

오존에 의한 피부손상 확인 및 이를 방어하는 피부 외용제 소재의 탐색

김 창 수 · 정 재 형* · 김 남 경* · 한 상 화* · 최 신 욱†

(주)레이디안, *강원대학교 생화학과

Identification of Ozone-induced Skin Damage and Screening of Antioxidant for Ozone

ChangSu Kim, Jae-Hyung Jung*, Nam-Kyung Kim*, Sanghwa Han*, and Shin Wook Choi†

Radiant Inc. Bioindustry Foundation, 198-53, Hupyong-dong, Chunchon-si, Gangwon 200-160, Korea

*Department of Biochemistry, Kangwon National University, Chunchon-si, Gangwon-do

요약: 오존(O₃)은 높은 독성을 가진 대기 오염 물질 중 하나로 강력한 산화제로 작용한다. 본 연구에서는 대기와 직접적 접촉을 하는 피부가 손상을 입을 것이라는 가정하에 O₂⁻, ·OH에 대한 천연물의 항산화 활성을 EPR법으로 측정하였으며 오존에 의한 단백질 손상 및 지질산화, 피부세포인 HaCaT 및 B16F10 세포의 세포자살 및 손상을 확인하였다. 또한 사람 피부 각질층의 항산화 물질인 ascorbic acid와 tocopherol의 농도 감소를 확인할 수 있었으며, 이러한 손상이 항산화제에 의해 억제될 수 있음을 확인하였다. 이에 오존에 의한 피부손상을 방어하는 천연 추출물을 선별한 결과 생열귀, 녹차, 곰취 등 총 8종의 추출물이 오존에 대한 우수한 방어능력을 보였다.

Abstract: Ozone(O₃), one of best-known toxic air pollutant, act as a strong oxidant. It is possible that skins exposed to the air can be easily damaged by such oxidative air pollutants. Therefore, in the present study, anti-oxidative effects of natural products on O₂⁻ and ·OH were investigated by EPR. Ozone caused protein damage and lipid oxidation, in HaCaT and B16F10 leading ultimately to programmed cell death. It also reduced the level of antioxidant molecules including ascorbic acid and tocopherol in stratum corneum. However, antioxidants originated from natural products could protect skin from these oxidative damages. We concluded that eight natural extracts including *Rosa davurica*, *Ligularia sibirica*, Green tea acted as strong antioxidants against ozone.

Keywords: ozone, free radical, antioxidants, skin damage, plant extracts

1. 서 론

서울을 비롯한 국내 대도시에는 높은 인구밀도와 급격한 자동차의 증가로 대기 오염물질의 농도가 지속적으로 증가하고 있다. 이러한 여건에서 1980년대 이후 대기의 질을 개선하기 위하여 청정연료의 보급과 자동차 배기가스의 규제강화 등으로 아황산가스는 크게 개선되어 1993년 이후에는 세계보건기구(WHO)의 권고기준치 이내를 유지하고 있다. 그러나 최근 자동차의 급격한 증가로 자동차 배출가스가 대기오염의 85.4%를 차지하면서 이산화질소와 오존오염도가 증가하는 추세로 오존주의보의 발령, 시정장에 현상 등의 여러 가지 피해상황이 우리의 건강과 생활을 위협하고 있다. Figure 1에서 보는 바와 같이 오존이 연차적으로 지속적인 증가추세에 있으며 앞

로도 자동차 증가 등의 영향으로 다소 증가할 것으로 보인다.

대기오염도가 높아질수록 다양한 피부질환이 증가한다는 사실은 대도시에서의 대기오염 관련 피부질환 환자수가 농어촌지역보다 많으며, 매년 피부질환으로 병원을 방문하는 전체 환자의 수가 증가함으로 비취볼 때 알 수 있다. 특히 점차적으로 증가되는 오존이 다양한 피부질환과 상관관계가 있음이 최근 연구 결과에 의해 밝혀지고 있다. 자동차 배기가스 중 한가지인 NO₂(이산화질소)와 자외선의 반응에 의해서 생긴 오존에 의한 피해는 직접적인 접촉이 일어나는 피부와 호흡기에서 일어나며 피부질환 및 호흡기 손상을 유발시키게 된다. 오존은 그 화학적 성질로 인해 강력한 산화제로 작용하여 피부에 있는 피지와 세포막 구성 성분인 지질에 있는 불포화지방산이 오존과 반응을 일으키고 이 과정에서 생긴 라디칼은 여러 가지 산화작용을 일으키게 된다. 오존에 의해 발생되

† 주 저자 (e-mail: biotour@chol.com)

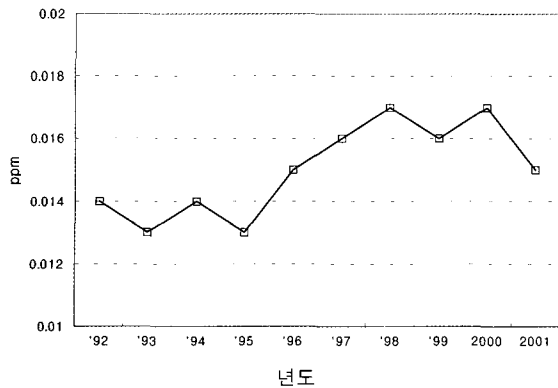


Figure 1. Ozone concentrations in Seoul.

는 산화물질에는 $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , O_2^- , $\text{ROO}\cdot$, $^1\text{O}_2$ (singlet oxygen, 단일항산소) 등이 있는 것으로 알려져 있다 [1-7]. 쥐를 대상으로 한 동물실험에서 오존에 노출시켰을 때 나타나는 증상으로는 시력저하[8], 피부 모세혈관에서 옥시헤모글로빈의 탈포화의 결핍 현상[9], 심장 단백질대사의 변화[10], 심장과 뇌조직에서 지질 과산화 증가[11] 등이 관찰되고 있다. 또한 쥐의 피부를 대상으로 한 연구결과에 따르면 오존은 피부에서의 비타민C와 E의 파괴를 유도하고 지질의 과산화를 일으켜 산화적 스트레스를 초래하여 피부노화를 촉진하고 결국 피부질환을 유발할 가능성이 크다고 한다[12-17].

현시점에서 오존이 피부손상에 미치는 영향은 기초연구 수준의 결과가 정립되어 확인된 학술적인 측면의 결론이기에 아직 이를 응용한 산업화 기술은 전 세계적으로 시작 단계에 불과하다고 할 수 있다. 대기오염에만 초점을 맞추어 개발된 화장품의 종류는 거의 없으며 대기오염물질을 녹이는 클렌징 크림정도만이 프랑스의 로레알에서 개발된 정도이다. 화장품 산업을 포함한 국내 피부 관련산업 또한 오존에 의한 피부손상에 미치는 영향 평가 및 그에 따른 정량적인 피부손상 판별기술은 거의 확립되어 있지 않으며 오존 등 대기오염물질에 의한 피부 손상을 방지하는 안전한 효능물질의 평가 기술 또한 미비한 수준이다. 이에 오존에 의한 피부 손상의 규명과 판별기술을 개발함으로써 대기오염물질에 의한 피부손상 방지 목적 제품의 산업화를 위해 오존에 의한 피부 손상을 방어할 수 있는 유효물질을 선별하여 그 효능을 평가하였다.

2. 실험

2.1. 유해산소에 대한 항산화능 평가

Superoxide radical에 대한 추출물의 항산화 활성은

xanthine/xanthine oxidase system으로 superoxide을 발생시키고 추출물의 superoxide의 제거 속도를 DMPO spin trap을 이용하여 EPR (전자상자성공명법)로 측정하였다. 추출물을 넣지 않은 대조군의 EPR 신호 세기의 값을 기준으로 추출물의 항산화력을 대조군에 대한 상대적인 EPR 신호 세기 감소로 나타내었다.

Hydroxy radical에 대한 항산화 활성은 Fenton 반응으로 hydroxyl radical을 발생시킨 후 DMPO spin trap을 이용한 EPR 방법으로 정량하였다. 추출물들을 가지고 이들의 hydroxyl radical 제거 능력을 EPR 신호의 감소로 측정하였으며, 이 때 항산화 활성은 추출물을 넣지 않은 대조군의 EPR 신호를 기준으로 하여 추출물을 넣었을 때의 EPR 신호를 측정하여 상대적인 신호 값으로 나타내었다.

