

# UVB 조사에 의한 육미지황탕의 광노화 피부 억제에 관한 실험적 연구

전혜숙 · 이창현<sup>1</sup> · 안홍석\*

성신여자대학교 식품영양학과, 1 : 우석대학교 한의과대학 해부학교실

## Experimental Studies on the Inhibitory Effects of Yukmijiwhang-tang on Photoaging Skin Induced by UVB Irradiation

Hye Sook Jeon, Chang Hyun Lee<sup>1</sup>, Hong Seok Ahn\*

Department of Food & Nutrition, Sungshin Women's University,  
1 : Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Woosuk University

The purpose of this study is to investigate the protective effects of Yukmijiwhang-tang(YM) water extracts against the UVB irradiation on the human keratinocyte HaCaT cells. We observed the effects of YM on the oxidative stress, gene expression of pro-inflammatory cytokine such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and matrix metalloproteinase-9 in UVB-irradiated HaCaT cells. On the effects of oxidative stress and antioxidant function on the treatment with YM, The activity of xanthine oxidase(XO) was significantly decreased by treatment of YM in all the concentrations( $p < 0.01$ ). The activity of superoxide dismutase(SOD) and catalase(CAT) was significantly increased by treatment of YM in a dose dependent manner( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ ). DPPH radical was erased by treatment of YM under dose of 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration. Treatment of HaCaT cells with YM had also significantly reduced intracellular ROS produced by UVB irradiation in a dose dependent manner( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ). Gelatin zymography assay showed that YM downregulated the MMP-9 activity in UVB-irradiated HaCaT cells. RT-PCR analysis revealed that YM suppressed the expression of IL-1 $\beta$  and MMP-9 however, it has no effects on the expression of TNF- $\alpha$  and MMP-3. Our study suggests that Yukmijiwhang-tang exert protective actions on the UVB-irradiated HaCaT cells largely by anti-oxidative and anti-inflammatory processes.

keywords : Yukmijiwhang-tang, UVB, XO, SOD, CAT, DPPH, ROS, Gelatin Zymography, MMP-9, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$

### 서 론

최근 인체의 건강이나 피부미용에 대한 관심이 크게 높아지면서 내적요인뿐 아니라 자외선 등 외적요인에 의한 피부 노화 억제 또는 노화 개선을 위한 목적으로 화장품, 식품 및 의약품을 비롯한 다양한 분야에서 항노화 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

피부 노화는 나이가 증가하면서 개인의 유전적인 요인에 의하여 발생하는 내재적인 노화(intrinsic aging)와 자외선이나 외부 물질의 자극 등에 의한 산화적 스트레스에 의하여 발생하는 광노화(photoaging)로 나눌 수 있다<sup>1)</sup>. 광노화 피부는 태양광선 중의 자외선에 의한 만성적인 노출로 피부의 구조와 기능에 부작용을 초래하며, 자외선의 종류와 조사량에 따라 피부에 화상, 면역억제, 암 및 조기노화(premature aging)와 같은 손상을 입히고 있다<sup>2)</sup>.

또한 반복적으로 노출되면 지속적인 손상에 의하여 피부암을 초래한다<sup>3)</sup>. 광노화 된 피부의 특징적인 증상은 주름형성, 피부늘어짐, 색소침착, 갈색반점 및 피부가 가죽같이 두꺼워진다<sup>4)</sup>.

Ultraviolet B(UVB)는 피부 세포내 활성산소를 생성하여 직접 DNA의 손상을 일으켜 항산화 방어체계의 불균형에 의한 산화적 스트레스를 유발시키고, 또한 기질금속 단백질분해효소(matrix metalloproteinase, MMPs)의 활성을 증가시켜 결합조직성분의 분해, 절단 및 비정상적인 교차결합에 의하여 주름을 생성시킨다<sup>5,6)</sup>. 자외선에 의한 활성산소종은 피부 세포 내 여러 가지 신호전달체계를 활성화시킴으로서 MMPs를 증가시켜 콜라겐의 생성과 탄력섬유의 합성을 감소시켜 피부주름을 생성하는 광노화의 주된 원인이 되고있다<sup>7)</sup>.

최근에는 피부노화의 기전에 대한 연구가 활발히 진행되어

\* Corresponding author

Hong-Seok Ahn, Department of Food & Nutrition, Sungshin Women's University, Woonjung Green Campus, Seoul 142-732, Korea.

E-mail : hsahn@sungshin.ac.kr · Tel : +82-2-920-7204

Received : 2014/07/23 · Revised : 2014/09/11 · Accepted : 2014/09/19

© The Korean Society of Korean Pathology, The Korean Society of Korean Physiology

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529

Available online at www.hantopic.com

대부분 유기합성된 비타민 유도체가 많이 사용되고 있으며<sup>8)</sup>, 이러한 유도체들은 분자 자체가 매우 불안정하여 많은 양이 피부에 유입되면 강한 피부자극을 일으키고, 적은 양이라도 사람의 체질에 따라 과민반응을 일으킬 수 있으므로 주름개선과 예방을 위하여 부작용이 적은 기능성 소재를 천연물에서 찾으려고 하고 있다<sup>9-11)</sup>. 국내에서도 hairless mice나 인체 피부세포를 이용하여 부작용이 적은 천연 식물소재에서 피부노화 억제와 관련된 기능성 물질을 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>12,13)</sup>.

임상적 또는 실험적으로 다양한 분야에 활용되고 있는 처방인 육미지황탕은 산수유, 백봉령, 택사, 숙지황, 구기자, 목단피 등 6종의 약재로 구성되어 있으며, 지금까지 임상에 널리 활용되고 있다. 육미지황탕의 실험적 연구로는 면역기능<sup>14)</sup>, 아토피피부염<sup>15)</sup>, 항염작용<sup>16)</sup> 등에 대하여 보고하였고, 또한 노화 환경에서 과산화지질의 생성억제와 대사효소계에 긍정적인 영향을 미친다는 보고<sup>17)</sup>와 활성산소 분해계 효소활성 증가<sup>18)</sup>에 의한 항산화 기능이 있다고 보고하였다.

이에 본 연구에서는 보습제인 육미지황탕을 이용하여 피부노화 억제와 관련된 인자들에 미치는 변화를 생화학적 및 분자생물학적으로 관찰하여 광노화 피부 억제와 관련된 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 과학적으로 검증하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약은 세포배양을 위하여 fetal bovine serum(FBS)과 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 등을 이용하였고, 항산화 관련 실험을 위하여 xanthine oxidase activity assay kit (BioVision Inc, CA, USA), superoxide dismutase assay kit 및 catalase assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI)를 이용하였다.

본 실험에 사용된 기기는 육미지황탕 추출액의 농축을 위하여 rotary vacuum evaporator (NE2001형, EYELA, Japan)를 이용하였고, 피부 자외선 조사를 위하여 20W Ultraviolet B(UVB) lamp(Sankyo G20T10E, 20W, Japan)와 UV light meter(UV-340, UVA+UVB, Lutron, Taiwan)를 이용하였다. 세포배양 관련 실험을 위하여 CO<sub>2</sub> incubator(SHEL LAB, Korea)와 inverted microscope(Carl Zeiss Inc., Axiovert 25C, Germany)를 이용하여 관찰하였다. 분자생물학적 실험을 위하여 Wallac 1420 VICTOR3 multilabel counter(PerkinElmer Life Science, Turku, Finland), Ultra-Turrax (T10 basic, (주)엘케이 랩코리아), Vacuum drying oven(국제 싸이언, Korea) 및 Microplate reader(Molecular Device, VERSAmax, Sunnyville, CA, USA) 등을 이용하였다.

