H₂O₂로 산화적 스트레스가 유도된 각질 형성 세포에서 흑삼 추출물의 항노화 효과

안소희¹ · 이계원² · 권득상³ · 신현중⁴ · 조영호^{1,2}

¹건양대학교 의료공학과, ²건양대학교 제약생명공학과
³(주)한국흑삼공사, ⁴천지현황(주)

Anti-Aging Effects of Black Ginseng Extract via H₂O₂-Induced Oxidative Stress Regulation in Human Keratinocytes

So Hee Ahn¹, Gye Won Lee², Deuk Sang Kwon³, Hyun Joong Shin⁴, and Young Ho Cho^{1,2}

¹Department of Medical Engineering & Science, Konyang University

²Department of Pharmaceutics and Biotechnology, Konyang University

³Korea Black Ginseng Co., Ltd.

⁴Cheonjihyunhwang Co., Ltd.

ABSTRACT In this study, black ginseng extract steamed six times at 95°C (BGE-A6) was evaluated for its antioxidant, anti-wrinkle, and skin moisturizing effects in human keratinocytes. When steamed six times at 95°C, the content of total ginsenosides including minor ginsenosides (Rg3, Rh4, Rk1, and Rg5) was the highest at 14.97 mg/g. The antioxidant properties of BGE-A6 were measured by using different *in vitro* antioxidant assays such as 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, ABTS), and superoxide anion radical scavenging activity. The antioxidant activity of BGE-A6 was increased in a dose-dependent manner. A 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay and a western blot assay were performed to verify the reactive oxygen species (ROS) scavenging activity of BGE-A6 in H₂O₂-induced human keratinocytes. Pretreatment with 100 µg/mL of BGE-A6 inhibited intracellular ROS production by about 40%. Also, the expression of heme oxygenase-1 (HO-1), catalase (CAT), and superoxide dismutase-1 (SOD-1), very well-known as antioxidant enzymes, was increased by BGE-A6 in a dose-dependent manner. BGE-A6 was shown to significantly inhibit the expression of matrix metalloproteinase-1 and increase the production of type I collagen, thus confirming its anti-wrinkle activity ($P < 0.05$). Furthermore, BGE-A6 significantly increased the phosphorylation of the epidermal growth factor receptors (EGFR) and the expression of moisturizing proteins, such as hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) and aquaporin 3 (AQP3), indicating that it is effective in enhancing skin hydration. The results of this study suggest that BGE-A6 has potential for use as an effective compound in anti-aging cosmetics to address wrinkle formation and skin hydration.

Key words: black ginseng, steaming, anti-aging effect, heme oxygenase, superoxide dismutase-1

서 론

인체는 자외선, 환경오염 물질과 같은 여러 외부자극과 정상적인 대사 작용 등에 의해 지속적으로 반응성 산소 라디칼에 노출되어 있고, 이러한 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 일반적으로 세포 수준에서 존재하는 효소

및 비효소적 방어시스템에 의해 제거된다(Lee, 2015). 피부는 인체의 물리적·생화학적 방어기능을 수행하는 주요 조직으로 바깥쪽으로부터 크게 표피, 진피, 피하 조직으로 구성되어 상호·기능적 특징을 가진다. 그중 각질 형성 세포는 표피의 95% 이상을 차지하는 세포로 세포외기질(extracellular matrix, ECM)을 구성하고 외부환경으로부터 신체를 보호

Received 20 July 2021; Revised 31 August 2021; Accepted 1 September 2021

Corresponding author: Young Ho Cho, Department of Medical Engineering & Science, Konyang University, 158, Gwanjeodong-ro, Seo-gu, Daejeon 35365, Korea, E-mail: micael@konyang.ac.kr

Author information: So Hee Ahn (Graduate student), Gye Won Lee (Professor), Young Ho Cho (Professor)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

하거나 보습, 체온조절 등의 중요한 역할을 한다(Seo와 Choi, 2013). 그러나 물리적 자극이나 화학물질에 노출되어 활성산소가 지나치게 많이 생성된 경우에는 방어시스템을 무너뜨리고 단백질, DNA와 같은 세포 성분이 손상되어 중요한 기능이 변질되거나 특이적인 신호전달과정에 영향을 준다(Nam과 Kim, 2004). 이는 피부건조, 민감도 증가, 색소 침착뿐만 아니라 궁극적으로 노화를 촉진시키고 광과민성 질환이나 악성종양과 같은 여러 피부질환을 유발한다(Trouba 등, 2002). 이러한 활성산소에 의한 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하고 노화를 지연시키기 위해 체내 항산화 방어 시스템을 유지하는 것이 중요하다.

인삼(*Panax ginseng*)은 약리적 효능이 지속적으로 규명됨에 따라 우리나라의 대표적인 약용 식물자원으로 인정받고 있을 뿐만 아니라 해외에서의 수요도 증가하고 있다(Jang 등, 2016; Ministry of Agriculture Food and Rur Affairs Horticulture Industry Division, 2020). 인삼은 높은 수분함량으로 인해 저장성이 매우 취약하여 백삼(白蔘)으로 가공하여 유통되어 왔지만 백삼의 저장성도 일반적으로 1년, 진공상태에서 3년 정도밖에 되지 않는다(Kwak, 2019). 특히, 장마철 등 습도가 높은 경우, 백삼이 대기 중의 습기를 흡습하게 되면 백삼 표면의 수분 활성도는 수삼보다 높아 곰팡이나 부패균의 생장을 촉진할 수 있어 장기간 저장과 유통을 위한 방법이 고려되었다(Jeon 등, 2008). 증숙(steaming)은 높은 온도에서 발생한 증기열을 이용하여 건조 약재 등을 찌는 공정으로 증숙된 약재는 물리화학적 변화가 발생하여 조직이 재구성되고 각종 효소들이 불활성화 되어 보다 안정적인 상태가 된다(Nam, 2005). 또한, 페놀성 화합물의 함량이 증가되고 고분자 형태의 유효성분이 저분자화 되는 등의 특성을 나타낸다(Lee 등, 2018). 홍삼(red ginseng)은 백삼을 1~2회 증숙하여 생산한 가공삼으로 주요성분인 ginsenoside가 열에 의해 선택적으로 가수분해되어 prosapogenin 형태인 Rg2, Rg3, Rg5, Rh1, Rh2 등이 생성된다. 이러한 prosapogenin계 ginsenoside의 항암, 항혈전, 항산화 작용 등과 같은 생리활성 효과가 규명됨에 따라 홍삼은 수요가 급증하여 우리나라의 가장 대표적인 건강기능식품으로 평가되고 있다(Oh 등, 2016; Jo 등, 2011). 또한, 홍삼보다 더 많은 횟수의 증숙 과정을 거쳐 가공한 흑삼(black ginseng)이 시장에 출시되고 있다. 흑삼은 전통적인 방법인 구증구포 공정을 통해 최종적으로 짙은 검은색을 나타내기 때문에 흑삼이라고 명명되었다(Nam 등, 2012). 흑삼은 홍삼보다 더 많은 Rg3를 함유하고 그 외에도 Rk1, Rh4 등을 함유하고 있어 더 우수한 생리활성 효과를 가진다고 평가된다(Park, 2019). 이외에도 흑삼은 항산화 및 항암, 항비만 등의 효과를 가지는 것으로 알려져 있다(Choi 등, 2006; Park 등, 2015). 최근에는 기존의 구증구포 공정의 제조시간 및 가공조건을 변경하여 수율 및 품질이 개선된 흑삼에 대한 연구가 지속되고 있으나 산화적 스트레스 조절을 통한 피부 각질 형성 세포에서의 항노화 기전 연구는 미

