

작약 및 포제작약의 최종당화산물 억제를 통한 피부 주름 개선 효과

김수지^{1#}, 이아름¹, 김수현¹, 김경조¹, 권오준², 최준영³, 구진숙⁴, 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, 2 : 경북지역산업평가단,
3 : 농업회사법인 새얼 바이오푸드 주식회사, 4 : 안동대학교 자연과학대학 생약자원학과

Skin Wrinkle Improvement Effect of Paeoniae radix and processed Paeoniae radix Through inhibition of Advanced glycation end products (AGEs)

SuJi Kim^{1#}, AhReum Lee¹, SooHyun Kim¹, KyeongJo Kim¹, OJun Kwon²,
JoonYoung Choi³, JinSuk Koo⁴, Seong-Soo Roh^{1*}

1 : College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea
2 : Gyeongbuk Institute for Regional Program Evaluation, Republic of Korea
3 : Sae Earl Bio Food co., Ltd, Republic of Korea
4 : Dept. of Bioresource Sciences, Andong National Univ. AnDong, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Collagen decrease of Skin appears through various path ways. One of causes may be the Advanced glycation endproducts (AGEs) that combine formation of glucose and protein. The aim of this study was to explore the prevent wrinkle formation of Paeoniae radix (PR) and heated Paeoniae radix (HPR) via AGEs path way.

Methods : AGEs formation inhibitory activities of PR and HPR measured using bovine serum albumin, glucose, and fructose. To evaluate the protective effects of PR and HPR in diabetic rats induced with streptozotocin (STZ) and methyl glyoxal (MGO), SD rat were distributed into four groups. Normal rats (Nor), AGEs-induced rats (Con), AGEs-induced rats treated with 100 mg/kg PR(PR), AGEs-induced rats treated with 100 mg/kg HPR (HPR). To induce AGEs, streptozotocin (50 mg/kg) was administered intraperitoneally and after 3 days administrated 100mM methyl glyoxal for 3 weeks.

Results : The oral administration of HPR inhibited AGEs in skin tissues compared with PR. The increased reactive oxygen species (ROS) levels in the serum were diminished by HPR treatment. The analyses of kidney and skin tissues proteins indicated that HPR treatment effectively reduced AGEs related protein levels as compared to that by PR treatment. Also, HPR decreased anti-oxidant related protein levels in skin tissues such as catalase, glutathione peroxidase. Moreover, it inhibited the reduction of COL1A2 by decreasing MMP-1.

Conclusion : Based on these results, it was suggested that PR and HPR could have Improving effects on wrinkle formation. These evidences provide useful information for the development wrinkle formation treated agent.

Key words : Paeoniae radix, Advanced glycation end product (AGEs), Collagen, Wrinkle

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2296 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : Su Ji Kim, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : yna555@hanmail.net

· Received : 12 June 2017 · Revised : 28 June 2017 · Accepted : 15 July 2017

I. 서 론

작약(芍藥, *Paeonia lactiflora*)은 작약과(Paeoniaceae)에 뿌리로서 복통, 진통, 진경, 부인약, 고혈압 및 염증 치료제로 사용되어지고 있으며, 대표적인 성분으로는 paeoniflorin, paeonol, peanonin, paeoniflorin 등이 있다. 작약의 성분 중 paeoniflorin은 항산화 효과가 있는 것으로 밝혀져 있으며¹⁾ 약리작용으로는 항암 작용,²⁾ 면역기능의 증진 등의 효과가 있다.³⁾ 포제란 한약재의 질과 치료효능을 높이고 한약재의 자극성, 독성으로 인한 부작용의 감소와 약성의 변화, 보관과 조제, 제제의 편리를 위한 가공 처리 방법의 총칭으로서, 작약을 포제하였을 경우 염증성 사이토카인 분비 조절 효과와 작약의 주요 성분인 Paeoniflorin의 성분변화에 영향을 미친다는 보고가 있으며,⁴⁾ 품질 평가 기준의 확립을 위한 연구로서 가공방법 및 품종에 따른 엑스 함량의 차이⁵⁾와 Paeoniflorin의 함량을 검토한 연구 보고가 있다.⁶⁾

고혈당일때에 포도당이 단백질의 free amino group과 반응하여 비효소적인 당화반응으로 생성된 물질을 최종당화산물(Advanced glycation endproducts, AGEs)이라고 한다. 최종당화산물은 전구물질 분해 효소인 glyoxalase의 활성을 감소시키며 신호전달체계를 활성화하여 산화적 스트레스와 염증을 유도한다.⁷⁾ 최종당화산물은 산화물질의 과다 생성을 유발하여 조직이나 혈액과 결합해 장기의 손상을 유발시킨다.⁸⁾ 한번 생성된 산화물질은 분해가 쉽지 않기 때문에 반감기가 긴 피부의 콜라겐과도 쉽게 결합하여 피부의 노화와 탄력을 떨어뜨리게 된다.⁹⁾ 따라서 최종당화산물을 억제하는 소재는 피부의 콜라겐 감소로 인한 주름 생성을 저해할 수 있다고 말할 수 있다. 대표적인 최종당화산물 생성 저해 억제 물질인 aminoguanidine이 임상실험에서 독성을 나타내는 것이 보고되어 부작용이 적으면서 안전한 최종당화산물 억제제로의 천연물 개발이 필요한 실정이다.¹⁰⁾ 최근 최종당화산물의 억제제로서의 천연물질의 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 다래나무(*Actinidia arguta*) 뿌리, 사철쭉(*Artemisia capillaris*) 전초, 석류나무(*Punica granatum*) 껍질 등의 약용식물로부터 최종당화산물의 생성을 효과적으로 저해하는 천연물인 flavonoid, ellagitannin, neolignan 등이 보고되었다.¹¹⁻¹⁴⁾

