

樺皮 에탄올 추출물의 Ultraviolet B로 자극한 피부 각질 세포 보호 작용

최학순¹, 김현주¹, 이학송², 백승원², 김지은², 송용선^{1*}

¹원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과, ²원광대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Protective Effect of *Betula Platyphylla* on Ultraviolet B-irradiated HaCaT Keratinocytes

Hag Soon Choi¹, Hyun Joo Kim¹, Hark Song Lee², Seung Won Paik², Ji Eun Kim², Yung Sun Song^{1*}

¹Department of Third Medicine, Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University

²Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Wonkwang University

Objectives: *Betula Platyphylla*(BP) has been used as a analgesic, anti-microbial, anti-oxidant drug in Eastern Asia. However, it is still unknown whether BP ethanol extract could exhibit the inhibitory activities against ultraviolet B(UVB)-induced skin injury on human keratinocytes, HaCaT cells. This study was aimed to investigate the protective activity of BP ethanol extract on UVB-irradiated skin injury in HaCaT cells.

Methods: The skin injury model of HaCaT cells was established under UVB stimulation. HaCaT keratinocyte cells were pre-treated with BP ethanol extract for 1 h, and then stimulated with UVB. Then, the cells were harvested to measure the cell viability, production of reactive oxygen species(ROS), pro-inflammatory cytokines such as interleukin(IL) 1-beta, IL-6, and tumor necrosis factor(TNF)- α , hyaluronidase, type 1 collagen, matrix metalloproteinase(MMP)s. In addition, we examined the mitogen activated protein kinases(MAPKs) and inhibitory kappa B alpha(I κ -B α) as inhibitory mechanisms of BP ethanol extract.

Results: The treatment of BP ethanol extract inhibited the UVB-induced cell death and ROS production in HaCaT cells. BP ethanol extract treatment inhibited the UVB-induced increase of IL-1beta, IL-6, and TNF- α . BP ethanol extract treatment inhibited the increase of hyaluronidase, MMP and decrease of collagen. BP ethanol extract treatment inhibited the activation of MAPKs and the degradation of I κ -B α .

Conclusions: Our result suggest that treatment of BP ethanol extract could inhibit the UVB-induced skin injury via deactivation of MAPKs and nuclear factor kappa B(NF- κ B) in HaCaT cells. This study could suggest that BP ethanol extract could be a beneficial agent to prevent skin damage or inflammation.

Key Words : *Betula Platyphylla*(BP), ultraviolet B(UVB), keratinocytes, skin, inflammation

• Received : 17 April 2023

• Revised : 6 May 2023

• Accepted : 10 May 2023

• Correspondence to : Yung Sun Song

Department of Third Medicine of Korean Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine,
Wonkwang University, 460 Iksan-daero, Iksan 54538, Korea

Tel : +82-63-270-1177, Fax : +82-63-270-1594, E-mail : yssong@wku.ac.kr

• 본 연구는 2022년도 원광대학교 교비 지원에 의하여 연구되었음.

서론

현대 과학의 발달로 평균 수명이 증가하게 되고, 그에 따라 삶의 질을 높이기 위한 관심이 증가하고 있다. 특히, 건강하고 젊은 피부를 유지하기 위해 많은 사람들은 피부 미용에 관심을 기울이고 있다. 이에 따라 미용 산업에서 피부 노화 억제 화장품을 개발하는데 많은 관심을 가지고 있으며, 화장품 개발을 위해 항산화 효능 혹은 항주름 효능을 가진 소재에 관련된 연구를 진행하고 있다. 노화는 세월에 따라 자연스럽게 일어나는 내인성 노화와 자외선(Ultraviolet, UV)에 오래 노출되어 얼굴, 손등, 목 뒤 등에서 발생하는 외인성 노화로 구분할 수 있다.¹⁾ 적당한 자외선 노출은 비타민 D의 합성을 위하여 필수적이거나, 너무 과도한 노출은 피부의 손상을 일으키고, 때에 따라 피부 색소 침착 및 피부 건조, 피부 노화 등을 초래한다.²⁾ 자외선에 의한 피부 노화를 광노화라고 하는데, 이 광노화는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)과 염증성 사이토카인 분비를 통하여 유발되며, 이러한 염증 매개 물질들은 피부 내 산화적 스트레스를 증가시켜 세포막과 피부 구성 단백질 손상 및 염증을 초래한다.³⁾

자외선은 파장길이에 따라 UVA(320~400 nm), UVB(280~320 nm), UVC (200-280 nm)로 나눌 수 있으며 그 중 UVC는 가장 유해하나 대부분 오존층 대부분 흡수 되어 인체에 미치는 영향이 미미한 것으로 보고되어 있다.²⁾ UVB는 급성 노출 시 피부 표피층에 흡수되어 피부홍반 및 일광화상을 일으키고 만성 노출시 피부암을 유발한다.⁴⁾ 자외선에 노출되면 신호전달 체계를 통해서 matrix metalloproteinase (MMP)가 활성화되는데 이는 세포 외 기질을 분해하여 피부의 구조를 변형시키게 된다.⁵⁾ 그 중, MMP-1은 피부세포에 가장 많이 존재하는 구조 단백질인 type I collagen과 type III collagen을 분해한다. 이렇게 분해된 collagen은 gelatinase B인 MMP-9에 의해서 더 작은 분자로 분해된다.⁶⁾ 이러

한 collagen의 분해는 피부의 구조적 변화를 일으켜 주름을 생성하고 피부의 탄력을 잃는 등의 피부 노화 현상을 가져오게 된다.⁷⁾ 따라서 ROS, 염증성 사이토카인, MMP의 발현을 억제하고, collagen 합성을 도와주는 소재를 개발하여, 광노화 예방 및 조절 화장품 개발이 필요하다.

