

사람 섬유아세포에서 UVB 조사에 대한 능소화 추출물의 항산화 효과

김진화[#] · 이범천 · Yong He Zhang* · 표형배

한불화장품 기술연구소, *Department of Pharmacology, Peking University

(Received February 4, 2005; Revised March 16, 2005)

Effect of *Campsis grandiflora* on Antioxidative Activity in UVB-irradiated Human Dermal Fibroblasts

Jin Hwa Kim[#], Bum Chun Lee, Yong He Zhang* and Hyeong Bae Pyo

Hanbul Cosmetics, R&D Center 72-7, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk 369-830, Korea

*Department Of Pharmacology, School of Basic Medical Science, Peking University, 38 Xueyuan Road, Beijing 100083, China

Abstract — The human skin is constantly exposed to environmental irritants such as ultraviolet, smoke, chemicals. Free radicals and reactive oxygen species (ROS) caused by these environmental facts play critical roles in cellular damage. These irritants are in themselves damaging to the skin structure but they also participate the immensely complex inflammatory reaction. The purpose of this study was to investigate the skin cell protective effect of *Campsis grandiflora* extract on the UVB-irradiated human dermal fibroblasts (HDFs). We tested free radical and superoxide scavenging effect *in vitro*. *C. grandiflora* extracts had potent radical scavenging effect by 82% at 100 µg/ml, respectively. For testing intracellular ROS scavenging activity the cultured HDFs were analyzed by increase in DCF fluorescence upon exposure to UVB 20 mJ/cm² after treatment of *C. grandiflora* extracts. The results showed that oxidation of CM-DCFDA was inhibited by *C. grandiflora* extracts effectively and *C. grandiflora* extracts has a potent free radical scavenging activity in UVB-irradiated HDFs. In ROS imaging using confocal microscope we visualized DCF fluorescence in HDFs directly. In conclusion, our results suggest that *C. grandiflora* can be effectively used for the prevention of UV-induced adverse skin reactions such as radical production, and skin cell damage.

Keywords □ *Campsis grandiflora*, fibroblast, anti-oxidation, free radical scavenging, UVB

자외선, 약물, 환경오염물질과 같은 여러 가지 외부 요인 및 그 외의 여러 가지 이유에 의해서 몸 안에 활성산소 중의 양이 크게 늘어 날 경우 생명체는 산화적 스트레스를 받아 세포 사멸, 질병 발생 그리고 세포의 노화를 일으키게 된다. 즉, 활성산소 중의 생성과 세포의 항산화력 간의 균형이 산화적 스트레스를 결정하게 되고, 산화적 스트레스는 세포내 단백질, 지질 및 DNA에 손상을 입히게 된다. 일반적으로 세포는 항상성 유지를 위하여 자체적으로 항산화제의 생산과 산화에 의한 손상의 복구 작업을 가지지만, UV, 흡연, 공해물질, 중금속 등의 물리, 화학적인 외부환경에 의해 세포 내 작용에 이상이 초래하거나 활성산소의 생성이 방어제의 용량을 초과할 정도로 과생성될 경우 산화스트

레스가 야기되며, 피부의 노화를 촉진시키게 된다.

태양광선과 산소는 피부세포에 자유라디칼(free radical)과 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성시켜 DNA의 손상과 세포막 지질의 과산화를 유발한다. 또한 콜라겐과 엘라스틴과 같은 세포 외 기질을 파괴, 또는 비정상적인 교차결합 유발에 관여하는 효소(matrix metalloproteinase, MMPs)의 발현에 영향을 주어, 결합조직을 손상시킨다.¹⁻⁶⁾

능소화는 쌍떡잎식물 능소화과의 낙엽성 덩굴식물로 원산지는 중국이며, 금동화라고 부르기도 하고, 한자 이름으로 '자위' '등라화'가 있다. 서양에서는 능소화를 '차이니즈 트럼펫 클리퍼 (Chinese trumpet creeper)'라고 부르기도 한다. 정원수로 많이 쓰이고 한방에서는 꽃을 사용하며, 피부소양, 풍진발흥, 좌창, 및 어혈과 혈열로 인한 질병에 효과가 있다고 한다. Jin 등은 능소화의 잎으로부터 triterpenoids 성분을 분리하여 혈소판 억제 작용에 대하여 연구하였으며, 그 외에 iridoids와 phenyl propanoid

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 043-879-2282 (팩스) 043-881-2128
(E-mail) jinhwa29@hanmail.net

glycosides를 분리한 예가 보고되었으나,⁷⁾ 사람 피부세포에 대한 자외선으로부터의 보호 효과에 대한 연구 예는 거의 보고되지 않았다.

