

## 자외선으로 유도된 섬유아세포 손상에 대한 해양소재 추출물의 항산화 보호효과

장정희·이찬·김상찬\*·정지욱\*\*·박찬익\*\*\*,†

대구한의대학교 한의과대학 병리학교실, \*대구한의대학교 한의과대학 방제학교실,  
\*\*대구한의대학교 한약재약리학과, \*\*\*대구한의대학교 화장품약리학과  
(2010년 3월 15일 접수, 2010년 3월 20일 수정, 2010년 3월 23일 채택)

### Protective Effect of Marine Natural Products against UVB-induced Damages in Human Skin Fibroblast via Antioxidant Mechanism

Jung-Hee Jang, Chan Lee, Sang-Chan Kim\*, Ji-Wook Chung\*\*, and Chan-Ik Park\*\*\*,†

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daegu Hanny University, Gyeongsangbuk-do 712-230, Korea

\*Department of Herbal Prescription, College of Oriental Medicine, Daegu Hanny University, Gyeongsangbuk-do 712-230, Korea

\*\*Department of Herbal Medicinal Pharmacology, Daegu Hanny University, Gyeongsangbuk-do 712-230, Korea

\*\*\*Department of Cosmeceutical Science, Daegu Hanny University, Gyeongsangbuk-do 712-230, Korea

(Received March 15, 2010; Revised March 20, 2010; Accepted March 23, 2010)

**요약:** 자외선은 생체 내 활성산소 생성 증가와 내인성 항산화 효소 및 항산화제 감소를 통하여 광노화 과정을 촉진하는 대표적인 외부 환경인자로 알려져 있다. 그러므로, 본 연구에서는 12종의 다양한 해양소재 추출물(김, 다시마, 모려, 모자반, 미역, 석결명, 청각, 해룡, 해마, 해삼, 파래, 툇)을 이용하여 기본적인 자유라디칼 소거능 실험을 바탕으로, 자외선 B 조사로 인한 세포독성 및 산화적 사멸을 억제하고 세포 내 항산화 기능을 강화시킬 수 있는 천연 항산화 피부보호 소재를 발굴하고자 하였다. 해양소재 추출물의 라디칼 소거능을 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay로 비교 측정된 결과 미역, 모자반, 다시마, 해마, 석결명, 모려, 해룡의 순으로 항산화력을 나타내었다. 이후 *in vitro* 세포 실험에서 자외선 B를 섬유아세포주인 HS68 세포에 노출시킨 경우 세포 독성이 유발되어 사멸이 진행되었으며 이는 모자반, 석결명, 청각, 해마 열수 추출물을 처리한 경우 현저히 억제되었다. 특히, 자외선 B로 인한 세포손상은 세포 내 활성산소종의 축적으로 인한 것임을 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) 형광염색법으로 확인할 수 있었으며, 활성산소종의 생성은 모자반, 석결명, 청각, 해마 열수 추출물을 처리한 경우 유의적으로 감소되었다. 한편, 이러한 항산화 작용은 대표적인 내인성 항산화 효소인 catalase, superoxide dismutase 및 heme oxygenase-1의 발현 증가로 매개되었다. 이상의 결과는 모자반, 석결명, 청각, 해마 등의 해양소재가 항산화 작용을 통하여 산화적 스트레스가 매개하는 피부손상과 노화과정을 예방 및 보호하는 새로운 화장품 천연소재로의 활용 가능성을 제시한다.

**Abstract:** Ultraviolet is the one of the main environmental factors promoting aging process via increased intracellular generation of reactive oxygen species (ROS) and decreased expression of endogenous antioxidant enzymes and molecules. Therefore, in this study, we tried to search for natural skin-protective antioxidant materials from marine origins (*Porphyra Thalli*, *Laminariae japonicae thallus*, *Ostreae Concha*, *Sargassum Thallus*, *Undaria thallus*, *Haliotidis Concha*, *Codium thalli*, *Syngnathoides biaculeatus*, *Hippocampus*, *Stichopus Stichopus*, *Thalli*, *Hizikia fusiforme thalli*) which exhibit free radical scavenging activity and protect against UVB-induced cytotoxicity and oxidative cell death. Free radical scavenging activity was shown in order of *Undaria thallus*, *Sargassum Thallus*, *Laminariae japonicae thallus*, *Hippocampus*, *Haliotidis Concha*, *Ostreae Concha*, *Syngnathoides biaculeatus*. In another experiment, UVB-induced cytotoxicity and cell death were effectively suppressed by treatment of *Sargassum Thallus*, *Haliotidis Concha*, *Codium thalli*, or *Hippocampus* water extract. Furthermore, UVB-induced cell death was mediated by intracellular accumulation or ROS, which was significantly inhibited by treatment with aforementioned extracts. The protective