樺皮(Betula Platyphylla)는 樺木科(자작나무과 ; Betulaceae)에 속한 落葉喬木인 만주자작나무 및 자작나무의 樹皮로 宋代《開寶本草》에 최초로 수록되었으며 異名으로는 樺木皮·樺樹皮·白樺皮 등이 있다.⁸⁻¹⁰⁾ 樺皮의 性味는 苦, 寒 無毒하고 胃經에 작용하며 清熱利濕·祛痰止咳·消腫解毒 등의 효능이 있어 痢疾, 泄瀉, 黃疸, 肺熱咳嗽, 扁桃腺炎, 폐렴, 신염, 요로 감염, 만성 기관지염, 급성 편도선염, 치주염, 癰腫, 癢疹, 痒疹, 肺風癩, 여드름 등을 치료한다는 보고가 있다.⁸⁻¹¹⁾ 또한 樺皮의 물 추출물과 에탄올 추출물은 실험적으로 항산화 효과, 항균 효과가 보고되어 있다.^{12,13)} 樺皮가 여드름, 癢疹, 痒疹, 肺風癩 등의 피부질환에 전통적으로 사용되었고,^{9,10)} 서양에서도 birch oil 등으로 피부 테라피에 사용되는 등 피부질환 치료에 다용되고 있다. 樺皮는 아직까지 뚜렷한 독성학적 및 생리학적 평가가 이루어지지 않았지만 오랜 기간 동안 피부 질환 치료에 사용되었다. 따라서 in vitro 실험을 통해 그 효과를 평가하여 객관적 근거를 확보하는 것은 매우 큰 의미가 있다.

이에 본 연구에서는 피부 각질 형성 세포주인 HaCaT 세포가 UVB로 인하여 손상을 입었을 때, 樺皮 에탄올 추출물의 보호 효과 및 보호 기전을 연구하였다. HaCaT 세포에 UVB로 피부 염증을 유도하여, ROS 및 염증성 사이토카인을 측정하여 염증 반응을 조사하였고, 보호 기전을 조사하기 위하여 MAPKs의 활성화와 Iκ-Bα의 분해를 조사하였고, 이에 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료의 조제

본 논문에 사용한 樺皮(산지:중국)는 광명당 제약(울산, 대한민국)에서 구입하여 정선하여 사용하였다. 樺皮 에탄올 추출물은 70% 에탄올 1 L에 樺皮 100 g을 넣고 실온에서 초음파 분쇄한 후 3일간 추출하였다. 거르로 여과하고 여과지(No. 2)를 사용해 진공펌프로 여과한 후 rotary evaporator로 감압 농축하여 15.32 g(수득률 15.32%)의 건조된 추출물을 얻었다. 시료는 DMSO (Dimethyl sulfoxide)에 녹여 사용하였고 DMSO는 최종 0.01% 이하의 농도 범위에서 사용하였다.

2. 시약

Fetus bovine serum(FBS), RPMI1640, penicillin/streptomycin은 GIBCO (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Diethylpyrocarbonate(DEPC), trizol 용액은 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA), high-capacity RNA-to-cDNA kit는 Applied biosystems(ABI, San Diego, CA, USA)사에서 각각 구입하였다. Total 및 phospho-specific mitogen activated protein kinases (MAPKs) 항체(extracellular signal-regulated kinase 1/2 [ERK 1/2], c-Jun NH2-terminal protein kinase [JNK], p38), inhibitory kappa B alpha(I κ -B α)은 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA), β -actin은 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)사의 제품을 사용하였다. 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT)는 Sigma Aldrich(Saint Louis, Missouri, USA)에서 구입하여 사용하였다.

3. 세포주

본 실험에 사용된 HaCaT 세포는 Addexbio(San Diego, California, USA)로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 각질 형성 세포인 HaCaT 세포주를 10%

FBS과 1% penicillin/streptomycin을 첨가한 RPMI1640 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 세포 배양기에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

4. MTT 분석

세포의 사멸을 측정하기 위하여 MTT 분석을 시행하였다. 피부 각질 형성 세포에 樺皮 에탄올 추출물을 처리한 후 24시간 동안 배양한 뒤 MTT 용액을 첨가하고 다시 30분 동안 배양하였다. 30분 후, 배양액을 제거하고 Formazan 생성물은 DMSO로 용해했다. Formazan의 용해액을 96-well plate에 loading 한 후, spectrophotometer(MD, USA)를 이용하여 540nm에 흡수되는 양을 측정하였다. 세포의 생존율은 어떠한 처리도 가하지 않은 control cell과의 비율로 나타내었다.

5. UVB조사

세포의 자외선 조사는 300~315 nm를 가장 강하게 방출하는 UVB lamp 306 nm(동서과학, 한국)를 사용하였으며, UV광량은 UVA/UVB light meter 850009(Sperscientific, Scottsdale, AZ, USA)로 측정하였다. RPMI 배지를 제거한 다음, Phosphate buffered saline pH 7.4(PBS)로 2번 씻어낸 후 자외선 조사 동안 세포가 건조되지 않도록 PBS 1 mL을 세포 배양 접시에 넣은 후 UVB 200 mJ/cm²로 조사하였다.

6. 형광 유세포 분석(Fluorescence-activated cell sorting, FACS)

세포 내 활성 산소의 생성을 측정하기 위하여 형광 유세포 분석을 진행하였다. HaCaT 세포에 樺皮 추출물을 1시간 전처리한 후 UVB 조사한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포를 수확하기 전에 10 μ M DCF-DA(Sigma, MO, USA)를 처리하여 37°C에서 20분 동안 배양하였다. 배양한 세포는 PBS로 세척하고 1% Trypsin-EDTA(Sigma, MO, USA) 용액을

처리하여 세포를 수확하고 다시 PBS로 세척하여 flow cytometry(FACS Calibur, BD Biosciences)로 형광을 측정하였다. 정보의 분석은 Cell Quest software(Becton Dickinson)을 이용하였다.

7. Total RNA 추출 및 mRNA 발현 측정

염증성 사이토카인 발현을 측정하기 위하여, RNA를 추출하고 mRNA의 발현을 측정하였다. 세포를 획득한 후, trizol 용액을 1 mL 넣어서 세포를 용해한 후 100 μ L의 chloroform 용액을 가하고 잘 섞어준 뒤 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 수집하여, 2-propanol과 1:1로 섞은 뒤 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 위에 상층액은 버리고 남은 침전물에 80% ethanol로 2회 씻고 침전물을 건조했다. 그리고 침전물에 DEPC 처리한 증류수를 15 μ L씩 넣어 RNA를 용해하고 정량하였다. 추출한 RNA는 cDNA Kit를 이용하여 Master mix 11 μ L, RNA 1 μ g을 튜브에 넣고 PCR machine (ABI, San Diego, CA, USA)에서 cDNA로 합성하였다. 그 후에 PCR machine을 이용하여 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)은 2X Taq PCR Pre-Mix kit를 사용해 각각의 튜브에 합성한 cDNA를 1 μ L 넣고 95 $^{\circ}$ C에서 2분 반응시켰다. 그 후에 95 $^{\circ}$ C에서 20초 합성 후, 각각 primer 60 $^{\circ}$ C 40초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 합성하였으며, 이 과정을 40 cycle 반복하였고, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 합성하였다. 사용한 primer는 Applied biosystems (ABI, San Diego, CA, USA)사에서 상용되는 PCR primer를 구입하였다.