2.2. 오존의 제조와 농도 측정

오존 발생기로는 '오존텍'에서 구입한 AOZ-1을 사용하였고 분광 광도계는 Hewlett Packard 제품인 HP 8453 UV-visible spectrophotometer를 이용하였다. 장시간 오존 농도를 유지시키기 위해서 오존발생기로 오존을 발생시키면서 pH와 온도가 낮은 증류수(황산으로 pH 2로 맞추)에 약 15~20분간 오존을 포화시켰다. 증류수(pH 2)를 blank로 잡고 여기에 오존수를 희석시켜 나타난 흡광($\epsilon_{245\text{ nm}} = 3150\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 수치를 가지고 오존수의 농도를 결정하였다. 실험에 따라 오존 발생기, AOZ-1을 이용해 오존 가스를 시료에 직접적으로 노출시켰으며 농도는 오존농도 측정기로 측정하였다.

2.3. 오존에 의한 지질 및 단백질 손상 측정

2.3.1. 오존에 의한 지질산화 평가 및 유효 추출물의 억제 효과

Solvent-extraction 방법으로 liposome을 제조하였으며, 그 방법을 간략히 말하면 일정량의 asolectin을 헥산에 녹인 후 질소가스로 불어서 헥산을 증발시켰다. 그 후 0.1 M 인산완충용액(pH 7.4)으로 지질의 농도가 20 mg/mL 되게 녹여 liposome으로 사용하였다. 오존의 농도에 따른 liposome의 지질산화는 TBARS 방법으로 측정하였다. 인산완충용액에 녹아 있는 liposome을 오존수에 노출시켜서 일정시간 배양한 후 1% TBA, 28% TCA를 첨가 후 끓는 물에 5분간 반응시킨 후 얼음에 보관하였다. 그 후 부탄올을 첨가하여 교반한 후 원심분리를 통해 부탄올층과 수층을 분획하여 부탄올층에서 소량의 시료를 취해 532 nm에서의 흡광도를 측정하여 지질산화의 정도를 측정하였다.

2.3.2. 오존에 의한 단백질 손상 측정

알부민(albumin)을 0.1 M 인산완충용액(pH 7.4)에 최종 농도가 80 ug/mL되게 녹인 후 96 well에 100 uL씩 넣었다. 오존발생기를 통해 일정량 농도의 오존(11 ppm~12 ppm)에 시간별로 시료에 노출시켜 준 후 소량의 시료를 취하였다. SDS sample buffer에 섞어 준 후 5분간 끓여 준 뒤 SDS-PAGE를 실시하였다. 그 후 coomassie blue 염색법으로 염색을 하여 단백질의 fragmentation의 정도를 판별하여 단백질의 손상 정도를 측정하였다.

2.4. 피부세포에 대한 오존의 영향 측정

2.4.1. HaCaT 세포주 및 B16F10 세포주의 배양

사람유래의 keratinocyte 세포주인 HaCaT과 쥐유래의 melanoma 세포주인 B16F10을 10% fetal bovine serum, penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 units/mL)가 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)을 이용해 37°C, 5% 탄산가스가 있는 세포배양기에서 배양하였다.

2.4.2. MTT assay

각각의 세포를 정상적으로 24시간 배양한 뒤 배지를 제거한 후 PBS (phosphate-buffered saline)을 이용해 세포를 세척 하였다. 그 후 일정 농도의 오존수에 노출시킨 후 6시간 배양하였다. 오존에 노출되지 않은 대조군과 세포독성을 MTT assay로 비교하여 평가하였다.

2.4.3. Confocal laser scanning microscopy

오존이 세포내로 유입되는 것을 알아보기 위하여 공초점레이저 현미경을 사용하였다. 세포주를 glass-bottomed 35-mm petri dish (MatTek Corp., Ashland, MA)에서 배양하였다. 일정 농도의 오존을 처리한 후 혈청이 없는 배지로 세척한 후, 10 ug/mL의 CFDA가 함유된 배지에서 30분간 더 배양시켰다. Glass-bottomed 35-mm petri dish에서 cover glass를 분리하여 고정화 단계없이 Live cell chamber에 장착 후 공초점레이저 현미경으로 관찰하였다. CFDA의 녹색형광이미지는 488 nm의 여기파장과 510 nm band pass filter를 이용해 얻었다.

오존에 의한 세포사의 기작을 알기 위해 Vybrant Apoptosis Assay Kit #3 (Molecular Probes, Inc)를 이용하여 FITC-Annexin V와 propidium iodide로 세포를 염색하였다. 그 후 cover glass를 Live cell chamber에 장착 후 공초점레이저 현미경으로 관찰하였다. FITC-annexin V의 녹색형광이미지는 488 nm의 여기파장, 510 nm band pass filter와 530 nm band pass filter를 이용하였고, propidium iodide의 적색형광이미지는 543 nm의 여기파장과 565 nm

band pass filter를 이용해 얻었다.

2.5. 오존에 대한 피부 각질층의 ascorbic acid 및 α -tocopherol 손상 측정

2.5.1. 피부에 대한 오존 노출

오존 발생기에 연결되어 있는 노즐과 주사기가 말단에 연결되어 있는 5×10×3 cm 크기의 플라스틱 챔버를 사람의 앞 팔의 뒤쪽에 고정시킨 후 전향에서 언급한 대로 일정 농도의 오존을 발생시킨 후 챔버에 연결되어 있는 빈 주사기로 챔버내의 공기를 빼주어 오존을 플라스틱 챔버내로 유입시켜 피부에 1시간 노출시켰다. 추출물의 방어 효과 측정 시에는 미리 추출물을 피부에 도말하여 건조시킨 후 오존을 처리하였다.

2.5.2. 피부 각질층의 획득

피부 각질층의 시료는 tape-stripping 방법을 이용하였다. 오존을 처리한 피부에 5×5 cm 크기의 cellophane tape를 부착시킨 후 떼어내어 각질층을 획득하였다. 부착되어 나온 각질층은 광학현미경을 이용하여 균질성을 확보한 후 그 질량은 stripping 전 후의 cellophane tape의 질량차이로 측정하였다. Tape strip 당 얻어진 각질층의 양은 2.98 ± 0.17 mg (±SD)이었다.

2.5.3. 각질층의 ascorbic acid 농도 측정

Tape의 질량을 측정한 후 1 mM EDTA가 함유된 2 mL의 PBS와 50 uL의 butylated hydroxytoluene (1 mg/mL), 1 mL의 2.9% (v/v) SDS를 첨가하여 vortexing을 실시하였다. 전처리가 끝난 시료를 membrane filtering (0.45 um)을 실시한 후 HPLC 분석을 실시하여 ascorbic acid를 정량하였다. HPLC 분석은 Waters사의 Module 2690 LC system과 동일 회사의 electrochemical detector를 사용하였고, 컬럼은 Alltech사의 Econosil C18 (10 um, 250×4.6 mm)을 이용하였다. 40 mM sodium acetate 및 0.537 mM EDTA, 5%의 메탄올을 함유하는 용액을 이동상으로 하였으며 유속은 1.0 mL/min으로 하였다.

2.5.4. 각질층의 α -tocopherol의 농도 측정

Tape의 질량을 측정한 후 1 mM EDTA가 함유된 2 mL의 PBS와 50 uL의 butylated hydroxytoluene (1 mg/mL), 1 mL의 2.9% (v/v) SDS를 첨가하여 vortexing을 실시하였다. 전처리 과정이 끝난 시료에 4 mL의 헥산을 첨가하여 분획한 후 2 mL의 에탄올을 헥산층에 첨가하여 tape의 접착성분을 침전시켜 제거하였다. 그 후 헥산/에탄올층을 질소가스로 말려 그 건조물을 500 uL의 에탄올:메탄올(1:1)에 녹인 후 HPLC 분석을 실시하여

α -tocopherol를 정량하였다. HPLC 분석은 Waters사의 Module2690 LC system과 동일 회사의 electrochemical detector를 사용하였고, 컬럼은 Alltech사의 Econosil C18 (10 μ m, 250 \times 4.6 mm)을 이용하였다. 20 mM lithium perchlorate을 함유하는 1:9의 메탄올:에탄올 용액을 이 동상으로 하였으며 유속은 1.2 mL/min으로 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 유해산소에 대한 항산화능 평가

3.1.1. Superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$)에 대한 항산화능 평가

추출물의 superoxide radical에 대한 항산화 활성은 Figure 2에서 보는 바와 같이 superoxide 제거에 의한 DMPO-OOH·의 EPR 신호세기의 감소로 나타낼 수 있다. 추출물의 항산화력을 다음 식에 의해 추출물을 넣지 않은 대조군의 EPR 신호 세기의 값을 기준으로 대조군에 대한 상대적인 EPR 신호 세기 감소로 나타내었다.

$$100 - \left(\frac{E_{EPR}}{C_{EPR}} \times 100 \right) \quad \begin{array}{l} E_{EPR} : \text{추출물첨가시 EPR 신호세기} \\ C_{EPR} : \text{대조군 EPR 신호세기} \end{array}$$

본 연구진에서 보유하고 있는 총 420여 가지의 천연 추출물을 대상으로 EPR을 이용한 추출물의 항산화활성 측정 실험 결과 녹차 추출물이 superoxide radical에 대해 가장 높은 항산화 활성을 나타냈으며, 총 15종의 추출물이 70% 이상의 항산화 효과를 나타내었다(Table 1). 특히 표준 항산화제로 사용되고 있는 ascorbic acid (약 70%의 항산화능)보다 높은 항산화 활성을 나타낸 추출물은 총 11종이나 되었다. Table 1에 superoxide radical에 대해 상위 20위권의 항산화능을 지닌 추출물을 나타내었다.