비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 희귀 ginsenoside인 prosapogenin계 ginsenoside의 함량이 최적화되는 증숙 공정을 통해 제조된 흑삼을 이용하여 피부 각질 형성 세포에서 산화적 스트레스에 대한 보호 효과와 피부보습 및 주름개선 효과를 검증함으로써 피부 노화 억제 소재로서의 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

시약

Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)은 Welgene (Daegu, Korea)에서 구입하였으며, fetal bovine serum (FBS)과 penicillin-streptomycin은 Gibco BRL(Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. Tannic acid, Folin-Ciocalteu's reagent, L-ascorbic acid, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), 2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS), quercetin, nitro blue tetrazolium(NBT), xanthine oxidase from bovine milk, potassium ferricyanide, trichloroacetic acid, iron(II) chloride, hydrogen peroxide(H₂O₂), dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 그 외에 실험에 사용된 모든 시약은 일급 및 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

흑삼의 제조

충청남도 금산군 금산읍에서 재배된 5년근 수삼을 깨끗이 세척하여 약 5% 정도 건조하고 95°C에서 약 2시간 30분 동안 증숙(1차 증숙)을 진행한 다음, 열풍건조기를 사용하여 50°C에서 24시간 동안 건조(1차 건조)하였다. 1차 증숙 및 건조 과정 후 2차부터 9차 증숙까지는 95°C에서 2시간 증숙한 다음 매 증숙마다 햇볕에서 8시간 건조를 진행하였다. 마지막 증숙 이후에는 수분함량이 13% 정도가 되도록 건조한 뒤, 공기가 순환되는 20~25°C 저장고에 6개월 이상 숙성하여 흑삼을 제조하였다. 증숙을 하지 않고 건조만 진행한 백삼을 WG(white ginseng), 1, 3, 6, 9차 증숙한 흑삼을 각각 BG-A1, BG-A3, BG-A6, BG-A9으로 명명하였다.

증숙 횟수에 따른 ginsenoside 함량 변화

제조된 흑삼의 ginsenoside 함량 변화를 측정하기 위한 분석조건은 다음과 같다. 표준원액은 ginsenoside Rg3(S, R), Rg1, Rb1, Rh4, Rk1, Rg5(Biopurify phytochemical Ltd., Chengdu, China) 표준물질 10.2 mg을 정밀하게 달아 70%(v/v) 메탄올 용액 10 mL에 정용하였다(1 mg/mL). 이를 70% 메탄올로 1.43, 7.14, 35.71, 71.42, 142.86 ppm의 농도로 희석하여 표준용액을 제조하였다. 시험용액은 시료 약 2 g을 정밀하게 달아 70%(v/v) 메탄올 용액 25 mL에

넣은 다음 분액 여두용 진탕기(RS-1, Jeiotech Co., Ltd., Daejeon, Korea)에서 15분간 200 rpm으로 진탕하였다. 이를 4°C에서 1,600×g로 10분간 원심분리한 후 상등액을 0.2 µm 멤브레인 필터로 여과한 여액을 적절히 희석하여 HPLC 분석에 사용하였다. Ginsenoside 분석을 위해 1260 infinity LC system(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였으며, 분석 컬럼으로 Accucore C18 (2.6 µm, 3.0×50 mm; 17126-053030, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하였다. 이때 이동상으로서 A 용매는 water, B 용매는 acetonitrile(HPLC grade)을 사용하였고 건강기능식품 시험법을 일부 변형하여 acetonitrile의 농도를 10%에서 80%로 순차적으로 증가시키고 마지막에 다시 10% acetonitrile 순으로 조절하였다. 전개 온도는 30°C, 유속은 0.8 mL/min이며, 검출기는 1260 infinity Diode Array Detector(Agilent Technologies)를 사용하여 203 nm의 파장에서 분석하였다. Ginsenoside 함량은 다음과 같은 식으로 구하였다.

$$\text{Ginsenoside 함량(mg/g)} = C \times \frac{a}{S} \times b \times \frac{100}{1,000}$$

C: 시험용액 중 개별 ginsenoside 농도(µg/mL)

a: 시험용액의 전량(mL)

S: 시료 채취량(g)

b: 희석배수

1/1,000: 단위 환산 계수

흑삼 추출물 제조

제조된 흑삼에 10배의 증류수를 첨가하여 85~90°C에서 24시간 추출을 3회 반복하였다. 추출액은 60°C에서 진공 농축하여 64°Brix로 맞춰 흑삼 추출물을 제조하여 사용하였다. 흑삼 추출물은 4°C에서 냉장 보관하여 후속 실험에 사용하였다.

총 폴리페놀 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin과 Dennis(1915)의 방법으로 측정하였으며, Folin-Ciocalteu's reagent가 폴리 페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색하는 원리를 이용하였다(Kim 등, 2013). 희석한 흑삼 추출물에 80% 에탄올과 증류수를 첨가하고 1 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 넣어 8분간 방치한 다음, 10% sodium carbonate를 가하여 40분간 반응시켜 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 폴리페놀 함량은 tannic acid의 표준곡선을 이용하여 구하였다.

자유라디칼 소거 활성

DPPH 라디칼 소거 활성 측정은 항산화 활성을 평가하기 위하여 널리 사용되는 평가법으로 본 실험에서는 Blois (1958)의 방법으로 측정하였다. 농도별로 희석한 흑삼 추출물에 DPPH 용액을 대조군에는 메탄올을 첨가하여 20분간

반응시킨 다음 560 nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거 활성을 구하였다.