† 주 저자 (e-mail: cipark@dhu.ac.kr)

effect of these marine natural products seemed to be mediated by increased expression of antioxidant enzymes such as catalase, superoxide dismutase, and heme oxygenase-1. These results suggest that *Sargassum Thallus*, *Haliotidis Concha*, *Codium thalli*, and *Hippocampus* may have preventive and protective potentials as new functional cosmetics against oxidative stress-mediated skin damages and aging with antioxidant properties.

**Keywords:** *ultraviolet, marine natural products, antioxidant, oxidative stress, skin fibroblast*

## 1. 서 론

피부는 기본적인 신진대사 과정을 통하여 우리 몸의 항상성을 저해하는 다양한 외부 요인으로부터 위해를 막아주는 일차적인 기능을 담당하고 있다. 즉, 피부는 신체 가장 바깥쪽에 위치함으로써 물리적, 화학적, 생물학적 장벽기능을 통한 보호작용, 체온조절작용, 감각작용, 분비 및 배설작용, 흡수작용, 저장작용, 재생작용 등의 다양한 역할을 수행하고 있지만, 지속적인 외부 스트레스가 가해지는 경우 가장 손상을 받기 쉽다[1]. 이러한 외부 스트레스의 주요 원인으로는 자외선 노출, 배기가스, 황사, 환경오염물, 중금속, 온도변화, 미생물을 대표적인 예로 들 수 있으며, 이들은 주로 산화적 스트레스(oxidative stress)를 통하여 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성함으로써 항산화 방어체계를 붕괴시켜 세포 손상 및 사멸을 야기하게 된다.

최근 활성산소종이 다양한 종류의 인체 질병에 관련되어 있음이 밝혀짐에 따라 활성산소의 생체 내 발생 및 생성억제에 관한 연구가 전세계적으로 활발히 수행되고 있다. 활성산소종은 산소에서 유래한 산소보다 산화력이 더 큰 분자들로, superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, singlet oxygen, peroxy radical 등을 포함한다. 세포 내 주요한 활성산소종은 mitochondria 전자전달계, peroxisome의 지방산 대사과정, cytochrome P450, xanthine oxidase, NADPH oxydase, cyclooxygenase 등의 다양한 효소들로부터 생성이 되는 것으로 알려져 있다[2]. 적절한 농도의 활성산소는 체외로부터 침입하는 병원균, 바이러스, 이물질들을 상대로 강력한 방어 역할을 하지만, 과량으로 생성되는 경우 세포와 장기를 공격하여 노화 및 이와 관련된 만성, 난치성 질환을 일으키는 원인이 된다.

외부 스트레스 중 태양광선 특히 자외선(ultraviolet, UV)은 활성산소종의 생성을 통하여 피부 세포 및 조직에 손상을 일으키며, 지속적인 스트레스는 생체내 거대분자인 지질의 과산화, 단백질 산화, DNA 산화, 단백질 분해효소 활성화, 탄력섬유 손상, 멜라닌 생성반응, 염증반

응, 면역기능 저하 등을 유발하며 궁극적으로 피부 노화 과정을 가속화하는 것으로 알려져 있다[3,4]. 특히, 자외선은 파장의 길이에 따라 장파장(UVA, 320 ~ 400 nm), 중파장(UVB, 290 ~ 320 nm), 단파장(UVC, 200 ~ 290 nm)으로 구분된다. 자외선 A는 피부 내 진피까지 도달하며 탄력 및 교원섬유의 변성으로 인한 피부탄력 감소, 피부위축, 주름형성, 색소침착, 광독성, 광알러지, 피부암 등을 유발할 수 있다[1]. 자외선 B는 표피의 기저층 또는 진피의 상부까지 도달하며 다량으로 노출되는 경우 면역저하, 염증악화, 피부각화, 홍반, 일광화상, 색소침착, DNA 손상, 피부암 등을 일으키게 된다[1]. 특히 자외선 A 및 B 조사 후 생체 내 활성산소의 증가 및 내인성 항산화 효소 및 항산화제들의 감소가 보고되고 있으며, 그 결과로 인하여 광노화 과정이 촉진되게 된다[5,6].