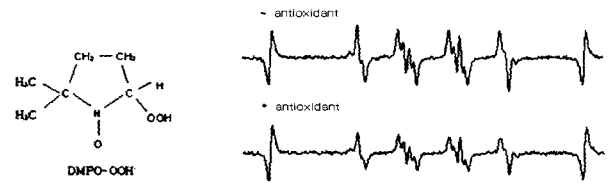


Figure 2. Structure and EPR signal of DMPO-OOH·.

3.1.2. Hydroxy radical ($\cdot OH$)에 대한 항산화능 평가

과산화수소와 2가의 철염을 첨가하면 $\cdot OH$ 가 발생되고, 이는 다시 DMPO와 반응하여 DMPO-OH· 라디칼을 생성한다. Figure 3에서 보는 바와 같이 DMPO-OH·의 EPR 신호를 측정함으로써 hydroxyl radical에 대한 추출물의 항산화 활성을 조사할 수가 있다. 추출물이 첨가된 실험에서 항산화 활성이 있을 경우 hydroxyl radical을 소거하여 EPR의 신호가 약해진다. 이 때 항산화 활성은 추출물을 넣지 않은 대조군의 신호를 기준으로 하여 추출물을 넣었을 때의 EPR 신호를 측정하여 상대적인 신호 값으로 나타내었다.

$$100 - \left(\frac{E_{EPR}}{C_{EPR}} \times 100 \right) \quad \begin{array}{l} E_{EPR} : \text{추출물 첨가시 EPR 신호세기} \\ C_{EPR} : \text{대조군 EPR 신호세기} \end{array}$$

곰취 추출물이 hydroxyl radical에 대해 가장 높은 항산화 활성을 나타냈으며 곰취, 도인, 도깨비바늘 등 총 3종의 추출물이 50% 이상의 항산화 효과를 나타내었다. 더덕, 도라지, 녹차, 딱총나무, 토사자, 가시나무 등 총 6종의 추출물은 40% 대의 항산화 활성을 지니고 있음이 밝혀졌다. 특히 곰취, 녹차, 생열귀, 곤드레, 가래나무 등은 superoxide radical과 hydroxy radical 모두에 좋은 항산화능을 지니고 있는 것으로 밝혀졌다(Table 2). Hydroxyl radical에 대해 상위 20위권의 항산화능을 가진 추출물을 Table 2에 나타내었다.

Table 1. Superoxide Radical Scavenging Activity of Plant Extracts

Extract (100 μ g/mL)	Superoxide radical($O_2^{\cdot-}$) scavenging activity	Extract (100 μ g/mL)	Superoxide radical($O_2^{\cdot-}$) scavenging activity
Green tea	92.2	<i>Alangium platanifolium</i> , stems	82.7
<i>Rosa davurica</i> , fruits	88.9	<i>Codonopsis pilosula</i> , leaves	76.8
<i>Ligularia sibirica</i>	87.5	<i>Berberis koreana</i> , stems	76.5
<i>Rosa davurica</i> , leaves	87.5	<i>Pleuropterus multiflorus</i>	72.3
<i>Lespedeza bicolor</i> , leaves	87.2	<i>Pteridium aquilinum</i>	70.7
<i>Lespedeza bicolor</i> , stems	84.3	<i>Zanthoxylum piperitum</i> , leaves	69.7
<i>Sanguisorba officinalis</i>	83.7	<i>Aralia elata</i>	68.9
<i>Zanthoxylum schinifolium</i> , leaves	83.4	<i>Cirsium setidens</i>	66.9
<i>Ginkgo biloba</i> , leaves	82.9	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	62.5
<i>Juglans mandshurica</i> , roots	82.7	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> , roots	57.6

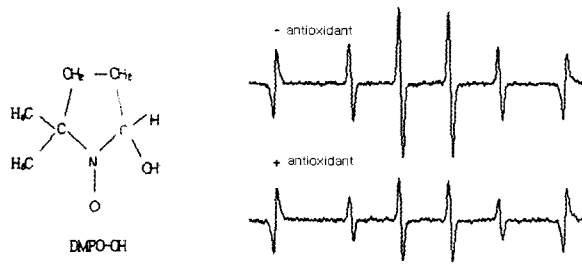


Figure 3. Structure and EPR signal of DMPO-OH·.

3.2. 오존에 의한 지질 손상 확인과 이에 대한 유효 추출물의 탐색

3.2.1. 오존에 의한 지질산화

오존수에 의한 liposome의 산화를 지질과산화물의 최종 산물인 malondialdehyde (MDA)의 검출로 확인하였다. Figure 4에서 보는 바와 같이 오존수의 농도를 50, 100, 200 uM가 되게 liposome에 처리한 결과 지질산화의 정도가 각각 오존수를 처리하지 않은 대조군(100%)에 비해서 232.796%, 489.552%, 1749.210%로 증가하였으며, liposome에 처리한 오존수의 농도가 증가할수록 지질산화가 증가함을 알 수가 있었다. 100 uM 이상의 오존수를 처리한 경우에는 오존에 의한 지질산화가 급격히 증가함을 알 수 있었다. 이는 높은 농도의 오존에 의해 촉발된 지질의 산화가 급격한 연쇄반응을 통해 더욱 더 많은 지질라디칼(ROO·, RO·)을 생성함으로써 지질산화를 증폭시킨 결과로 해석할 수 있으며, 이를 통해 오존이 지질의 산화를 유발시킴을 알 수 있다.

3.2.2. 표준 항산화제의 오존에 대한 지질산화의 억제능

이러한 오존에 의한 지질산화를 항산화제가 억제할 수 있는지를 평가하여 보았다. Figure 5에서 보는 바와 같이

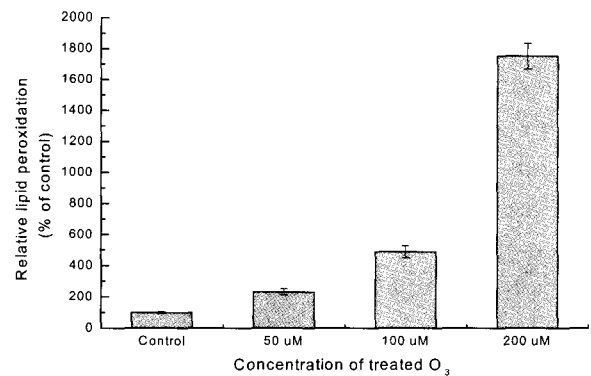


Figure 4. Lipid peroxidation of liposome by ozone treatment.

160 uM의 오존에 노출된 liposome의 지질산화를 100%로 잡았을 때 100, 200 ug/mL의 ascorbic acid는 오존에 의한 지질산화가 각각 약 57.143%와 38.571%로 나타났으며, catechin의 경우에는 오존만 처리한 대조군의 지질산화에 대해 85.714%와 58.571%의 지질산화가 측정되었다. 지질산화 억제 효과가 친수성 항산화제인 ascorbic acid의 경우 더 높은 것은 아마도 외부의 오존을 소거하여 지질과 반응할 수 있는 오존의 농도를 감소시켜 준 결과로 사료되며, 소수성 항산화제인 catechin의 경우에도 liposome 내에 생성된 지질라디칼을 제거함으로써 오존에 의한 지질산화 반응을 억제한 것으로 판단된다. 오존에 의한 지질산화는 오존이 불포화지방산의 이중 결합에 첨가되어 cyclic peroxide을 형성함으로써 지질라디칼(ROO·, RO·) 형성을 촉진하여 지질산화를 유도하는 것으로 판단되어지며, 이러한 오존의 지질산화는 라디칼의 연쇄반응으로 일어나는 것이기 때문에 항산화제에 의해 그 산화가 억제된 것으로 판단된다.