### 2. 시료 제조

육미지황탕의 처방구성은 방약합편<sup>19)</sup>에 준하였으며, 약재는

삼흥건재약업사(경동시장)에서 국산(제품)만을 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 육미지황탕의 처방 내용은 다음과 같다 (Table 1). 육미지황탕 10첩 분량(458 g)을 둥근 플라스크에 넣고 증류수 4L를 넣은 후 약 3시간 전탕하여 여액을 rotary vacuum evaporator (NE2001형, EYELA, Japan)로 감압 농축하여 육미지황탕 추출물(YM) 182 g을 회수하였다. 회수한 YM을 95% EtOH, 85% EtOH, 75% EtOH로 다시 추출하여 여과하였다. 여과액은 rotary vacuum evaporator로 감압 농축한 후 동결 건조하여 86 g을 회수하였다.

Table 1. The composition of Yukmijihwang-tang prescription.

Yukmijihwang-tang		
Name of Herbs	Pharmacognostic Name	Weight(g)
熟地黄	<i>Rehmanniae Radix Preparat</i>	14.0
山藥	<i>Discoreae Rhizoma</i>	7.5
山茱萸	<i>Cornus Officinalis</i>	7.5
白茯苓	<i>Poria Cocos Wolf.</i>	5.6
牡丹皮	<i>Cortex Moutan Radicis</i>	5.6
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	5.6
Total		45.8

### 3. 세포배양

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

### 4. 세포생존율 측정

Mosmann<sup>20)</sup>이 보고한 방법에 따라 살아있는 세포의 효소활성으로 인한 tetrazolium dye인 MTT를 자줏빛의 불용해성 포르마잔으로 환원하는 원리를 이용한 MTT assay를 통하여 육미지황탕(YM)이 HaCaT 세포의 생존에 미치는 효과를 측정하였다. HaCaT 세포를 96-well plate에 well 당 1×10<sup>5</sup> cells 밀도로 분주한 후 농도별로 YM을 처리하여 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 습도 100 % 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 새로운 배지로 교환하여 4 시간 동안 배양한 후 PBS에 용해한 MTT(0.5 mg/ml)용액 50 µl/ml를 각 well에 넣고 3 시간 동안 배양하였다. 그런 다음 배양액을 버리고 0.01N HCl로 만든 10% SDS를 100 µl/well씩 넣어 MTT-formazan crystal을 용해한 후 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 확인하였다. 살아있는 세포의 백분율은 미처리 세포를 기준으로 계산하였고, 모든 실험은 3번 반복하였다.

### 5. Ultraviolet B(UVB) 조사

세포배양 실험의 자외선 조사는 20W Ultraviolet B(UVB) lamp(Sankyo G20T10E, 20W, Japan)에서 조사한 광원을 UV Light meter(UV-340, UVA+UVB, Lutron, Taiwan)로 측정된 후 UVB 강도(intensity)가 0.3 mW/cm<sup>2</sup>가 되는 높이에서 3×10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 DMEM medium에 부유시켜 6 well plate에 분주한 후 YM을 실험의 종류에 따라 농도별로 선 처리(0.01, 0.1, 0.5, 1 mg/ml)한 후 24시간 동안 배양한 후 60 mJ/cm<sup>2</sup>를 1 회 조사하였다.

## 6. 유해산소 대사 활성도 측정

### 1) Xanthine oxidase(XO) 생성량 변화

XO의 생성량은 Bergmeyer 등<sup>21)</sup>의 방법에 따라 HaCaT cells(human keratinocytes)을 이용하여 수행하였다. HaCaT 세포를 3×10<sup>5</sup> cells/well에 준비한 후 YM 100, 500, 1000 µg/ml을 선 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 UVB를 60 mJ/cm<sup>2</sup>로 조사하고 15분후에 각 well에 lysis buffer를 넣고 IKA homogenizer(ULTRA-TURRAX)를 이용하여 lysis시켰다. Assay buffer로 lysis한 HaCaT cell lysate내 XO 함량을 측정하기 위해 xanthine oxidase activity assay kit (BioVision Inc., CA, USA)를 사용하였으며, 사용방법은 제조회사의 지시에 따라 시행하였다. 사용한 표준물질은 hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 사용하였다. Standard는 3차 증류수로 희석하여 0.1 mM 농도로 조제하였다. 조제한 표준물질과 cell lysate를 96 well plate에 각각 50 µl씩 넣은 후 xanthine oxidase mixture (46 µl assay buffer, 2 µl substrate mix, 2 µl enzyme mix)를 50 µl 처리하여 즉시 microplate reader를 이용해 570 nm에서 측정하였고(T1, A1), 차광하여 30분 후에 다시 측정하였다(T2, A2). XO 생성량은 다음과 같은 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{XO Activity} = \frac{B}{(T2-T1) \times V} \times \text{dilution factor} = \text{nmol/min/ml} = \text{mU/ml}$$

B : the amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated by XO from standard curve (in nmol), T1 : the time of the first reading (in min), T2 : the time of the second reading (in min), A1 : the absorbance of the first reading, A2 : the absorbance of the second reading, V : the pretreated sample volume added into the reaction well (in ml)

### 2) Superoxide dismutase(SOD)의 활성 변화

SOD 함량은 Maier and Chan<sup>22)</sup>의 방법에 따라 HaCaT cells을 이용하여 수행하였다. HaCaT 세포주를 3×10<sup>5</sup> cells/well에 준비한 후 YM 100, 500, 1000 µg/ml을 선 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 UVB를 60 mJ/cm<sup>2</sup>로 조사하고 15분 후에 각 well에 lysis buffer를 넣고 IKA homogenizer(ULTRA-TURRAX)를 이용하여 lysis시켰다. 20 mM HEPES buffer(pH 7.2, containing 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, and 70 mM sucrose)로 lysis한 HaCaT cell lysate 내 SOD 활성을 측정하기 위해 superoxide dismutase assay kit(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI.)를 사용하였으며, 사용방법은 제조회사의 지시에 따라 시행하였으며, 사용한 표준물질은 bovine erythrocyte SOD(Cu/Zn)를 사

용하였다. SOD 활성측정은 96 well plate에 빛을 차광시킨 200 µl의 radical detector를 넣고 각 well에 standard 용액 또는 HaCaT cell lysate 10 µl를 넣었다. 그리고 모든 well에는 50 mM Tris-Cl(pH 8.0)로 희석한 xanthine oxidase를 20 µl를 넣고 수 초간 교반시킨 후 20 분간 실온에서 반응시킨 다음 microplate reader를 사용하여 440 nm에서 460 nm값을 제외한 값을 다음과 같은 식을 이용해 SOD를 계산하였다.

