

발효홍삼의 인간진피섬유모세포에서 UVA로 유도한 염증 및 기질단백분해효소 발현 억제 효능

이근현^{1,4} · 정승일² · 이창현³ · 신상우⁴ · 정한솔^{4*}

1: 헤민한의원, 2: (재) 전주농생명소재연구원, 3: 우석대학교 한의과대학 해부학교실, 4: 부산대학교 한의학전문대학원 응용의학부

Ferment Red Ginseng Suppresses the Expression of Matrix Metalloproteinases in UVA-irradiated Human Dermal Fibroblast Cells

Keun-Hyeun Lee^{1,4}, Seung-II Jeong², Chang-Hyun Lee³, Sang Woo Shin⁴, Han-Sol Jeong^{4*}

1: Hemin Traditional Korean Medical Clinic, 2: Jeonju AgroBio-Materials Institute(JAMI),

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

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

Prolonged exposure to solar ultraviolet A (UVA) radiation has been known to cause premature skin aging (photo-aging). UVA radiation generates ROS thereby induce degenerative changes of skin such as degradation of dermal collagen, elastic fibers. Matrix metalloproteinases (MMPs), the proteolytic enzymes have been implicated as a major player in the development of UVA-induced photo-aging. Many studies have been conducted to block the harmful effects of UV radiation on the skin. Recently, we are interested in the availability of fermented red ginseng (FRG) as natural matrix metalloproteinases inhibitors (MMPi). The efficacy difference between red ginseng and FRG has been compared. Both RG and FRG have no cytotoxic effects below the concentration of 300 µg/ml. Human dermal fibroblasts (HDFs) were pretreated with FRG or RG for 24h, followed by irradiation of UVA. Then, we measured the intracellular ROS production and the expression of MMP, IL-1β at the mRNA level. We also examined the intracellular localization of NF-κB and MMP-9 on the FRG or RG treated and UVA-irradiated HDFs. FRG decreased the intracellular ROS production elicited by UVA. In addition, FRG decreased the mRNA expression of MMP-3, MMP-9, and IL-1β more efficiently than RG. Furthermore, FRG suppressed the nuclear localization of NF-κB, and the expression of MMP-9. Taken together, our results suggest that FRG is promising agents to prevent UVA-induced photo-aging by suppressing MMP expression and inflammation.

keywords : UVA, Fermented Red Ginseng, MMP

서 론

자외선에 대한 급성노출은 피부홍반이나 화상을 유발시키며, 장기간의 만성노출은 피부암이나피부노화를 일으키는 것으로 잘 알려져 있다. 자외선 중 장파장에 해당되는 UVA (파장320-400 nm)는 단파장인 UVB (파장 280-320 nm)보다 피부에 깊이 침투하여 피부노화와 주름형성에 주요한 역할을 하는 것으로 알려졌다¹⁾.

UVA는 진피층의 결합조직과 혈관의 퇴행성 변화를 유발하며, 피부의 탄성을 점차 떨어뜨릴 뿐 만 아니라, 반복적이고 지속적인 UVA에 대한 노출은 피부세포의 DNA 손상을 일으켜 피부암을 유발하는 것으로 보고되고 있다. UVA에 의한 진피 조직의 손상기전은 완전히 밝혀지지 않았으나, 가장 널리 알려진 기전은 UVA에 의

한 산화적 스트레스의 증가이다. 진피층으로 흡수된 UVA는 진피섬유모세포나 세포의 기질에서 활성산소를 생산함으로써 조직손상을 유발한다²⁾.

세포외 기질의 항상성은 섬유모세포 등 피부기저세포에서의 세포외 기질 단백질들의 합성과 여러 기질단백분해효소(matrix-metalloproteinases; MMPs)에 의한 세포외 기질의 분해 과정을 통하여 역동적으로 유지되고 있다. UVA는 진피의 주요기질 성분인 collagen I, III, V 및 기저막의 주요기질성분인 collagen IV, VII, proteoglycans, laminin 등을 특이적으로 분해하는 다양한 MMPs의 합성을 조절함으로써 피부 진피층의 세포외 기질 성분 및 탄력섬유를 분해시키고, 이어서 피부주름과 광노화를 유도하는 것으로 보고되었다³⁾. 따라서 UV에 의한 산화, MMPs의 활성에 대

* 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 : 2017/03/15 · Revised : 2017/04/18 · Accepted : 2017/04/20

© 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.2017.04.31.2.105>

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

한 유효한 억제 약물에 대한 개발의 필요성은 지속되고 있다.