본 연구는 능소화추출물의 항산화효과와 자외선에 의해 유발되는 자유라디칼 생성 저해 효과 등을 검색하여 다양한 생리활성 효과와 피부세포의 보호 효과 소재로서 이용하고자 하였다.

실험 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 능소화(*Campsis grandiflora*)는 중국 북경 대학에서 제공 받아 사용하였다. 능소화 100 g을 분쇄하여 50% EtOH 1000 ml로 환류시키면서 3시간씩 2회 반복 추출하고 감압 농축, 동결 건조하여 그 분말을 사용하였다.

세포내 free radical 확인을 위해 5-(6-) chloromethyl-2',7'-dichloro-dihydro-fluoresceindiacetate(CM-H₂DCFDA)는 Molecular Probe사(Eugene, OR, USA)에서 구입하였고, 형광스펙트로포토미터(luminescence spectrophotometer, Perkin Elmer, UK) 및 flow cytometry(FACS Calibur-S System, Becton Dickinson, NJ, USA), Leica DM IRE2 inverted microscope(Leica, Germany)로 측정하였다. Butylated hydroxytoluene(BHT), epigallocatechin-3-gallate(EGCG)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

DPPH에 의한 자유라디칼 소거 효과

자유라디칼 소거 효과 측정은 0.1 mM, DPPH(2,2-Di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl radical)에 실험원료를 농도별로 동량을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.⁸⁾

Superoxide radical 소거 효과

Xanthine, xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical를 소거하는 효과를 SOD Test Wako 방법에 의해 측정하였다.⁹⁾ 0.05 M Na₂CO₃ buffer(pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 능소화추출물을 가한 후 25°C에서 10분간 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/ml xanthine oxidase를 가하고 25°C에서 25분 동안 반응 후 superoxide radical 소거 효과를 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 배양(Cell culture)

신생아의 포피조직에서 분리한 human dermal fibroblast(HDF)는 Modern Tissue Technology(MTT, Korea)로부터 구입하였다. 구입한 HDF를 Dulbecco's Modified Eagle's Media(DMEM)/F12(3:1) 배지에 10% fetal bovine serum(FBS), 1%

penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 6~10세대 세포를 실험에 이용하였다.

Free radical scavenging activity in Human Dermal Fibroblasts(Microtiter plate assay)

섬유아세포(Human dermal fibroblasts, HDFs)를 96 well plate에 1×10⁵/m로 분주하여 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양한다. 자외선(UVB) 조사 전에 배양 배지를 제거한 후 HCSS(HEPES-buffered control salt solution : 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂, 2.3 mM CaCl₂, 15 mM Glucose, 20 mM HEPES, 10 mM NaOH)로 세척하여 배지 내 serum 성분을 제거하였다. 4 μM CM-H₂DCFDA in HCSS with 0.1% Pluronic F-127(Molecular Probe)를 빛이 들어가지 않도록 주의하여 처리한 후 37°C 20분 반응시킨 후 농도 별로 처리해 준다. 37°C 30분 반응시킨 후 20 mJ/cm² UVB(UVB G15T8E, Sankyo Denki, Japan)를 조사하였다. 모든 시료를 처리 후 37°C에서 반응시켜 Luminescence Spectrophotometer를 사용하여 DCF(Ex=488 nm; Em=525 nm)에 의한 세포내 형광값을 측정하였다.¹⁰⁻¹²⁾

