간 정상군, 당뇨군, 목단피 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 투여군으로 나누어 피부에서 hydroxyproline 양을 측정하였다.

당뇨군은 비당뇨군에 비해서 hydroxyproline의 양이 49.5% 감소하였고, PSA 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 군과 1000 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 군은 비당뇨군에 비해서 hydroxyproline의 양이 40.4%와 20.8% 감소하였다. 즉, 목단피를 투여하는 농도에 비례하여 당뇨흰쥐의 피부 콜라겐 감소가 억제되었다(Table VI, Fig. 6).

7. 인간 피부 섬유아세포의 MMP-1 생성에 미치는 영향

각각의 대조시약 및 약물 투여와 UVB조사 후 배양액에 분비된 콜라겐 분해효소MMP-1의 양을 측정하였다. 비조사군에 비해서 UVB조사 후에는 MMP-1의 생성량이 2.2배 증가하였고, 레티노이드 ($1 \mu\text{M}$)를 투여한 후에 MMP-1의 생성이 현저히

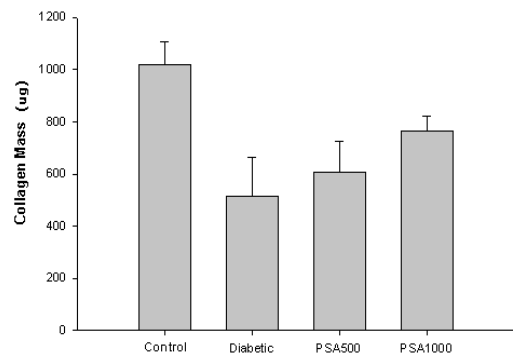


Fig. 6. The effect of PSA extract on collagen mass

Each bar represents the mean ± SD.

Table VI. Skin Collagen Mass PSA Treated Diabetic Rrats

	Control	Diabetic	PSA500	PSA1000
Mean	1018.00 ± 87.93	515.67 ± 146.57	607.67 ± 116.52	765.00 ± 58.40
P		Base	0.44	0.005

Skin hydroxyproline content of minced defatted skin 1.5g from 3 animals in each group 28 days
 · Control : normal group receiving distilled water
 · Diabetic : diabetic group (75mg/kg of STZ)
 · PSA500 : receiving STZ + PSA 500 $\mu\text{g/ml/day}$
 · PSA1000 : receiving STZ + PSA 1000 $\mu\text{g/ml/day}$

억제되었다(47.4%). 목단피를 투여한 군에서도 MMP-1의 생성이 억제되었는데 100, 250, 500 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 16.1, 23.7, 31.7 및 38.4%의 농도의존적 억제 효과를 보였고, 고농도에서는 레티노이드와 거의 유사한 억제 효과를 보여주었다. 레티노이드와 목단피 250, 500 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 MMP-1 생성억제결과는 통계적으로 유의성 있다 (Table VII, Fig. 7).

고 찰

STZ 로 유발된 당뇨병쥐에게 목단피를 투여하여 혈당강하효과 및 안정성에 대한 실험을 실시하

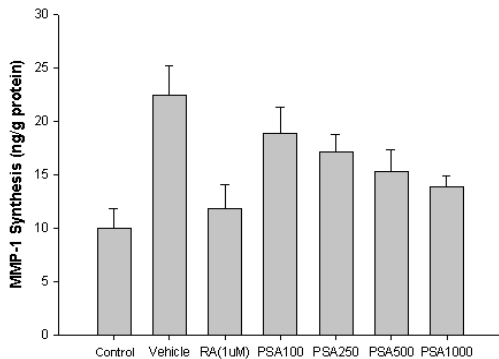


Fig. 7. The effect of PSA extract on MMP-1 Synthesis

Each bar represents the mean \pm SD.

였다. 체중과 식이효율, 장기 무게의 변화, 혈당 및 생화학적 지표를 측정하였다. 피부노화효과를 확인하기 위해 당뇨병쥐에서의 피부 콜라겐의 양의 변화를 측정하였다. 인간 피부 섬유아세포주에서 콜라겐 분해효소인 MMP-1생성을 억제하는 수준을 조사하였고, 그 효과를 항피부노화 물질로 알려진 레티노이드 (Retinoic acid)와 비교하였다.

실험에 사용되는 당뇨병쥐는 STZ의 강한 작용 또는 실험인자 (온도, 습도, 조명, 외부소음 및 cage 환경 등 스트레스를 줄 수 있는 인자들) 또는 실험숙련에 의해 실험 도중 사망하는 일이 발생하기도 한다. 본 실험에서도 일부 처리군에서 치사율이 증가하였고 특히 정상흰쥐에게 목단피를 투여한 N+P군에서도 흰쥐의 생존율이 감소한 것은 목단피의 독성효과에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 본다. 또한 독성 효과가 없다고 알려진 녹차 처리군(D+G100)에서도 12.5%의 치사율이 나타난 것을 볼 때 실험환경과 실험숙련도에 대한 점검이 필요하다고 본다.