8. Western blot 분석

樺皮 에탄올 추출물의 보호 기전을 연구하기 위하여, MAPK와 I κ -B α 를 조사하기 위하여 Western blot을 시행하였다. 세포를 획득하여 RIPA lysis buffer를 넣어 단백질을 lysis 시켜서 원심분리 (15,000 rpm, 20 min) 하여 pellet을 가라앉히고 단

백질을 정량하였다. 같은 양의 단백질을 샘플링 버퍼 (4X)를 같이 넣어 섞은 다음 샘플을 전기영동한 후 membrane에 옮기고 나서 5% skim milk로 2시간 blocking 하였다. 단백질 발현은 ECL detection 용액 (Amersham)으로 확인하였다.

9. 통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 실시하여 그 평균값을 기초로 Mean \pm S.E.M.로 나타내었다. 실험 결과에 대한 통계처리는 Graphpad prism(v7.0)의 one way ANOVA를 사용하였고, Duncan method로 사후검증을 하였다. P-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1.樺皮 에탄올 추출물의 HaCaT 세포에 대한 독성

HaCaT 세포에樺皮 에탄올 추출물을 0.1, 0.5, 1, 2 mg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 세포 생존율을 조사하였다. 그 결과, HaCaT 세포에서 정상군의 생존율이 100% 일 때, 0.1, 0.5, 1 mg/mL 농도에서는 유의성 있는 세포 독성이 나타나지 않았고,樺皮 에탄올 추출물은 농도 2 mg/mL에서 유의성 있는 세포 독성이 나타났다(Fig. 1). 따라서,樺皮 에탄올 추출물의 UVB로 인한 피부 손상 보호 효과를 확인하기 위하여 0.1, 0.5, 1 mg/mL의 농도를 선정하여 모든 분석에 적용하였다.

2. UVB로 인한 HaCaT 세포 사멸에서樺皮 에탄올 추출물의 효과

HaCaT 세포에樺皮 에탄올 추출물을 0.1, 0.5, 1 mg/mL의 농도로 1시간 전처리하고, UVB(200 mJ/cm²)로 24시간 동안 자극 후, 세포 생존율을 관찰하였다. 그 결과, HaCaT 세포에서 정상군의 생존율이 100% 일 때, UVB를 조사한 세포는 유의성 있

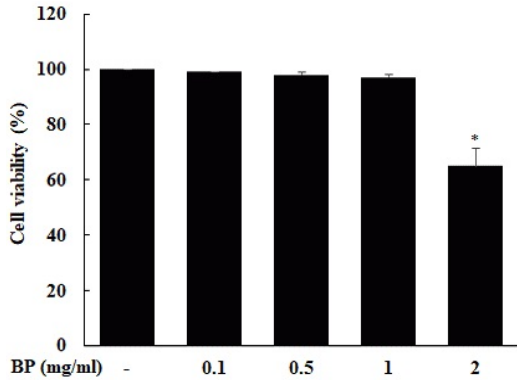


Fig. 1. The cytotoxicity of BP ethanol extract in human keratinocyte, HaCaT cells

The cell viability was measured by MTT assay. HaCaT cells were incubated with or without BP ethanol extract as indicated doses for 24 h. The similar results were obtained from three additional experiments. *p < 0.05 significant as compared to normal.

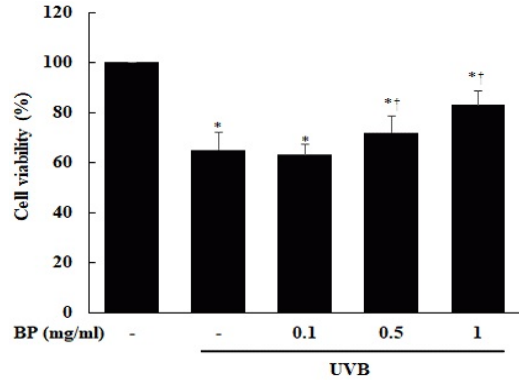


Fig. 2. The effects of BP ethanol extract on UVB-induced cell death in human keratinocyte, HaCaT cells

The cell viability was measured by MTT assay. HaCaT cells were pre-treated with BP ethanol extract for 1 h, and then stimulated with UVB (200 mJ/cm²) for 24 h. The similar results were obtained from three additional experiments. *p < 0.05 significant as compared to normal. +p < 0.05 significant as compared to UVB alone

는 피부 세포 사멸이 나타났다. 그러나樺皮 에탄올 추출물이 처리된 그룹은 농도 의존적으로 세포 사멸이 감소하였다(Fig. 2).

3. HaCaT 세포에서 UVB로 인한 ROS

생성에서樺皮 에탄올 추출물의 효과

HaCaT 세포에樺皮 에탄올 추출물을 0.1, 0.5, 1 mg/mL의 농도로 1시간 전처리하고, UVB(200 mJ/cm²) 조사 24시간 후, ROS 생성을 조사하였다. HaCaT 세포에서 UVB를 처리한 세포는 유의성 있는 ROS 생성이 나타났다. 그러나樺皮 에탄올 추출물 처리에 의하여 UVB로 인한 ROS 생성이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3).

4. HaCaT 세포에서 UVB로 인한 염증성

사이토카인 생성에서樺皮 에탄올 추출물의 효과

HaCaT 세포에樺皮 에탄올 추출물을 0.1, 0.5, 1 mg/mL의 농도로 1시간 전처리하고, UVB(200 mJ/cm²) 조사 24시간 후, 염증성 사이토카인 생성을 조사하였다. HaCaT 세포에서 UVB를 조사한 세포는 유의

성 있는 염증성 사이토카인 생성이 관찰되었다. 그러나樺皮 에탄올 추출물 처리에 의하여 UVB로 인한 염증성 사이토카인 생성이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 4).

5. HaCaT 세포에서 UVB로 인한 피부 수분 조절에서樺皮 에탄올 추출물의 효과

HaCaT 세포에樺皮 에탄올 추출물을 0.1, 0.5, 1 mg/mL의 농도로 1시간 전처리하고, UVB(200 mJ/cm²) 조사 24시간 후, 피부 수분 조절 인자를 조사하였다. HaCaT 세포에서 UVB를 조사한 세포는 유의성 있는 피부 수분 분해 인자인 hyaluronidase 2, 4의 활성을 증가시켰다. 그러나樺皮 에탄올 추출물 처리 때문에 UVB로 인한 hyaluronidase 2, 4의 활성이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 5).