Table 2. Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Plant Extracts

Extract (100 ug/mL)	Hydroxyl radical(·OH) scavenging activity	Extract (100 ug/mL)	Hydroxyl radical(·OH) scavenging activity
<i>Ligularia sibirica</i>	73.1	<i>Rosa davurica</i>	35.8
<i>Prunus persica</i>	62.5	<i>Dioscorea batatas</i>	35.2
<i>Bidens bipinnata</i>	54.5	<i>Patrinia scabiosaefolia</i>	35.1
<i>Codonopsis lanceolata</i>	49.1	<i>Dioscorea nipponica</i>	31.2
<i>Platycodon grandiflorum</i>	45.9	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	30.7
Green tea	45.6	<i>Lycium chinense</i>	29.6
<i>Sambucus williamsii</i>	44.4	<i>Lycium chinense</i>	28.8
<i>Cuscuta japonica, seeds</i>	43.6	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	28.6
<i>Quercus myrsinaefolia</i>	41.1	<i>Cirsium setidens</i>	27.2
<i>Juglans mandshurica</i>	39.4	<i>Castanea crenata</i>	27.2

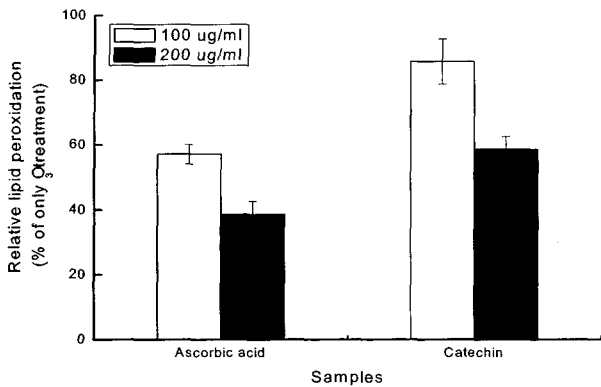


Figure 5. Protective effects of antioxidants on lipid peroxidation by ozone treatment.

3.2.3. 오존에 의한 지질산화를 방어하는 유효 추출물의 탐색

항산화제의 오존에 대한 지질산화의 억제 효과 실험을 통해 ascorbic acid와 catechin 모두 그 효과가 크다는 점을 밝혀내었으며, 이를 통해 추출물의 오존에 대한 지질산화 억제 활성을 측정하여 유효한 추출물을 탐색하였다.

본 연구진이 보유하고 있는 420여종의 천연물을 대상으로 오존에 대한 지질산화 억제 효과를 탐색하였다. 160 uM 농도의 오존을 liposome에 노출시킨 후 그 지질산화를 측정한 결과 초피잎의 경우 대조군 대비 75.64%의 지질산화를 보여 주었으며, 맥문동, 박쥐나무줄기, 가래나무

뿌리 등은 오존에 의한 지질산화를 미미하나마 오히려 촉진시키는 것으로 나타났다(Table 3). 초피잎, 향나무, 생열귀, 곤드레 등 총 4종의 천연 추출물이 대조군 대비 80% 이하의 지질산화를 보여주어 오존에 의한 지질산화를 억제하는 것으로 나타났으며, superoxide 및 hydroxyl radical에 대한 좋은 항산화 활성을 보여준 조릿대, 만삼잎, 개두릅, 녹차 등도 대조군 대비 85% 이하의 지질산화를 보여주어 활성산소에 대한 항산화능이 높은 추출물이 오존에 의한 지질산화 억제 활성도 좋은 것으로 나타났다(Table 3).

3.3. 오존에 의한 단백질 손상 확인과 이에 대한 유효 추출물의 탐색

3.3.1. 오존에 의한 단백질의 손상

오존에 의한 단백질을 손상을 확인하기 위해 일정 농도의 오존(11~12 ppm)을 처리한 albumin을 SDS-PAGE를 이용하여 단백질의 손상을 확인하였다. Figure 6에서 보는 바와 같이 오존을 처리하지 않은 대조군에 비해 시간이 지날수록 단백질의 밴드가 희미해지는 것을 볼 수가 있으며, 오존에 노출된 지 20분이 경과될 경우에는 albumin의 밴드가 거의 보이지 않았다. 그러나 원래 albumin 밴드 이외의 밴드가 관찰되지 않은 것으로 보아 cross-linking이나 aggregation에 의한 단백질의 변화는 없는 것으로 보인다. 다만 밴드가 감소하는 현상을 미루

Table 3. Protective Effects of Antioxidants on Lipid Peroxidation by Ozone Treatment

Extracts (100 ug/mL)	Relative lipid oxidation (% of control ¹⁾)	Extracts (100 ug/mL)	Relative lipid oxidation (% of control ¹⁾)
<i>Juglans mandshurica</i>	106.55	<i>Liriope platyphylla</i>	104.73
<i>Aralia elata</i>	83.27	<i>Alangium platanifolium</i> , stems	105.09
<i>Viscum album</i>	82.18	<i>phellinus linteus</i>	98.91
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	91.64	<i>Phaseolus nipponensis</i>	87.64
<i>Cirsium setidens</i>	97.45	<i>Rosa davurica</i>	77.40
<i>Cirsium setidens</i>	79.64	<i>Campanula punctata</i>	97.09
<i>Ligularia sibirica</i>	84.36	<i>Lespedeza bicolor</i> , stems	92.36
<i>Lycium chinense</i>	82.55	<i>Nelumbo nucifera</i>	89.09
Green tea	83.30	<i>Sanguisorba officinalis</i>	93.09
<i>Ulmus davidiana</i> , hull	82.55	<i>Ginkgo biloba</i> , leaves	93.45
<i>Alangium platanifolium</i> , stems	94.91	<i>Panax ginseng</i> , leaves	90.55
<i>Codonopsis lanceolata</i>	107.64	<i>Sasa borealis</i>	81.45
<i>Platycodon grandiflorum</i>	98.55	<i>Zanthoxylu piperitum</i> , leaves	75.64
<i>Codonopsis pilosula</i> , leaves	82.91	<i>Pleuropterus multiflorus</i>	110.18
<i>Berberis koreana</i> , stems	98.18	<i>Juniperus chinensis</i>	76.00

¹⁾ Lipid oxidation of liposome expose to 160 uM ozone in absence of plant extract

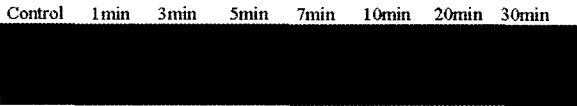


Figure 6. Identification of protein damage by ozone using SDS-PAGE.

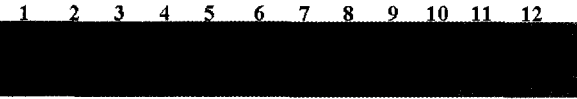


Figure 7. Protective effects of antioxidants on protein damage by ozone treatment. Lane 1: control, 2: control + NaOH (solvent for plant extracts), 3-12: Ozone treatment, 4-6: ascorbic acid 1, 10, 100 ug/mL, 7-9: catechin 1, 10, 100 ug/mL, 10-12: quercetin 1, 10, 100 ug/mL.

어 보아 오존에 의해서 fragmentation (단백질의 조각화)에 의해 단백질의 분자량이 작아져서 tracking dye와 같이 겔을 빠져나간 것으로 판단된다. 이러한 결과를 근거로 오존이 단백질의 fragmentation (조각화)를 유도하여 작은 분자량의 펩타이드로 분해함을 알 수 있다.

3.3.2. 표준 항산화제의 오존에 대한 단백질 손상의 억제능

오존에 의한 단백질의 손상을 항산제가 방어할 수 있는지를 평가하기 위해 ascorbic acid, catechin 및 quercetin이 첨가된 조건에서 오존에 노출시켜 본 결과 Figure 7에서 보는 바와 같이 항산제의 농도가 높아질수록 단백질의 밴드가 증가하였다. 이러한 결과로 미루어 보아, 항산제의 단백질 방어효과가 그다지 크지 않으나 유의적으로 오존에 대한 단백질 손상에 대한 방어 효과를 가지고 있음을 알 수 있다. 오존에 대한 단백질 손상에 대한 방어 효과는 quercetin과 catechin의 효과가 비슷하며, ascorbic acid가 가장 낮았다. 오존에 의한 단백질 손상을 SDS-PAGE를 통해 확인하였으며, 항산화제 표준품이 오존에 의한 단백질의 손상을 억제함을 밝혀내었다.