작약 및 포제 작약은 선행연구에서 glucose, fructose, bovine serum albumin을 사용하여 최종당화산물 저해 활성을 평가하였을 때, 충분한 저해 활성을 가진다고 보고된 소재이다.¹⁵⁾ 따라서 본 논문에서는 최종당화산물 유도 동물 모델에 작약 및 포제 작약을 경구투여하여 신장 및 혈액, 피부조직에서 최종당화산물 억제효능을 평가하였으며 피부 조직을 분쇄하여 최종당화산물 관련 인자 및 콜라겐 함량을 확인하여 최종당화산물 억제로 인한 주름 억제 효능을 평가하였고 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에서 사용한 작약은 용기한약국(대구, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 포제 작약은 roasting machine (Genesis Co., Ltd., Kyungki-do, Korea) 기기를 이용하여 200℃에서 7분간 30% 에탄올을 분무하여 酒炙를 하였다. 작약 및 포제 작약은 분쇄한 다음 10배수의 증류수를 가지고 100℃에서 2시간 동안 가열하여 추출한 다음 이를 여과지(Whatman No.2, GE healthcare, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 여과하였다. 여과액을 rotary vacuum evaporator (JP/N-1000X, Sunileyela Co. Ltd, Gyeonggido, Korea)를 사용하여 50℃에서 감압농축 후 동결건조하고 얻어진 분말을 -20℃에 보관하여 사용하였다.

2. 실험 동물

Sprague-Dawley (SD) 흰쥐 7주령 수컷 24마리를 대한바이오(충북, 한국)에서 구입하여 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도 22±2℃, 습도 50±5%, 명암주기(light : dark cycle)는 12시간 주기로 조절하였다. 사료는 고휘사료(Samyang Co., Seoul, Korea) (조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다. 실험은 대구한의대학교 동물 실험 윤리위원회의 승인(DHU 2017-049)을 얻어 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다.

3. 시약

Protease inhibitor mixture, DMSO, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), streptozotocin은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하였고 methyl glyoxal solution는 Sigma Aldrich (St Luis, MO, USA)에서 구입을 하였다. 또한, 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, U.S.A.)에서 ECL Western Blotting Detection Reagents는 GE Healthcare (Arlington Height, IL, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), catalase (CAT), glutathione peroxidase (gpx), Collagen, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), Histone, β -actin과 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas CA, USA)로부터 구입해서 사용하였으며, anti-N^e-(carboxyethyl)lysine (CEL) antibody and polyclonal anti-N^e-(carboxymethyl)lysine (CML) AGE-receptor for AGE (RAGE)항체는 COSMO BIO (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 단백질 정량을 위한 BCA protein assay kit는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다.

4. 최종당화산물 유발

최종당화산물을 유도하기 위하여 streptozotocin (50 mg/kg)를 복강 내 투여 하였고, 3일 후부터 3주간 100mM methyl glyoxal (MGO)를 경구 투여 하였다. 실험군은 총 4개의 군으로

정상군 (Normal rat ; Nor), 100 mM MGO와 증류수를 경구 투여한 대조군 (AGEs-induced rats ; Con), 작약 추출물을 100 mg/kg 농도로 경구 투여한 군 (AGEs-induced rat treated with Paeoniae radix 100 mg/kg body weight ; PR), 포제 작약 추출물을 100 mg/kg 농도로 경구 투여한 군 (AGEs-induced rat treated with processed Paeoniae radix 100 mg/kg body weight ; HPR)으로 각각 6마리씩 나누어서 사용하였다.

5. 혈액 및 조직 내 최종당화산물 측정

실험 종료 후 복대 정맥에서 채혈한 혈액을 4,000 rpm 10분 원심 분리하여 혈청을 얻었고 피부 조직은 적출 후 1 mM EDTA-50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 분쇄하여 실험에 사용하였다. 혈액 및 피부 조직의 최종당화산물은 rat advanced glycation end products ELISA Kit (cusabio tech, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

6. 산화적 스트레스 바이오마커 측정

ROS 값은 혈청과 25 mM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 혼합한 후, 형광 광도계를 이용하여 0분부터 매 10분씩 emission 파장 530 nm와 excitation 파장 485 nm를 이용하여 30분간 측정된 산출 값을 계산하였다.