최근 한약재를 발효시킴으로써 유효한 생리활성물질을 증가된다는 여러 연구들이 보고되었다. 락토바실루스와 같은 발효균주는 당을 발효시킴으로써 장에 유익한 균의 성장을 촉진하는 것으로 보고되었다⁴⁾. 발효공정을 거친 인삼은 당성분이 분해되면서 진세노사이드의 구조가 변하는 것으로 알려졌다.

발효홍삼의 항산화, 광노화억제에 대한 여러 보고들이 있었으나 UVA로 인한 진피섬유모세포에 대한 연구는 없었다. 본 연구에서는 기존에 보고된 발효홍삼의 광노화억제기전에 대한 범위를 확장하여, UVA로 활성화시킨 진피섬유모세포의 산화, 염증, mmp 발현 등에 미치는 영향을 검사한 결과 유의미한 결과를 얻었기에 본 학회지에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

MTT Formazan (Cat. No. M2003)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) (D399)는 Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, USA)로부터 구입하였다. 일차 항체인 NF- κ B (sc-372), MMP-9(sc-21733)은 Santa Cruz Biotechnology, Inc (Dallas Texas, USA)로부터 구입하였고, 이차 항체인 anti-Rabbit Alexa Fluor 488 (A-11008)과 anti-mouse Alexa Fluor 488 (A-11001)과 DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) (D1306)는 Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, USA)로부터 구입하였다.

TRIzol® Reagent (#15596026)은 Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, USA)로부터 구입하였으며, iScript™ cDNA Synthesis Kit (#1708891)는 Bio-rad (Hercules, CA, USA)로부터 구입하였다.

발효홍삼은 기존 본 학회지에 보고했던 연구에서 사용한 시료와 동일한 것으로 동결건조 후 본 실험실에서 보유 중이며, 제조법과 추출법 및 발효 후 사포닌 구성 성분의 변화는 기존에 보고한 내용과 같다⁵⁾.

2. 세포배양

인간진피섬유모세포(human dermal fibroblasts)는 (주)이츠바이오(서울, 대한민국)에서 구입하였다. 세포는 3-4 계대 후 실험에 사용하였다. 세포는 DMEM에 10% FBS, penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 μ g/ml)를 첨가한 배지를 사용하여, 37 °C, 5 % CO₂의 조건의 습윤 incubator에서 배양하였다.

3. UVA 조사

본 실험에서는 BIO-LINK BLX-254(Vilber Lourmat, Marne La Vallee, France) UVA 조사기를 사용하였다. 인간진피섬유모세포(human dermal fibroblasts)를 PBS로 2회 세척한 후 배지 대신 PBS에 침지된 상태에서 UVA를 조사하였고, 총 조사량은 10 J/cm²로 설정하였다.

4. 세포 생존율 측정(MTT assay)

세포 생존율의 측정은 살아있는 세포의 미토콘드리아의 전자전달계에 존재하는 탈수소효소 (dehydrogenase)가 tetrazolium salt를 분해하여 formazan을 생성하는 원리를 이용한 MTT assay법을 이용하였다. 진피섬유모세포를 96well plate에 well당 10,000개씩 분주한 후 홍삼과 발효홍삼 추출물을 농도별로(10-500 μ g/ml) 24시간 처리한 후 MTT solution (5 mg/ml in PBS) 20 ul을 well에 넣고 37°C CO₂ incubator에서 4시간 incubation 시켰다. 이후 배지를 제거하고 200 ul의 DMSO를 넣고 피펫팅하여 섞고, 약 5분 후 microplate reader로 595nm 흡광도를 측정하였다.

5. 세포 내 활성산소 측정(DCF-DA assay)

인간진피섬유모세포를 5 X 10⁴/well의 농도로 24 well plate에 분주한 후 24시간 incubation 하였다. 이어 RG와 FRG를 50-300 μ g/ml의 농도로 24시간 처리하였고, 이 후 UVA를 조사하였다(총 조사량 10 J/cm²). 2시간 후 세포를 PBS로 washing하고 5 μ M의 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA)를 37°C에서 30분간 염색 한 후 형광도를 측정하였다. 형광도의 측정은 excitation 485, emission 530 nm의 파장에서 Wallac 1420 VICTOR3 multilabel counter (PerkinElmer Life Science, Turku, Finland)로 측정하였다.

6. MMP 및 IL-1 β mRNA 발현측정(RT-PCR)

총 RNA의 추출은 TRIzol® Reagent를 이용하여 제작사의 프로토콜을 따라 추출하였다. 이 후 iScript™ cDNA Synthesis Kit를 이용하여 cDNA를 합성한 후 MMP-1, MMP-3, MMP-5, IL-1 β , β -actin에 대한 PCR을 다음과 같은 primer를 사용하여 시행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.0% agarose gel에 전기영동을 한 후 이미지는 GelDoC Imaging System (UVP, Upland, CA, USA)를 이용하여 저장하였다.