ABTS 라디칼 소거 활성 측정은 지용성 및 수용성 성질의 항산화 물질 모두 사용 가능한 항산화 활성 측정 방법으로 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 청록색의 ABTS 라디칼이 항산화 물질에 의해 탈색되는 원리를 이용하는 Re 등(1999)의 방법을 변형하여 측정하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 암소에서 12~24시간 동안 반응시켜 ABTS⁺ stock solution을 제조하였고 흡광도가 0.7~0.8이 되도록 증류수로 희석하여 사용하였다. 농도별로 희석한 흑삼 추출물에 희석한 ABTS 라디칼 용액을 대조군에는 증류수를 첨가하여 암소에서 10분간 반응시킨 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하여 ABTS 라디칼 소거 활성을 구하였다.

Superoxide anion 라디칼 소거 활성은 nitro blue tetrazolium(NBT) 환원법으로 측정하였다(Nishikimi, 1975). 3 mM xanthine sodium salt와 0.6 mM NBT 용액, 15 mM Na₂-EDTA 용액, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 혼합하고, 농도별로 희석한 흑삼 추출물과 50 mM xanthine oxidase(0.1 units/mL)를 첨가하여 5분간 차광한 다음 37°C에서 15분간 반응시켜 이를 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

환원력 활성

환원력(reducing power) 활성은 ferric ferricyanide (Fe³⁺)가 ferrous(Fe²⁺) 형태로 환원될 때 푸른색을 띠는 원리를 이용하는 Oyaizu(1986) 방법에 따라 측정하였다. 농도별로 희석한 흑삼 추출물에 200 mM sodium phosphate buffer(pH6.6)와 1% potassium ferricyanide를 차례로 가하여 50°C에서 20분간 반응하였다. 반응액에 10% trichloroacetic acid를 가하여 반응을 멈춘 후 원심분리하여 얻은 상등액을 96 well plate에 넣고 실험군에는 1% iron (II) chloride, 대조군에는 증류수를 가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포배양

실험에 사용된 각질 형성 세포(HaCaT)는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)에 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% penicillin-streptomycin(P/S)을 첨가하여 5% CO₂가 공급되는 배양기(MCO-170AIC, Panasonic, Osaka, Japan)에서 37°C로 배양하였다.

세포 생존율

흑삼 추출물의 세포에 대한 독성을 측정하기 위하여 Mosmann(1983)의 방법에 따라 MTT assay를 진행하였다. 세포를 96-well plate에 최종 농도 1×10⁴ cells/mL가 되도록 분주하여 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 CO₂ incubator에서 배양하였다. 그 후, MTT 용액(5 mg/mL)을

처리하여 반응시킨 뒤 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 생성된 formazan을 용해시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 표시하였다.

세포 내 ROS 소거 활성

흑삼 추출물의 세포 내 ROS 소거 활성을 측정하기 위하여 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(H_2DCFDA)가 세포 내에서 활성산소와 반응하여 녹색의 형광물질인 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)로 변화되는 원리인 DCF-DA assay를 이용하였다(Lee, 2014). 12-well plate에 세포를 1×10^5 cells/mL의 농도로 분주하여 배양 후 시료를 1시간 전처리한 뒤 0.5 mM H_2O_2 를 처리하여 추가 배양하였다. 그 후 20 μM 의 DCF-DA를 처리하여 30분간 반응시킨 뒤 PBS로 3회 세척한 세포를 형광현미경(U-HGLGPS, OLYMPUS, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였고 이때 형광세기는 iSolution autoplus 프로그램을 이용하여 정량하였다.

Western blot을 이용한 항산화, 주름개선 및 보습 관련 단백질 발현량 측정

흑삼 추출물의 항산화 효과를 측정하기 위하여 항산화, 주름개선 및 보습 관련 단백질의 발현량을 western blot으로 확인하였다. 6-well plate에 세포를 2×10^5 cells/mL 농도로 분주하여 배양한 후 시료를 농도별로 1시간 전처리한 다음 500 μM H_2O_2 를 처리하여 재배양하였다. 세포 내 단백질을 protease inhibitor mixture가 첨가된 passive lysis buffer로 추출한 후, 세포 용해물의 단백질 농도는 BCA protein assay kit(Thermo scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 측정하였다. 단백질은 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 통해 분리한 후, nitrocellulose membrane에 분리된 단백질을 blotting 하였다. 그 후 membrane을 5% skim milk로 1시간 동안 blocking하고 TBST로 3회 세척한 다음 4°C에서 1차 항체와 12시간 동안 반응시키고 HRP 컨쥬게이션된 2차 항체와 1시간 동안 실온에서 반응하였다. 단백질 발현은 enhanced chemiluminescence(ECL) detection system(AI680, GE healthcare, Uppsala, Sweden)을 이용하여 분석하였다.

ELISA를 이용한 collagen 및 MMP-1 발현량 측정

흑삼 추출물의 주름개선 효과를 측정하기 위하여 collagen 및 MMP-1 생성량을 ELISA kit을 이용하여 확인하였다. 6-well plate에 세포를 2×10^5 cells/mL의 농도로 분주하여 배양한 후 시료를 농도별로 1시간 전처리한 다음 0.5 mM H_2O_2 를 처리하여 재배양하였다. 그 후 세포배양 배지를 채취하여 MMP-1 및 제1형 pro-collagen 생성물을 MMP-1 ELISA kit(Abcam, Cambridge, UK) 및 Type 1 pro-collagen kit(Abcam)을 각각 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 표기하였으며, 각 군간의 통계적 유의성 검증은 SPSS 18.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용한 Student's t-test로 하였으며, P 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

증숙 횟수에 따른 흑삼의 ginsenoside 함량 변화

증숙 공정에서 ginsenoside는 3번과 6번 탄소에서 가수분해와 이성화 반응, 그리고 20번 탄소에서 탈수 반응을 일으켜 극성이 낮은 ginsenoside로 구조 변화가 일어난다(Sun 등, 2009). 이러한 저극성·저분자 ginsenoside인 prosapogenin은 기존의 ginsenoside에 비해 체내에서 흡수율이 높고 독성이 낮으며, 생리활성이 증가함으로써 강한 약리활성을 나타낸다(Nam 등, 2013). 이에 따라 증숙 횟수별로 제조된 흑삼의 효능 검증을 위한 소재를 선정하기 위하여 흑삼에 함유된 ginsenoside 함량을 비교한 결과를 Table 1에 나타내었다. 증숙 처리 전 백삼의 총 ginsenoside 함량은 3.34 mg/g이었고, 증숙 회수가 1, 3, 6회로 많아질수록 총 ginsenoside 함량이 각각 5.88, 10.01, 14.97 mg/g으로 증가하였으나 증숙 회수가 9회인 경우에는 총 ginsenoside의 함량이 10.2 mg/g으로 감소하였다. 특히, 열에 의해 protopanaxadiol(PPD)계와 propanaxtriol(PPT)계 ginsenoside의 특정 부위의 당이 떨어져 나가면서 백삼(WG)에는 함량이 극히 미량이거나 존재하지 않았던 prosapogenin인 Rg3, Rh4, Rk1, Rg5 등의 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 prosapogenin의 함량이 가장 증가된 흑