7. 조직 Western blotting

신장과 피부의 세포질을 얻기 위해 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT, protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder (BioSpec Product, Oklahoma, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 20분간 정치시킨 후 12,000 rpm 으로 2분간 원심분리 하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 행구고 100 ml의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)를 첨가해 재부유 시킨 뒤 10분마다 vortex을 3번 하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80°C에서 각각 냉동 보관하였다. 신장 조직 세포질의 CML, CEL, β-actin과 피부조직 세포질의 RAGE, CML, CEL, COL1A2, MMP-1, catalase, GPx, b-actin, Histone의 단백질 발현을 측정하기 위하여 10 mg의 단백질을 8~15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기연동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 antibody를 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBS-T로 1 : 3000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액에 노출

시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co. Ltd, Seoul, Korea)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)프로그램을 사용하여 정량하였다.

8. 통계분석

모든 수치는 평균과 표준오차로 표시하였으며, SPSS (Version 22.0, IBM, Armonk, NY, USA)을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 Tukey Multiple Comparison test로 사후검증을 실시하여 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성을 5% 수준에서 검증하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 산화적 스트레스 바이오마커 측정 결과

복대 정맥에서 채혈한 혈액을 원심 분리하여 혈청을 분리하였고 분리된 혈청을 이용하여 산화적 스트레스의 마커인 ROS를 측정하였다. 그 결과 대조군 (64.1 ± 1.9 fluorescence/min/ml)은 정상군 (52.0 ± 1.2 fluorescence/min/ml (*p* < 0.01))에 비해 수치가 증가하였고 PR투여군 (41.1 ± 2.5 fluorescence/min/ml (*p* < 0.001)) 및 HPR투여군 (39.3 ± 3.5 fluorescence/min/ml (*p* < 0.001))은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 1).

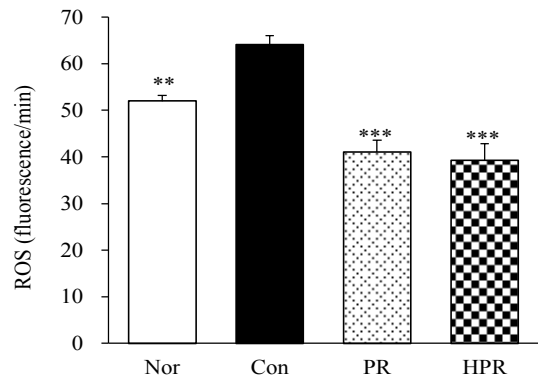


Fig. 1. ROS in serum. Oxidative stress biomarkers reactive oxygen species (ROS) in serum. Normal rats ; Nor, AGEs-induce rats ; Con, AGEs-induce with treated PR 100 mg/kg body weight rats ; PR, AGE-induce with treated HPR 100 mg/kg body weight rats ; HPR. The effects of PR treated rats and HPR treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means ± SEM, n=6 rats per group. Significance : **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs. AGE-induce rats.

2. 피부 조직의 최종당화산물 측정 결과

피부 조직을 분쇄하여 최종당화산물을 측정된 결과, 정상군 (13.32 ± 0.6 μg/ml)에 비하여 대조군 (16.30 ± 1.0 μg/ml)은 증가되었고, PR투여군 (14.27 ± 0.8 μg/ml)과 HPR투여군 (15.11 ± 0.9 μg/ml)은 대조군에 비하여 감소하였다. (Fig. 2)

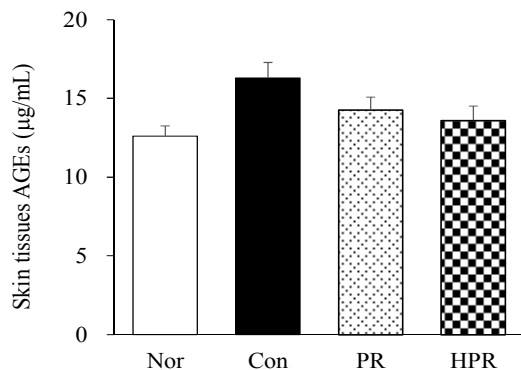


Fig. 2. AGEs accumulation in tissue.

Advanced glycation end products (AGEs) accumulation in tissue. Normal rats ; Nor, AGEs-induce rats ; Con, AGEs-induce with treated PR 100 mg/kg body weight rats ; PR, AGE-induce with treated HPR 100 mg/kg body weight rats ; HPR. The effects of PR treated rats and HPR treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means \pm SEM, n=6 rats per group.