Primer		Primer Sequence	product size	Accession No.
MMP-1	F	5-GGCTCTGAGGGTCAAGCAG-3	207 bp	NM_002421.3
	R	5-AGTTCATGAGTCGAACACG-3		
MMP-3	F	5-GCAGTTTGCTCAGCCTATCC-3	215 bp	NM_002422.4
	R	5-GAGTGTCCGAGTCCAGCTTC-3		
MMP-9	F	5-GTGCTCCTGGTGTGGGCTG-3	325 bp	NM_004994.2
	R	5-GGTGCCACTTGAGGTGCCCC-3		
IL-1 β	F	5-TTCGACACATGGGATAACGA-3	260 bp	NM_000576.2
	R	5-TCTTTCAACACGCAGGACAG-3		
β -actin	F	5-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3	234 bp	NM_001101.3
	R	5-AGCACTGTGTGGCGTACAG-3		

7. Confocal microscopy

12 well plate에 glass cover slip을 덮고, HDFs를 1 X 10⁵/well의 수로 분주하고 48시간을 incubation 하였다. 이 후 300 μ g/ml의 RG와 FRG를 24시간 처리한 후 세포를 PBS로 세척하고, 4% formaldehyde solution으로 10분간 고정하였다. PBS로 세척한 후 0.1% Triton X-100/PBS solution으로 세포막의 투과성을 확보하였다. 이 후 1시간 동안 3% BSA/PBS solution으로

blocking 한 후 세포를 MMP-9, NF- κ B antibody (1:200)로 4°C에서 overnight incubation 하였다. 다음날 anti-Rabbit Alexa Fluor 488 anti-mouse Alexa Fluor 488 antibody로 1시간 동안 반응 시킨 후 PBS로 수세하였고, 이어서 ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI로 mounting 한 후 nail polish로 sealing 하였다. 다음날 Zeiss LSM 700 laser scanning confocal microscope로 이미지를 얻었다.

결 과

1. RG와 FRG의 세포 생존율에 미치는 영향

HDFs에 RG, FRG를 농도별(10-500 μ g/ml)로 24시간 처리한 후 MTT assay를 이용하여 세포의 생존율을 측정한 결과 고농도의 RG 투여군에서 대조군 대비 80 % 정도의 생존율을 보였고, FRG 투여군에서는 모든 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1A). HDFs에 10 J/cm²의 UVA를 조사한 후 RG, FRG를 같은 농도별로 24시간 처리한 후 세포생존율을 측정한 결과 모든 농도의 투여군에서 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1B). 본 실험결과에 따라 RG와 FRG의 최대 처리농도를 300 μ g/ml로 설정하고 이후 실험을 진행하였다.

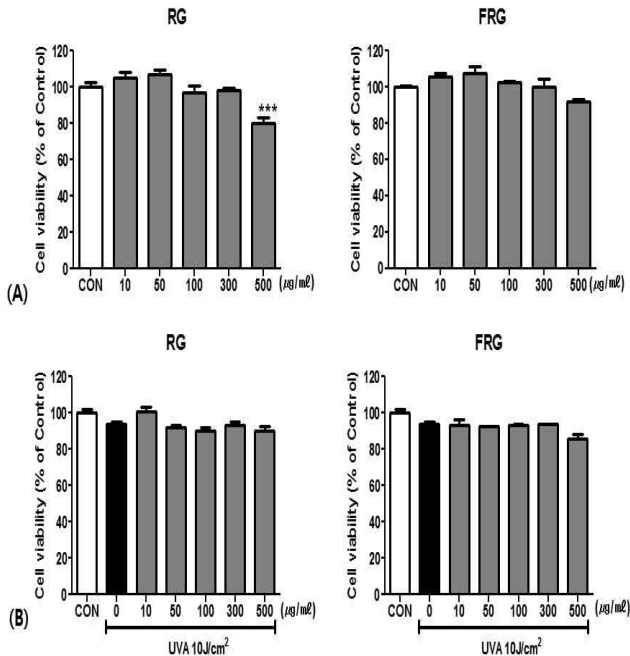


Fig. 1. The effect of red ginseng (RG) and fermented red ginseng (FRG) on the viability of human dermal fibroblast (HDFs). (A) HDFs were treated with the indicated concentrations of RG and FRG for 24h. (B) HDFs were irradiated with 10 J/cm² of UVA, followed by treated with RG and FRG for 24h. Cell viability was measured by MTT assay. Data represents the mean \pm SD of 3 independent measurements. ***P<0.001 vs control