6. HaCaT 세포에서 UVB로 인한 피부 노화 및 주름 관련 인자 발현에서樺皮 에탄올 추출물의 효과

HaCaT 세포에樺皮 에탄올 추출물을 0.1, 0.5, 1

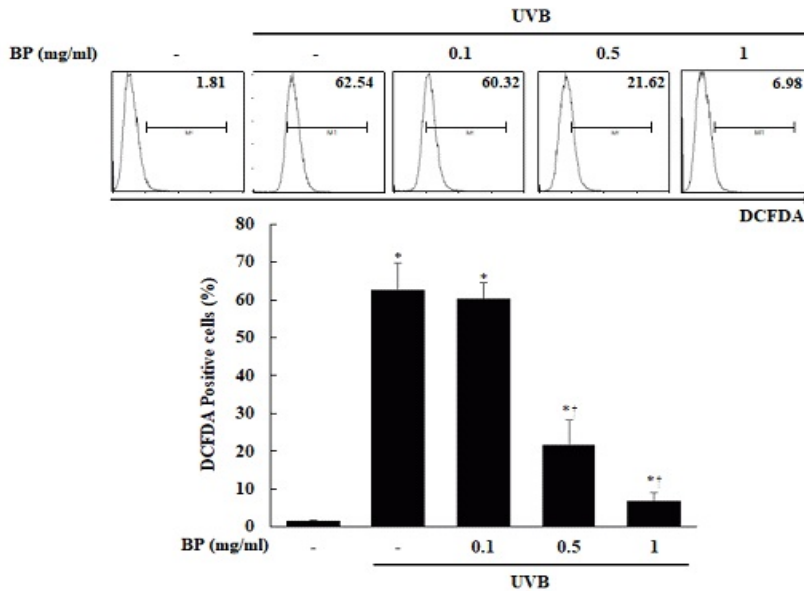


Fig. 3. The effects of BP ethanol extract on UVB-induced ROS production in human keratinocyte, HaCaT cells
The ROS production were measured by relative DCFDA intensity using FACS. HaCaT cells were pre-treated with BP ethanol extract for 1 h, and then stimulated with UVB for 24 h. The similar results were obtained from three additional experiments. * $p < 0.05$ significant as compared to normal. + $p < 0.05$ significant as compared to UVB alone.

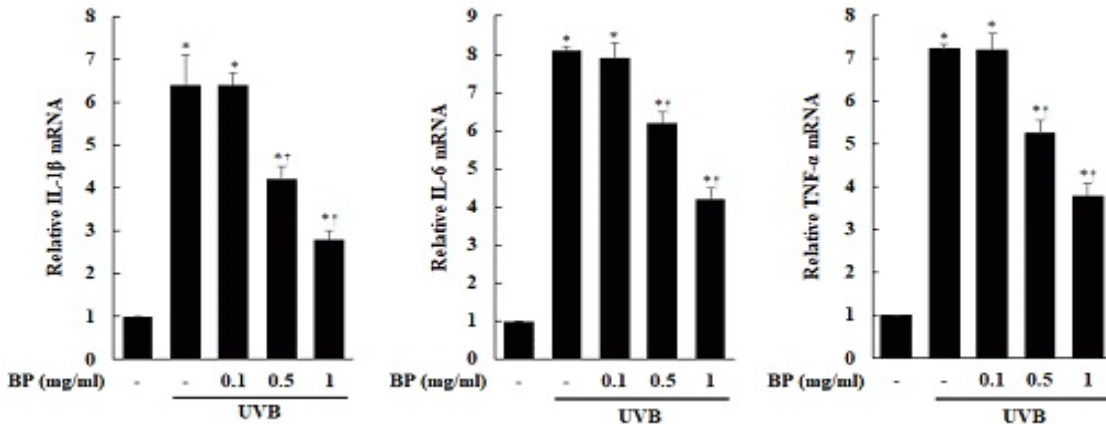


Fig. 4. The effects of BP ethanol extract on UVB-induced elevation of inflammatory cytokines in human keratinocyte, HaCaT cells
The inflammatory cytokines were measured by realtime RT-PCR. HaCaT cells were pre-treated with BP ethanol extract for 1 h, and then stimulated with UVB for 24 h. The similar results were obtained from three additional experiments. * $p < 0.05$ significant as compared to normal. + $p < 0.05$ significant as compared to UVB alone.

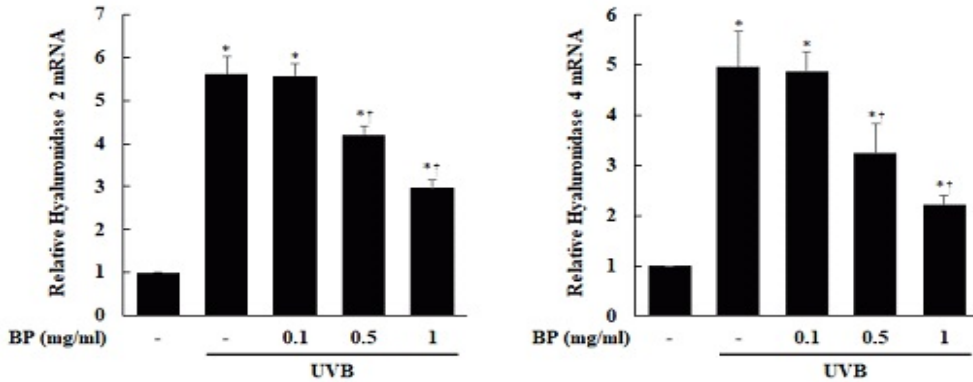


Fig. 5. The effects of BP ethanol extract on UVB-induced hyaluronidase 2 and 4 in human keratinocyte, HaCaT cells. The mRNA expression of hyaluronidase 2 and 4 were measured by realtime RT-PCR. HaCaT cells were pre-treated with BP ethanol extract for 1 h, and then stimulated with UVB for 24 h. The similar results were obtained from three additional experiments. *p < 0.05 significant as compared to normal. +p < 0.05 significant as compared to UVB alone.