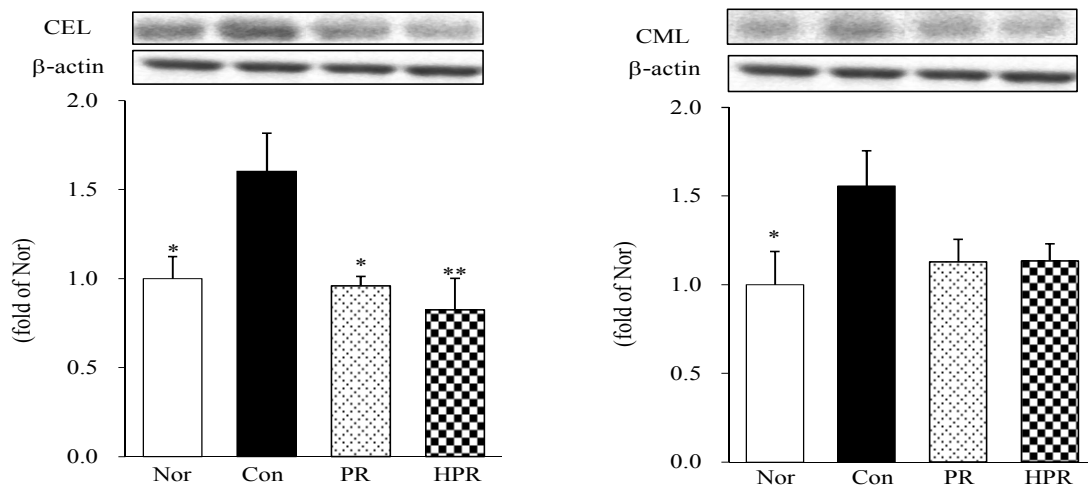


Fig. 3 Expression AGEs-related protein in kidney.

Western bolt analysis of CEL, CML, B-actin expression ; Normal rats ; Nor, AGEs-induce rats ; Con, AGEs-induce with treated PR 100 mg/kg body weight rats ; PR, AGE-induce with treated HPR 100 mg/kg body weight rats ; HPR. The effects of PR treated rats and HPR treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means \pm SEM, n=6 rats per group. Significance : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. AGE-induce rats.

4. 피부 조직에서의 최종당화산물 관련 단백질 발현

피부 조직을 분쇄하여 최종당화산물 관련 단백질인 CEL, CML, RAGE를 western bolt으로 측정하였다. 그 결과 CEL의 발현은 대조군 (1.64 ± 0.18)에서 정상군 (1.00 ± 0.08 ($p < 0.01$))에 비하여 증가하는 경향이 있었고, PR투여군 (1.15 ± 0.05 ($p < 0.001$))과 HPR투여군 (1.13 ± 0.02 ($p < 0.001$))은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. CML의 발현은 대조군에서 정상군에 비하여 증가하는 경향이 있었고, PR투여군과 HPR투여군에서는 대조군보다 정상군 가까이 감소하는 경향을 보였다. RAGE의 발현을 확인한 결과 또한 대조군 (1.32 ± 0.08)은 정상군 (1.00 ± 0.09 ($p < 0.05$))에 비해 유의하게 증가하였고, PR투여군 (1.16 ± 0.10)과

3. 신장 조직의 최종당화산물 관련 단백질 발현

신장 조직에서 western bolt을 실시하여 최종당화산물 관련 단백질 발현을 관찰한 결과, CEL의 발현은 대조군 (1.60 ± 0.21)은 정상군 (1.00 ± 0.12 ($p < 0.05$))에 비해 유의하게 감소하였고, PR투여군 (0.96 ± 0.05 ($p < 0.05$))과 HPR투여군 (0.82 ± 0.18 ($p < 0.01$)) 또한 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다. CML의 발현은 대조군에 비해 정상군이 유의하게 감소하였다. PR투여군, HPR투여군은 대조군에 비하여 감소되는 경향을 보였다.(Fig. 3)

HPR투여군 (1.14 ± 0.09)은 대조군보다 정상군 가까이 감소하는 경향을 보였다.(Fig. 4)

5. 항산화 관련 단백질 발현

피부 조직에서 항산화 단백질인 catalase, GPx를 측정하였다. 그 결과 catalase의 발현은 정상군 (1.00 ± 0.07 ($p < 0.01$))은 대조군 (0.67 ± 0.04)에 비하여 유의성 있게 증가하였고, PR투여군 (0.70 ± 0.08)과 HPR투여군 (0.81 ± 0.09)은 대조군에 비해 증가하는 경향만 보였다. GPx의 발현을 확인한 결과 또한 대조군 (1.32 ± 0.08)에 비해 정상군 (1.00 ± 0.09 ($p < 0.05$))이 유의성 있게 증가하였고, PR투여군 (1.16 ± 0.10)과 HPR투여군 (1.14 ± 0.09)은 대조군에 비해 증가하는 경향만 보였다 (Fig.5).