Table 1. Changes in ginsenoside content of black ginseng with different steaming times

Samples	Times	Ginsenoside contents (mg/g)						
		Rg3 (S+R)	Rg1	Rb1	Rh4	Rk1	Rg5	Total
WG	0	ND ¹⁾	1.74	1.6	ND	ND	ND	3.34
BG-A1	1	0.12	2.16	3.35	0.21	0.04	ND	5.88
BG-A3	3	0.97	1.64	4.7	1.51	0.52	0.67	10.01
BG-A6	6	3.35	0.31	2.73	4.19	1.9	2.49	14.97
BG-A9	9	2.74	ND	0.27	3.33	1.6	2.26	10.20

¹⁾ND: Not detected.

Table 2. Total polyphenol contents of black ginseng extract

	WGE	BGE-A6
Phenolics (tannic acid, mg/g)	15.29±0.97 ¹⁾	51.67±1.56

¹⁾Values are mean±SD (n=3).

삼(95°C에서 6회 증숙한 BG-A6)으로 흑삼 추출물(BGE-A6)을 제조하여 후속실험에 사용하였다.

총 폴리페놀 함량

식물체 내 페놀 성분은 phenolic hydroxyl(OH)기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대분자들과 쉽게 결합하고 다양한 생리활성을 나타내며 여러 질환의 근본적인 원인으로 알려진 활성산소를 소거하는 능력이 우수하다고 알려져 있다. 따라서 총 폴리페놀 함량은 항산화 활성을 탐색하는 일차적인 자료가 될 수 있다고 여겨진다(Boo 등, 2009). 인삼은 maltol, salicylic acid, vanillic acid 등과 같은 20여종 이상의 페놀성 화합물을 함유하고 있다. 그중 배당체나 아민작용기와 연결되어 있는 결합형 페놀산과 고분자 불용성 페놀 화합물은 열처리 과정을 통해 유리형 페놀산 및 페놀 화합물로 전환되거나 새로운 페놀 화합물이 생성되어 총 폴리페놀 화합물이 증가하는 것으로 보고되고 있다(Yoon 등, 2005). 이에 따라 증숙 전(WGE)과 증숙 후(BGE-A6) 추출물의 총 폴리페놀 함량을 비교하였으며 그 결과를 Table 2에 나타내었다. BGE-A6의 총 폴리페놀 함량은 51.67 mg/g으로 WGE에 비해 약 3배 이상 함량이 증가하였다. Kim 등(2016b)의 연구에서도 증숙 과정을 거치지 않은 수삼과 95°C에서 6번 증숙한 흑삼의 폴리페놀 함량이 각각 2.90, 14.02 mg/g으로 증숙 과정을 통해 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 이는 인삼이 증숙 과정을 통해 화학적 변화를 일으켜 총 폴리페놀 함량이 증가된 것으로 사료된다.

자유라디칼 소거 활성

증숙 전 백삼 추출물(WGE)과 증숙 후 흑삼 추출물(BGE-A6)의 항산화 활성을 측정하기 위하여 DPPH, ABTS 라디칼, superoxide anion 라디칼 소거 활성을 측정하고 그 결과를 Table 3에 SC₅₀ 값(라디칼을 50% 소거하는데 필요한 시료의 농도)으로 나타내었다. 흑삼 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 WGE와 BGE-A6의 SC₅₀ 값은 각각 1,096.80±9.83, 252.50±1.26 µg/mL로 나타나 증숙 전에 비해 증숙 후에 소거 활성이 약 4배 정도 높아지는 것으로 확인되었다. 이때 양성 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid의 SC₅₀ 값은 2.93±0.01 µg/mL로 나타났다. 또한, WGE와 BGE-A6의 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 SC₅₀ 값은 각각 185.37±0.89, 35.02±0.38 µg/mL로 증숙 후에 소거 활성이 증숙 전에 비해 약 5배 이상 증가하였다. 이때 양성 대조군인 L-ascorbic acid의 SC₅₀ 값은 1.16±0.01 µg/mL로 나타났다. 본 연구에서 WGE와 BGE-A6의 DPPH

Table 3. Effect of black ginseng extract on DPPH, ABTS, and superoxide anion radical scavenging

Sample ¹⁾	Antioxidant activity (SC ₅₀ , µg/mL)		
	DPPH radical	ABTS radical	Superoxide anion radical
L-Ascorbic acid	2.93±0.01 ²⁾	1.16±0.01	—
Quercetin	—	—	2.61±0.02
WGE	1,096.80±9.83	185.37±0.89	>10,000
BGE-A6	252.50±1.26	35.02±0.38	656.87±10.58

¹⁾WGE: dried *Panax ginseng* extract without processing, BGE-A6: black ginseng extract by steaming-drying 6 times at 95°C, L-ascorbic acid and quercetin are used as a positive control.

²⁾Values are mean±SD (n=3).

라디칼 소거 활성은 1 mg/mL에서 46.85, 99.18%, ABTS 라디칼 소거 활성은 0.1 mg/mL에서 33.51, 91.51%로 나타났으며, 이러한 결과는 Kim 등(2016a)의 연구에서 백삼, 홍삼, 흑삼의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였을 때 1 mg/mL에서 12.07, 23.98, 72.50%, ABTS 라디칼 소거 활성을 측정하였을 때 0.1 mg/mL에서 15.80, 28.70, 89.60%로 나타난 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 또한, 증자 처리를 하였을 때 ginsenoside Rh1, Rg2, Rg3 등이 많이 생성되고 이에 따라 폴리페놀 함량과 DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성이 증가한다고 보고하였다.

Superoxide anion 라디칼은 호기성 세포의 효소 및 비효소적 단계에서 생성되는 라디칼로 독성이 매우 강하고 노화와 관련된 산화 반응의 개시단계에 관여한다. 또한 hydrogen peroxide, hydroxyl radical, singlet oxygen 등과 같은 다른 활성 산소종의 생성에 관여하여 지질, 단백질, DNA 등에 산화적 손상을 유도하는 것으로 알려져 있다(Chung과 Jeon, 2011). 이에 따라 WGE와 BGE-A6의 superoxide anion 라디칼 소거 활성을 측정한 결과를 Table 3에 나타내었다. WGE의 SC₅₀ 값은 10,000 µg/mL 이상으로 나타났고 BGE-A6는 656.87±10.58 µg/mL로 나타났다. 이때 양성 대조군인 quercetin의 SC₅₀ 값은 2.61±0.02 µg/mL로 나타났다. Shin 등(2011)의 연구에 따르면 건지황을 시간별로 증숙하여 건지황과 숙지황의 superoxide anion 라디칼 소거 활성을 비교한 결과, 100 µg/mL의 농도에서 각각 26.53, 79.46%로 3시간 동안 증숙하였을 때 활성이 약 3배 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과로 보아 흑삼 추출물의 경우 증숙 과정을 거치면서 열에 의해 prosapogenin과 총 폴리페놀의 함량이 증가되어 자유라디칼 소거 활성을 높이는 것으로 사료된다.