3.3.3. 오존에 대한 단백질 손상 억제 효능을 가진 유효 추출물의 탐색

오존에 의한 단백질의 손상을 어느 추출물이 방어할 수 있는지를 평가한 결과 도깨비바늘을 제외한 생열귀, 녹차, 오가피잎, 가시나무, 더덕, 도라지, 토사자, 마, 마로니에, 딱총나무, 신탱나무잎 등 총 11종이 오존에 대한 단백질의 손상을 효과적으로 방어해 주는 것으로 나타났다 (Figure 8). 비록 생열귀 및 더덕의 경우에는 10 ug/mL 농도에서는 미미한 방어효과를 보여주었으나, 100 ug/mL의 농도에서는 다른 추출물과 유사한 방어효과를 보여주었다.

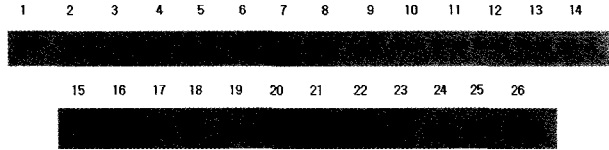


Figure 8. Protective effects of plant extracts on protein damage by ozone treatment. Lane 1: control 2-26: Ozone treatment 3-26: 10 ug/mL, 100 ug/mL of plant extract 3,4: *Rosa davurica* 5,6: Green tea 7,8: *Acanthopanax senticosus*, leaves 9,10: *Quercus myrsinaefolia* 11,12: *Codonopsis lanceolata* 13,14: *Bidens bipinnata* 15,16: *Platycodon grandiflorum* 17,18: *Cuscuta japonica*, seeds 19,20: *Dioscorea batatas* 21,22: *Meliosma myriantha* 23, 24: *Sambucus williamsii* 25,26: *Lespedeza bicolor*, leaves.

오존에 대한 단백질 손상을 방어해 주는 유효 추출물의 성격을 살펴보면, 활성산소종에 대한 항산화능이 높은 추출물들이 대부분이라는 점을 알 수 있는 데, 이는 아마도 오존이 수용액상에는 높은 산화력을 지니고 있기 때문에 항산화제들이 이를 효과적으로 방어해 주는 것으로 풀이할 수 있다. 또한 오존은 수용액상에서 수많은 화학 반응을 유발하여 활성산소를 만들어내는 것으로도 알려져 있다. 이를 미루어 보아 활성산소에 대한 높은 항산화력을 지닌 추출물들이 오존에 대한 우수한 보호 효과를 가질 수 있음을 알 수 있다.

3.4. 피부세포에 대한 오존의 영향

3.4.1. 오존의 세포 생존율에 대한 영향

오존이 피부세포에 어느 정도의 독성을 가지고 있는지를 평가하기 위해 쥐유래의 흑색종 세포주인 B16F10과 사람유래의 섬유아세포주 HaCaT를 대상으로 오존의 독성 실험을 실시하였다. Figure 9에서 보는 바와 같이 B16F10 세포와 HaCaT 세포 모두 오존에 노출된 시간이 증가할수록 세포의 생존율이 감소함을 알 수 있었다.

특정 물질에 의해서 오존에 대한 세포 손상 억제 효과를 평가하기 위해 항산화제를 첨가한 상태에서 오존에 노출시켜 본 결과 Figure 10과 11에 나타나듯이 catechin과 quercetin이 모두 오존에 의한 세포 손상을 효과적으로 막아주는 것으로 나타났다. 특히 quercetin의 경우, 그 보호 효과가 catechin보다 높은 것으로 나타났다. 이런 결과를 미루어 보아 오존에 의해 세포 손상이 유발되며 이러한 세포손상은 항산화제 처리에 의해 어느 정도 보호될 수 있음을 알 수 있다.

3.4.2. 오존에 의한 세포내 손상 관찰

세포에 오존 처리를 할 경우 오존의 영향이 실제로 세

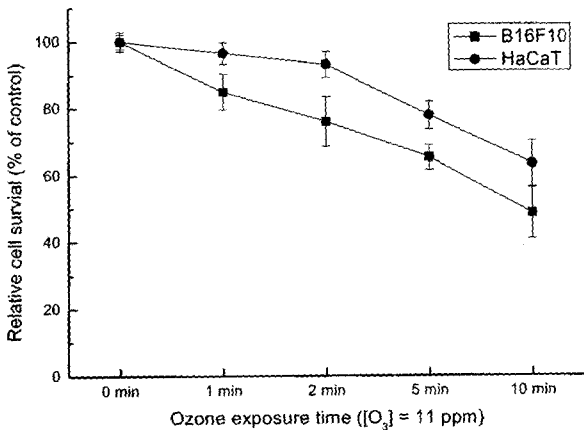


Figure 9. Cell viability depends on ozone exposure time.

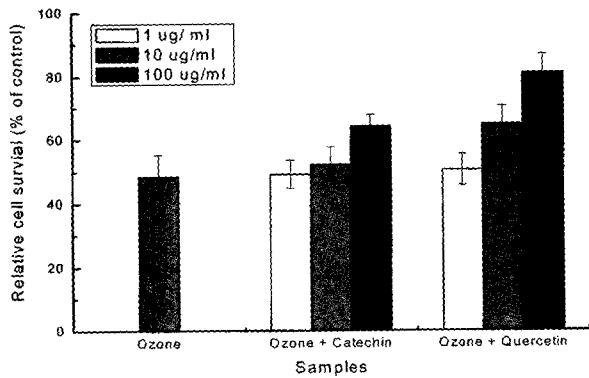


Figure 10. Protective effects of antioxidants on viability of B16F10 cells exposed to ozone (cells were exposed to 11 ppm ozone for 10 min).

포막 이외에 세포내에서도 일어나는지를 알아보기 위해 형광탐자인 CFDA 형광의 감소를 측정하였다. 오존에 의해 세포내에서도 손상이 일어난다면, 오존이나 오존에 의해 만들어지는 산화제에 의해 CFDA가 손상을 입어 그 형광이 감소할 것으로 추측할 수 있는 데, Figure 12에서 보는 것과 같이 오존처리 후 시간이 증가할수록 CFDA의 형광이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이로 미루어 보아 오존에 의해 세포막뿐만 아니라 세포내에서도 그 손상이 일어난다고 판단할 수 있으며 오존이나 오존에 의해 만들어지는 활성산소나 또는 세포의 생체물질과의 반응으로 만들어지는 산화제가 세포의 손상을 유발시키는 것으로 판단할 수 있다.

3.4.3. 오존에 의한 세포사멸 기작의 규명

세포에 오존을 처리할 경우, 세포사멸이 괴사(necrosis)나 자살사(apoptosis)인지를 판단하기 위해 Vybrant Apoptosis Assay Kit(Molecular Probes, Inc)를 이용하였다.

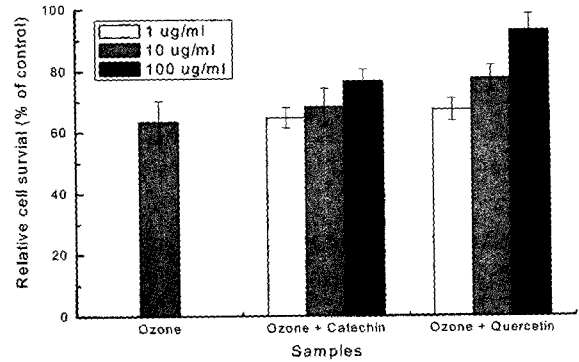


Figure 11. Protective effects of antioxidants on viability of HaCaT cells exposed to ozone (cells were exposed to 11 ppm ozone for 10 min).

세포자살의 초기단계에서 phosphatidylserine이 세포막의 외막으로 노출되며 이는 annexin V라는 지질결합단백질에 의해 선택적으로 결합하게 된다. 외부에서 FITC라는 형광물질이 결합되어 있는 annexin V를 처리할 경우, 세포자살을 일으키는 세포는 녹색의 형광을 띄게 된다. 또한, 세포괴사의 경우에는 세포막이 손상되어 막의 투과성이 급격히 증가하게 되는데, 살아있는 세포의 막을 투과할 수 없는 propidium iodide라는 DNA 결합 형광물질이 세포내로 들어가 핵을 염색시키며 FITC-annexin V 또한 세포내로 유입되어 세포의 막을 염색시키는데, 이를 이용함으로써 괴사를 일으키는 세포를 염색할 수 있다.