$$\text{SOD} (\text{U/sample LR}^a - y \text{ intercept}) = \frac{\text{slope}}{\text{slope}} \times \frac{0.23 \text{ ml}}{0.01 \text{ ml}} \times \text{sample dilution}$$

$$a) \text{sample LR} = \text{Abs Std A/Abs sample}$$

### 3) Catalase(CAT)의 활성 변화

CAT활성도는 Johanson and Borg<sup>23)</sup>의 방법에 따라 HaCaT cells을 이용하여 수행하였다. HaCaT 세포주를 3×10<sup>5</sup>/well에 준비한 후 YM 100, 500, 1000 µg/ml을 선처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 UVB를 60 mJ/cm<sup>2</sup>로 조사하고 15분 후에 각 well에 lysis buffer[50 mM potassium phosphate(pH 7.0, containing 1 mM EDTA)]를 넣고 IKA homogenizer (ULTRA-TURRAX)를 이용하여 lysis시켰다. HaCaT cell lysate 내 CAT 활성을 측정하기 위해 CAT assay kit(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI.)를 사용하였으며, 사용방법은 제조회사의 지시에 따라 시행하였다. 사용한 표준물질은 CAT formaldehyde를 사용하였다. 96 well에 assay buffer(100 mM potassium phosphate, pH 7.0) 100 µl와 methanol(HPLC-grade) 30 µl를 넣고 sample buffer(25 mM potassium phosphate, pH 7.5, containing 1 mM EDTA and 0.1% BSA)로 희석한 standard와 HaCaT cell lysate를 각각 20 µl씩 첨가한 후 과산화수소를 20 µl 첨가하여 반응을 시켰다. 20분 동안 실온에서 차광상태로 교반하면서 반응시킨 후 30 µl의 potassium hydroxide를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 그 후 30 µl의 CAT purpald를 넣고 10 분간 실온에서 교반한 후 CAT potassium periodate를 10 µl를 첨가하고 실온에서 5분 반응한 후 540 nm에서 측정하였다. YM의 formaldehyde 농도와 catalase 활성은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Formaldehyde} (\mu\text{M}) = \frac{\text{sample absorbance} - (y \text{ intercept})}{\text{slope}} \times \frac{0.17 \text{ ml}}{0.02 \text{ ml}}$$

$$\text{CAT activity} = \frac{\mu\text{M of sample}}{20 \text{ min}} \times \text{dilution factor} = \text{nmol/min/ml}$$

### 7. 라디칼소거능 측정(DPPH)

옥미지황탕의 항산화 활성은 Wang과 Zhang<sup>24)</sup>의 DPPH 법을 이용하여 측정하였다. 실험방법은 96 well microplate에 옥미지황탕 10 µl를 넣고 DPPH solution 190 µl를 가한 후 실온에서 30분간 반응시켜 각 반응액의 흡광도를 517 nm에서 측정하였다. 양성 대조군으로는 BHT(butylated hydroxytoluene, Sigma, USA)를 양성대조군으로 사용하였으며, DPPH radical을 50% 소거시키는 시료의 농도를 IC<sub>50</sub> 으로 하였다. 각 시료에 대한 DPPH radical 소거작용을 4회 반복하여 측정하였다. 환원능

은 다음과 같이 계산하였다.

$$\% \text{ 억제율} = [(A0-A1)/A0 \times 100]$$

A0 : 대조군 흡광도

A1 : 실험군 흡광도

#### 8. 세포내 Reactive oxygen species(ROS) 생성 측정

HaCaT cell 내 ROS의 생성은 형광표지자인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 사용하여 측정하였다. DCFH-DA는 쉽게 세포막을 뚫고 세포 안으로 확산되어 세포 안의 에스테라아제에 의해 형광을 잃은 DCFH로 가수분해 되고, 이후 ROS가 존재하는 환경에서 높은 형광을 띄는 DCF로 빠르게 산화된다. 따라서 DCF의 형광 강도는 세포 안의 ROS의 양과 비례한다. HaCaT cell을  $3 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 부유시켜 96-well plate에 분주하여 24시간 동안 incubation 하였다. YM을 농도별로 선 처리(0, 10, 50, 100, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )한 후 2시간 동안 배양하였고,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 DCFH-DA를 각각 1 mM, 10  $\mu\text{M}$ 의 농도로 20분 동안 처리한 후 형광도를 측정하였다. DCF 형광도는 excitation 485 nm, emission 530 nm의 파장에서 Wallac 1420 VICTOR3 multilabel counter (PerkinElmer Life Science, Turku, Finland)로 측정하였다.

#### 9. Gelatin zymography assay

MMP-9의 분비를 측정하기 위하여 substrate gel zymography를 시행하였다<sup>25)</sup>. HaCaT 세포를  $3 \times 10^5$  cell/ml의 농도로 분주하였다. 실험시작 전 무혈청배지로 교환한 후 YM을 농도별로 1시간 동안 선 처리하였다. 이 후 세포를 60 ml/cm<sup>2</sup>세기의 UVB를 조사하여 자극시키고 다시 24시간 배양하였다. 배지에 존재하는 분비된 단백질의 양은 세포의 숫자로 가능하였다. 배지를 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10 % glycerol, 2 % SDS, and 0.00625 % (w/v) bromophenol blue가 함유된 sample buffer에 섞고, 0.1 % gelatin이 함유된 7.5 % acrylamide/bisacrylamide (29.2:0.8) separating gel에 loading 한 후 4 °C, 100V에서 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel을 0.25 % Triton X-100에 30분 동안 두 번 담가 SDS를 제거하였다. 3차 증류수로 씻은 후 0.1% (w/v) Coomassie blue R-250 용액에서 30분 간 염색하여 관찰하였다.

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

#### 10. 총 RNA의 추출과 RT-PCR

Total RNA는 Trizol reagent(Invitrogen)를 이용하였으며 제조회사의 방법에 준하였다. Spectrophotometer를 이용하여 RNA의 농도를 측정한 후 M-MLV reverse transcriptase(Promega, Madison, WI, USA)에 의하여 cDNA를 합성하였고, specific primer 들을 이용한 PCR방법을 통하여 cDNA를 증폭하였다.

PCR 증폭을 하기 위하여 TaqPCRxDNA polymerase, Recombinant (Invitrogen) 을 사용하였고, 반응조건은 다음과 같이 하였다. 95°C에서 5분간 초기 denaturation 시킨 후 30 cycle을 증폭시켰다. 각각의 cycle은 95°C에서 30초 동안 denaturation, 62 °C(TNF- $\alpha$ : 59 °C)에서 30 초 동안 annealing, 72 °C에서 40 초 동안 extension시켰다. PCR product는 1 % agarose gel에서 전기영동 하였고, ethidium bromide로 염색을 한 후 Gel Doc(Bio-Rad, USA)을 사용하여 관찰하였다.  $\beta$ -actin을 internal control로 사용하여 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , human MMP-9, MMP-3의 발현을 상대적으로 평가하였다. PCR에 사용된 primer는 Table 2와 같다.

Table 2. Oligonucleotide primers used for PCR in this study

Target gene	PCR primer	sequence(5' to 3')	Expected size
IL-1 $\beta$	sense	GCA CAA GGC ACA ACA GGC TGC	463bp
	antisense	TGC TGT GAG TCC CGG AGC GT	
TNF- $\alpha$	sense	AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT	434bp
	antisense	CCA AAG TAG ACC TGC CCA GAC	
MMP-9 (human)	sense	GTG CTC CTG GTG CTG GGC TG	325bp
	antisense	GGT GCC ACT TGA GGT CGC CC	
MMP-3 (human)	sense	CTT TCC TGG CAT CCC GAA GT	252bp
	antisense	GCA TAG GCA TGG GCC AAA AC	
$\beta$ -actin	sense	CAA GAG ATG GCC ACG GCT GCT	247bp
	antisense	TCC TTC TGC ATC CTG TCG GCA	

#### 11. 자료분석

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

## 결 과

#### 1. 세포생존율에 미치는 효과

육미지황탕(YM)이 HaCaT 세포에 대한 세포독성을 MTT assay를 통하여 측정한 결과 YM은 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지 어떠한 세포독성도 나타내지 않았다(Fig. 1).