환원력 활성

환원력은 활성산소 및 유리기에 전자를 공여하는 능력을 뜻하며 WGE와 BGE-A6의 환원력 활성을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과, WGE는 125, 250, 500 µg/mL 농도에서 흡광도 값이 0.65±0.01, 0.90±0.01, 1.31±0.01로 나타난 반면에 BGE-A6는 1.32±0.01, 2.08±0.01,

Fig. 1. Effect of WGE and BGE-A6 on reducing power. All data are shown as the mean±SD of three independent experiments. *** $P<0.001$ represent significant difference compared to control.

3.61±0.10로 나타나 농도 의존적으로 활성이 증가하는 것으로 확인되었다. 이때 양성대조군인 L-ascorbic acid은 125 µg/mL 농도에서 2.33±0.02로 나타났다. Song 등 (2012)의 연구에서 더덕 열수 추출물과 증숙 더덕의 열수 추출물의 환원력 값이 125 µg/mL 농도에서 각각 0.615, 1.245로 증숙 공정을 거친 더덕의 환원력이 현저히 증가하는 것으로 보고하였으며, 이러한 결과는 본 연구의 결과와 유사한 결과로 판단된다. 따라서 흑삼 추출물의 환원력 활성은 자유라디칼 소거 활성과 동일한 경향을 나타내므로 증숙

공정은 시료의 항산화 활성을 증가시키는데 효과적인 방법이라고 사료된다.

세포보호 효과

HaCaT 세포에서 BGE-A6의 효능을 평가하기에 앞서 세포독성에 미치는 영향을 확인하였으며 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 세포에 BGE-A6를 6.25~100 µg/mL의 농도로 24, 48시간 동안 처리한 후 MTT assay를 통해 세포의 생존율을 측정한 결과, Fig. 2A에서 나타난 바와 같이 100

Fig. 2. Effect of BGE-A6 on the cell viability in H₂O₂-induced HaCaT cells. (A) Cells were treated with BGE-A6 for 24, 48 hr and (B) Cells were treated with BGE-A6 for 1 hr then treated with 0.5 mM H₂O₂ for 6 hr. The cell viability was analyzed using MTT assay. (C) Expressions of PCNA were determined by western blot analysis. HSC70 was used as an internal standard. All data are shown as the mean±SD of three independent experiments. * $P<0.05$ represent significant difference compared to control and # $P<0.05$ compared to H₂O₂ treated group.

$\mu\text{g/mL}$ 이하의 모든 농도에서 세포 독성을 보이지 않았기 때문에 항후 실험에 사용될 시료의 농도 범위를 $12.5\sim 100\ \mu\text{g/mL}$ 로 결정하였다. 산화적 스트레스에 대한 BGE-A6의 세포보호 효과를 확인하기 위해 BGE-A6를 $12.5\sim 100\ \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 1시간 동안 전처리한 다음 $0.5\ \text{mM}\ \text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리하여 6시간 후 세포 생존율을 측정하였다. Fig. 2B에 나타난 바와 같이 세포에 $0.5\ \text{mM}\ \text{H}_2\text{O}_2$ 처리하였을 때, 약 30% 정도 감소된 세포의 생존율이 BGE-A6 처리에 의해 농도 의존적으로 회복되는 것으로 확인되었다($P<0.05$). 이를 바탕으로 단백질 수준에서 세포 생존율을 회복시키는 지 확인하기 위하여 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 발현 여부를 확인하였다. PCNA는 세포주기의 G1기와 S기에서 발현이 증가하여 증식과 관련된 핵단백질로 알려져 있어 세포 증식능의 지표로서 이용되고 있다(Shin과 Park, 1995). Fig. 2C에 나타난 바와 같이 앞서 세포 생존율을 측정한 결과와 동일한 양상을 나타내어 H_2O_2 로 감소된 생존율을 BGE-A6가 효과적으로 회복시킨다고 판단하였다.

세포 내 ROS 소거 활성

HaCaT 세포에서 H_2O_2 처리에 의해 유발된 세포 독성에 대한 BGE-A6의 세포보호 효과가 산화적 스트레스 억제제를 통한 직접적인 효과인지 확인하기 위하여 세포내 ROS 생성에 미치는 영향을 DCF-DA 형광염색을 통해 활성 산소종의 양을 형광현미경으로 확인하였다. 그 결과 Fig. 3A에 나타난 바와 같이 HaCaT 세포에 $0.5\ \text{mM}$ 의 H_2O_2 를 6시간 처리 시 현저하게 초록 형광이 증가하였으나, $100\ \mu\text{g/mL}$ 의 BGE-A6를 1시간 전처리 후 동일한 농도의 H_2O_2 를 6시간 처리한 군에서는 초록 형광이 현저하게 감소되는 것으로 나타났다. 또한, DCF-DA 형광세기를 iSolution autoplus 프로그램을 이용하여 정량한 결과 HaCaT 세포에 $0.5\ \text{mM}\ \text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리하였을 때 증가한 ROS 생성이 BGE-A6를 $100\ \mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 경우 약 40% 정도 감소되는 것으로 나타났다(Fig.

3B). Jang 등(2016)의 연구에서 산화적 스트레스를 유도한 대식세포에 백삼, 홍삼, 흑삼 추출물을 $100\ \mu\text{g/mL}$ 농도로 처리하였을 때 흑삼 추출물이 홍삼과 백삼 추출물에 비하여 ROS 생성 저해 활성이 높다고 보고하였다. 또한, Seo와 Choi(2013)는 HaCaT 세포에서 $\text{H}_2\text{O}_2\ 500\ \mu\text{M}$ 을 처리하였을 때 증가한 ROS 생성이 금은화 물 추출물에 의해 농도 의존적으로 유의하게 억제되었고 이를 통해 세포사멸 및 손상을 억제할 수 있다고 보고하였다. 이러한 결과는 BGE-A6가 H_2O_2 처리로 인해 과도하게 증가된 산화적 스트레스로부터 생성되는 ROS를 억제하여 세포보호 효과를 가지는 것으로 사료된다.