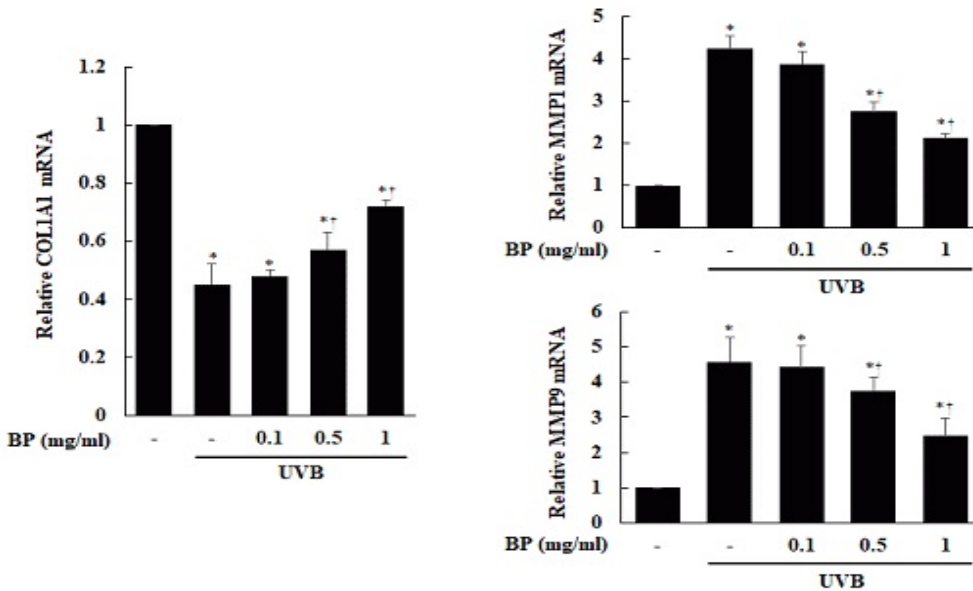


Fig. 6. The effects of BP ethanol extract on UVB-induced collagen and MMP 1, and 9 in human keratinocyte, HaCaT cells. The mRNA expression of MMP1 and 9 were measured by realtime RT-PCR. HaCaT cells were pre-treated with BP ethanol extract for 1 h, and then stimulated with UVB for 24 h. The similar results were obtained from three additional experiments. *p < 0.05 significant as compared to normal. +p < 0.05 significant as compared to UVB alone.

mg/mL의 농도로 1시간 전처리하고, UVB(200 mJ/cm²) 조사 24시간 후, 피부 노화 및 주름 생성과 관련이 있는 collagen과 MMP(matrix metalloproteinase)를 조사하였다. HaCaT 세포에서 UVB를 조사한 세포

는 유의성 있는 collagen 감소 및 MMP의 증가가 관찰되었다. 그러나樺皮 에탄올 추출물 처리에 의하여 UVB으로 인한 collagen 감소 및 MMP의 증가를 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 6).

7. HaCaT 세포에서 UVB로 인한 MAPK 및 NF-κB 활성화에 대한 樺皮 에탄올 추출물의 효과

HaCaT 세포에 樺皮 에탄올 추출물을 1 mg/mL 의 농도로 1시간 전처리하고, UVB(200 mJ/cm²) 조사 30분 후, MAPK와 NF-κB를 조사하였다. NF-κB의 활성화는 Iκ-Bα의 분해를 통하여 측정하였다. HaCaT 세포에서 UVB를 조사한 세포는 유의성 있는 MAPK와 NF-κB의 증가가 관찰되었다. 하지만 樺皮 에탄올 추출물 처리에 의하여 UVB으로 인한 MAPK와 NF-κB의 활성화 증가가 억제되었다(Fig. 7).

고찰

고령화 시대가 도래함에 따라 웰빙, 안티에이징, 웰에이징 등의 키워드가 부각 되면서 스파와 헬스케어 등과 같은 미용산업에 대한 관심이 집중되고 있다. 과중한 업무 스트레스를 벗어나 정신적 육체적인 건강함을 삶의 최우선 가치로 꼽는 “웰빙”문화로 인해 스스로에 대한 관심이 증가하고, 건강한 아름다움을 지향하는 “웰루킹(well-looking)”이 새로운 트렌드의 중심이 되고 있다. 웰빙, 웰루킹을 위해서는 탄력 있고 건강한 피부 유지가 중요하며, 이는 항산화, 항노화 관련 기능성 화장품 연구로 이어지고 있다. 기존의 기능성 원료는 뛰어난 항산화, 주름 개선 효과가 있지만, 합성 화학 성분에 과다노출, 부작용으로 인한 트러블 등이 다소 동반된다. 이에 본 연구에서는 천연 한약 소재를 사용함으로써 부작용을 최소화하면서 광노화로 인한 피부 손상을 호전시킬 수 있는 방안으로 樺皮를 연구하였다.

樺皮는 樺木科(자작나무과; Betulaceae)에 속한 落葉喬木인 만주자작나무 및 자작나무의 樹皮로서, 《本草綱目》에 性은 平, 無毒, 味는 苦하며, 淸熱, 解毒, 利濕, 消腫 등의 효능이 있어, 黃疸, 乳癰, 肺風癩, 癰癤, 梅毒, 皮膚發疹, 急性扁桃, 腺炎, 外傷

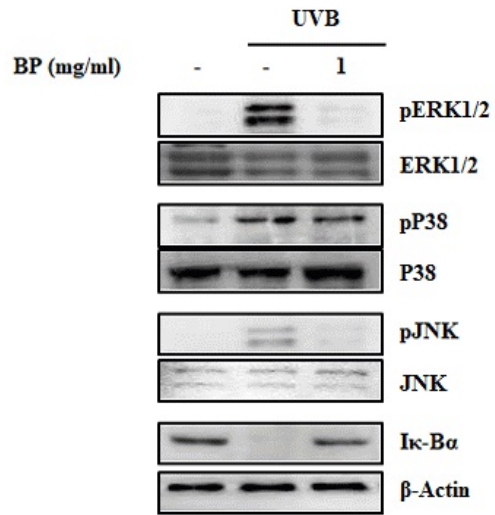


Fig. 7. The Effects of BP ethanol extract on UVB-induced MAPKs activation and the degradation of Iκ-Bα in human keratinocyte, HaCaT cells

The activation of MAPKs and degradation of Iκ-Bα were measured by Western blot. HaCaT cells were pre-treated with BP ethanol extract for 1 h, and then stimulated with UVB for 30 min. The similar results were obtained from three additional experiments.