Flow cytometry assay

섬유아세포를 6 well plate에 1×10⁵/m로 분주하여 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양한 후 능소화 추출물을 적정 농도별로 세포 배양액에 처리하여 1시간 배양한다. 자외선(UVB) 조사 전에 배양 배지를 제거한 후 HEPES-buffered control salt solution(HCSS)으로 세척하여 배지 내 serum 성분을 제거하였다. 자외선 조사를 위하여 배지를 제거하고 세포를 세척한 후 각 dish에 PBS를 1 ml씩 채워 자외선(UVB)은 조사량을 증가시키면서 조사하였다. Trypsin을 처리하여 세포를 떼어낸 후 HCSS로 washing하면서 세포를 잘 혼합하고 500 rpm, 3분 원심 분리 후 1 μM CM-H₂DCFDA 처리하고 빛을 차단하여 37°C 20분 반응시킨 후 유세포 분류기를 사용하여 DCF(Ex=488 nm; Em=525 nm)에 의한 세포내 형광값을 측정하였다.¹⁰⁻¹³⁾

ROS imaging using confocal microscope

섬유아세포를 cover slip에 1×10⁵/m로 분주하여 배양 후 능소화 추출물을 농도별로 희석하여 세포 배양액에 처리하고 1시간 동안 배양한다. 자외선(UVB) 조사 전에 배양 배지를 제거한 후 HEPES-buffered control salt solution(HCSS)으로 세척하여 배지 내 serum 성분을 제거하였다. 자외선 조사를 위하여 배지를 제거하고 세포를 세척한 후 각 dish에 PBS를 1 ml씩 채워 자외선(UVB)의 조사량을 증가시키면서 조사한 후 1 μM CM-H₂DCFDA를 처리하고 빛을 차단하여 37°C 20분 반응시킨 후 Leica

DM IRE2 inverted microscope(Leica, Germany)를 사용하여 라디칼에 의해 녹색 형광을 나타내는 세포를 직접 관찰하였으며, background signal을 최소화하기 위해 20×HCX FLUOTA lens/TCS-SP2 confocal system(Leica, Germany)으로 illumination 후 3초 이내에 촬영하였다.

자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

피부 유해 라디칼 소거 효과

활성산소는 체내 각종 세포들의 여러 대사과정에서 끊임없이 생성되며, 자외선 및 외부환경에 의해서도 세포내에서 발생된다. 활성산소와 지질이 반응하면 과산화 지질이 생성되어 혈관벽이나 세포막의 구조가 파괴되어 조직이 손상된다. 이런 산화반응에서 활성산소에 의해 피부노화가 가속화되며, 활성산소의 프리라디칼에 대한 피부보호효과를 측정하기 위해 프리라디칼인 DPPH에 대한 라디칼소거효과와 xanthine oxidase가 xanthine과 반응하여 uric acid로 전환되고 이때 생성되는 O²⁻ (superoxide radical)를 소거하는 효과를 평가하였다.¹⁴⁻¹⁶ 능소화추출물의 농도별 프리라디칼 소거효과를 측정한 결과 100 µg/ml 실험 농도에서 82%의 우수한 프리라디칼 소거효과를 나타내었다(Fig. 1). 또한, 능소화추출물은 100 µg/ml에서 81%의

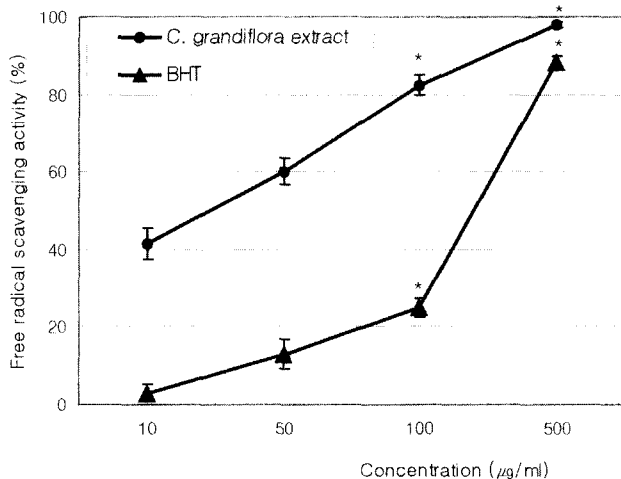


Fig. 1 – Free radical scavenging activity (DPPH method). BHT was used as a positive control. The activity indicated by percentage of increase in comparison with that of control. The activity is significant (*p<0.05) and the values are mean±S.E. from 5 individual experiments.