2. UVA조사에 의한 HDFs의 ROS 생성 억제효과

UVA 조사에 의한 HDFs에서의 ROS 생성이 진피조직의 변성과 노화를 촉진하는 기전으로 알려져 있는 보고에 따라 RG, FRG

의 ROS 생성 예방 효과를 관찰하고자 DCF-DA assay를 진행하였다. 24시간 동안 RG와 FRG를 농도별로 HDFs에 전처리 한 후 10 J/cm²의 UVA를 조사하였고, 2시간 후 DCF-DA를 처리한지 30분 후 ROS의 생성을 나타내는 형광도를 측정하였다. 형광도를 측정할 결과 300 μ g/ml의 RG 처리군에서 유의성 있는 ROS의 생성 감소를 관찰할 수 있었고, FRG 처리군에서는 100, 300 μ g/ml의 처리군에서 보다 유의성 있는 ROS 생성 감소를 관찰하였다. 특히 300 μ g/ml의 처리군에서는 FRG의 항산화효능이 RG에 비하여 유의성 있게 우수한 것을 알 수 있었다 (Fig. 2).

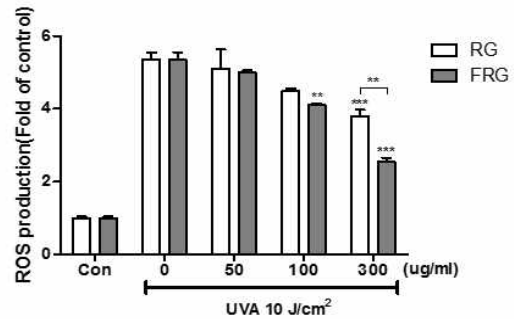
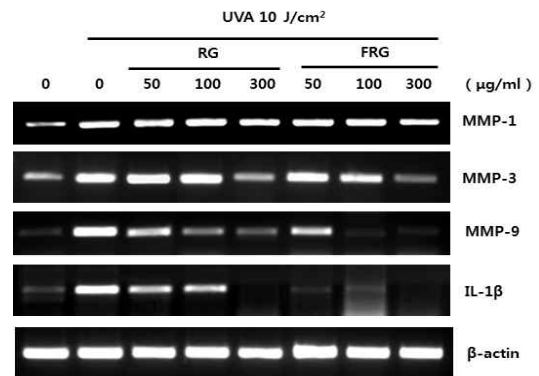


Fig. 2. FRG and RG suppressed the UVA elicited ROS production in HDFs. Intracellular ROS production was measured by DCF-DA assay. HDFs were pretreated with FRG or RG for 24h, followed by irradiated with 10 J/cm² of UVA. Fluorescent signals were read at 530 nm. **P<0.01 and ***P<0.001 compared with control.

3. UVA 조사에 의한 MMP, IL-1 β mRNA expression 억제효과

UVA에 의한 HDFs에서의 ROS 생성 억제 효능이 있는 RG와 FRG가 진피조직의 세포외기질 분해를 촉진하여 세포의 주요 기질 성분인 아교질을 분해하는 기질단백분해효소 (MMP)의 발현에 미치는 영향과 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 발현을 확인하고자 RT-PCR을 시행하였다. Internal control로 β -actin을 사용하였다. RT-PCR을 시행한 결과 UVA의 조사는 MMP-1, MMP-3, MMP-9 및 IL-1 β 의 mRNA expression을 현저히 증가시켰다. 한편 RG와 FRG를 농도별로 선처리 한 결과 MMP-1의 발현억제에는 큰 영향을 미치지 못한 반면, MMP-3, MMP-9, IL-1 β 의 발현은 억제하고 있음을 확인할 수 있었다. 특히 MMP-9과 IL-1 β 발현이 RG, FRG 처리군에서 현저히 억제되어 있음을 확인하였고, 억제 정도는 FRG가 더 우수한 것도 확인할 수 있었다(Fig. 3).