따라서, 외부 스트레스로부터 피부 세포를 보호하고 노화를 예방하기 위해서는 활성산소로 인한 산화적 스트레스를 억제하고 활성산소를 효율적으로 제거 할 수 있는 항산화 방어 강화가 중요하며, 최근에는 인체에 무해하고 보다 강력한 항산화력을 가진 천연 물질에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[7]. 특히, 해양소재는 청정성과 풍부한 미네랄로 인하여 이미 식품, 화장품, 의약품 등 여러 분야에서 항균, 미백, 항노화 등 효과에 대해 다양한 연구가 이루어지고 있다[8]. 그러므로, 본 연구에서는 라디칼 소거능이 탁월한 해양소재 추출물을 이용하여 섬유아세포에서 자외선 B로 인한 세포독성 및 사멸, 산화적 스트레스를 억제하고 세포 내 항산화 기능을 강화시킬 수 있는 천연 항산화 소재를 발굴하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험재료 및 시약

인간 피부 섬유아세포주(human skin fibroblast, HS68 세포주)는 ATCC (Rockville, MD, USA)로부터 분양받아 사용하였으며, 세포배양을 위한 Dulbecco's modified Egel's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 항생제(penicillin/streptomycin)는 Gibco사(Grand

Island, NY, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) 및 tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE)는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 사용하였고, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 및 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 포함한 일반 시약은 Sigma-Aldrich 제품(St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

2.2. 해양소재의 추출

김(*Porphyra Thalli*: PT), 다시마(*Laminariae japonicae thallus*: LJ), 모려(*Ostreae Concha*: OC), 모자반(*Sargassum Thallus*: ST), 미역(*Undaria thallus*: UT), 석결명(*Haliotidis Concha*: HC), 청각(*Codium thalli*: CT), 해룡(*Syngnathoides biaculeatus*: SB), 해마(*Hippocampus*: Hc), 해삼(*Stichopus Stichopus*: SS), 파래(*Thalli*: Th), 툃(*Hizikia fusiforme thalli*: HF)은 경상북도 포항에서 구입하였다. 각각의 열수 추출물(water extract : WE)은 물 1.5 L를 가하여 3 h 전탕한 후 No.2 filter paper (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과하였다. 이후 여액을 진공회전농축기(EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 농축하고, 동결 건조하여 -20 °C에서 보관하였다. 각 추출물의 최종 수율은 김(PTWE) 45.38 %, 다시마(LJWE) 2.74 %, 모자반(STWE) 6.63 %, 모려(OCWE) 0.27 %, 미역(UTWE) 3.32 %, 석결명(HCWE) 0.2 %, 청각(CTWE) 5.8 %, 해룡(SBWE) 15.82 %, 해마(HcWE) 14.23 %, 해삼(SSWE) 3.74 %, 파래(ThWE) 13.15 %, 툃(HFWE) 3.69 %였다.

2.3. DPPH Assay

열수 추출물의 항산화 활성은 DPPH 라디칼에 대한 시료의 환원력으로 측정하였다. DPPH는 보라색을 띠며 화학적으로 안정화된 자유라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 전자를 받게 되면 흡광도가 감소하며, 환원력이 있는 물질과 만나 전자를 내어주면 DPPH 라디칼이 소멸되어 특유의 보라색이 옅은 노란색으로 변하는 것을 측정하게 된다[9,10]. 각 50 mM Tris-HCl (pH, 7.4)에 적정 농도로 희석된 열수 추출물 1000 µL에 0.2 mM DPPH 용액 1000 µL를 첨가하여, 상온에서 10 min간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거 활성(radical scavenging activity)은 추출물을 첨가하지 않은 대조군의 흡광도(A<sub>control</sub>) 및 추출물을 첨가한 실험군(experiment)의 흡광도(A<sub>experiment</sub>)를 측정하여 다음의

식으로 계산하였다. 특히, 라디칼 소거활성이 50 % 감소하는데 필요한 추출물의 농도(µg/mL)를 IC<sub>50</sub>로 하였다.