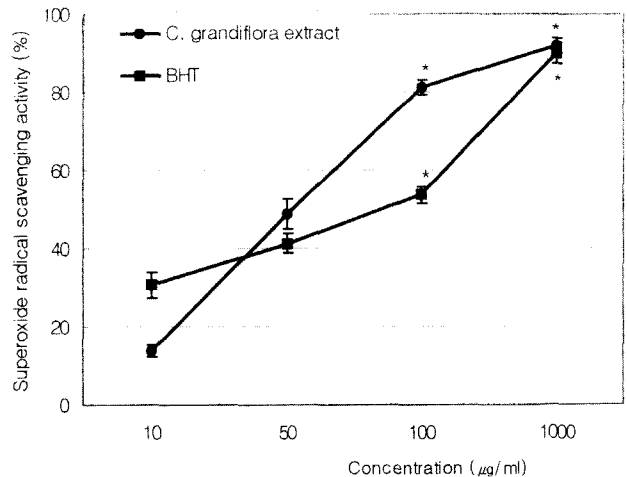


Fig. 2 – Superoxide scavenging activity (NBT method). BHT was used as a positive control. The activity indicated by percentage of increase in comparison with that of control. The activity is significant (*p<0.05) and the values are mean±S.E. from 5 individual experiments.

우수한 항산화 효과를 나타내었으며, 세포에 유해효과를 나타내는 라디칼인 O²⁻ 소거효과도 BHT보다 우수하게 나타났다 (Fig. 2).

Free radical scavenging activity in HDFs

DCFH의 산화로 생성된 DCF의 형광값을 측정한 실험으로 세포내에 생성된 과산화수소나 산화적 스트레스를 실험하였다. DCFH는 hydroxyl radical, nitrogen oxide radical(NO²), thiyl radical, bicarbonate radical anion 등에 의해 산화된다. DCFH는 apoptosis 동안 세포내 산화적 스트레스를 평가하는데 사용되어져 왔으며, H₂O₂나 자외선에 의해 생성된 라디칼 및 세포내 신

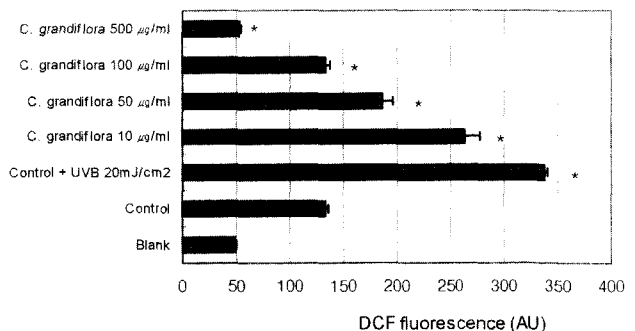


Fig. 3 – Effect of *C. grandiflora* extract on the production of intracellular ROS in human dermal fibroblasts. HDFs were incubated with 4 µM CM-H₂DCFDA for 20 min, and irradiated by UVB 20 mJ/cm². ROS generation was assessed by luminescence spectrophotometer. The values of DCF fluorescence is significant (*p<0.05) and the values are mean±S.E. from 5 individual experiments.

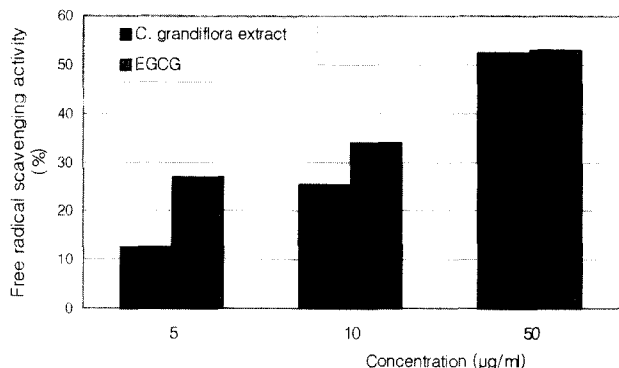


Fig. 4 – Free radical scavenging activity of *C. grandiflora* extract and EGCG after UV irradiation in human dermal fibroblasts (HDFs). *C. grandiflora* extract reduced the UVB-induced fluorescence increase in the dose dependent manner. EGCG was used as a positive control.