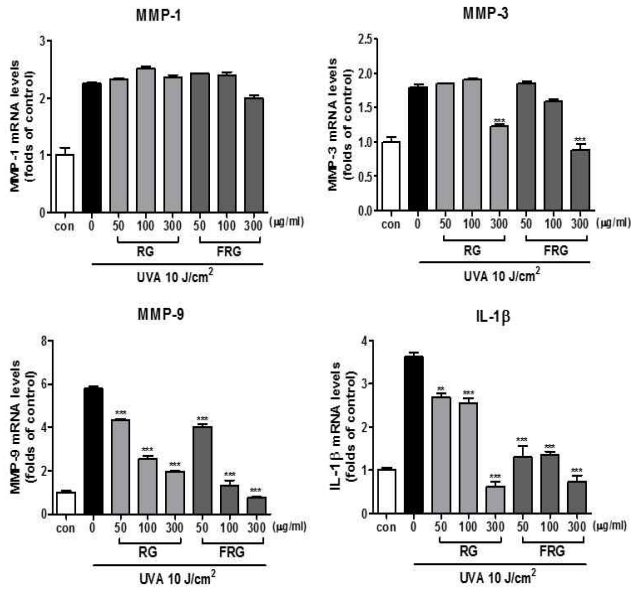
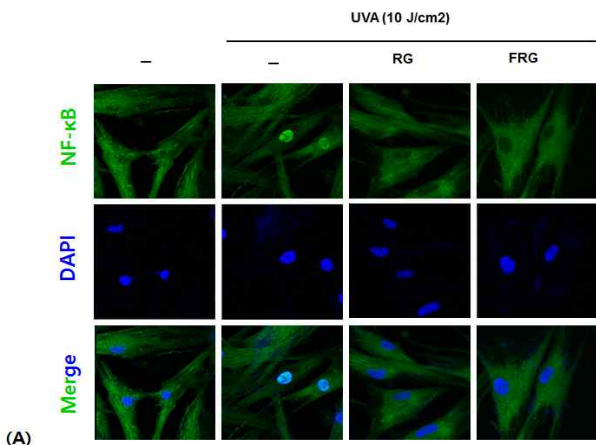


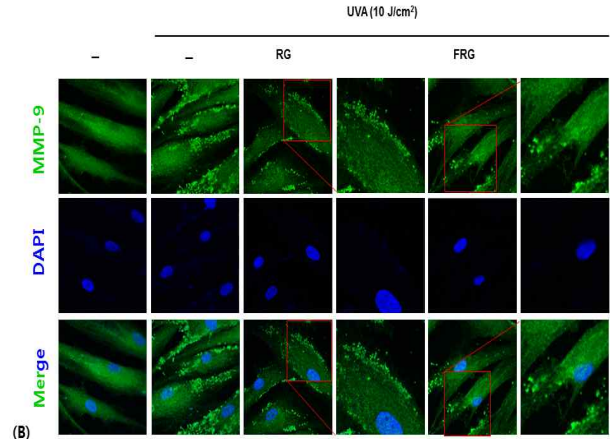
Fig. 3. FRG and RG suppressed the MMP-9 and IL-1β mRNA expression elicited by UVA irradiation. Indicated concentrations of RG or FRG were pretreated to HDFs for 24h, then 10 J/cm² of UVA was irradiated. **P<0.01 and ***P<0.001 compared with control.

4. UVA 조사에 의한 NF-κB와 MMP-9의 세포내 발현에 미치는 영향

RT-PCR결과 RG와 FRG가 IL-1β의 발현을 현저히 억제하였음을 관찰하여 IL-1β발현에 핵심적 전사인자인 NF-κB 의 핵내 발현 여부를 확인하고자 300 ug/ml 농도의 RG와 FRG를 선처리 한 후 UVA를 조사한 세포에서 NF-κB의 세포내 위치를 confocal microscope를 이용하여 관찰하였다. UVA의 조사는 HDFs에서 NF-κB 의 핵내 발현을 현저히 증가시킨 반면, RG, FRG의 선처리는 이들의 핵내 발현 증가를 유도하지 않았다 (Fig. 4A). 이는 RG, FRG에 의한 염증성 사이토카인 IL-1β의 발현 억제가 NF-κB 경로를 따라 억제하는 것임을 시사하는 결과이다. 이어서 같은 실험조건에서 세포내 MMP-9의 발현을 관찰하였다. UVA의 조사는 HDFs 내에서 과립모양의 MMP-9의 발현을 현저히 증가시켰으나, MMP-9 발현의 증가는 RG, FRG 선처리 군에서 현저히 억제되었다. 억제된 정도는 FRG에서 더 두드러짐을 확인할 수 있었다 (Fig. 4B).



(A)



(B)

Fig. 4. Intracellular localization of NF-κB and MMP-9 by RG or FRG. HDFs were pretreated with 300 μg/ml of RG or FRG for 24h followed by UVA irradiation. Intracellular location of NF-κB and MMP-9 were observed by confocal microscopy. (A) Nuclear localization of NF-κB by UVA irradiation was significantly inhibited by RG or FRG. (B) Increased amount of MMP-9 seen as small vesicle, by UVA irradiation, was decreased by treatment of RG or FRG. Decreased level of MMP-9 was more prominent in FRG treated cells.