#### 2. 육미지황탕의 xanthine oxidase(XO) 생성량의 변화에 미치는 영향

UVB를 조사한 HaCaT 세포에 육미지황탕 추출물(YM)을 농도별로 첨가한 후 XO의 생성량을 관찰한 결과, 유해산소를 생성하는 효소인 XO는 HaCaT cell lysate에서 대조군에서는  $1.670 \pm 0.1$  mU/ml이었으나 육미지황탕(YM) 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가

한 군에서는  $0.620 \pm 0.06$  mU/ml, 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서는  $0.570 \pm 0.04$  mU/ml, 1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서는  $0.530 \pm 0.05$  mU/ml로 모든 농도의 YM군에서 유의적인( $p < 0.01$ ) 차이를 보였다(Fig. 2).

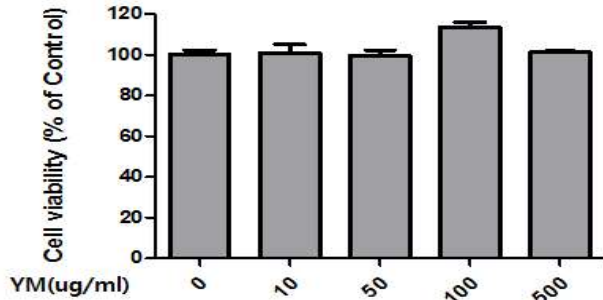


Fig. 1. Cytotoxic effect of Yukmijihwang-tang extracts(YM) on HaCaT cells. To determine the cytotoxicity of YM on HaCaT cells, MTT assay was performed. HaCaT cells were treated with indicated amount of YM for 24 h before the MTT assay. Data represent the mean  $\pm$  SD of 3 independent measurements.

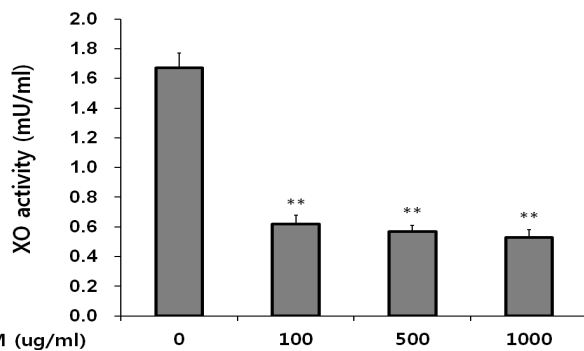


Fig. 2. Inhibitory effects of Yukmijihwang-tang extracts(YM) on the activity of xanthine oxidase(XO) in HaCaT cells induced by UVB irradiation. Each values are mean  $\pm$  SD(n=3). \*\*  $p < 0.01$  compared with control group(C).

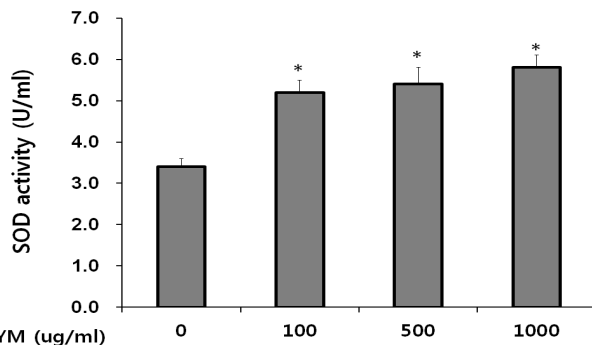


Fig. 3. Effects of Yukmijihwang-tang extracts(YM) on the activity of superoxide dismutase(SOD) in HaCaT cells induced by UVB irradiation. Each values are mean  $\pm$  SD(n=3). \*  $p < 0.05$  compared with control group(C).

3. 옥미지황탕의 superoxide dismutase(SOD)의 활성화에 미치는 영향

UVB를 조사한 HaCaT 세포에 옥미지황탕 추출물(YM)을 농도별로 첨가한 후 SOD의 효과를 관찰한 결과, 유해산소를 제거

하는 효소인 SOD는 HaCaT cell lysate에서 대조군에서는  $3.4 \pm 0.2$  U/ml이었으나 옥미지황탕 추출물(YM) 100  $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 군에서는  $5.2 \pm 0.3$  U/ml, 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서는  $5.4 \pm 0.4$  U/ml, 1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서는  $5.8 \pm 0.3$  U/ml로 농도의존적으로 YM군에서 유의적인 차이( $P < 0.05$ )를 보였다(Fig. 3).

4. 옥미지황탕의 CAT의 활성화에 미치는 영향

UVB를 조사한 HaCaT 세포에 옥미지황탕 추출물을 농도별로 첨가한 후 CAT의 효과를 관찰한 결과, CAT는 HaCaT cell lysate에서 대조군에서는  $5.41 \pm 0.3$  nmol/min/ml이었으나 옥미지황탕 추출물(YM) 100  $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 군에서는  $8.89 \pm 0.4$  nmol/min/ml, 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서는  $9.60 \pm 0.5$  nmol/min/ml, 1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서는  $10.20 \pm 0.5$  nmol/min/ml로 농도의존적으로 YM군에서 유의적인 차이( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ )를 보였다(Fig. 4).

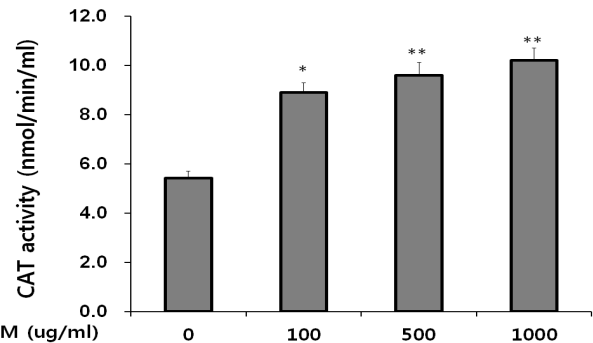


Fig. 4. Effects of Yukmijihwang-tang extracts(YM) on the activity of catalase in HaCaT cells induced by UVB irradiation. Each values are mean  $\pm$  SD(n=3). \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  compared with control group(C).

5. 자유라디칼 소거능(DPPH assay)

옥미지황탕(YM)이 자유라디칼을 소거하는 능력이 있는지 확인하고자 DPPH assay를 시행하였다. 각각의 다른 농도의 YM을 DPPH와 섞은 후 상온에서 30분간 반응시켰다. Fig. 5.에서 보는 바와 같이 500  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서는 큰 차이가 없었으나, YM의 농도가 증가함에 따라 자유라디칼을 소거하는 활성도가 증가함을 관찰하였다. 활성도의 증가는 양성 대조군인 BHT와 유사하였다(Fig. 5).