호전달과 관련된 연구에 최근 사용되고 있다.¹⁷⁾ 형광 스펙트로포도미터를 이용하여 세포가 well plate에 부착되어 살아있는 상태에서의 형광값을 측정된 결과, 세포가 없는 CM-H₂DCFDA 용액 상태의 형광값이 약 50 AU 정도의 값으로 나타났으며, 섬유아세포(HDFs)를 배양함으로써 세포자체의 생리작용에 의한 기본적인 형광값이 100~130 AU 정도의 값으로 높아졌으며, 자외선(UVB 20 mJ/cm²) 조사 결과 340 AU 정도로 급격히 증가함을 알 수 있었다. 이러한 조건에서 능소화추출물을 농도 별로 처리한 결과 자외선에 의해 높아졌던 형광값이 농도 의존적으로 다시 감소하였으며(Fig. 3), 이 결과로 자외선 조사군과 비교하여 프리라디칼 소거효과를 분석한 결과 10 µg/ml의 농도에서는 EGCG에 비해 비교적 낮은 효과를 나타내었으나, 능소화 추출물이 50 µg/ml의 농도에서 53% 정도로 EGCG와 비슷하게 우수한 프리라디칼 소거 효과를 나타내었다(Fig. 4).

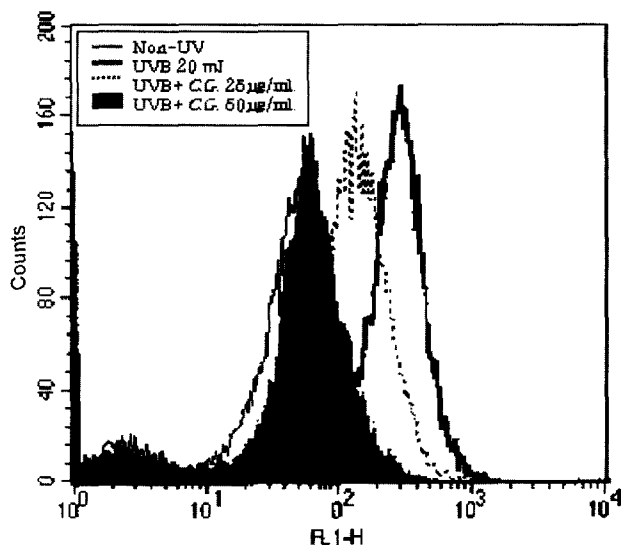


Fig. 5 – DCF fluorescence profile comparing non-UVB with UVB irradiated human dermal fibroblasts (HDFs) and the effect of *C. grandiflora* extract. This panel reports the generation of intracellular ROS after UVB exposure and the effect of the *C. grandiflora* extract 25 µg/ml (···) and 50 µg/ml (■). HDFs were incubated with the *C. grandiflora* extract in the culture medium for 2 hrs. After washing twice the cells were irradiated by a UVB lamp (UVB 20 mJ/cm²) and treated with carboxymethyl-2'7'-dihydrodichloro-fluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA, 1 µM). After 20 min the ROS generation was assessed by flow cytometry, using CM-H₂DCFDA as probe.

Flow cytometry assay

배양세포 각각에 대한 상태와 전체 세포군에서 프리라디칼의 생성 분포를 측정하기 위해 flow cytometry(FACS Calibur-S System, Becton Dickinson, NJ, USA)를 사용하여 형광생성량을 측정된 결과, 자외선 조사 전(—)과 비교하여 UVB 20 mJ을 조