항산화 효소 발현량 변화

정상세포들은 여러 메커니즘을 통해 산화 경로를 억제하여 세포 상해로부터 스스로를 보호하고 항상성을 유지하기 위한 다양한 항산화 시스템을 가지고 있다. 생체 내 존재하는 항산화 시스템으로는 heme oxygenase-1(HO-1), superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT) 등이 있으며, 그중 HO-1은 heme의 산화를 유도하여 biliverdin, free iron 및 carbon monoxide로 산화 및 분해하는 세포 내 heme을 조절하는 주요 효소이다(Gozzelino 등, 2010). 또한, SOD는 항산화 방어 체계 첫 번째 단계에서 독성이 강한 O_2^- 를 H_2O_2 와 산소로 전환시키는 과정을 촉매하고 CAT는 H_2O_2 를 물과 산소로 분해하는 대표적인 효소이다(Ighodaro와 Akinloye, 2018). 그러나 ROS가 과도하게 발생하면 이러한 생체 내 항산화 반응이 균형을 이루지 못해 활성산소가 축적되어 노화를 촉진한다(Jeong, 2017). BGE-A6가 H_2O_2 에 의해 증가된 세포내 ROS 소거를 통해 세포보호 효과를 나타냄에 따라 BGE-A6의 ROS 소거 효과를 규명하기 위하여 세포 내 존재하는 항산화 효소의 발현량을 western blot으로 평가하였다. 그 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이 HaCaT 세포에 $0.5\ \text{mM}\ \text{H}_2\text{O}_2$ 를 처리하여 감소된 HO-1, CAT, SOD

Fig. 3. Effect of BGE-A6 on H_2O_2 -induced intracellular ROS levels in HaCaT cells. Cells were pretreated with BGE-A6 for 1 hr and then stimulated with $0.5\ \text{mM}\ \text{H}_2\text{O}_2$. Then cells were stained with DCF-DA for 30 min and observed under fluorescence microscopy. (A) Image of the intracellular ROS levels by fluorescence microscopy and (B) the relative fold increase of detected ROS level was measured by DCF-DA assay. All data are shown as the mean $\pm$ SD of three independent experiments. *** $P<0.001$ represent significant difference compared to control and #### $P<0.001$ compared to H_2O_2 treated group.

Fig. 4. Effect of BGE-A6 on the expression of antioxidant enzymes (HO-1, CAT, and SOD) in H₂O₂-induced HaCaT cells. Cells were pretreated with BGE-A6 for 1 hr and then stimulated with or without 0.5 mM H₂O₂ for 6 hr. Expressions were determined by western blot analysis. HSC70 was used as an internal standard. All data are shown as the mean±SD of three independent experiments. **P*<0.05 represent significant difference compared to control and #*P*<0.05 compared to H₂O₂ treated group.

단백질의 발현이 BGE-A6 처리 시 회복되는 것으로 나타났다. 특히, CAT와 SOD의 경우는 BGE-A6 처리 시 농도 의존적으로 발현이 회복되는 것으로 나타났으며 HO-1의 경우는 모든 농도에서 발현이 회복되는 것으로 나타났다.

주름 개선 및 보습 관련 단백질 발현량 변화

피부는 체내 수분을 유지하고 외부 자극으로부터 내부를 보호하는 장벽 기능을 하는 동시에 면역반응을 나타내는 기관으로 산화적 스트레스 의해 ROS가 생성되면 피부 노화가 시작된다. 또한, 피부 노화가 진행되면 피부 세포 내 수분이

Fig. 5. Effect of BGE-A6 on the production and expression of type 1 procollagen and MMP-1 in H₂O₂-induced HaCaT cells. Cells were pretreated with BGE-A6 for 1 hr and then stimulated with 0.5 mM H₂O₂ for 6 hr. Production of (A) type 1 procollagen and (B) MMP-1 released into the culture media was determined by ELISA. Expressions of (C) collagen, MMP-1, (D) HAS2, AQP3, and EGFR were determined by western blot analysis. HSC70 was used as an internal standard. All data are shown as the mean±SD of three independent experiments. ***P*<0.01 represent significant difference to control and #*P*<0.05 compared to H₂O₂ treated group.

소실될 뿐만 아니라 세포 구성 성분인 단백질, DNA 및 지질을 손상시켜 콜라겐 및 엘라스틴과 같은 세포외기질을 분해하는 matrix metalloproteinases(MMPs)의 발현이 증가하여 결과적으로 피부 탄력이 저하된다(Yun 등, 2018). 특히, MMP-1은 세포 내 존재하는 주요 콜라겐 분해 효소로 피부에 가장 많이 존재하는 섬유성 콜라겐 I 형과 III형을 분해하기 때문에 피부 노화에 미치는 영향이 가장 크다고 알려져 있다(Lee 등, 2017). 따라서 본 연구에서는 BGE-A6의 주름개선 효과를 확인하기 위하여 콜라겐 발현 및 MMP-1 발현 억제 정도를 ELISA와 western blot으로 측정하였다. 그 결과 Fig. 5A에 나타난 바와 같이 0.5 mM H₂O₂를 처리하였을 때 콜라겐 생성이 대조군에 비해 약 40% 감소하였고, BGE-A6를 100 µg/mL 농도로 처리 할 경우 H₂O₂ 처리에 의해 감소된 콜라겐 생성이 약 20% 정도 회복되는 것으로 확인되었다($P<0.05$). MMP-1의 생성은 0.5 mM H₂O₂를 처리하였을 때 약 2배 이상 증가하였으며, BGE-A6를 처리하였을 때 농도 의존적으로 MMP-1 생성이 억제되는 것으로 나타났다. 또한, 콜라겐과 MMP-1의 발현 정도를 western blot을 이용하여 측정한 결과 ELISA 결과와 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 5C). 이러한 결과는 이전의 연구에서 보고된 여러 천연 소재들이 산화적 스트레스를 유도한 피부세포에서 ROS 생성을 억제하고 동시에 콜라겐 합성을 증가시키며 MMP-1 생성을 억제시켜 주름 생성을 예방한다는 결과와 일치한다(Hwang 등, 2018; Choi 등, 2016). Kim 등(2007)은 홍삼 물 추출 액기스를 피부 섬유아세포에 처리하였을 때 콜라겐 생성과 MMP 억제 효과가 미약하였다고 보고하였지만, 본 연구에서는 유의적 차이를 나타내어 BGE-A6는 홍삼에 비해 피부 손상과 주름 개선에 더 효과적이라고 사료된다.