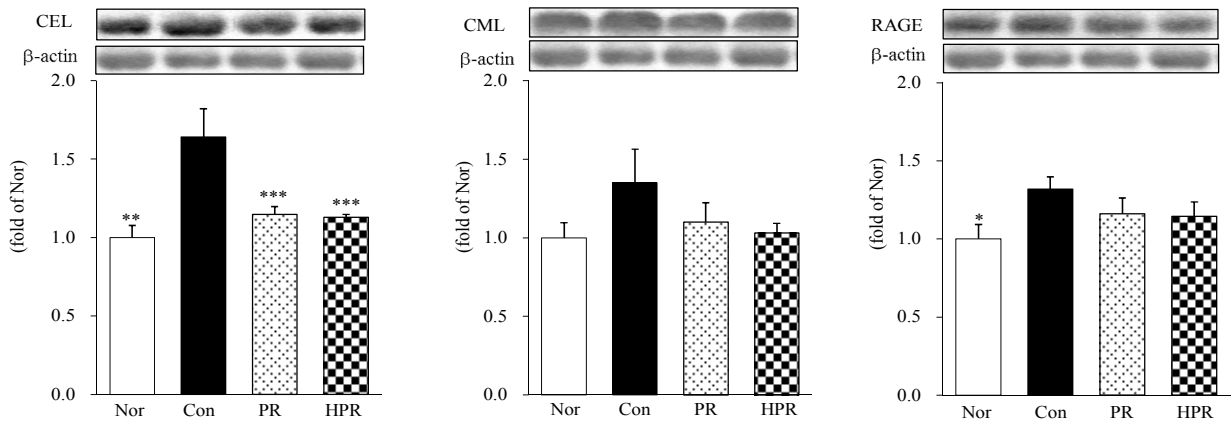


Fig. 4 Expression AGEs-related protein in skin.

Western bolt analysis of CEL, CML, RAGE, B-actin expression ; Normal rats ; Nor, AGEs-induce rats ; Con, AGEs-induce with treated PR 100 mg/kg body weight rats ; PR, AGE-induce with treated HPR 100 mg/kg body weight rats ; HPR. The effects of PR treated rats and HPR treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means \pm SEM, n=6 rats per group. Significance : * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. AGE-induce rats.

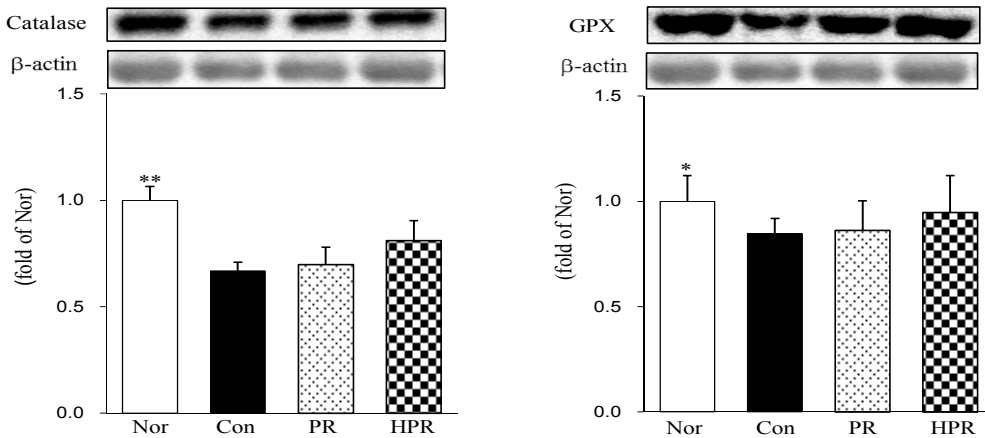


Fig. 5 Expression anti-oxidant related protein skin.

Western bolt analysis of catalase, GPx, B-actin expression ; Normal rats ; Nor, AGEs-induce rats ; Con, AGEs-induce with treated PR 100 mg/kg body weight rats ; PR, AGE-induce with treated HPR 100 mg/kg body weight rats ; HPR. The effects of PR treated rats and HPR treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means \pm SEM, n=6 rats per group. Significance : * p <0.05, ** p <0.01 vs. AGE-induce rats.

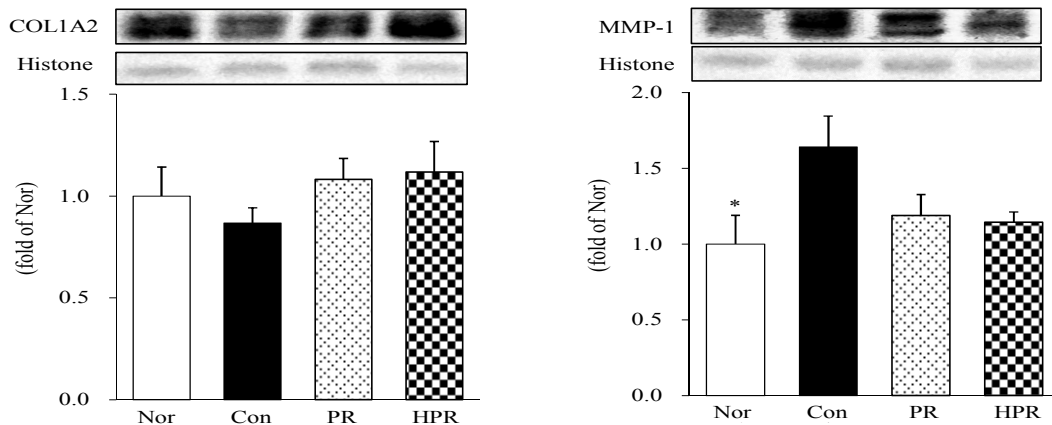


Fig. 6 Expression skin wrinkle-related protein in skin.

Western bolt analysis of COL1A2, MMP-1, Histone expression ; Normal rats ; Nor, AGEs-induce rats ; Con, AGEs-induce with treated PR 100 mg/kg body weight rats ; PR, AGE-induce with treated HPR 100 mg/kg body weight rats ; HPR. The effects of PR treated rats and HPR treated rats were compared with those of normal and control rats. All data are expressed means \pm SEM, n=6 rats per group. Significance : * p <0.05 vs. AGE-induce rats.