고찰

광노화란 반복적인 UV에 대한 노출로 말미암아 발생하는 피부의 이른 노화를 말하며, 고령에 따른 피부노화와는 구분된다. UV의 가장 큰 원천은 태양광선이지만 인공적인 UV 장치에 의해서도 피부의 광노화는 발생될 수 있다^{6,7}.

UV는 파장의 크기에 따라 다른 깊이로 피부를 침투한다. 파장이 비교적 짧은 UVB는 대부분 표피층에서 흡수되어 각질세포나 다른 표피세포들에 영향을 주는 반면, 파장이 비교적 긴 UVA는 보다 깊숙한 피부내로 침투하여 진피섬유모 세포 등 진피층의 세포들에 영향을 준다⁸. 지속적이고 반복적인 UV에 대한 노출은 진피층의 세포외기질 성분들의 변화를 초래함으로써 주름과 탄력소실을 유발하는 것으로 알려져 있다. 세포외 기질 성분들 가운데 교원질은 UV의 노출에 의해 분해가 가속되거나 합성이 억제됨으로써 감소된다^{9,10}.

금속기질단백분해효소(matrix metalloproteinase; MMP)는 세포외 기질성분을 분해하는 효소이며, 정상시 이들의 잠재적인 단백질분해능력은 이 효소에 대한 특이억제인자인 tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)에 의하여 견제된다¹¹. UV에 노출되면 세포내 다양한 인산화효소들의 신호전달계통을 활성화시킴으로써 세포를 활성화시킨다. 이 중 활성화된 인산화효소들은 전사인자인 AP-1의 발현을 증가시키며, 이들은 단백질분해효소인 MMP-1, MMP3, MMP-9유전자의 전사를 자극하는 것으로 알려져 있다^{12,13}. 세포의 회복능이 완벽하지 못한 상황에서 MMP에 의한 교원질, 피브로넥틴, 엘라스틴과 같은 세포외 기질의 손상은 UV에 대한 노출이 축적됨에 따라 심해지며, 이러한 교원질의 손상은 광노화 피부를 형성하는데 핵심적인 기여인자로 인식된다¹⁴.

UV에 노출된 후 형성된 고농도의 활성산소(ROS) 또한 피부세포를 손상하는 것으로 알려져 있다¹⁵. UV에 의한 ROS는 전사인자

들을 활성화시키거나, 지방의 과산화, DNA의 손상을 유발하는 것으로 보고되었다¹⁶⁻¹⁸⁾. 이들은 또한 피하의 교원질 대사에 상당한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. UVA에 의하여 형성되는 ROS인 옥시젠프리라디칼과 과산화수소는 MMP-1과 MMP-3의 발현을 높이며, TIMP를 불활성화시킨다^{19,20)}. 이들은 또한 IL-1, IL-6와 같은 염증성 사이토카인의 분비를 유도하는 것으로 알려졌다²¹⁾.

본 연구에서는 기존 UVB로 유도했던 피부손상을 억제하는 것으로 보고했던 발효홍삼(Fermented Red Ginseng; FRG)의 UVA로 유도한 진피섬유아세포의 ROS, MMP-1, MMP-3, MMP-9, IL-1 β 의 mRNA 발현 및 NF- κ B 전사인자의 핵 내 발현 및 MMP-9의 세포 내 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 발효공정을 거친 인삼은 probiotics와 같은 살아있는 유용한 세균들을 제공해줄 뿐 아니라 진세노사이드의 당구조를 분해시킴으로써 보다 많은 유용한 사포닌을 생성한다²²⁾. 경구로 섭취한 인삼의 진세노사이드는 위산이나 간의 효소에 의하여 잘 분해되지 않고, 장에서의 흡수율도 매우 낮은 것으로 알려져 있으나, 발효공정을 거친 인삼은 소화, 흡수가 더 잘 되는 것으로 보고되었다²³⁾. 홍삼의 사포닌 성분 가운데 Rg3, Rg5, Rg6, Rh2, Rh4, Rs3, F는 인삼보다 더 농축되어 있으며, F4, Rg3, Rg5사포닌은 인삼에는 존재하지 않는 것으로 보고되었다²⁴⁾.