각질층은 약 30% 이상의 수분을 함유해야 건강한 피부 상태를 유지할 수 있다. 외부 자극에 의해 수분이 10% 이하로 떨어지게 되면 피부장벽에 이상이 발생하여 보습 능력이 저하되고 피부 건조를 유발한다(Jo, 2016). 또한, 피부는 적절한 보습 상태를 유지하기 위하여 히알루론산을 생성하는 효소인 hyaluronan synthase 2(HAS2)와 외부의 수분을 세포막에서 세포 내로 수송하는 막 단백질 역할을 하는 aquaporin(AQPs)의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다(So 등, 2019; Li 등, 2010). Cao 등(2006)과 Saavalainen 등(2005)의 연구에서는 epidermal growth factor receptor(EGFR)의 활성화를 통해 HAS2와 AQP3의 발현을 유도하여 피부보습 및 항상성을 유지한다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 BGE-A6의 피부보습 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 western blot으로 측정하였다. 그 결과 Fig. 5D에서 보는 바와 같이 BGE-A6는 처리 시 농도 의존적으로 HAS2와 AQP3 발현량 및 EGFR의 인산화를 증가시키는 것으로 나타났다.

결론적으로 피부세포에 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유도하였을 때 BGE-A6는 AQP3, HAS2 및 콜라겐

단백질의 발현은 증가시키고 MMP-1의 발현을 감소시켜 피부보습 및 피부장벽을 유지하는 것으로 사료된다. 또한 AQP3의 증가는 피부조직 및 피부세포막에 발현되는 EGF 수용체의 인산화를 증가시킴으로써 피부 건조에 대한 보호 효과도 있는 것으로 판단된다. 향후 BGE-A6의 항산화 및 피부보습 효과를 규명하기 위해서 추가적인 기전 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 95°C에서 6번 증숙하여 제조한 흑삼 추출물의 항산화 활성과 피부세포에서 산화적 스트레스로부터 보호 효과를 확인하고, 항산화 효소 발현, 주름개선 및 보습 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 흑삼 추출물(BGE-A6)의 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH, ABTS, superoxide anion 라디칼 소거 활성 및 환원력을 측정하였다. 그 결과 증숙 후 흑삼 추출물이 증숙 전에 비하여 DPPH 라디칼 소거 활성은 4배, ABTS 라디칼 소거 활성은 5배 정도 항산화 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 피부 각질 형성 세포에서 산화적 스트레스로부터 BGE-A6의 세포보호 효과를 측정하기 위하여 BGE-A6를 1시간 전처리하고 0.5 mM H₂O₂를 6시간 동안 처리하여 분석한 결과, H₂O₂ 처리로 증가된 ROS 생성이 BGE-A6를 100 µg/mL 농도로 처리한 경우 약 40% 정도 감소되는 것으로 나타났다. 또한, BGE-A6의 ROS 소거 효과를 규명하기 위하여 세포 내 존재하는 항산화 효소의 발현량을 western blot으로 평가한 결과 H₂O₂에 의해 유도된 산화 스트레스로부터 감소된 항산화 효소(HO-1, CAT, SOD)의 발현을 농도 의존적으로 회복시켰다. 또한, BGE-A6의 주름 개선 효과를 확인하기 위하여 콜라겐 발현 및 MMP-1 발현 억제 정도를 ELISA와 western blot으로 측정한 결과 0.5 mM H₂O₂를 처리하였을 때 감소된 콜라겐 생성량이 BGE-A6를 100 µg/mL 농도로 처리할 경우 H₂O₂ 처리에 의해 감소된 콜라겐 생성량을 약 20% 정도 회복시키는 것으로 확인되었다($P<0.05$). 0.5 mM H₂O₂를 처리하였을 때 증가된 MMP-1의 생성이 BGE-A6 처리 시 농도 의존적으로 억제되는 것으로 나타났다. BGE-A6의 피부보습 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 western blot으로 측정한 결과 HAS2와 AQP3 발현량 및 EGFR의 인산화를 처리 시 농도 의존적으로 증가시키는 것으로 나타났다. 결론적으로 피부세포에 H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유도하였을 때 BGE-A6는 항산화 효소의 발현을 통해 세포보호 효과를 나타내고, AQP3, HAS2 및 콜라겐 단백질의 발현은 증가시키고 MMP-1의 발현을 감소시켜 피부보습 및 피부장벽 기능을 유지하는 것으로 사료된다. 또한, AQP3의 증가는 피부조직 및 피부세포막에 발현되는 EGF 수용체의 인산화를 증가시킴으로써 피부 건조에 대한 보호 효과도 있는 것으로 판단된다. 따라서 흑삼 추출물은 항산화 효과, 피부보습 및 장벽기능 유지를 통한 항노

화 화장품 소재로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 이루어졌으며 이에 감사드립니다(11913-01).