당뇨가 유발된 흰쥐는 체내 대사의 퇴행적인 변화 때문에 식이 이용효율이 감소한다²⁸⁾. 본 실험모델에서도 이와 같은 결과를 관찰하였다. 목단피 투여군은 당뇨대조군과 유의성 있는 차이는 없었지만 체중감소를 약간 지연시켰고, FER (식이효율)은 목단피 투여군이 유의성 있는 증가를 나타내었다. 목단피의 투여는 당뇨로 인한 체내 대사의 퇴행적

Table VII. Inhibition of UVB-induced Collagenase Secretion by the PSA in Fibroblasts

	Control	Vehicle	RA	PSA100	PSA250	PSA500	PSA1000
Mean	10.03	22.40	11.80	18.87	17.17	15.33	13.83
	± 1.74	± 2.79	± 2.29	± 2.40	± 1.63	± 1.95	± 1.097
P		base	0,007	0,17	0,048	0,002	0,004

· Control : no treated cells

· Vehicle : cells were irradiated with UVB (15mJ/cm²)

· RA : cells treated with the RA(1 μM)

· PSA100, 250, 500, 1000: cells treated with PSA(100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$)

Three independent experiments were performed to determine the mean value of MMP-1 levels.

인 변화를 억제하는 것으로 보여지며, 당뇨의 주요 증상인 다식(polyphagia) 현상을 개선할 수 있을 것으로 사료된다.

STZ로 유발된 당뇨흰쥐는 혈액에 증가된 포도당의 산화가 진행되면서 혈액과 각 장기의 과산화물이 증가하게 된다. 또한 생성된 활성산소는 장기의 기능을 손상시키므로, 당뇨흰쥐의 장기가 점차 비대해지는 것으로 보고되고 있다²⁹⁻³¹. 간 비대는 정상적인 당 대사가 원활히 이루어지지 않아서 acetyl-CoA에 의한 지질 생합성 체계가 형성되어 간장 내에 지질 성분이 축적되기 때문이다³². 또한 신장의 경우, 당뇨병 초기에 고농도의 혈장 포도당이 세포막의 비대를 가져오는 UDP-galactose 또는 glycogen으로 대사되어 사구체내의 mesangial cell에 축적되므로 신장 비대를 초래한다³². 본 실험에서도 STZ로 유발된 모든 당뇨흰쥐에서 장기의 무게가 비당뇨군에 비해 증가하였다. 그러나 녹차 투여군과 목단피 투여군 모두, D군과의 유의성 있는 차이는 확인되지 않았다.

당뇨를 유발하지 않은 N군에서는 목단피 추출물의 투여가 혈당에 어떠한 영향도 미치지 않는 것으로 확인되었다. D군은 실험기간 4주 후 N군에 비해 혈당이 유의성 있게 증가하였다($p < 0.05$). 한편 녹차 투여군의 경우 혈당감소에 효과적이지 못했는데 이전에 보고된 논문의 결과와 동일하다^{33,34}. 목단피 투여군은 당뇨 유발흰쥐의 혈당을 유의적이지는 않으나 약간 감소시켰다. 당뇨상태에 의해 혈장과 조직내의 산화적 스트레스 증가는 지질과산화물을 증가시켜 당뇨병 환자에게 가장 흔한 심혈관 질환 합병증을 유발한다. STZ도 산화 유리기 생성을 증가시킨다³⁵. 따라서 당뇨에서의 혈당 강하는 합병증을 지연시키는 좋은 방안 중 하나로 생각된다.

당뇨가 유발되면서 정상군에 비해 혈액 내 GOT와 GPT의 농도가 증가하였으며, 목단피 투여로 두 수치가 유의적이지는 않으나 감소하였다. 목

단피 투여는 당뇨병에 의한 간 조직기능의 저하에 대한 보호효과가 어느 정도 있는 것으로 생각된다. 또한 신장의 장애를 나타내는 혈중 creatinine 농도 측정으로 STZ에 의한 직접적인 신장기능의 저하를 확인할 수 있는데^{30,31}, 본 실험결과에서는 오히려 정상군에 비해 당뇨를 유발한 군들이 creatinine 함량이 감소하였다. 정확한 결과를 얻기 위한 더 많은 연구가 필요하다. D군과 비교해서 목단피를 투여한 D+P50과 D+P100군 간의 유의성 있는 차이는 없으므로 STZ에 의한 신장 기능저하를 보호하는 효과가 없는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 앞선 신장 무게에 대한 결과와 어느 정도 일치하는 결과로 보여진다.