6. 피부 주름 관련 단백질 발현

피부 조직에서 주름 관련 단백질인 COL1A2와 MMP-1의 발현을 관찰하였다. COL1A2의 발현은 정상군 (1.00 ± 0.14)에 비해 대조군 (0.87 ± 0.08)이 감소하는 경향이 있고 PR투여군 (1.08 ± 0.10) HPR투여군 (1.12 ± 0.15) 또한 대조군에 비해 증가하는 경향이 보였다. MMP-1의 발현을 측정할 결과, 대조군 (1.64 ± 0.20)에 비해 정상군 (1.00 ± 0.19) ($p < 0.05$)이 유의성 있게 감소되었다. PR투여군 (1.19 ± 0.14)과 HPR투여군 (1.14 ± 0.07)은 대조군에 비해 정상군 가까이 감소하는 경향을 보였다. (Fig. 6)

IV. 고 찰

Collagen은 피부의 기질에서 진피세포의 대부분을 차지하며 피부 진피세포의 섬유아세포 (fibroblast)에서 elastin 등의 여러 단백질과 뮤코다당류(mucopolysaccharide) 생산하여 세포외기질 (extracellularmatrix, ECM)을 형성하며 피부의 점탄성과 강도 유지에 아주 중요한 역할을 한다.¹⁶⁾ collagen의 감소와 elastin의 변형은 피부의 수분과 탄력이 저하되고 주름이 생성되며 피부 노화의 원인이 된다.¹⁷⁻¹⁸⁾

고혈당을 가지는 당뇨병환자에서 포도당이 혈액중의 단백질과 반응하면 초기당화산물 (early glycosylation products)인 schiff base를 형성한 후 재배열되어 아마도리 (amadori)형의 초기당화산물을 생성하는데 비교적 농도 조절이 가능해 평형한 상태이다.¹⁹⁾ 그러나 고혈당 상태가 지속되면 초기당화산물은 collagen과 같은 수명이 긴 기질 단백질과의 비가역적인 교차결합으로 인해 최종당화산물(Advanced glycation endproducts, AGEs)이 생성된다.²⁰⁾ 정상적인 collagen의 교차결합은 특정 부위에서만 일어나지만, 최종당화산물에 의한 collagen의 교차결합은 모든 부위에 일어나며 이러한 비정상적인 교차결합에 의해서 치명적인 합병증을 유발한다.²¹⁾ 선행연구에 의하면 이러한 최종당화산물이 피부에 축적이 되어 피부의 탄력저하와 주름을 생성시켜 피부 노화를 촉진한다고 알려져 있다.²²⁾

이에 본 연구에서는 작약 및 포제 작약의 추출물을 최종당화산물 유발 동물모델에 경구투여 하여 항산화 효과 및 최종당화산물의 억제 효과를 통해 주름 개선의 효능을 평가 하였다.

ROS에 의한 산화적 스트레스는 세포의 손상과 지질과산화물을 유발하며,²³⁾ 초기당화산물이 산화 분해되어 생성되는 최종당화산물의 주된 유도체인 CML의 형성에 ROS가 영향을 끼친다는 보고가 있다.²⁴⁾ PR과 HPR의 산화적 스트레스의 마커인 ROS를 측정할 결과 대조군 (64.1 ± 1.9)은 정상군 (52.0 ± 1.2)에 비해 수치가 증가하였고, PR투여군 (41.1 ± 2.5) 및 HPR투여군 (39.3 ± 3.5)은 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.

피부 조직의 최종당화산물을 측정할 결과, 정상군 ($13.32 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$)에 비해 대조군 ($16.30 \pm 1.0 \mu\text{g/ml}$)은 증가하였고, PR투여군 ($14.27 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$)과 HPR투여군 ($15.11 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$)은 대조군에 비하여 감소하였다.

신장 조직의 최종당화산물 관련 단백질인 CEL과 CML의 발현을 관찰한 결과, CEL의 발현은 대조군 (1.60 ± 0.21)이 정상군 (1.00 ± 0.12)에 비해 유의성 있게 감소하였고, PR투

여군 (0.96 ± 0.18)과 HPR투여군 (0.82 ± 0.18) 또한 대조군에 비해 유의성 있게 감소 하였다. CML의 발현 또한 대조군에 비해 정상군이 유의하게 감소 하였다. PR투여군, HPR투여군은 대조군에 비하여 감소되는 경향을 보였다. 당뇨병성 신증 환자의 산장에 CML이 증가하며, CML은 단백질의 물리화학적 성질을 변화시켜 세포내의 지질, 단백질, 세포의 기질을 변형시켜 최종당화산물 수용체와의 반응을 통해 세포신호전달에 중요한 전사인자를 활성화 시킨다는 보고가 있다.²⁵⁾