REFERENCES

- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958. 181:1199-1200.
- Boo HO, Lee HH, Lee JW, Hwang SJ, Park SU. Different of total phenolics and flavonoids, radical scavenging activities and nitrite scavenging effects of *Momordica charantia* L. according to cultivars. *Korean J Med Crop Sci*. 2009. 17:15-20.
- Cao C, Sun Y, Healey S, Bi Z, Hu G, Wan S, et al. EGFR-mediated expression of aquaporin-3 is involved in human skin fibroblast migration. *Biochem J*. 2006. 400:225-234.
- Choi EY, Kim EH, Lee JB, Do EJ, Kim SJ, Kim SH, et al. Mechanisms for anti-wrinkle activities from fractions of black chokeberries. *J Life Sci*. 2016. 26:34-41.
- Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem*. 2006. 99:381-387.
- Chung HJ, Jeon IS. Antioxidative activities of methanol extracts from different parts of *Chrysanthemum zawadskii*. *Korean J Food Preserv*. 2011. 18:739-745.
- Folin O, Denis W. A colorimetric method for the determination of phenols and phenol derivatives in urine. *J Biol Chem*. 1915. 22:305-308.
- Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010. 50:323-354.
- Hwang E, Gao W, Xiao Y, Ngo HTT, Yi TH. *Helianthus annuus* L. flower prevents UVB-induced photodamage in human dermal fibroblasts by regulating the MAPK/AP-1, NFAT, and Nrf2 signaling pathways. *J Cell Biochem*. 2018. 120:601-612.
- Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med*. 2018. 54:287-293.
- Jang AY, Sueng YC, Ji J. The comparative study on physiological activity of white ginseng, red ginseng and black ginseng extract. *J Digit Converg*. 2016. 14:459-471.
- Jeon BS, Kwak YS, Baek SS. Research prospect of Korean ginseng processing. *The Korean Ginseng Research and Industry*. 2008. 2(2):7-12.
- Jeong SH. Anti-oxidant activities of phytol on keratinocytes. *Asian J Beauty Cosmetol*. 2017. 15:457-465.
- Jo AR. Effects of *Poria cocos* extracts containing cream on the improvement of skin barrier functions. Master's thesis. Konkuk University, Seoul, Korea. 2016.
- Jo HK, Sung MC, Ko SK. The comparison of ginseng prosapogenin composition and contents in red and black ginseng. *Kor J Pharmacogn*. 2011. 42:361-365.
- Kim E, Jin Y, Kim KT, Lim TG, Jang M, Cho CW, et al. Effect of high temperature and high pressure on physicochemical properties and antioxidant activity of Korean red ginseng. *Korean J Food Nutr*. 2016a. 29:438-447.
- Kim H, Kim MS, Kim SH, Yun KW, Song JH. Analysis of total phenolic content and antioxidant activity from fruits of *Vaccinium oldhamii* Miq.. *J Korean For Soc*. 2013. 102:566-570.
- Kim MY, Kwon OJ, Noh JS, Roh SS. Inhibitory activities of water extracts of black ginseng on HCl/ethanol induced acute gastritis through anti-oxidant effect. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2016b. 45:1249-1256.
- Kim N, Koo B, Lee S, Hwang E, So S, Do J. Effect of Korean red ginseng on collagen biosynthesis and MMP-1 activity in human dermal fibroblast. *J Ginseng Res*. 2007. 31:86-92.
- Kwak YS. Bibliographic consideration on the efficacy and the origin of Korean ginseng. *Journal of Ginseng Culture*. 2019. 1:43-56.
- Lee JB, Park SA, Kang SM. c-Jun/MMP-1 inhibitory effect of *Rhododendron brachycarpum* via reactive oxygen species (ROS) regulation. *J Invest Cosmetol*. 2017. 13:313-319.
- Lee SJ. Anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-senescence effects of amentoflavone on human dermal fibroblasts. Dissertation. Konkuk University, Seoul, Korea. 2015.
- Lee SN. The antioxidant effect of rutin in human dermal fibroblasts damaged by reactive oxygen species. *Kor J Aesthet Cosmetol*. 2014. 12:831-836.
- Lee YJ, Kim HK, Go EJ, Choi JH, Jo AR, Kim CJ, et al. Extraction of low molecular weight ginsenosides from adventitious roots culture of wild mountain ginseng by steam processing. *Korean J Med Crop Sci*. 2018. 26:148-156.
- Li J, Tang H, Hu X, Chen M, Xie H. Aquaporin-3 gene and protein expression in sun-protected human skin decreases with skin ageing. *Australas J Dermatol*. 2010. 51:106-112.
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs Horticulture Industry Division. 2019 Ginseng Statistics Collection. 2020 [cited 2020 Jul 17]. Available from: http://www.korean-ginseng.org/bbs/board.php?bo_table=02_01&wr_id=24
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983. 65:55-63.
- Nam HJ, Kim YB. Aging and skin aging. *The Journal of Korean Medicine Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology*. 2004. 17(1):16-33.
- Nam KY, Choi JE, Park JD. Transformation techniques for the large scale production of ginsenoside Rg3. *Korean J Med Crop Sci*. 2013. 21:401-414.
- Nam KY, Lee NR, Moon BD, Song GY, Shin HS, Choi JE. Changes of ginsenosides and color from black ginsengs prepared by steaming-drying cycles. *Korean J Med Crop Sci*. 2012. 20:27-35.
- Nam KY. The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs processed ginsengs (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *J Ginseng Res*. 2005. 29:1-18.
- Nishikimi M. Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochem Biophys Res Commun*. 1975. 63:463-468.
- Oh MH, Park YS, Lee H, Kim NY, Jang YB, Park JH, et al. Comparison of physicochemical properties and malonyl ginsenoside contents between white and red ginseng. *Korean J Pharmacogn*. 2016. 47:84-91.
- Oyaizu M. Studies on products of browning reactions—antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine—. *Jpn J Nutr*. 1986. 44:307-315.
- Park H. The role of gut microbiota in ginsenoside metabolism and biotransformation of ginsenoside by lactic acid bacteria. *Curr Top Lact Acid Bact Probiotics*. 2019. 5:1-12.
- Park HJ, Kim AJ, Cheon YP, Lee M. Anti-obesity effects of water

- and ethanol extracts of black ginseng. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2015. 44:314-323.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Ric-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999. 26:1231-1237.
- Saavalainen K, Pasonen-Seppänen S, Dunlop TW, Tammi R, Tammi MI, Carlberg C. The human hyaluronan synthase 2 gene is a primary retinoic acid and epidermal growth factor responding gene. J Biol Chem. 2005. 280:14636-14644.
- Seo SH, Choi MO. Protective effects of *Lonicerae Japonicae* Flos against hydrogen peroxidase-induced oxidative stress on Human keratinocyte, HaCaT cells. Kor J Herbology. 2013. 28:57-62.
- Shin SH, Park ED. Proliferating cell nuclear antigen: relation to histologic grade and prognosis. Korean J Gynecol Oncol Colposc. 1995. 6:157-165.
- Shin YJ, Cheong KJ, Lee GW, Lee SY, Seo YB, Song GY. Study on new manufacturing method of *Rehmanniae radix* preparata and evaluation of antioxidant activity. Kor J Aesthet Cosmetol. 2011. 9:199-211.
- So Y, Hwang JY, Kim HW, Jo HN, Lee TB. Skin hydration and skin barrier effects of *Cymbopogon citratus* and *Perilla frutescens* extracts. J Soc Cosmet Sci Korea. 2019. 45:225-235.
- Song CH, Seo YC, Choi WY, Lee CG, Kim DU, Chung JY, et al. Enhancement of antioxidative activity of *Codonopsis lanceolata* by stepwise steaming process. Korean J Med Crop Sci. 2012. 20:238-244.
- Sun BS, Gu LJ, Fang ZM, Wang CY, Wang Z, Lee MR, et al. Simultaneous quantification of 19 ginsenosides in black ginseng developed from *Panax ginseng* by HPLC-ELSD. J Pharm Biomed Anal. 2009. 50:15-22.
- Trouba KJ, Hamadeh HK, Amin RP, Germolec DR. Oxidative stress and its role in skin disease. Antioxid Redox Signal. 2002. 4:665-673.
- Yoon SR, Lee MH, Park JH, Lee IS, Kwon JH, Lee GD. Changes in physicochemical compounds with heating treatment of ginseng. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2005. 34:1572-1578.
- Yun ME, Lee YS, Lee YJ, Park YM, Park SN. Antimicrobial, antioxidant and cellular protective effects of *Houttuynia cordata* extract and fraction. Appl Chem Eng. 2018. 29:452-460.