사람유래의 피부세포주인 HaCaT 세포에 오존 처리를 할 경우, 시간에 따라 Figure 13에서 보는 것과 같이 자살사나 괴사가 일어나는 것을 관찰하였다. 오존에 대한 노출 시간이 증가할 경우 세포사는 세포괴사의 형태를 띠는 것을 알 수 있었으며 짧은 노출 시간의 경우에는 약 2~3시간부터 세포자살이 나타나며 3시간 이후부터는 세포괴사도 같이 관찰되었다. 이런 결과를 미루어 보아 오존에 의해 피부세포는 처리한 오존의 농도에 따라 세포괴사나 세포자살을 일으키는 것으로 보이며, 이는 오존이 피부세포에 심각한 손상을 입힌다는 것을 단적으로 말해 준다.

3.4.4. 추출물의 오존에 대한 세포 독성 방어 효과

오존에 대한 세포 보호 효능을 가지는 유효 추출물을 탐색하기 위해 일정 농도의 오존(11~12 ppm)을 처리한 세포(각질화세포, HaCaT)를 이용하여 세포 손상의 정도를 MTT 시험법으로 세포의 생존율로 확인하였다. 오존을 처리한 경우 세포의 손상을 확인할 수 있으며, 오존에 대한 세포 보호능을 가지는 유효 추출물의 경우에는 오존을 처리하지 않은 대조군의 생존율에 가까운 것을 확인할 수 있었다. 유효 추출물의 오존에 대한 세포 보호

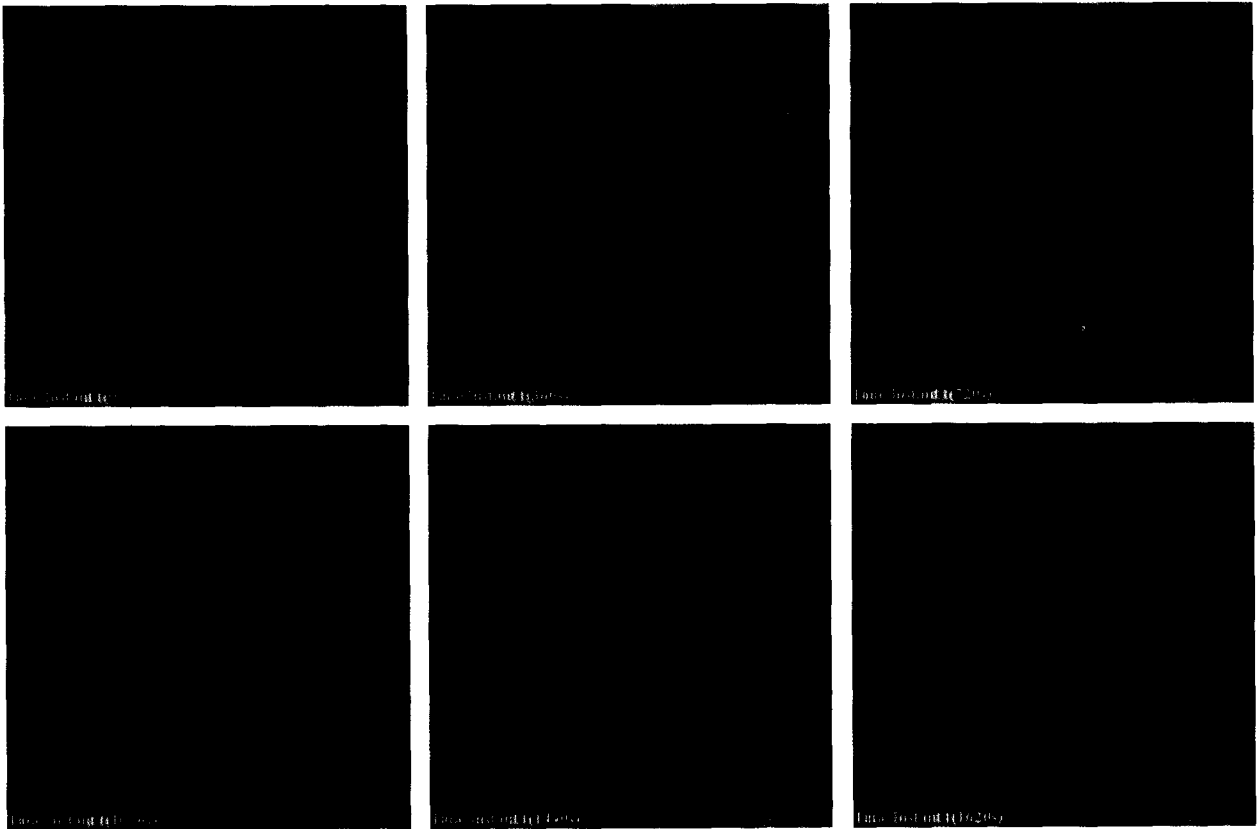


Figure 12. Decay of fluorescence of CFDA in cells by ozone treatment.

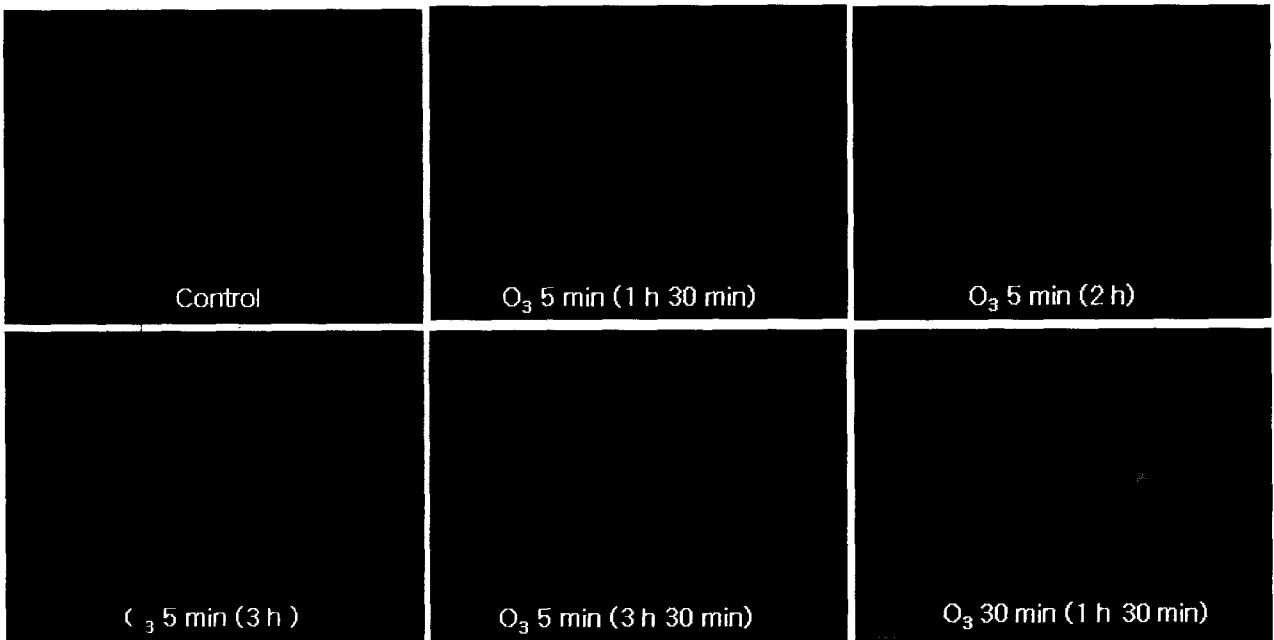


Figure 13. Death of HaCaT cell exposed to ozone (confocal laser scanning microscopy). Green; annexin v-FITC conjugate, Red ; propidium iodide / Green-apoptosis, Green+Red-necrosis.