Radical Scavenging Activity (%)

$$= [ 1 - (A_{\text{experiment}}/A_{\text{control}}) ] \times 100$$

2.4. 세포배양

HS68 세포는 10 % FBS, penicillin (10,000 IU/mL) 및 streptomycin (10,000 g/mL)을 포함하는 DMEM 배지를 이용하여, 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C 배양기를 사용하여 배양하였다. 세포배양 배지는 2일마다 새로운 배지로 갈아주었다. 실험을 위하여 4 × 10<sup>4</sup>개/ 300 µL의 세포를 48-well 및 2 × 10<sup>6</sup>개/2 mL의 세포를 6-well plate에 접종한 후, 24 h 뒤 세포가 안정적으로 부착되면 열수 추출물을 처리하였다.

2.5. 자외선 조사

자외선 B 조사로 인한 세포독성 및 산화적 세포사멸에 대한 열수 추출물의 보호 효과를 확인하기 위해서 자외선 B를 하기와 같은 조건으로 처리하였다. HS68 세포를 80 % 밀도가 되도록 배양한 뒤 배지를 걷어내고 인산완충용액(phosphate buffered saline, PBS)으로 1회 세척한 다음 자외선 조사장치(BLX-E254, Viber Lourmat, Paris, France)를 사용하여 120 mJ/cm<sup>2</sup>의 자외선 B를 조사하였다. 자외선 조사 후 다양한 농도의 열수 추출물을 처리하여 24 h 배양하였다.

2.6. 세포생존율 측정(MTT Dye Reduction Assay)

세포 생존율 측정을 위하여 MTT 분석법을 이용하였으며, 이는 노란색의 tetrazolium이 살아있는 세포의 미토콘리아 효소에 의해 보라색의 formazan 변환되는 것을 측정하는 분석 방법이다. HS68 세포를 48-well culture plate에 4 × 10<sup>4</sup>개/ 300 µL의 세포를 접종한 후 24 h 뒤 세포가 안정적으로 부착되면 열수 추출물을 처리, 또는 자외선 B를 조사한 후 열수 추출물을 처리하여 24 h 배양한 뒤 MTT (최종 농도 1 mg/mL) 시약을 첨가한 후 2 h 동안 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C 배양기에서 배양하였다. 상등액을 제거한 후 200 µL DMSO를 가하여 formazan을 용해한 다음, ELISA reader (Emax, Molecular device, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 추출물을 첨가하지 않은 배지만 넣고 배양한 대조군의 흡광도를 기준으로 세포생존율(%)을 산출하였다.

Table 1. Primer Sequence of Antioxidant Enzymes

Gene	Forward	Reverse
Catalase	5'-CCG ACG AGA TGG CAC ACT TTG ACA-3'	5'-CGC GAG CAC GGT AGG GAC AGT TC-3'
CuZnSOD	5'-CCA TCA ATA TGG GGA CAA TAC AC-3'	5'-ACA CGA TCT TCA ATG GAC AC-3'
MnSOD	5'-TGA CCT GCC TTA CGA CTA TG-3'	5'-CGACCT TGC TCC TTA TTG AA-3'
HO-1	5'-ACT TTC AGA AGG CTC AGG TGT CC-3'	5'-TTG AGC AGG AAG GCC GTC TTA G-3'
GAPDH	5'-GCC AAG GTC ATC CAT GAC AAC-3'	5'-AGT GTA GCC CAG GAT GCC CTT-3'

## 2.7. 미토콘드리아 막전압(Mitochondrial Transmembrane Potential, $\Delta\Psi$ ) 측정

미토콘드리아 막전압을 측정하기 위하여 TMRE dye를 사용하였다. 세포( $6 \times 10^4$ 개/ $500 \mu\text{L}$ )를 chamber slide에 넣고 자외선 B를 조사한 후 열수 추출물을 처리하여 5%  $\text{CO}_2$ , 37 °C 배양기에서 24 h 배양하였다. 배지를 덜어낸 후 PBS로 2회 세척한 뒤 10 nM TMRE를 가하여 37 °C에서 30 min 간 반응을 시킨 후 형광의 변화를 excitation 파장 540 nm 및 emission 파장 590 nm에서 fluorescence microscopy로 측정하였다(SpectraMax Gemini XS, Molecular Device).