당뇨흰쥐의 피부 콜라겐 양을 측정하기 위해 hydroxyproline 함량을 측정한 결과, 당뇨군은 비당뇨군에 비해서 hydroxyproline의 양이 49.5% 감소하였고, 목단피 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 군과 1000 $\mu\text{g/ml}$ 를 투여한 군은 비당뇨군에 비해서 hydroxyproline의 양이 40.4%와 20.8% 적게 측정되었다. 이는 STZ로 유발된 당뇨흰쥐에 투여한 목단피의 농도에 비례하여 피부콜라겐의 감소가 유의성 있게 억제된 것이다.

피부콜라겐의 감소는 collagenase의 분비와 반비례하므로, 인간 피부 섬유아세포주에 UVB조사 및 약물투여를 하여 배양액에 분비된 MMP-1을 측정하였고, 항피부노화제로 알려진 레티노이드의 효과와 비교실험을 하였다. UVB조사에 의해 MMP-1의 생성량이 2.2배 증가하고, 레티노이드 (1 μM)의 투여는 MMP-1의 생성을 현저히 억제(47.4%)시킨다는 것을 알 수 있었다. 목단피 투여군 역시 MMP-1의 생성이 억제되었는데 250, 500 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 23.7, 31.7 및 38.4 %의 유의성 있는 변화가 보여졌다. 목단피의 투여농도에 비례하여 MMP-1의 생성이 억제되었고, 특히 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 레티노이드와 거의 유사한 억제 효과를 보여주었다.

결론

목단피의 항피부노화효과를 확인하기 위해 당뇨병 쥐에서의 피부 콜라겐 양의 변화를 측정하고, 인간 피부 섬유아세포주에서 콜라겐 분해효소인 MMP-1생성을 억제하는 수준을 조사하였다.

1. 목단피 투여는 당뇨병쥐의 식이효율을 유의적으로 증가시켰고($p < 0.05$), 혈당과 총콜레스테롤 및 GOT와 GPT는 유의적이지는 않으나 약간 감소시켰다.
2. 목단피 투여 농도에 비례하여 당뇨병쥐에서의 콜라겐 감소가 유의적으로 억제되었다($p=0.005$).
3. 목단피 투여는 UVB를 조사한 인간 피부 섬유아세포주에서 MMP-1의 생성을 유의적으로 저하시켰다($p < 0.05$). 특히, $1000 \mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 레티노이드(47.4%)와 유사한 억제효과(38.4%)가 나타났다.

이상의 결과는 목단피가 피부노화를 효과적으로 억제함을 의미한다. 심도깊은 고찰을 위하여 목단피의 항피부노화 작용에 대한 구체적인 기전과 피부질환에 사용되는 다른 瘀血劑의 항피부노화 효과에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. 두호경 편저. 동의신계학. 서울:성보사. 2003;1141-61.
2. Schneir M, Bowersox J, Ramamurthy N, Yavelow J, Murray J, Edin-Folz E, Golub L. Response of rat connective tissues to streptozotocin diabetes: Tissue specific effects on collagen metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1979;583(1):95-102.
3. Spanheimer RG, Umpierrez GE, Stumpg V. Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes*. 1988;37:371-6.
4. Gilchrist BA. Skin Aging and photoaging: an overview. *J Am Acad Dermatol*. 1989;21:610-3.
5. Bernstein EF, Chen YQ, Tamai K, Shepley KJ, Resnik KS, Zhang H, Tuan R, Mauviel A, Uitto J. Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J Invest Dermatol*. 1994;103(2):182-6.
6. 김영만. 당뇨병의 한방요법. 대한한의학회지. 1994;4:139-58.
7. 허종희. 加味六味地黃湯이 Streptozotocin 백서 혈당량에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1984;7:149-50.
8. 곽규호, 김성훈, 송효정. 六味地黃湯加山藥이 Alloxan 당뇨병 백서의 혈당 및 혈청변화에 미치는 영향. 동의병리학회지. 1993;8:137-56.
9. 변성희. 六味地黃湯 및 鹿茸加味方이 흰쥐 당뇨병에 대한 면역조직화학적 연구. 제한동의학술원논문집. 1995;1(1):1-16.
10. 이윤경, 김순동. Diabetes-prone BB Rat을 이용한 加味六味地黃湯의 항당뇨 효과. 한국식품과학회지. 2000;32(5):1206-12.
11. 서은경, 강동휘, 서진우, 김경숙, 이태균, 이영춘, 남경수, 김철호. 비만 실험동물쥐에서의 육미지황탕의 항당뇨 효과. 생명과학회지. 2000;10(4):388-96.
12. 안상원, 이철완. 숙지황과 육미지황탕이 노화과정 흰쥐에서의 항산화기전에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1999;8(1):593-623.
13. 박성민, 임명현, 이준희, 박재현. 보중익기탕과 육미지황탕이 노화축진생쥐의 간장내 항산화작