Table 4. Effects of Plant Extracts on Cell's Viability Exposed to Ozone

Extracts (100 ug/mL)	Cell viability (%)	Extracts (100 ug/mL)	Cell viability (%)
<i>Green tea</i>	91.3	<i>Alangium platanifolium</i> , stems	72.6
<i>Rosa davurica</i> , fruit	88.9	<i>Codonopsis pilosula</i> , leaves	71.8
<i>Ligularia sibirica</i>	86.4	<i>Berberis koreana</i> , stems	66.5
<i>Rosa davurica</i> , leaves	85.3	<i>Pleuropterus multiflorus</i>	64.8
<i>Lespedeza bicolor</i> , leaves	82.1	<i>Pteridium aquilinum</i>	60.7
<i>Lespedeza bicolor</i> , stems	80.9	<i>Zanthoxylu piperitum</i> , leaves	59.4
<i>Sanguisorba officinalis</i>	80.8	<i>Aralia elata</i>	56.1
<i>Zanthoxylum schinifolium</i> , leaves	79.4	<i>Cirsium setidens</i>	51.3
<i>Ginkgo biloba</i> , leaves	78.9	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	50.7
<i>Juglans mandshurica</i> , roots	78.6	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> , stems	50.2

효과를 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\left(\frac{E_{MTT} - O_{MTT}}{C_{MTT} - O_{MTT}} \times 100 \right)$$

E_{EPR} : 추출물 첨가시 MTT 흡광치
 C_{EPR} : 대조군 MTT 흡광치
 O_{MTT} : 오존 단독처리시 MTT 흡광치

본 연구진이 보유하고 있는 총 420여 가지의 천연 추출물을 대상으로 오존에 의한 세포의 손상을 어느 추출물이 방어할 수 있는지를 평가한 결과 녹차 추출물이 가장 높은 세포 보호능을 나타냈으며 총 12 종의 추출물이 70% 이상의 세포 보호능을 나타냈었다(Table 4). Table 4에 오존에 대해 상위 20위권의 세포 보호능을 지닌 추출물을 나타내었다.

3.5. 유효 추출물의 오존에 대한 피부 각질층 ascorbic acid 및 α -tocopherol 손실 방어 효과

3.5.1. 오존에 의한 피부 각질층 ascorbic acid 및 α -tocopherol 손실

오존에 의한 피부 손상 및 유효 추출물의 방어 효과를 알아보기 위하여 피부 각질층에 함유되어 있는 대표적인 항산화제인 ascorbic acid와 α -tocopherol의 함량을 조사하였다. 10 ppm의 오존을 피부에 1시간 처리한 후 tape-stripping 기법을 획득한 각질층에 함유되어 있는 ascorbic acid의 함량은 161 ± 29 pmol/mg으로 오존을 처리하지 않은 피부 각질층의 357 ± 19 pmol/mg보다 급격히 감소함을 알 수 있었다. 각질층의 α -tocopherol 함량 또한 대조군은 8.4 ± 1.3 pmol/mg이었으나, 오존을 처리한 경우에는 0.7 ± 0.3 pmol/mg으로 거의 대부분 손실된 것으로 밝혀졌다(Figure 14, Table 5). 오존을 처리한 피부 각질층의 항산화제인 ascorbic acid와 α -tocopherol의 함량이 급격히 감소한 것으로 미루어 보아 오존이 피부에 심

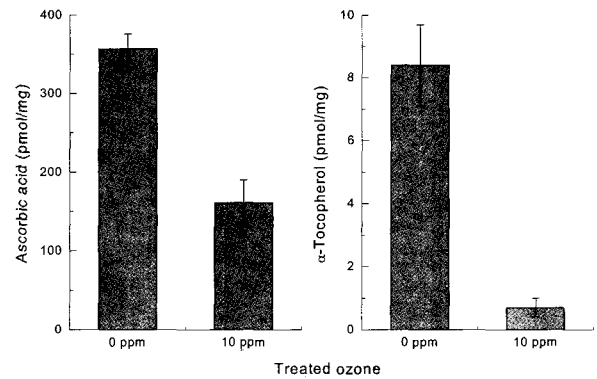


Figure 14. Concentration of ascorbic acid and α -tocopherol in stratum corneum exposed to ozone.

각한 산화적 스트레스를 유발시키며 이로 인해 피부가 손상을 받는다는 것을 확인할 수 있었다.

3.5.2. 오존에 의한 피부손상을 방어하는 유효 추출물의 선별

오존에 의한 피부손상을 방지하는 유효 추출물을 선별하기 위해 오존 처리 전 추출물을 피부에 도말하여 그 영향을 확인하여 보았다. 결과(Figure 15, Table 6)에서 보듯이 녹차, 생열귀, 곰취나물 순으로 ascorbic acid의 손실을 방어해주는 것으로 실험 결과 밝혀졌으며, α -tocopherol의 경우에는 녹차, 오이풀, 생열귀 순으로 그 손실을 방어해 주었다. 오존에 의한 피부 각질층내 ascorbic acid의 손실을 방어해 주는 추출물은 대부분 α -tocopherol의 손실도 상당수준 방어해 주는 것으로 나타났다. 이를 미루어 보아 녹차, 생열귀, 곰취나물의 추출물은 오존에 의한 심각한 피부 손상을 방어해줄 수 있는 것으로 판단되며 이를 오존에 의한 피부 손상방지의 화장품 원료로 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 5. Concentration of Ascorbic Acid and α -Tocopherol in Stratum Corneum Exposed to Ozone

Treated concentration	Concentration in stratum corneum (pmol/mg)	
	Ascorbic acid	α -Tocopherol
0 ppm	357 \pm 19	8.4 \pm 1.3
10 ppm	161 \pm 29	0.7 \pm 0.3

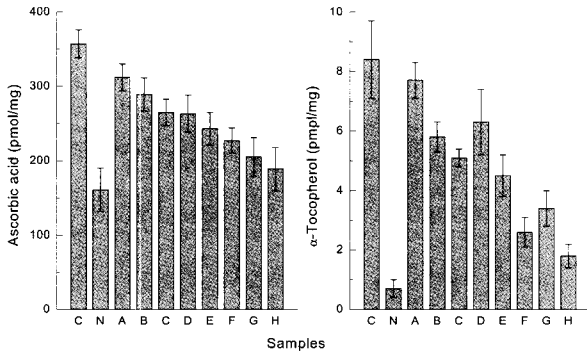


Figure 15. Effect of plant extracts on concentration of ascorbic acid and α -tocopherol in stratum corneum exposed to ozone C: 0 ppm ozone, N, A-H: 10 ppm ozone, A: Green tea. B: *Rosa davurica*, C: *Ligularia sibirica*, D: *Sanguisorba officinalis*, E: *Zanthoxylum schinifolium*, leaves, F: *Pteridium aquilinum*, G: *Lycium chinense*, H: *Cinnamomum zeylanicum*.

4. 결 론

총 420여 가지의 천연 추출물을 대상으로 EPR을 이용한 추출물의 항산화 활성 측정 실험 결과 녹차 추출물이 superoxide radical에 대해 가장 높은 항산화 활성을 나타냈으며 총 15종의 추출물이 70% 이상의 항산화 효과를 나타냈었다. 특히 표준 항산화제로 사용되고 있는 ascorbic acid (약 70%의 항산화능)보다 높은 항산화 활성을 나타낸 추출물은 총 11종이나 되었다. 또한 hydroxy radical에 대한 항산화 활성 측정 결과 곰취 추출물이 superoxide radical에 대해 가장 높은 항산화 활성을 나타냈으며 곰취, 도인, 도깨비바늘 등 총 3종의 추출물이 50% 이상의 항산화 효과를 나타내었다. 더덕, 도라지, 녹차, 딱총나무, 토사자, 가시나무 등 총 6종의 추출물은 40% 대의 항산화 활성을 지니고 있음이 밝혀졌다. 특히 곰취, 녹차, 생열귀, 곤드레, 가래나무 등은 superoxide radical과 hydroxy radical 모두에 좋은 항산화능을 지니고 있는 것으로 밝혀졌다.

오존에 의한 피부유해성을 확인하기 위하여 세포의 구성분인 단백질, 지질에 대한 오존의 유해성을 확인하였다.