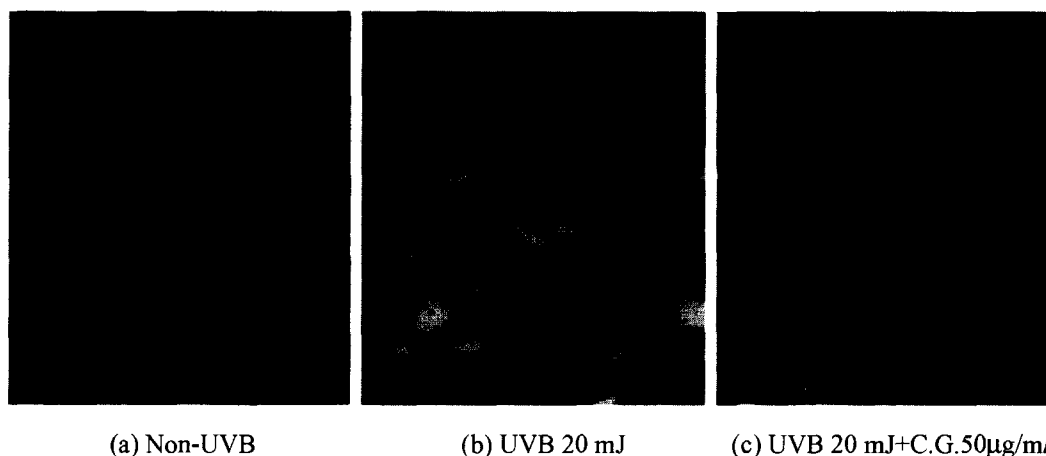


Fig. 6 – Confocal microscopic observation of ROS by CM-H₂DCFDA staining in cultured human dermal fibroblasts (HDFs). (a) Control : HDFs on non-UVB, (b) exposed to 20 mJ/cm² UVB-irradiation, (c) pretreated with 50 µg/ml *C. grandiflora* extract for 2 hrs, followed by treatment with 20 mJ/cm² UVB-irradiation, Magnification : × 400.

사하였을 경우 세포내 형광값이 급속히 증가하여 피크(■)가 오른쪽으로 이동하였으며, 능소화추출물 25 µg/ml 처리 시(○) 자외선에 의해 전체적인 세포분포 피크가 높은 형광을 나타내던 것이 컨트롤에 가까운 쪽으로 이동하는 것을 확인할 수 있었다. 능소화추출물 50 µg/ml 처리 시(■)에는 컨트롤과 거의 비슷하게 이동하는 것으로 나타났다. 또한 cell viability를 측정하여 실험에 사용된 세포의 상태도 정상적으로 살아있음을 확인하였다 (Fig. 5).

ROS imaging using confocal microscopy

DCF는 녹색형광을 나타내는 것으로 실제 세포가 형광을 띠고 있는 상태를 confocal microscope로 관찰하였다. 세포가 살아있는 상태에서 형광을 바로 측정, 촬영해야 하므로 시간이나, 조건이 많은 영향을 미쳤으며, 현미경의 불빛으로도 형광물질의 세기가 강해지므로 3초 이내에 신속히 관찰 및 촬영하였다. 실제로 세포관찰에서도 자외선에 의해 형광값이 강해짐을 볼 수 있었으며, 능소화추출물에 의해 형광 밝기가 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).

피부에 자외선에 조사되면 $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} 와 같은 ROS의 생성이 증가하여 피부손상을 유발시킨다. Superoxide dismutase (SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GSH-Px)와 같은 ROS 소거효소들은 자외선 조사에 의해 유발되는 세포손상에 대해 보호효과가 있다. Bestwick 등¹⁸⁾은 과일이나 야채와 같은 식물에 다량 함유된 quercetin이 세포내에서 ROS에 의해 증가된 DCF 형광값을 줄여주는 효과가 있음을 보고하였으며, 세포생존률과 DNA 손상에 대한 보호효과도 확인하였다. 능소화 꽃의 성분으로는 apigenin 및 기타 배당체, 플라보노이드 등이 함유되어 있다고 알려져 있으며,¹⁹⁾ 이러한 성분들을 함유하여 피부 섬유아세포에서 자외선에 의한 라디칼 생성을 소거시켜주는 효과가 우수하게 나타나는 것으로 추측된다.