- 용에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003;18(4):175-91.
14. 신민교. 임상본초학. 서울:영림사. 2002:385-7.
15. 전국한외과대학 본초학교실. 본초학. 서울:영림사. 1999:193-4.
16. 노영득, 심영섭, 송호준, 신민교. 목단피의 항염효과에 관한 연구. 대한본초학회지. 2004;19(3):13-24.
17. 부용출, 전체옥. 녹차와 목단피의 항산화 성분. 한국응용생명화학회지. 1993;36(5):326-31.
18. 권오근, 손진창, 김상철, 정신교, 박승우. 목단피 추출물의 항균 및 항산화 작용. 한국식품저장유통학회지. 1998;5(3):281-5.
19. 박선민, 전동화, 박춘희, 장진선, 박성규, 고병섭, 김보중, 최수봉. 목단피 추출물의 혈당 강하 효과. 한국식품과학회지. 2004;36(3):472-7.
20. Sabu MC, Smitha K, Ramadasan K. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol*. 2002;83:109-16.
21. Babu PVA, Sabitha KE, and Shyamaladevi CS. Therapeutic effect of green tea extract on advanced glycation and cross-linking of collagen in the aorta of streptozotocin diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33:351-7.
22. Schneir M, Imberman M, Ramamurthy N, Golub L. The in vivo fractional rate of gingival collagen production in non-diabetic and diabetic rats: Application of a novel approach for quantification-pool expansion. *J Periodontal Res*. 1986;21:56-63.
23. Schneir M, Imberman M, Ramamurthy N, Golub L. Streptozotocin-induced diabetes and the rat periodontium: Decreased relative collagen production. *Collagen Rel Res*. 1988;8:221-32.
24. Schneir M, Ramamurthy N, Golub L. Skin collagen metabolism in the streptozotocin-induced diabetic rat: Free hydroxyproline, the principal in vivo degradation product of newly synthesized collagen-probably procollagen. *Collagen Rel Res*. 1984;4:183-93.
25. Schneir M, Ramamurthy N, Golub L. Minocycline-treatment of diabetic rats normalizes skin collagen production and mass: possible causative mechanisms. *Matrix*. 1990;10:112-23.
26. Zhang J, Fujimoto N, Iwata K, Sakai T, Okada Y, Hayakawa T. A one-step sandwich enzyme immunoassay for human matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta*. 1993;219:1-14.
27. Ho JN, Lee YH, Lee YD, Jun WJ, Kim HK, Hong BS, Shin DH, Cho HY. Inhibitory effect of Aucubin isolated from *Eucommia ulmides* against UVB-induced matrix metalloproteinase-1 production in human skin fibroblasts. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005;69(11):2227-31.
28. Chatterjea MN, Shinde R. *Text Book of Medical Biochemistry*, fifth ed. New Delhi: Jaypee Brothers, Medical Publishers (P) Ltd., 2002:17.
29. Stanely P, Mainzen P, Venugopal PM. Hypoglycemic and the related actions of *Tinospora cordifolia* roots in alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharm*.

- 2000;70:9-15.
30. Singh SN, Vats P, Suri S, Shyam R, Kumria MML, Ranganathan S, Sridharan K. Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. *J Ethnopharm.* 2001;76:269-77.
31. Maiti R, Jana D, Das UK, Ghosh D. Antidiabetic effect of aqueous extract of seed of *Tamarindus indica* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharm.* 2004;92:85-91.
32. Kim HK, Kim MJ, Cho HY, Kim EK, Shin DH. Antioxidative and anti-diabetic effects of amaranth (*Amaranthus esculantus*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct.* 2006;24(3):195-9.
33. 김현만, 채봉남, 노혜림, 이성규, 홍은경, 정윤석. 제2형 당뇨병 환자에서의 녹차의 혈당 조절 효과. *국제녹차심포지움.* 1999;5:31-9.
34. 석지혜, 김미경, 주재원, 한지숙, 박정현. 녹차 폴리페놀이 제2형 당뇨병환자의 혈당, 지질 및 항산화 체계에 미치는 영향. *당뇨병.* 2006; 30(3):217-25.
35. Fiordaliso F, Cuccovillo I, Bianchi R, Bai A, Doni M, De Angelis N, Ghezzi P, Latini R. Cardiovascular oxidative stress is reduced by an ACE inhibitor in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Life Sci.* 2006;79(2):121-9.