6. 옥미지황탕(YM)의 세포내 활성산소종(ROS) 생성 억제효과

옥미지황탕(YM)이 UVB에 의하여 증가된 세포내 ROS에 미치는 영향을 관찰하고자 DCFH-DA assay를 시행하였다. HaCaT 세포에 60 mJ/cm<sup>2</sup>의 강도로 UVB를 조사하여 12시간을 방치한 후 YM을 농도별로 처리함과 아울러 DCFH-DA 시약을 처리하고, 5분 후 형광 흡광도를 측정하였다. Fig. 6.에서 보는 바와 같이 UVB의 자극은 세포 내 ROS의 생성을 유의성있게 현저히 증가시켰으며(2nd column, #  $p < 0.001$ ), 이러한 ROS의 생성은 YM의 처리에 의하여 농도의존적으로 유의성있게 억제되었다(3rd, 4th, 5th, 6th columns:  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ )(Fig. 6). 이러한 결과 YM은 세포 내 ROS의 생성을 억제하는 효능을 수행하는 기능이 있음을 알 수 있었다.

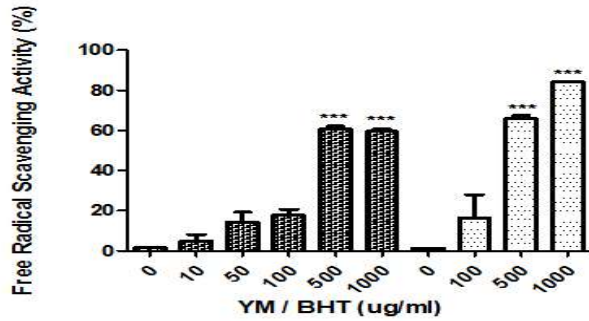


Fig. 5. Yukmijiwhang-tang extracts(YM) scavenges free radicals. A capability of YM that scavenges free radicals was measured by 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) assay. BHT was included as positive controls. Each value represents as the mean  $\pm$  SD of quadruplicate. \*\*\* $P < 0.0001$ , compared to control(1st column).

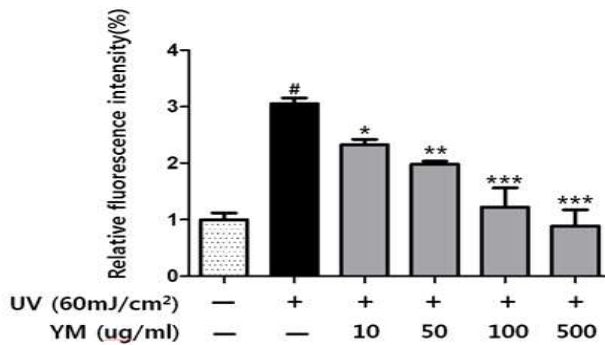


Fig. 6. Yukmijiwhang-tang extracts(YM) suppresses intracellular ROS generation. Treatment of HaCaT cells with YM reduced intracellular ROS produced by UVB irradiation. Shown are mean  $\pm$  SD (n=3). #  $p < 0.05$ , compared to control(1st column from left); \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , compared to UVB stimulated group (2nd column from left).

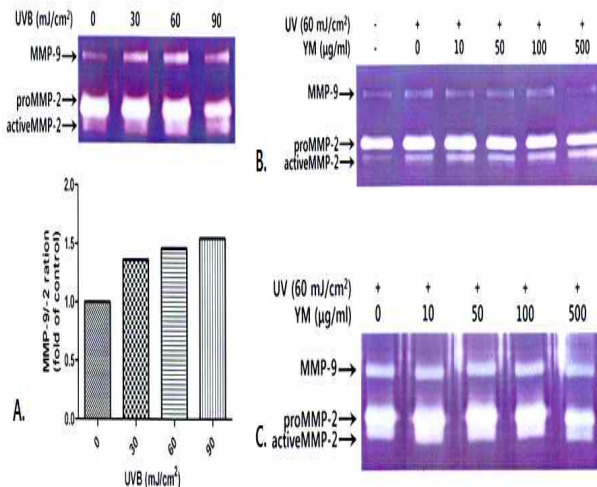


Fig. 7. Inhibitory effect of YM on MMP-9 expression in UVB-stimulated HaCaT cells. (A) To identify accurate dose of UVB that upregulate MMP-9 activity, various amount of UVB (30, 60, 90 mJ/cm<sup>2</sup>) were treated on the HaCaT cells. Among them, MMP-9 activity was most prominent in the 60 mJ/cm<sup>2</sup> UVB treated cells. (B) HaCaT cells were pre-incubated with the indicated amount of YM for 1 h and then stimulated with UVB for 24 h. Conditioned media were analyzed by zymography for MMP-9 activity. (C) To exclude the possibility of direct enzymatic inhibition, in vitro zymography was performed using the conditioned media of UVB-stimulated cells as a source of enzymes.

7. HaCaT 세포에서 MMP-9의 분비에 대한 억제효과

UVB를 어느 정도 자극했을 때 HaCaT 세포에서 MMP-9의 분비가 가장 많은지 관찰한 결과 60 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB에서 MMP-9의 분비가 가장 많았다(Fig. 7A). 옥미지황탕(YM)의 HaCaT cell에서의 MMP-9의 분비에 대한 효능을 관찰하고자 gelatin zymographic assay를 시행하였다. HaCaT cell은 다양한 농도의 YM으로 1시간 동안 선처리 하였다. 60 mJ/cm<sup>2</sup>의 강도로 UVB를 조사하여 24시간 동안 배양한 후 배양액을 전기영동하였다. UVB는 MMP-9의 분비는 자극하였으나 MMP-2에는 영향을 미치지 않는 않았다. YM은 500 µg/ml의 농도에서 현저하게 MMP-9의 감소를 확인하였다(Fig. 7B). YM이 MMP-9의 활성을 직접적으로 억제하는지 관찰하고자 UVB를 조사한 HaCaT 세포의 배양액을 가지고 in vitro zymography를 시행하였다. 그 결과 MMP-9의 활성은 직접적으로 YM에 의하여 감소되지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 7C).

8. HaCaT 세포에서 염증 및 주름과 연관된 인자의 mRNA 발현에 미치는 영향

HaCaT 세포에 다양한 농도의 옥미지황탕을 2시간 전 처리하고, UVB로 자극한 후 24시간 배양하였다. 전체 RNA를 세포에서 추출하였고, 염증 및 주름과 연관된 유전자의 발현은 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. Fig. 8.에서 보는 바와 같이 UVB는 HaCaT 세포에서 MMP-9의 발현을 현저히 증가시켰고 YM은 농도의존적으로 MMP-9의 발현을 감소시켰다. 그러나 MMP-3의 발현에는 별 영향을 미치지 않았다. 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 에 있어서 UVB는 HaCaT 세포에서 이들 유전자의 발현을 증가시켰으며, YM은 고농도에서 이들의 발현을 감소시켰으나 그 효과는 현저하지 않았다(Fig. 8).

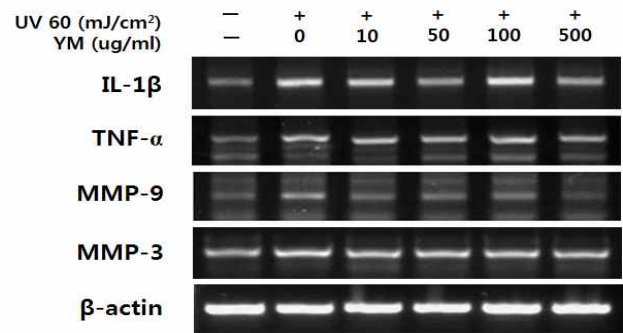


Fig. 8. YM down-regulates the expression of various inflammatory and wrinkle associated genes. Total RNA was extracted from HaCaT cells differentially treated with YM and UVB, and analyzed by semiquantitative RT-PCR for IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MMP-9, MMP-3. Relative expression of each mRNA was also shown against the message of  $\beta$ -actin, and internal control.