결 론

능소화 추출물의 유해 라디칼 소거 효과 실험 결과 프리라디칼 및 superoxide 소거 효과가 우수하게 나타났으며, 세포 내에서 ROS에 의해 형광을 띠는 물질로 전환되는 CM- H_2 DCFDA를 이용하여 ROS의 양을 측정된 결과 자외선에 의해 증가된 세포내 ROS의 양이 능소화추출물을 처리함으로써 50 µg/ml 농도에서 53% 이상의 우수한 소거효과를 나타내었으며, 공초점 현미경을 이용하여 직접 세포내에 나타나는 ROS의 생성량을 형광물질을 이용하여 확인할 수 있었다.

능소화추출물은 자외선 및 외부자극물질에 의해서 발생할 수 있는 피부손상에 대하여 효과적으로 보호할 수 있는 우수한 피부세포 보호소재로 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) Claude, S., Manabu, K., Laura, M. and Lester, P. : Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line. *Free Radical Biol. & Med.* **26**, 174 (1999).
- 2) Naqui, A., Chance, B. and Cadenas, E. : Reactive oxygen intermediate in biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 137 (1986).
- 3) Cadenas, E. : Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 79 (1989).
- 4) Davies, K. J. : Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* **262**, 9895 (1987).
- 5) Park, S. N. : Skin aging and antioxidant. *J. Soc. Cos. Sci. Kor.* **23**, 75 (1997).
- 6) Yaar, M. and Gilchrist, B. A. : Aging versus photoaging: postulated mechanisms and effectors. *J. Investing. Dermatol. Symp. Proc.* **3**, 47 (1998).
- 7) Jin, J. L., Lee, Y. Y., Heo, J. E., Lee, S., Kim, J. M. and Yun-Choi, H. S. : Anti-platelet pentacyclic triterpenoids from leaves of *Campsis grandiflora*. *Arch. Pharm. Res.* **27**(4), 376 (2004).
- 8) Blois, M. S. : Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199 (1958).
- 9) Furuno, K., Akasako, T. and Sugihara, N. : The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Boil. Pharm. Bull.* **25**, 19 (2002).
- 10) Seo, S. Y., Kim, E. Y., Kim, H. and Gwang, B. J. : Neuroprotective effect of high glucose against NMDA, free radical and oxygen-glucose deprivation through enhanced mitochondrial potentials. *J. Neurosci.* **19**(20), 8849 (1999).
- 11) Trayner, I. D., Rayner, A. P., Freeman, G. E. and Farzaneh, F. : Quantitative multiwell myeloid differentiation assay using dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) or dihydro-rhodamine 123 (H₂R123). *J. Immunological Methods* **186**, 275 (1995).
- 12) Lee, B. C., Bae, J. T., Pyo, H. B., Choe, T. B., Kim, S. W., Hwang, H. J. and Yun, J. W. : Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola Frondosa*. *Enzyme Microb. Technol.* **6274**, 1 (2003).
- 13) Ryoo, Y. W., Suh, S. I., Mun, K. C., Kim, B. C. and Lee, K. S. : The effects of the melatonin on ultraviolet-B irradiated cultured dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* **27**, 162 (2001).
- 14) Masaki, H., Sakaki, S., Atsumi, T. and Sakurai, H. : Activeoxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 162 (1995).
- 15) Kuppusamy, P. and Zweier, J. L. : Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **264**, 9880 (1989).

- 16) Ryoo, Y. W., Suh, S. I., Mun, K. C., Kim, B. C. and Lee, K. S. : The effects of the melatonin on ultraviolet-B irradiated cultured dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Science* **27**, 162 (2001).
- 17) Tampo, Y., Kotamraju, S., Chitambar, C. R., Kalivendi, S. V., Keszler, A., Joseph, J. and Kalyanaraman, B. : Oxidative stress-induced iron signaling is responsible for peroxide-dependent oxidation of dichlorodihydrofluorescein in endothelial cells. *Circ. Res.* **92**, 56 (2003).
- 18) Bestwick, C. S. and Milne, L. : Quercetin modifies reactive oxygen levels but exerts only partial protection against oxidative stress within HL-60 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1528**, 49 (2001).
- 19) 육창수 : 생약도감, 도서출판 경원, p. 486 (1997).