본 연구에 사용된 FRG의 사포닌 성분변화를 살펴보면, 파낙사 트리올의 Rg5, Rf의 상대함량이 높아졌다. 또한 당의 개수가 4개인 Rb1, Rb2, Rb3, Rc, 당의 개수가 3개인 Rd성분은 줄어든 반면, 당의 개수가 2개인 Rg3, Rg5, 당의 개수가 1개인 RK1, Rh1성분은 증가하였다⁵⁾.

본 연구에서는 FRG와 RG의 UVA로 유도한 세포내 MMP발현 억제능력을 세포수준에서 비교하였다. UVB보다 파장이 긴 UVA는 피부의 진피층까지 도달하여 진피조직의 변화를 초래하기 때문에 진피섬유모세포를 선택하여 실험을 진행하였다. 세포독성검사에서 고농도의 RG처리군에서 (500 ug/ml) 세포 생존율의 감소를 관찰하였으나, 같은 농도의 FRG처리군에서는 유의한 감소를 확인할 수 없었다 (Fig. 1A). 이는 RG의 사포닌 성분들 가운데 고농도 처리 시 세포독성을 보이는 성분들이 존재하는 반면, FRG의 사포닌 성분들은 세포독성이 500 ug/ml의 농도에서 미미함을 시사한다. 또한 진피섬유모세포에 10 J/cm² 용량의 UVA를 조사했을 경우 세포독성은 미미하였으며, 다양한 농도의 RG나 FRG를 선처리한 후 UVA를 조사할 경우 역시 세포독성은 미미하였다 (Fig. 1B). 고농도의 RG 선처리 후 UVA를 조사한 군에서 오히려 세포독성이 미미한 결과는 고농도의 RG성분들의 독성효능을 UVA가 상쇄시켰을 수도 있으나, 본 연구에서는 FRG의 UVA에 의한 세포의 활성화 억제에 초점을 맞추어 실험을 진행하고자 이 후 실험에서는 최고농도를 300 ug/ml로 설정하여 진행하였다. UVA로 유도한 진피섬유모세포에서의 ROS의 생성은 FRG와 RG처리군에서 농도의존적으로 억제되었으나, ROS생성 억제능력은 FRG가 더 우수하였다 (Fig. 2). 이는 발효공정을 통하여 변화된 사포닌 성분들 가운데 항산화 능력이 더 우수한 성분들이 증가하였음을 시사한다. 또한 UVA로 인한 광노화를 일으키는 주요 단백질분해효소인 MMP-1, MMP-3, MMP-9와 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 발현과 FRG, RG의 선처리로 인한 이들의 발현억제를 mRNA 레벨에서 관찰한

결과 UVA의 조사는 기존의 연구보고와 마찬가지로 MMP-1, MMP-3, MMP-9, IL-1 β 의 발현은 증가시켰으며, FRG와 RG의 선처리 한 결과 MMP-1를 제외한 MMP-3, MMP-9, IL-1 β 의 발현은 농도의존적으로 억제되었다 (Fig. 3). 발현억제능력은 FRG가 우수하였다. 이는 RG와 FRG에 함유되어 있는 진세노사이드가 UVA로 유도한 MMP-1의 발현에는 별 영향을 주지 않은 반면, MMP-3, MMP-9, IL-1 β 의 발현억제 효능이 있음을 나타내는 결과이며, RG보다 FRG내의 유효한 진세노사이드의 억제능력이 더 우수함을 시사하는 결과이다.

MMP의 발현은 다양한 전사인자에 의하여 조절되어진다. 그 가운데 NF- κ B는 부분적으로 MMP의 발현을 조절하고 있으며, 이 전사인자를 억제시키면 MMP-1, MMP-3, MMP-9의 발현이 억제된다²⁵⁾. 따라서 본 연구에서는 UVA를 조사한 진피섬유모세포에서 NF- κ B의 핵 내 발현과 MMP-9의 세포내 발현 및 FRG 또는 RG를 선처리한 후 UVA를 조사한 실험군에서의 핵내, 세포 내 발현의 정도를 관찰하였다. 실험결과 UVA의 조사는 NF- κ B의 핵내 발현을 증가시키고, MMP-9의 세포질 발현을 증가시켰다. FRG 또는 RG를 선처리한 군에서는 NF- κ B의 핵내 발현이 현저히 억제되었으며, MMP-9의 세포질 발현 또한 억제되었다 (Fig. 4). 특히 FRG 선처리군에서의 MMP-9의 발현억제는 RG처리군에서보다 더 두드러졌다.

이상의 결과를 종합해 보면 FRG에서 증가되어 있는 당의 개수가 적은 Rg3, Rg5, RK1, Rh1 사포닌들이 RG보다 우수한 ROS 생성억제, MMP-9 발현 억제효과를 유도한 것으로 추정할 수 있으며, 향후 각 사포닌 성분들에 대한 기전연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 기본연구지원사업 (2년)의 지원을 받아 수행되었음.