고 찰

웰빙의 열풍으로 인해 실내 활동의 증가, 생명의 연장, 많은 여가 생활 등 자의선으로부터 피부를 보호하고 유지하려는 노력이 증가하는 추세이므로 광노화 피부에 대한 연구는 향후 더욱

관심의 대상이 되고 있다.

피부는 표피와 진피로 나누며, 표피는 피부의 제일 바깥층으로서 피부를 보호하는 상피층이며, 표피 밑에 있는 진피는 표피를 기계적으로 지지하는 지지층으로서 결합조직으로 구성되어 있다. 진피의 세포외기질에는 주로 type I collagen이 존재하여 피부에 장력과 탄력을 제공하며, 일부 type III collagen, 엘라스틴, 단백질 및 fibronectin으로 구성되어 있다<sup>26)</sup>.

피부의 노화는 내재적인 노화(intrinsic aging)와 광노화(photoaging) 2가지 유형으로 나누며, 내재적인 노화(intrinsic aging)는 모든 생물체에서 기본적인 또는 공통적으로 일어나는 생물학적인 기전으로서 나이가 증가함에 따라 피부의 구조와 기능이 더욱 악화되어 표피가 위축되고, 표피-진피 결합부위가 편평해지며, 비정상적으로 엘라스틴이 많이 침착되는 특징(elastogenesis)을 나타낸다<sup>27)</sup>.

광노화를 유발하는 자외선은 파장의 종류에 따라 피부에 침투하는 부위에 차이가 있어 UVB(280-320 nm)는 대체로 표피에서 흡수되므로 표피상피(각질세포)에 영향을 미치며, UVA(320-400 nm)는 보다 심층부위에 침투하므로 표피의 각질세포와 진피의 섬유아세포에 영향을 미친다<sup>7)</sup>.

육미지황탕은 동의보감<sup>28)</sup>에 "治虛勞腎氣衰弱久新憔悴寢汗"라 하였고, 본초학<sup>29)</sup>에서는 滋補肝腎, 淸虛熱, 利濕이라 하여 만성 소모성 질환, 대사성 이화작용 항진, 내분비기능 실조 등에 補肝 및 補腎劑로 사용해왔다. 육미지황탕은 숙지황, 산수유, 산약, 택사, 목단피, 복령으로 구성되며, 약물의 효능에 대하여 熟地黃은 滋陰補血, 益精填髓하고 山茱萸는 補益肝腎, 澀精固脫하고 山藥은 健脾, 補肺, 固腎, 益精하고 澤瀉는 利水滲濕, 腎中瀉火하며 熟地黃의 滋膩를 방지하고 牡丹皮는 淸熱涼肝, 瀉陰中之伏火하고 茯苓은 山藥을 助하여 補脾하고 澤瀉를 助하여 利水한다고 하였다<sup>30)</sup>.

노화와 수명연장은 신장의 기능과 관계가 있으며, 노화로 인하여 나타나는 제반 임상 장애들이 신장과 상생관계에 있는 간의 기능저하에 의해 유발되므로 간과 신장의 기능은 노화와 밀접한 관계가 있다<sup>31)</sup>. 육미지황탕은 기와 혈을 보하고 인체의 음양과 장부의 기능실조를 조정하여 질병에 대한 저항력을 증강시켜 질병의 발생을 억제하고 치료하는데 중요하다. 신장과 간을 보하는 육미지황탕을 이용하여 광노화피부와 관련된 연구는 진행된 바 없고, 보음제의 대표적인 처방인 육미지황탕이 항산화, 아토피피부염 관련 제반 증상 완화 및 면역조절을 통한 항염증 등의 효과가 있다고 보고되고 있으나 광노화피부와 관련된 연구는 진행된 바 없으므로 본 연구에서 육미지황탕을 이용하여 생화학적 및 분자생물학적으로 체계적인 광노화 피부의 억제에 관한 연구가 필요하였다.

Xanthine oxidase는 체내 유리기 생성계의 비특이적인 효소로 주로 purine체의 대사산물인 hypoxanthine을 xanthine으로 산화시켜 uric acid를 생성하는 과정에서 superoxide radical을 생성하는 효소이다<sup>32)</sup>. 본 실험에서는 UVB를 조사한 HaCaT 세포에 육미지황탕 추출물(YM)을 농도별로 첨가한 바 대조군에서는 1.670±0.1 mU/ml 이었으나 육미지황탕 추출물

(YM) 100 µg/ml을 첨가한 군에서는 농도의존적으로 육미지황탕 추출물 투여군에서 유의적인(p<0.01) 차이를 보여 육미지황탕이 UVB에 의한 체내 유해 활성산소 생성기인 XO 저해작용을 야기시킨 것으로 사료되었다.

Oxygen free radical은 불안정한 분자구조로 산소이용력이 떨어져 보다 안정된 상태를 유지하기 위하여 체내의 조직에서 전자를 가져오는 과정에서 여러가지 세포들의 변형과 손상을 야기한다. Superoxide dismutase(SOD)는 2개의 superoxide radical을 제거하여 체내 축적을 막아준다. 한 개의 superoxide radical은 산화하여 전자(e-)가 방출되고, 나머지 하나는 환원되어 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 변화시키는 항산화제이다. 제2 항산화제인 catalase(CAT)는 SOD와 서로 균형을 이루어 상호협력하며, 이러한 균형이 깨져 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거하는 catalase에 비해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 산물로 만들어내는 SOD작용이 더 크면 세포손상을 일으켜 질병을 유발시킨다. 세포방어에 관여하는 CAT는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 물과 산소로 분해시켜 oxygen radical 생성을 제어하는 강력한 효소이다. 본 실험에서 UVB를 조사한 HaCaT 세포에 육미지황탕 추출물(YM)을 농도별로 첨가한 바 유해산소를 제거하는 효소인 SOD는 HaCaT cell lysate에서 대조군에서는 3.4±0.2 U/ml 이었으나 육미지황탕 추출물(YM) 100 µg/ml을 첨가한 군에서는 5.2±0.3 U/ml, 500 µg/ml에서는 5.4±0.4 U/ml, 1000 µg/ml에서는 5.8±0.3 U/ml로 농도의존적으로 육미지황탕 추출물 투여군에서 유의적인 차이(p<0.05)를 보였다. 또한 UVB를 조사한 HaCaT 세포에 육미지황탕 추출물을 농도별로 첨가하면 CAT는 HaCaT cell lysate에서 대조군에서는 5.41±0.3 nmol/min/ml 이었으나 YM 100 µg/ml을 첨가한 군에서는 8.89±0.4 nmol/min/ml, 500 µg/ml에서는 9.60±0.5 nmol/min/ml, 1000 µg/ml에서는 10.20±0.5 nmol/min/ml로 농도의존적으로 YM군에서 유의적인 차이(p<0.01 또는 p<0.05)를 보여 육미지황탕은 UVB 조사에 의하여 피부에 생성된 oxygen free radical을 소거하려는 생리적인 적응현상으로 SOD가 활성화된 것으로 사료되었고, UVB 광노화에 의한 지방과 유기물의 자동산화에 의하여 발생한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해하기 위하여 육미지황탕 추출물에 의한 CAT의 활성이 증가한 것으로 사료되었다. 또한 육미지황탕의 항산화 기능에 대하여 윤철호<sup>17)</sup>는 과산화지질의 생성억제와 대사효소계에 긍정적인 영향을 미친다고 보고하였고, 정지천<sup>18)</sup>은 육미지황탕이 활성산소 분해계 효소를 활성화시킨다는 연구결과가 본 실험의 결과를 뒷받침하고 있다.