## 2.8. 세포 내 활성산소종 생성 측정

세포 내에 생성되는 활성산소는 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ )를 사용하여 측정하였다.  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 는 지용성 물질로 세포 내로 쉽게 투과되며 esterase에 의해 아세틸기가 가수분해 되어 수용성인 HDCF가 활성산소와 반응하여 형광을 띠는 DCF를 생성하며, 이 형광강도를 측정함으로써 활성산소 생성량을 측정할 수 있다. 활성산소의 측정을 위하여 HS 세포에 120 mJ 강도의 UVB를 조사한 후 열수 추출물을 처리하여 3시간 배양한 다음 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 를 처리하여 37 °C에서 20 min간 배양하였다. 20 min 뒤 PBS로 세척한 다음, DMSO를 사용하여 세포를 용해시켜 형광의 변화를 excitation 파장 485 nm 및 emission 파장 535 nm에서 fluorescence microscopy로 측정하였다(SpectraMax Gemini XS, Molecular Device).

## 2.9. RNA 추출 및 RT-PCR (Reverse Transcriptase-polymerase Chain Reaction)

Total RNA의 추출은 Invitrogen사의 TRIzol Reagent (Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 제시된 방법에 따라

RNA를 추출하였다. 추출한 RNA로부터 cDNA 합성은 M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 합성하였으며, 항산화 효소들의 유전자 발현을 비교 측정하기 위하여 PCR을 진행하였다. PCR 조건은 95 °C에서 5 min간 진행한 후 95 °C 30 s, 53~61 °C 1 min, 72 °C 1 min을 40 cycle 수행 후 72 °C 5 min간 더 반응시켰다. 각 PCR 산물들은 ethidium bromide를 포함하고 있는 1.5% agarose gel에서 50 V로 전기영동한 후 BIO-RAD사의 Image analysis (Gel Doc XR System, Hercules, CA, USA) 장비를 사용하여 항산화 효소의 유전자 발현을 측정하였으며, Quantity One Software (BIO-RAD)를 이용하여 정량분석 하였다. 실험에 사용된 각 항산화 효소의 특정 프라이머(primer) 서열은 Table 1과 같다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 해양소재 추출물의 라디칼 소거능

노화의 원인은 아직 확실히 규명되지는 않았으나, 기본적으로 유전적인 요인과 환경적인 요인이 상호 복합적으로 작용하여 노화현상이 나타나는 것으로 생각되어지고 있다. 최근 많은 연구자들이 역학조사, 유전자 연구, 분자 및 세포 생물학적 연구 등을 상호 조합하여 노화의 몇몇 기전들을 밝혀나가고 있으며, 노화를 설명하기 위해 다양한 가설들이 제안되고 있다. 이는 크게 free radical theory, cross linking theory, accumulation of waste product theory 등을 포함하는 비유전자설(소모설)과 somatic mutation theory, programmed aging theory의 유전자설로 대별된다[11,12].

이 중 'free radical theory'는 1956년 Harman에 의해 제안되었으며, 정상적인 대사과정에서 부수적으로 생성되는 여러 가지 활성산소들에 의하여 생체구성 성분(지

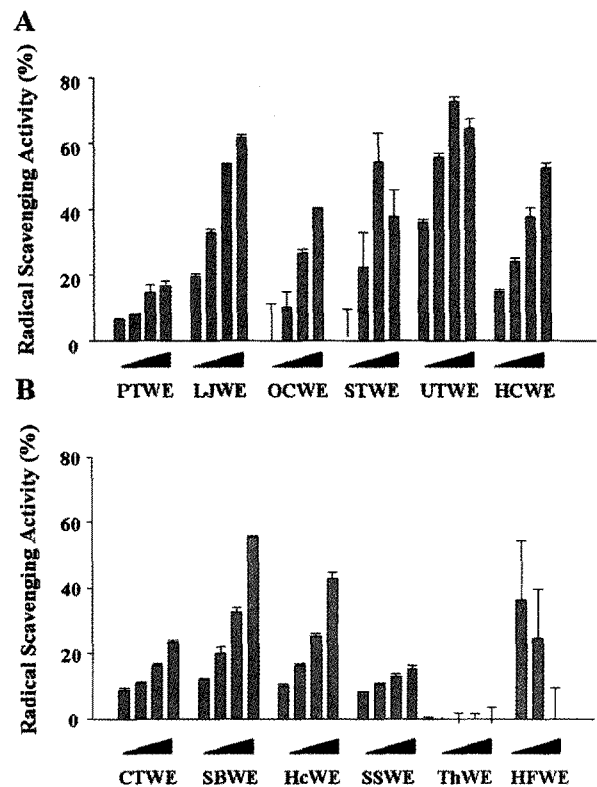
방, 단백질, 핵산)들이 산화적 손상을 받게 되고 이러한 손상들이 축적되어 노화에 이르게 된다는 것이다. 유해한 활성산소의 작용은 수년 내지 일생을 통하여 만성적으로 일어나 누적되어 세포나 조직의 기능을 저하시키고, 이것이 곧 노화 및 질병의 원인이 된다[11,12].