피부 조직에서 최종당화산물 관련 단백질인 CEL, CML, RAGE를 측정할 결과, CEL의 발현은 대조군 (1.64 ± 0.18)에서 정상군 (1.00 ± 0.08)에 비하여 증가하는 경향이 있었고, PR투여군 (1.15 ± 0.05)과 HPR투여군 (1.13 ± 0.02)은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. CML의 발현은 대조군에서 정상군에 비하여 증가하는 경향이 있었고, PR투여군과 HPR투여군에서는 대조군보다 정상군 가까이 감소하는 경향을 보였다. RAGE의 발현을 확인한 결과 또한 대조군 (1.32 ± 0.08)은 정상군 (1.00 ± 0.09)에 비해 유의하게 증가하였고, PR투여군 (1.16 ± 0.10)과 HPR투여군 (1.14 ± 0.09)은 대조군보다 정상군 가까이 감소하는 경향을 보였다. 최종당화산물 수용체중의 하나인 RAGE는 신장의 사구체와 신세뇨관 상피세포에서도 많이 발현되며 CML과도 상호작용하여 다양한 세포신호 기전에 중요한 매개체로 알려져 있다.²⁶⁾

피부 조직에서 항산화 관련 단백질인 catalase, GPx를 측정할 결과, catalase의 발현은 정상군 (1.00 ± 0.07)은 대조군 (0.67 ± 0.04)에 비해 유의성 있게 증가 하였다. PR투여군 (0.70 ± 0.08)과 HPR투여군 (0.81 ± 0.09)은 대조군에 비해 증가하는 경향만 보였다. GPx의 발현을 확인한 결과 또한 대조군 (1.32 ± 0.08)에 비해 정상군 (1.00 ± 0.09)이 유의성 있게 증가하였고, PR투여군 (1.16 ± 0.10)과 HPR투여군 (1.14 ± 0.09)은 대조군에 비해 증가하는 경향만 보였다.

피부 조직에서 피부 주름 관련 단백질인 COL1A2와 MMP-1의 발현을 측정할 결과, COL1A2의 발현은 정상군 (1.00 ± 0.14)에 비해 대조군 (0.87 ± 0.08)이 감소하는 경향이 있고 PR투여군 (1.08 ± 0.10) HPR투여군 (1.12 ± 0.15) 또한 대조군에 비해 증가하는 경향이 보였다. MMP-1의 발현을 측정할 결과, 대조군 (1.64 ± 0.20)에 비해 정상군 (1.00 ± 0.19)이 유의성 있게 감소되었다. PR투여군 (1.19 ± 0.14)과 HPR투여군 (1.14 ± 0.07)은 대조군에 비해 정상군 가까이 감소하는 경향을 보였다.

이러한 실험결과를 종합하여 보았을 때 작약 추출물의 경구투여는 ROS의 생성 억제와 신장과 피부의 CEL 생성 억제와의 관계에서 유의성이 있음을 확인하였다. 이는 산화적 스트레스의 억제를 통해 최종당화산물의 생성을 막음으로써 피부 주름 개선 효과가 있는 것으로 사료되었고 작약을 포제하였을 때 그 효과가 증가하는 것으로 판단된다.

V. 결 론

작약 및 포제 작약을 최종당화산물 유발 동물모델에 경구투여하여 최종당화산물 억제를 통한 피부 주름 개선 효능을 평가하였다.

1. 작약 및 포제 작약 추출물의 경구 투여는 혈액과 피부조직에서 최종당화산물을 억제하였다.
2. 작약 및 포제 작약 추출물의 경구 투여는 ROS를 유의적으로 감소시켰다.
3. 포제 작약 추출물의 경구 투여는 작약 추출물과 비교하였을 때, 신장 및 피부에서 최종당화산물을 더 효과적으로 억제하였다.
4. 포제 작약 추출물의 경구 투여는 대조군과 작약 추출물에 비하여 피부조직에서 catalase 및 gpx를 증가시켰다.
5. 포제 작약 추출물의 경구 투여는 대조군과 작약 추출물에 비하여 피부조직에서 MMP-1을 감소시켜 collagen 감소를 억제하였다.

이상의 결과들로 포제 작약의 경구 투여는 혈액, 피부, 신장 조직에서 최종당화산물을 억제함을 확인하였고, 항산화 효과를 통하여 MMP-1을 감소시켜 결과적으로 collagen 감소를 억제하였다. 따라서 포제 작약은 최종당화산물 억제를 통한 주름 개선 효과가 뛰어나 항산화 및 항주름 소재로서의 활용가능성이 높다고 사료된다.