Table 6. Effect of Plant Extracts on Concentration of Ascorbic Acid and α -Tocopherol in Stratum Corneum Exposed to Ozone

Treatment	Concentration in stratum corneum (pmol/mg)	
	Ascorbic acid	α -Tocopherol
0 ppm	357 \pm 19	8.4 \pm 1.3
-	161 \pm 29	0.7 \pm 0.3
Green tea	312 \pm 18	7.7 \pm 0.6
<i>Rosa davurica</i>	289 \pm 22	5.8 \pm 0.5
<i>Ligularia sibirica</i>	265 \pm 18	5.1 \pm 0.3
10 ppm <i>Sanguisorba officinalis</i>	263 \pm 25	6.3 \pm 1.1
<i>Zanthoxylum schinifolium</i> , leaves	243 \pm 22	4.5 \pm 0.7
<i>Pteridium aquilinum</i>	227 \pm 17	2.6 \pm 0.5
<i>Lycium chinense</i>	205 \pm 26	3.4 \pm 0.6
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	189 \pm 29	1.8 \pm 0.4

오존은 단백질, 지질 및 핵산에 손상을 입히는 것으로 밝혀졌으며 이러한 손상은 표준 항산화제인 ascorbic acid, catechin, quercetin에 의해 상당부분 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이로써 오존이 피부 유해성을 가짐을 확인할 수 있었다. 총 420여 종의 천연물을 대상으로 오존에 대한 지질산화, 단백질 및 핵산 손상 억제 효과를 탐색한 결과 지질산화 억제 효과에서는 초피잎, 향나무, 생열귀, 곤드레 등이 좋은 효능을 가지고 있음이, 단백질 손상 억제제의 경우에는 생열귀, 녹차, 오가피잎, 가시나무, 더덕, 도라지, 토사자, 마, 마로니에, 딱총나무, 신타나무잎 등 총 11종이, 핵산 손상 억제 효능 평가에서는 생열귀, 녹차, 오가피잎, 신타나무잎, 도인 등 총 5종이 효과적으로 방어해 주는 것으로 밝혀졌다. 또한 세포 손상에 대한 유효 추출물로는 녹차 추출물이 가장 높은 세포 보호능을 나타냈으며 총 12종의 추출물이 70% 이상의 세포 보호능을 나타내었다. 유해산소에 대한 항산화 활성 효과 측정 결과와 지질산화, 단백질 및 핵산 손상 억제 효과에서 우수한 효능을 나타낸 녹차, 생열귀, 곰취, 오이풀 산초 등 총 8종의 유효 추출물을 오존에 대한 피부 손상을 방지하는 추출물로 선별하였다. 녹차, 생열귀, 곰취, 오이풀, 산초 등 총 8종의 추출물을 대상으로 오존에 의한 피부 각질층의 손상을 방지 효과를 평가한 결과 피부 각질층에 심각한 손상을 입히는 것으로 나타났으며, 이러한 피부 각질층의 손상을 녹차, 생열귀, 곰취, 오이풀, 산초 등 총 5종의 추출물이 효과적으로 방어해주는 것으로 확인되었다.

오존이 피부손상에 미치는 기작은 현시점에서 기초연

구 수준의 결과가 정립되어 확인된 학술적인 측면의 결론이기에 아직 이를 응용한 산업화 기술은 전 세계적으로 시작 단계에 불과하다고 할 수 있으며, 현재 프랑스의 로레알사와 스위스의 인두캄사 두 곳만 오존에 대한 피부 손상 방지 기술을 확보하고 있다. 그러나 대기오염에만 초점을 맞추어 개발된 화장품의 종류는 거의 없으며 대기오염물질을 녹이는 클렌징 크림정도만이 개발된 수준이다. 특히, 오존의 피부손상 방어를 위한 제품은 아직 개발되어 있지 않은 실정이다.

이러한 현실을 감안하면 본 연구를 토대로 선별된 추출물은 오존에 의한 피부 손상을 방지하는 피부외용제의 소재로 개발이 가능하며 사계절이 뚜렷한 국내의 기후에 적합한 자생식물로부터 오존에 의한 피부 손상을 방지하는 피부 외용제의 소재를 제품에 적용하면 미국, 유럽 등지의 관련 선진 업체의 기술과 소재 모두를 차별화하여 당당하게 경쟁할 수 있는 기술적인 위치를 점하게 되고, 제품의 경쟁력과 차별성의 확보도 대단히 용이할 것이라 사료된다. 이는 아시아 시장을 넘어 미국, 유럽 등지의 관련산업 선진국의 시장에도 접근이 가능하며 더구나 오존은 선진국형의 대기오염물로 선진국의 대도시일수록 심하여 이러한 제품의 실덕력은 더 강하게 작용할 것이다. 또한 기능성 화장품 시장의 폭발적인 증가와 환경과 건강에 대한 소비자의 변화에 발맞추어 세계 시장에서도 영속적으로 독점적인 시장을 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

감 사

이 연구는 “『대기오염에 의한 피부손상을 방어하는 항산화 소재의 개발』에 관한 중소기업기술혁신개발사업”(개발기간: 2003. 4. 1~2004. 3. 31) 과제외 기술개발결과 중 일부이며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. R. Bilgin, S. Gul, and S. S. Tukul, Effects of sulfhydryl compounds on the inhibition of erythrocyte membrane $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase by ozone, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **47** 227 (1999).
2. J. B. Mudd, P. J. Dawson, J. R. Adams, J. Wingo, and J. Santrock, Reaction of ozone with enzymes of erythrocyte membranes, *Arch. Biochem. Biophys.* **335** 145 (1996).
3. B. S. Berlett, R. L. Levine, and E. R. Stadtman, Comparison of the effects of ozone on the modification of amino acid residues in glutamine synthetase and bovine serum albumin, *J. Biol. Chem.* **271** 4177 (1996).
4. J. B. Mudd, P. J. Dawson, S. Tseng, and F. P. Liu, Reaction of ozone with protein tryptophans: band III, serum albumin, and cytochrome C, *Arch. Biochem. Biophys.* **338** 143 (1997).
5. T. Frischer, A. Pullwitt, J. Kuhr, R. Meinert, N. Haschke, M. Studnicka, and G. Lubic, Aromatic hydroxylation in nasal lavage fluid following ambient ozone exposure, *Free Radic. Biol. Med.* **22** 201 (1997).
6. A. Hemmingsen, J. T. Allen, S. Zhang, J. Mortensen, and M. A. Spiteri, Early detection of ozone-induced hydroperoxides in epithelial cells by a novel infrared spectroscopic method, *Free Radic. Res.* **31** 437 (1999).
7. W. A. Pryor, G. L. Squadrito, and M. Friedman, The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products, *Free Radic. Biol. Med.* **19** 935 (1995).
8. M. Foksinski, K. Bialkowski, M. Skiba, I. Ponikowska, W. Szmurlo, and R. Olinski, Evaluation of 8-oxodeoxyguanosine, typical oxidative DNA damage, in lymphocytes of ozone-treated arteriosclerotic patients, *Mutat. Res.* **438** 23 (1999).
9. J. J. Thiele, M. Podda, and L. Packer, Tropospheric ozone: an emerging environmental stress to skin, *Biol. Chem.* **378** 1299 (1997).
10. J. J. Thiele, M. G. Traber, K. Tsang, C. E. Cross, and L. Packer, *In vivo* exposure to ozone depletes vitamins C and E and induces lipid peroxidation in epidermal layers of murine skin, *Free Radic. Biol. Med.* **23** 385 (1997).
11. G. Valacchi, S. U. Weber, C. Luu, C. E. Cross, and L. Packer, Ozone potentiates vitamin E depletion by ultraviolet radiation in the murine stratum corneum, *FEBS Lett.* **466** 165 (2000).
12. G. Valacchi, E. Pagnin, A. M. Corbacho, E. Olano, P. A. Davis, L. Packer, and C. Cross, *In vivo* ozone exposure induces antioxidant/stress-related responses in murine lung and skin, *Free Radic. Biol. Med.* **36** 673 (2004).
13. G. Valacchi, E. Pagnin, T. Okamoto, A. Corbacho, E. Olano, P. Davis, A. Vilet, L. Packer, and C. Cross, Induction of stress proteins and MMP-9 by 0.8 ppm of ozone in murine skin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305** 741 (2003).

14. S. Weber, J. Thiele, C. Cross, L. Packer, and Vitamin C, Uric acid, and glutathione gradients in murine stratum corneum and their susceptibility to ozone exposure, *J. Invest. Dermatol.* **113** 1128 (1999).
15. J. Thiele, M. Traber, M. Podda, K Tsang, C. Cross, and L. Packer, Ozone depletes tocopherols and tocotrienols topically applied to murine skin, *FEBS lett.* **401** 167 (1997).
16. J. Thiele, M. Traber, T. Polefka, C. Cross, and L. Packer, Ozone-exposure depletes vitamin E and induces lipid peroxidation in murine stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.* **108** 753 (1997).
17. J. Thiele, M. Traber, M. Podda, K Tsang, C. Cross, and L. Packer, *In vivo* exposure to ozone depletes vitamins C and E and induces lipid peroxidation in epidermal layers of murine skin, *Free Rad. Biol. Med.* **23** 385 (1997).