感染, 濕疹, 痒疹, 癰癤腫毒, 小兒瘡疹 등의 증상을 치료하는 것으로 나타나 주로 염증성 질환이나 피부 질환에 많이 응용되며,¹⁴⁻¹⁶ 실제로 濕熱의 증상이 있는 아토피 피부염을 치료하는 처방에 가미하여 임상에서 많이 사용되고 있다. 그 약리 성분은 특히 항산화 기능 및 elastase 억제 효과가 있어 피부 주름을 완화 시킨다고 보고된 바 있다.¹⁵ 따라서 이러한 樺皮의 濕疹, 痒疹, 癰癤 등에 대한 효과가 피부질환에 유효한 의미가 있을 것으로 판단되어 본 연구에 소재로 이용하였다. 자작나무의 성분으로는 polyphenol 성 화합물로서 catechin 및 epicatechin 등을 함유하며, lupane 계열의 triterpene 계열의 화합물로서 betulin이 함유되어 있다. 특히 樹皮에는 betulin이 약 35 %로, 각종 고급지방산이 약 35% 이상이며, tannin이 약 7%가 함유되어 있다.¹⁷⁻¹⁹ Betulin은 항염증, 항산화 효능을 가진 유명한 성분으로서,²⁰ 이 성분을 다량 함유하고 있다는 것은 추후 항염증 효

과가 있을 것으로 예측이 가능하다. 실제로樺皮의 추출물인 Birch 추출물은 아로나나 화장품 재료로서 다양하게 사용되고 있으나, 실험적으로 피부 손상에서 보호 효과가 있는지 연구는 미비하다. 현재樺皮를 이용하여 항균 작용,²¹⁾ 간 보호 작용,²²⁾ 항산화²³⁾ 및 항암 작용²⁴⁾ 등이 보고된 바 있으나, 자외선으로 인한 피부 손상에서樺皮 에탄올 추출물의 보호 효과는 보고된 바가 없다.樺皮의 우수한 항균성, 항염증 효과에 대한 문헌적 근거가 많기 때문에,樺皮 에탄올 추출물이 UVB로 인한 피부 손상 개선에 효과가 있을 것으로 판단되어 연구를 진행하였다. 피부 최외각에 해당하는 표피의 각질 형성 세포(keratinocytes)는 외부 물질 침입 시, ROS을 생성한다.²⁵⁾ 과도하게 생성된 ROS은 피부의 항산화 방어 체계를 손상시키고, 염증반응 유발, 피부 면역 기능 억제, 세포 성분의 손상을 야기시키고 광노화를 촉진시킨다.²⁶⁾ 따라서 자외선과 같은 외부 반응이 피부 각질 세포에 반응했을 때, ROS 생성을 조절하여 세포의 사멸을 억제하는 것은 피부 손상 및 노화를 억제하는 아주 중요한 방법이다. 본 연구에서는 UVB를 각질 형성 세포에 조사하였을 때, 각질 형성 세포에서 ROS 생성이 유의성 있게 증가하였으며(Fig. 3), 그에 따라 세포 사멸이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 2). 하지만,樺皮 에탄올 추출물은 UVB로 인한 ROS 생성 및 피부세포 사멸을 억제하는 것을 볼 수 있었고, 이는樺皮 에탄올 추출물이 UVB로 인한 피부 손상에 유효한 효과가 있었다(Fig. 2, Fig. 3).

피부 각질 형성 세포는 외부로부터 손상을 막아주는 물리적 장벽의 역할뿐만 아니라, 면역세포와 마찬가지로 interleukin-1(IL-1), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 여러 가지 사이토카인을 생성하여, 피부 면역을 조절하는데, 이것이 잘 이루어지지 않으면 피부 염증 및 노화가 발생한다.²⁷⁾ 노화(aging), 아토피성 피부염, 주름, 노화, 건선 등과 같은 피부 염증 질환에서 TNF- α 와 IL-6가 다량 발현하고, 주요한 역할을 한다고 보고되어 있

다.^{28,29)} 따라서 UVB로 인한 피부 손상 및 염증 반응 연구 시, 각질 형성 세포에서 분비되는 염증성 사이토카인 조절은 중요하다. 본 연구에서는 UVB로 각질 형성 세포를 자극하였을 때, 염증성 사이토카인이 유의성 있게 증가하였고, 이러한 증가는樺皮 에탄올 추출물에 의해 억제되었다. 이는樺皮 에탄올 추출물이 염증성 사이토카인 억제를 통하여 피부 염증 반응 억제에 효과가 있었다(Fig. 4).

피부는 각질층에 존재하는 일정 수준 이상의 수분이 유지되어야 탄력 있고 건강한 상태가 유지된다.³⁰⁾ Hyaluronan(HA)은 피부 기질의 주요 구성 성분으로서, 수분을 보유할 수 있고,³¹⁾ hyaluronidase에 의하여 분해된다.³²⁾ 일반적으로 외부자극이나 노화에 의하여 수분 손실이 일어나면 hyaluronidase 증가에 의해 HA가 감소하게 되고, 결국 피부 탄력 감소 및 건조증상이 발생하게 된다.³²⁾ 기존의 보고와 마찬가지로 본 연구에서도 UVB로 각질 형성 세포에 피부 자극을 주었을 때 hyaluronidase-2와 hyaluronidase-4의 생성이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 이는 UVB로 인하여 hyaluronidase가 증가하여 HA를 감소시키고, 그에 따라 피부 수분 손실이 발생하고 있음을 추측할 수 있다(Fig. 5). 하지만樺皮 에탄올 추출물을 전처리한 후 hyaluronidase-2와 hyaluronidase-4의 생성이 억제되었고, 이는樺皮 에탄올 추출물이 수분 보유 단백질은 HA의 분해를 유도하는 hyaluronidase의 생성 억제를 통하여 피부 수분 손실 억제에 효과가 있었다(Fig. 5).

자외선의 과도한 노출로 인하여 주름과 같은 피부 노화 현상이 일어날 때, MMP의 증가와 콜라겐의 감소가 주요하게 영향을 미친다고 보고되어 있다.³³⁾ 피부세포의 MMP는 피부 세포의 기질인 콜라겐을 직접 분해할 수 있기 때문에 MMP의 조절은 주름 조절에 있어서 중요하다고 볼 수 있다.³⁴⁾ 본 연구에서도 마찬가지로, UVB로 각질 형성 세포를 자극하였을 때, MMP-2, 9가 증가하고, 콜라겐이 감소하였다(Fig. 6), 하지만樺皮 에탄올 추출물은 콜라겐 감

소 및 MMP의 증가를 농도 의존적으로 개선하였고, 이는 樺皮 에탄올 추출물이 콜라겐 증가 및 MMP 감소를 통하여 피부 주름 형성 및 노화 반응 억제에 효과가 있었다(Fig. 6).