감사의 글

이 연구결과는 2017년도 중소기업청에서 시행한 기업부설 연구소 신규설치사업(과제번호 : C0268169)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Kim ID. Effect of paeoniflorin on the anti-inflammatory and anti-oxidation, Silla University. 2009.
2. Park HR, Jung UH, Jeong LY, Yee ST, Jo SK. Inhibition of Tumor Growth through Macrophage Activation by Polysaccharide Fraction from Peonia japonica. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 2003 ; 32 : 149-54.
3. Park HR, Ham YH, Yee ST, Paik SG. Characteristics of B cell proliferation by polysaccharide fraction of Peonia japonica miyabe. Immune Network. 2001 ; 1 : 126-34.
4. Yoon CH. Comparative study of anti-inflammatory effects of Paeoniae Radix prepared by different processing methods. Wonkwang University. 2003.
5. Jung MG, An YN, Kang GH, Jo YS, Kim JH. Comparison on the Extract Content by Different Processing Method in Peony (Paeonia lactiflora Pall.) Root. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2003 ; 11 :

- 201-206.
6. He Y1, Zhao HD, He BX, Tang LY, Zhang QW, Wang ZJ. Experimental study on processing of Paeonia lactiflora. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2006 ; 31 : 889-91.
7. Kwon HO, Lee MH, Kim YJ, Kim E, Kim OK. Beneficial effects of Acanthopanax seticosus extract in type II diabetes animal model via down-regulation of advanced glycated hemoglobin and glycosylation end products. J. Korean Soc Food Sci Nutr. 2016 ; 45 : 929-37.
8. Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JEB. Diabetes and advanced glycooxidation end products. Diabetes Care. 2006 ; 29 : 1420-32.
9. Lee HS, Yoon JA. Inhibitory activity of advanced glycation endproducts (AGE) formation of edible plant for development of anti-wrinkle ingredients. J. Korean Soc Food Sci Nutr. 2010 ; 39 : 186-92.
10. Rahbar S, Figarola JL. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. Arch Biochem Biophys. 2003 ; 419 : 63-79.
11. Eika B, Levin RM, Longhurst PA. Collagen and bladder function in streptozotocin-diabetic rats : effects of insulin and aminoguanidine. J Urol. 1992 ; 148 : 167-172.
12. Kelly DJ, Gilbert RE, Cox AJ, Soulis T, Jerums G, Cooper ME. Aminoguanidine ameliorates overexpression of prosclerotic growth factors and collagen deposition in experimental diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2001 ; 12 : 2098-2107.
13. Klandorf H, Zhou Q, Sams AR. Inhibition by aminoguanidine of glucose-derived collagen cross-linking in skeletal muscle of broiler breeder hens. Poult Sci. 1996 ; 75 : 432-437.
14. Kochakian M, Manjula BN, Egan JJ. Chronic dosing with aminoguanidine and novel advanced glycosylation end product-formation inhibitors ameliorates cross-linking of tail tendon collagen in STZ-induced diabetic rats. Diabetes. 1996 ; 45 : 1694-1700.
15. Kim SA, Lee JA, Kim MJ, Kim AH, Kim YA, Yun HJ, Cho YH. Effect of Ascorbic Acid, Silicon, Fe, Proline and Lysine on Proliferation and Collagen Synthesis in the Human Dermal Fibroblast Cell (HS27). J Korean Soc Food Sci Nutr. 2009 ; 38 : 1492-1498.
16. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation : the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch Biochem Biophys. 1991 ; 288 : 481-487.
17. Kim NM, Koo BS, Lee SK, Hwang EI, So SH, Do JH. Effect of Korean red ginseng on collagen

- biosynthesis and MMP-1 activity in human dermal fibroblast. *J Ginseng Res.* 2007 ; 31 : 86-92.
18. Kim JH, Kim CK, Kim JS. Inhibitory Effects of the EtOH Extract of *Aster koraiensis* on AGEs formation in STZ-induced diabetic rats and AGEs-induced Protein Cross-linking in vitro. *Kor. J. Pharmacogn.* 2016 ; 47 : 312-318.
 19. Kim CK, Jang DS, Kim JH, Lee GY, Lee YM, Kim YS, Kim JS. Inhibitory Effects of the Seeds of *Cornus officinalis* on AGEs Formation and AGEs-induced Protein Cross-Linking. *Kor. J. Pharmacogn.* 2008 ; 39 : 249-254.
 20. Kim YS, Lee YM, Kim CS, Sohn EJ, Jang DS, Kim JS. Inhibitory Effect of KIOM-79, a New Herbal Prescription, on AGEs Formation and Expressions of Type 4 Collagen and TGF- β 1 in STZ-induced Diabetic Rats. *Kor. J. Pharmacogn.* 2006 ; 37 : 103-109.
 21. Sell DR, Kleinman NR, Monnier VM. Longitudinal determination of skin collagen glycation and glycoxidation rates predicts early death in C57BL/6NNIA mice. *FASEB J.* 2000 ; 14 : 145-156.
 22. Genuth S, Sun W, Cleary P, Sell DR, Dahms W, Malone J, Sivitz W, Monnier VM. Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005 ; 54 : 3103-3311.
 23. Hwang JY, Lee HS, Han JS. Protective effect of *Sasa borealis* leaf extract on AAPH-induced oxidative stress in LLC-PK1 cells. *J Food Sci Nutr.* 2011 ; 16 : 12-17.
 24. Lee JS, Yang R, Shin BD. Effect of Reactive Oxygen Species on the Formation of N ϵ -(carboxymethyl) lysine, an Endproduct of Maillard Reaction of Proteins. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2004 ; 33 : 123-131.
 25. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM. N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J. Biol. Chem.* 1999 ; 274 : 31740-31749.
 26. Tanji N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM, D'Agati VD. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2000 ; 11 : 1656-1666.