활성산소는 생체내외의 산화-환원 반응, 자외선 및 방사선 등에 의해 생성되며, 지방산화, DNA 손상 및 단백질 변성 등을 초래하여 암, 동맥경화, 심혈관 질환 등을 유발하는 것으로 알려졌다<sup>33)</sup>. 본 실험에서는 UVB를 조사한 HaCaT 세포에 육미지황탕 추출물(YM)을 농도별로 첨가한 후 유해산소를 생성하는 효소인 XO의 생성량을 관찰한 바 육미지황탕 추출물의 농도에 의존하여 유의성있게 감소하였고(p<0.01), 유해산소를 제거하는 효소인 SOD는 YM군이 대조군에 비해 농도 의존적으로 유의성있게(p<0.05) 증가하였다 또한 CAT도 대조군에 비해 농도 의존적으로 YM군에서 유의성있게(p<0.01 또는 p<0.05) 증가하여 유해



활성산소 생성계 효소(XO)의 활성도를 억제하였고, 또한 유해 활성산소 제거계 효소(SOD와 CAT)의 활성도를 증가시킴을 알 수 있었다.

육미지황탕의 항산화 활성을 DPPH 라디칼 소거능에 의하여 관찰하였다. DPPH 라디칼은 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 라디칼로서 항산화 성분에 의해 환원되면 짙은 자색이 탈색되어 지는데, 특히 토코페롤, 아스코르빈산 및 방향족 아민류 등에 의해 환원력이 큰 것으로 알려졌다<sup>34)</sup>. DPPH 시약에 대해 YM을 10, 50, 100, 500, 1000 µg/ml 농도로 처리하였을 때 10-500 µg/ml 농도에서 진보라색을 탈색시켜 YM의 농도가 증가함에 따라 자유라디칼을 소거하는 활성도가 증가함을 관찰하였다. 또한 농도의존적으로 더욱 높은 활성을 보여 육미지황탕에는 항산화 활성을 갖는 유용한 성분들이 함유되어 있음을 확인할 수 있었고, 이러한 육미지황탕의 항산화 활성은 세포내에서 염증발현 시 증가되는 산화적 스트레스에 대해 효과적으로 방어할 것으로 사료되었다.

MMPs는 세포외기질의 재구성에 관여하는 Zn 의존성 펩티드내부가수분해효소(endopeptidase)로서 형태발생, 혈관신생, 관절염, 피부궤양, 종양 침입 및 전이에 관여한다<sup>35)</sup>. MMPs 가운데 gelatinase A(MMP-2 또는 72KDa type IV collagenase)와, gelatinase B(MMP-9 또는 92-KDa type IV collagenase)는 type IV와 type VII collagen을 분해시키고, stromelysin(MMP-3와 MMP-10)은 기저막의 접착성 단백질인 라미닌(laminin)을 분해시킨다<sup>36)</sup>. MMPs는 불활성화 된 zymogen(proMMP)으로 분비되는데 제 기능을 하기 위해서는 활성화(active MMP) 되어야한다. proMMP 합성을 자극하는 것은 대체로 성장인자 또는 사이토카인에 의한 전사수준하에서 조절된다<sup>36)</sup>. 콜라겐을 분해하는 MMP-1, 3, 9는 주로 표피에서 유발되지만 분비된 효소는 진피에 확산되어 콜라겐을 분해한다<sup>37)</sup>. 이러한 확산은 직접 MMP가 콜라겐의 세포외기질에 결합하여 확산을 도와준다<sup>38,39)</sup>. 이러한 연구결과는 자외선이 사람의 피부에 노출되면 표피의 각질세포가 반응하여 MMP를 분비하며, 진피는 간접적으로 방분비기전(paracrine mechanism)을 통한 성장인자 또는 사이토카인을 방출하여 표피 각질세포에서 MMPs의 생성에 관여한다고 하였다<sup>37)</sup>.

본 실험에서 HaCaT cell에 다양한 농도의 YM으로 1시간 동안 선처리 한 후 60 mJ/cm<sup>2</sup>의 강도로 UVB를 조사한 후 24시간 동안 배양한 후 배양액을 전기영동하여 관찰한 바 UVB는 MMP-9의 분비는 자극하였으나 MMP-2에는 영향을 미치지 않았으며, 특히 YM은 500 µg/ml의 농도에서 현저하게 MMP-9를 감소시킴을 확인하였다. HaCaT 세포를 이용하여 염증 및 주름과 연관된 유전자의 발현에서 UVB는 HaCaT 세포에서 MMP-9의 발현은 현저히 증가시켰으며 육미지황탕(YM)은 농도의존적으로 MMP-9의 발현을 감소시켰다. 그러나 MMP-3의 발현에는 별 영향을 미치지 않았다. 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF-α와 IL-1β에 있어서 UVB는 HaCaT 세포에서 이들 유전자의 발현을 증가시켰으며, YM은 고농도에서 이들의 발현을 감소시켰으나 그 효과는 현저하지 않았다.

이상의 실험 결과로 육미지황탕은 UVB에 의한 피부 광노화를 억제시킬 것으로 사료되었으며, 자외선 손상에 의한 광노화 피부에서 육미지황탕의 개별 약제에 대한 심도있는 연구가 추후에 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

보음제로서 항산화, 아토피피부염 관련 제반 증상 완화 및 면역조절을 통한 항염증 효과 등에 효과가 있다고 보고된 육미지황탕의 광노화 억제효과를 관찰하기 위하여 피부노화 억제와 관련된 인자들에 미치는 변화를 HaCaT cell을 이용하여 생화학 및 분자생물학적으로 관찰함으로써 광노화 피부 억제와 관련된 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 과학적으로 검증한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

UVB를 조사한 HaCaT 세포에 육미지황탕(YM)을 농도별로 첨가한 후 유해 활성산소 생성기인 XO의 생성은 육미지황탕 추출물 투여군이 대조군에 비해 농도의존적으로 유의성있게(p<0.01) 감소하였다. SOD는 HaCaT cell lysate에서 육미지황탕 추출물 투여군이 대조군에 비해 농도의존적으로 유의성있게(p<0.05) 증가하였고, CAT는 HaCaT cell lysate에서 대조군에 비해 농도의존적으로 YM군에서 유의성있게(p<0.01 또는 p<0.05) 증가하였다.

육미지황탕(YM)의 자유라디칼 소거능력은 10-500 µg/ml의 농도에서 활성도가 증가하였으며, 활성산소종(ROS)의 생성도 육미지황탕의 농도에 비례하여 농도 의존적으로 유의성 있게 억제되었다(p<0.05, p<0.01, p<0.001). 육미지황탕(YM)의 HaCaT 세포에서의 MMP-9의 분비에 대한 효능은 500 µg/ml의 농도에서 현저하게 감소함을 확인하였고, MMP-9의 활성은 직접적으로 육미지황탕에 의하여 감소하지 않음을 확인할 수 있었다.