피부 손상 혹은 노화 반응이 진행되면 ROS 및 염증성 사이토카인들의 생성이 증가하게 되는데, 그 upstream으로서 MAPKs(ERK, JNK, p38)와 NF-κB가 활성화가 알려져 있다.³⁵⁾ MAPKs의 인산화(phosphorylation) 및 Ik-Bα가 분해(degradation)는 이 기전의 활성을 유도하고, 그에 따라 각종 산화적 스트레스 및 염증반응이 일어나게 된다.^{36,37)} 기존 보고에서도 MAPKs와 NF-κB는 피부 염증 및 손상에서 주요 기전으로 인식되었고, MAPKs와 NF-κB 억제는 피부 손상 및 염증 억제 조절에 사용 되었다.^{38,39)} 본 연구에서도 UVB로 인하여 MAPKs의 인산화 및 Ik-Bα의 분해가 증가하였고, 이러한 MAPKs와 NF-κB의 활성화는 樺皮 에탄올 추출물 처리로 억제되었다(Fig. 7). 이는 樺皮 에탄올 추출물이 MAPKs와 NF-κB 억제를 통하여 UVB로 인한 피부 손상을 억제하였다.

결론적으로, 樺皮 에탄올 추출물은 피부세포 사멸, ROS 생성, 염증성 사이토카인 생성, hyaluronidase 및 MMP의 생성을 억제하였고, 이는 MAPKs와 NF-κB의 활성 억제를 통해서 일어나는 것으로 보인다. 樺皮는 한의학적으로 利濕, 消腫 등 인체의 물을 조절하는 효능이 있다.^{14,16)} 水液조절은 인체 신진대사를 주관하며, 피부 영양공급에 있어서 주요한 역할을 한다. 樺皮의 利濕, 消腫 효능은 인체의 水液조절을 통해 피부의 상태를 조절할 수 있음을 한의학적으로 유추할 수 있고, 이를 실험적으로 본 연구에서 증명하였다고 생각된다. 향후 樺皮 관련 제품은 UVB 관련 다양한 피부 염증 질환에 응용하여 화장품 및 피부 질환 치료제 개발에 응용될 수 있다고 사료 된다.

결론

피부 각질 형성 세포 HaCaT 세포에 UVB로 피부 손상 반응을 일으켰을 때, 樺皮 에탄올 추출물의 피부 보호 효과와 기전을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 樺皮 에탄올 추출물은 HaCaT 세포에서 UVB로 인한 세포 사멸을 유의성 있게 억제하였다.
2. 樺皮 에탄올 추출물은 HaCaT 세포에서 UVB로 인한 ROS 생성을 유의성 있게 억제하였다.
3. 樺皮 에탄올 추출물은 HaCaT 세포에서 UVB로 인한 염증성 사이토카인의 생성을 유의성 있게 억제하였다.
4. 樺皮 에탄올 추출물은 HaCaT 세포에서 UVB로 인한 Hyaluronidase의 생성을 유의성 있게 억제하였다.
5. 樺皮 에탄올 추출물은 HaCaT 세포에서 UVB로 인한 collagen 감소 및 MMP의 생성을 유의성 있게 억제하였다.
6. 樺皮 에탄올 추출물은 HaCaT 세포에서 MAPK 및 NF-κB의 활성을 유의성 있게 억제하였다.

이상의 결과는 樺皮 에탄올 추출물이 HaCaT 세포에서 MAPK 및 NF-κB의 활성 억제를 통하여 피부 손상을 억제하였음을 보여준다.

참고문헌

1. Choi EY, Sohn HY, Lee JT. (2019). The Antioxidant and Anti-aging Effects of Treatment with Schisandra chinensis Seed Fractions in UVB-irradiated Human HaCaT cells. J Life Sci; 29(10) : 1071-9. <https://doi.org/10.5352/JLS.2019.29.10.1071>
2. Alexandra AO, Betty Y, John AD. (2014).

- Ultraviolet radiation, aging and skin: prevention of damage by tropical cAMP manipulation. *Molecules*; 19 : 6202-19. <https://doi.org/10.3390/molecules19056202>
3. Edwin DL. (2016). Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Res Rev*; 31 : 36-54. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.001>
 4. Masamitsu I, Hideya A, Masaki Y, Toko N, Mary M. (2009). Photoaging of the skin. *J Anti Aging Med*; 6 : 46-59. <https://doi.org/10.3793/jaam.6.46>
 5. Martin GM, Austad SN, Johson TE. (1996). Genetic analysis of aging: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nat Genet* ; 13(1) : 25-34. <https://doi.org/10.1038/ng0596-25>
 6. Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. (2016). Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci* ; 17 : 868-88. <https://doi.org/10.3390/ijms17060868>
 7. Kim SM, Chung JH. (2008). Berberine prevents UV-induced MMP-1 and reduction of type I procollagen expression in human dermal fibroblasts. *Phytomedicine* ; 15(9) : 749-53. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.11.004>
 8. Chae YM. (1996). *Jungyakyakmyeongsajun*. Beijing: Chinese Medicine Publisher.: 44.
 9. Sin MG, Jeong BY. (2003). *Dohae Hyangyakdaesajeon*. Seoul: Yeongrimsa.: 803-4.
 10. Sin MG. (2002). *Clinical Traditional Herbalogy*. Seoul: Yeongrimsa.: 399-400,844.
 11. Kim YJ, Lee JD, Lee YH. (2007). The Effects of *Betula Platyphylla* on Cartilage Protection, Anti-inflammatory and Analgesic Activity in Arthritis. *The Journal of Korean Acupunct & Moxibustion Society*. 2007 ; 24(2) : 73-81.
 12. Kim WI, Kim JE, Lee SH, Moon YS, Lee SH, Park SY, Na CS. (2013). Antioxidative and Antimicrobial Activities of Water- and Ethanol-Extracts from *Betula platyphylla* var. *japonica*, *Punica granatum* and *Rhus javanica*. *Kor J Herbology* ; 28(3) : 45-51 <https://doi.org/10.6116/kjh.2013.28.3.45>
 13. Lee CH, Cho YM, Park ES, Shin CS, Lee JY, Jeong HS. (2009). In vivo Immune Activity of Sap of the White Birch(*Betula platyphylla* var. *japonica*). *Kor J Food Sci Technol* ; 41(4) : 413-6.
 14. Park SY, Na CS, Jeong WC, Lee JC. (2012). A Literature Study of Pericarpium Granati and Cortex Betulae Platyphyllae. *The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*. ; 25(3) : 13-33. <https://doi.org/10.6114/jkood.2012.25.3.013>
 15. Herbal Pharmacology Textbook Compilation Committee. (1992). *Herbal Pharmacology*. Seoul: Shinil Publisher. : 469-71.
 16. The National College of Oriental Medicine Herbology Classroom. (2008). *Herbology*. Seoul: Youngrimsa.: 190-1,728.
 17. An JB. (2002). *Dictionary of oriental medicine*. Mock Yang.
 18. Huh JE, Hopng JM, Baek HY, Lee JD, Choi DY, Park SS. (2011). Anti-inflammatory and anti-nociceptive effect of *Betula platyphylla* var. *japonica* in human interleukin-1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in experimental animal models. *J Ethnopharmacol* ; 135(1) : 126-34. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.03.005>
 19. Ryu MH, Park EK, Kim YH, Lee YA, Lee SH, Hong SJ, Baek YH, Park DS, Han JS, Yoo