References

- Ohnishi Y, Tajima S, Akiyama M, Ishibashi A, Kobayashi R, Horii I. Expression of elastin-related proteins and matrix metalloproteinases in actinic elastosis of sun-damaged skin. *Arch. Dermatol. Res.* 2000;292(1):27-31.
- Bernernd F, Asselineau D. UVA exposure of human skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging. *Cell Death Differ.* 1998;5(9):792-802.
- Herrmann G, Wlaschek M, Lange TS, Prenzel K, Goerz G, Scharffetter-Kochanek K. UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. *Exp Dermatol.* 1993;2:92-7.

4. Goldin BR. Health benefits of probiotics. *Br J Nutr.* 1998;80(4):S203-207.
5. Lee CH, Kim HI, Kim JS, Oh MJ, Kim SW, Ma SY, et al. Morphological Studies on the Inhibitory Effects of Photoaging Skin of Fermented Red Ginseng in Hairless Mice. *Korean J Oriental Physiology & Pathology.* 2014;28(2):206-16.
6. Ichihashi M, Ueda M, Budiyo A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, et al. UV-induced skin damage. *Toxicology.* 2003;189(1-2):21-39.
7. de Gruijl FR, van Kranen HJ, Mullenders LH. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol B.* 2001;63(1-3):19-27.
8. Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blanduschun R, Wenk J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biological Chemistry.* 1997;378(11):1247-57.
9. 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.
10. Varani J, Spearman D, Perone P, Fligel SEG, Datta SC, Wang ZQ, et al. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *American Journal of Pathology.* 2001;158(3):931-42.
11. Tschesche H. Bimolecular interaction of matrix metalloproteinases and their inhibitors TIMPS. *J Protein Chem.* 1998;17(6):549-51.
12. 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.
13. Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene.* 2001;20(19):2413-23.
14. Quan TH, Qin ZP, Xia W, Shao Y, Voorhees JJ, Fisher GJ. Matrix-Degrading Metalloproteinases in Photoaging. *J Invest Derm Symp P.* 2009;14(1):20-4.
15. Jurkiewicz BA, Buettner GR. Ultraviolet Light-Induced Free-Radical Formation in Skin - an Electron-Paramagnetic-Resonance Study. *Photochemistry and photobiology.* 1994;59(1):1-4.
16. Wlaschek M, Tantcheva-Poor I, Naderi L, Ma WJ, Schneider A, Razi-Wolf Z, et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B.* 2001;63(1-3):41-51.
17. Brenneisen P, Wenk J, Klotz LO, Wlaschek M, Briviba K, Krieg T, et al. Central role of ferrous/ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem.* 1998;273(9):5279-87.
18. Nocentini S, Guggiari M, Rouillard D, Surgis S. Exacerbating effect of vitamin E supplementation on DNA damage induced in cultured human normal fibroblasts by UVA radiation. *Photochemistry and photobiology.* 2001;73(4):370-7.
19. Wlaschek M, Briviba K, Stricklin GP, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Singlet Oxygen May Mediate the a-Induced Synthesis of Interstitial Collagenase. *J Invest Dermatol.* 1995;104(2):194-8.
20. Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma WJ, Kuhr L, et al. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol.* 2000;35(3):307-16.
21. Wlaschek M, Wenk J, Brenneisen P, Briviba K, Schwarz A, Sies H, et al. Singlet oxygen is an early intermediate in cytokine-dependent ultraviolet-A induction of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts in vitro. *FEBS Lett.* 1997;413(2):239-42.
22. Quan LH, Cheng LQ, Kim HB, Kim JH, Son NR, Kim SY, et al. Bioconversion of Ginsenoside Rd into Compound K by *Lactobacillus pentosus* DC101 Isolated from Kimchi. *Journal of Ginseng Research.* 2010;34(4):288-95.
23. Doh ES, Chang JP, Lee KH, Seong NS. Ginsenoside change and antioxidation of fermented ginseng. *Korean J Med Crop Sci* 2010;18:255e65.
24. Lee SJ, Ha N, Kim Y, Kim MG. Changes in the Ginsenoside Content During Fermentation Using an Appliance for the Preparation of Red Ginseng. *Am J Chinese Med.* 2016;44(8):1595-606.
25. Bond M, Chase AJ, Baker AH, Newby AC. Inhibition of transcription factor NF-kappa B reduces matrix metalloproteinase-1,-3 and-9 production by vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2001;50(3):556-65.