육미지황탕의 염증 및 주름과 연관된 유전자의 발현은 육미지황탕의 농도에 비례하여 MMP-9의 발현을 감소시켰고, 대표적인 염증성 사이토카인인 TNF-α와 IL-1β의 발현은 감소시켰으나 현저하지는 않았다.

이상의 실험 결과로 육미지황탕은 자외선에 의한 광노화피부를 야기하는 여러 가지 인자들의 활성을 억제 할 것으로 사료되어 광노화에 의한 피부손상을 예방할 수 있는 생리활성이 있는 기능성 화장품소재로서 활용이 가능할 것으로 판단된다.

## References

1. Meinhard, W., Iiana, T.B., Lale, N., Wenjian, M., Lars, A.S., Ziba, R.W., Jutta, S., Karin, S.K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem and Photobiology* 63: 41-51, 2001.
2. Cooper, K.D., Oberhelman, L., Hamilton, T.A., Baadsgaard, O., Terhune, M., LeVee, G., Anderson, T., Koren, H. UV exposure reduces immunization rates and promotes tolerance to epicutaneous



- antigens in humans: relationship to dose, CD1a-DR epidermal macrophage induction, and Langerhans cell depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8497-8501, 1992.
3. Fisher, G.J., Wang, Z.Q., Datta, S.C., Varani, J., Kang, S., Voorhees, J.J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 337(20):1419-1428, 1997.
  4. Gilchrist, B.A., Yaar, M. Ageing and photoageing of the skin: observations at the cellular and molecular level. *Br J Dermatol* 127(Suppl 41):25-30, 1992.
  5. Afaq, F., Syed, D.N., Malki, A., Hadi, N., Sarfaraz, S., Kweon, M.H., Khan, N., Zaid, M.A., Mukhtar, H. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB mediated oxidative stress and apoptosis. *J Invest Dermatol* 127: 222-232, 2007.
  6. Park, K., Lee, J.H. Protective effects of resveratrol on UVB-irradiated HaCaT cells through attenuation of the caspase pathway. *Oncol Rep* 19: 413-417, 2008.
  7. Berneburg, M., Plettenberg, H., Krutmann, J. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16: 239-244, 2000.
  8. Park, C.M., Lee, S.Y., Joung, M.S., Choi, J.W. Anti-wrinkle effect of 3-O-cetyl-L-ascorbic acid. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 34(4):303-309, 2008.
  9. Wyss, R. Chromatographic and electrophoretic analysis of biomedically important retinoids. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 671: 381-425, 1995.
  10. Weiss, J.S., Ellis, C.N., Headington, J.T., Voorhees, J.J. Topical tretinoin in the treatment of aging skin. *J Am Acad Dermatol* 19: 169-175, 1988.
  11. Gary, J.F., Kang, S.W., Varani, J., Zsuzsanna, B.C., Wan, Y., Datta, S., Voorhees, J.J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 138: 1462-1470, 2002.
  12. Kim, Y.G., Sumiyoshi, M., Sakanaka, M., Kimura, Y. Effects of ginseng saponins isolated from red ginseng on ultraviolet B-induced skin aging in hairless mice. *Eur J Pharm* 602: 148-156, 2009.
  13. Jeon, T.R., Choi, S.Y., Kim, Y.C., Chang, B.S. Improving effects of black tea water extract on skin aging. *J Investigative Cosmetology* 7(4):441-447, 2011.
  14. Jung, D.Y., Ha, H.K., Lee, H.Y., Lee, J.A., Lee, J.K., Huang, D.S., Shin, H.K. Stimulation of the immune response by Yin-tonifying formula. *J Korean Med* 31(5):112-123, 2010.
  15. Cho, J.H., Kim, Y.B. The effects of Yukmijihwangtang on Atopic dermatitis of NC/Nga mouse. *J Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology* 22(1):120-132, 2009.
  16. Lee, G.H., Yoo, D.Y. Evaluation of anti-inflammatory of Yukmijihwangtang and individual drug substances based on the extraction methods. *J. Oriental Obstetrics & Gynecology* 25(2):89-107, 2012.
  17. Yoon, C.H., Jeong, J.C. Effects of Jwagyuyueum and Woogyuyueum on free radicals generating enzyme activities and lipid peroxidation in senile Rat,s liver. *J Korean Oriental Internal Medicine* 16: 62-80, 1995.
  18. Jeong, J.C. Increased antioxidant enzyme activities and scavenging effect of oxygen free radicals by Jwagyuyueum and Woogyuyueum. *J Korean Med* 17: 145-165, 1996.
  19. Shin, J.Y. Explanation of Bangyakhappyun. Sungbosa, Seoul. p 44, 1984.
  20. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63, 1983.
  21. Bergmeyer, H.U., Gawehn, K., Grassl, M. In methods of enzymatic analysis. 2nd ed. New York, Academic Press Inc. pp 521-522, 1974.
  22. Maier, C.M., Chan, P.H. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* 8(4):323-334, 2002.
  23. Johanson, L.H., Borg, L.A.H. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 174: 331-336, 1988.
  24. Wang, L.F., Zhang, H.Y. A theoretical investigation on DPPH radical-scavenging mechanism of edaravone. *Bioorg Med Chem Lett* 13: 3789-3792, 2003.
  25. Ha, K.T., Kim, J.K., Lee, Y.C., Kim, C.H. Inhibitory effect of Daesungki-Tang on the invasiveness potential of hepatocellular carcinoma through inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities. *Toxicol Appl Pharmacol* 200(1):1-6, 2004.
  26. Uitto, J. Collagen. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, eds. *Dermatology in general medicine*. 4th ed. Vol. 1. New York, McGraw-Hill. pp 299-314, 1993.
  27. Lavker, R.M. Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. *J Invest Dermatol* 73:59-66, 1979.
  28. Hur, J. Dongeuibogam, Namsandang, Seoul. p 449, 1983.
  29. Professors Council of Pharmacognosy. *Herbology*,

- Korean Pharmaceutical Association. p 784, 1994.
30. Professors Council of Prescription. Herbal Formula Science, Younglimsa, Seoul. p 298, 2003.
  31. Hong, W.S. Hwangjenaegyong. Institute of Oriental Medicine, Seoul. pp 19-20, 111, 246, 301, 1981.
  32. Duke, E.J., Joyce, P., Ryan, J.P. Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *J Biochem* 131(2):187-190, 1973.
  33. Miquel, J., Quintaniha, A.T., Weber, H. Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. CRC Press. Vol I, p 223, 1989.
  34. Blois, M.S., Antioxidant determination by the use a stable free radicals. *Nature* 26: 1191-1204, 1958.
  35. Birkedal-Hansen, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 7: 728-735, 1995.
  36. Reynolds, J.J. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis* 2: 70-76, 1996.
  37. Quan, T., Qin, Z., Xia, W., Shao, Y., Voorhees, J.J., Fisher, G.J. Matrix-degrading metalloproteinases in Photoaging. *J Investig Dermatol Symp Proc* 14(1):20-24, 2009.
  38. Knäuper, V., Cowell, S., Smith, B., Lopez-Otin, C., O'Shea, M., Morris, H., Zardi, L., Murphy, G. The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem* 272: 7608-7616, 1997.
  39. Overall, C.M. Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies. *Methods Mol Biol* 151:79-120, 2001.