- MC, Yang HI, Kim KS. (2006). Anti-inflammatory effects of an ethanolic extract from *Betula Platyphylla*. *J Korean Oriental Med.* ; 27(1) : 184-95.
20. Schwiebs A, Radeke HH. (2018). Immunopharmacological Activity of Betulin in Inflammation-associated Carcinogenesis. *Anticancer Agents Med Chem.* ; 18(5) : 645-51. <http://dx.doi.org/10.2174/1871520617666171012124820>
21. Lim JP. (2011). Antibacterial activity against *S. mutans* or *P. gingivalis* and anti-inflammatory effect of betulae cortex. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* ; 25(4) : 635-40,
22. Matsuda H, Ishikado A, Nishida N, Ninomiya K, Fujiwara H, Kobayashi Y, Yoshikawa M. (1998). Hepatoprotective, superoxide scavenging, and antioxidative activities of aromatic constituents from the bark of *Betula Platyphylla* var. *Japonica*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry letters.* ; 8 : 2939-44. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(98\)00528-9](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(98)00528-9)
23. Joo SY. (2013). Antioxidant activities of medicinal plant extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* ; 42(4) : 512-9. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2013.42.4.512>
24. Ju EM, Lee SE, Hwang HJ, Kim JH. (2004). Antioxidant and anticancer activity of extract from *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Life Sciences.*; 74 : 1013-26. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.07.025>
25. Halliday GM. (2005). Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. *Mutation Research.* 2005 ; 571(1-2) : 107-20. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.09.013>
26. Trouba, K. J., Hamadeh, H. K., Amin, R. P. and Germolec, D. R. (2002). Oxidative stress and its role in skin disease. *Antioxid. Redox. Signal.*; 4 : 665-73. <https://doi.org/10.1089/15230860260220175>
27. Ansel J, Luger TA, Lowry D. (1988). The expression and modulation of IL-1 alpha in murine keratinocytes. *J Immunol.* ; 140 : 2274-8.
28. Diniyah N, Alam MB, Choi HJ, Lee SH. (2020). Lablab Purpureus Protects HaCaT Cells from Oxidative Stress-Induced Cell Death through Nrf2-Mediated Heme Oxygenase-1 Expression via the Activation of p38 and ERK1/2. *Int J Mol Sci.* ; 21(22) : 8583. <https://doi.org/10.3390/ijms21228583>
29. Gates T. (2007). Atopic dermatitis : diagnosis, treatment, and aeromedical implications. *Aviat Space Environ Med.* ; 78 : 29-37.
30. Verdier-Sévrain S, Bonté F. (2007). Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol.* ; 6(2) : 75-82. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2007.00300.x>
31. Myung DB, Han HS, Shin JS, Park JY, Hwang HJ, Kim HJ, Ahn HS, Lee SH, Lee KT. (2019). Hydrangenol Isolated from the Leaves of *Hydrangea serrata* Attenuates Wrinkle Formation and Repairs Skin Moisture in UVB-Irradiated Hairless Mice. *Nutrients.* ; 11(10) : 2354. <https://doi.org/10.3390/nu11102354>
32. Kang SJ, Choi BR, Kim SH, Yi HY, Park HR, Park SJ, Song CH, Park JH, Lee YJ, Kwang S. (2015). Inhibitory effects of pomegranate concentrated solution on the activities of hyaluronidase, tyrosinase, and metalloproteinase. *J Cosmet Sci.* ; 66(3) : 145-59.

33. Scharffetter K, Wlaschek M, Hogg A, Bolsen K, Schothorst A, Goerz G, Krieg T, Plewig G. (1991). UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch. Dermatol. Res.* ; 283(8) : 506. <https://doi.org/10.1007/bf00371923>
34. Brenneisen P, Wenk J, Klotz LO, Wlaschek M, Briviba K, Krieg T, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. (1998). 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* ; 273(9) : 5279-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.9.5279>
35. Zhang M, Zhou J, Wang L, Li B, Guo J, Guan X, Han Q, Zhang H. (2014). Caffeic acid reduces cutaneous tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-6 and IL-1 levels and ameliorates skin edema in acute and chronic model of cutaneous inflammation in mice. *Biol. Pharm. Bull.* ; 37 : 347-54. <https://doi.org/10.1248/bpb.113-00459>
36. Celec P. (2004). Nuclear factor kappa b-molecular biomedicine: the next generation. *Biomed. Pharmacother.*; 58 : 365-71.
37. Qi T, Huan Y, Enmie L, Hya W. (2017). P38/ERK MAPK signaling pathways are involved in the regulation of filaggrin and involucrin by IL-17. *Mol. Med. Rep.* ; 16(6) : 8863-7. <https://doi.org/10.3892%2Fmmr.2017.7689>
38. Choi HJ, Alam MB, Baek ME, Kwon YG, Lim JY, Lee SH. (2020). Protection against UVB-Induced Photoaging by *Nypa fruticans* via Inhibition of MAPK/AP-1/MMP-1 Signaling. *Oxid Med Cell Longev.* 2020, 2905362. <https://doi.org/10.1155/2020/2905362>
39. Liu A, Zhao W, Zhang B, Tu Y, Wang Q, Li J. (2020). Cimifugin ameliorates imiquimod-induced psoriasis by inhibiting oxidative stress and inflammation via NF- κ B/MAPK pathway. *Biosci Rep.*; 40(6) : BSR20200471. <https://doi.org/10.1042%2FBRSR20200471>

ORCID

- 최학순 <http://orcid.org/0009-0000-8035-5677>
 김현주 <http://orcid.org/0009-0008-5567-0921>
 이학송 <http://orcid.org/0009-0004-1331-8752>
 백승원 <http://orcid.org/0009-0006-3465-811X>
 김지은 <http://orcid.org/0009-0008-3139-992X>
 송용선 <http://orcid.org/0000-0002-6318-0585>