활성산소로 인한 산화적 손상 중 특히 지질 과산화 과정에서 지질의 hydroperoxyl radical은 이웃한 불포화지질의 이중 결합쇄로부터 수소원자를 하나 빼앗아 hydroperoxide와 alkyl radical로 전환된다. 이후 alkyl radical은 산소와 결합하면 새로운 hydroperoxyl radical로 되며 이는 연쇄적인 산화반응을 일으킨다. 이때 불포화된 알데히드를 비롯한 여러 가지 부산물(malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, isoprostanes)들이 만들어지게 되고, 이들은 돌연변이원으로 작용하거나, 다양한 효소들의 활성을 억제하거나, 단백질 및 핵산과 작용하여 cross-link를 이룬다.

우선 본 연구에서는 이러한 자유라디칼(free radical) 소거능력을 특정하기 위하여 DPPH를 사용하였다. DPPH 화합물은 화학구조에 안정화된 라디칼을 갖는 물질로 반응 중 DPPH의 감소는 자유라디칼 소거반응을 의미한다. 해양소재 추출물의 라디칼 소거능을 비교 측정 한 결과 미역(UTWE), 모자반(STWE) 열수 추출물의 경우 라디칼을 50 % 소거할 수 있는 농도(IC<sub>50</sub>)가 각각 27.45, 45.88 µg/mL로 비교적 낮게 나타나 높은 항산화력을 보였으며, 그 다음으로 다시마(LJWE), 해마(HcWE), 석결명(HCWE), 모려(OCWE), 해룡(SBWE)의 순으로 각각 66.10, 87.46, 87.65, 112.92, 118.86 µg/mL로 중간 정도의 항산화력을 나타내었다. 한편 김, 해삼, 톳, 파래 추출물의 경우 IC<sub>50</sub>이 300 µg/mL 이상의 수치를 보여 라디칼 소거능이 비교적 약한 것으로 관찰되었다. 해양소재 추출물의 농도에 따른(µg/mL) 상대적인 자유라디칼 소거능(radical scavenging activity %)을 Figure 1에서 보여주고 있다.

### 3.2. 자외선 B로 인한 세포 손상에 대한 해양소재 추출물의 보호 효과

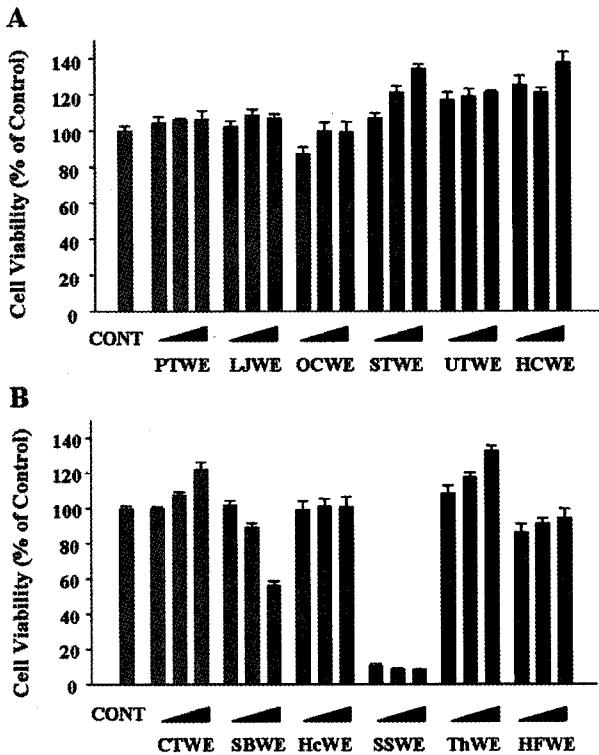
자외선 B는 세포 내 신호전달을 통하여 면역억제, 염증촉진, 유전자 손상을 통한 암 유발을 매개하는 것으로 알려져 있으며, 특히 이러한 신호전달과정의 시작은 산화적 스트레스가 중요한 역할을 한다[13]. 자외선 B로 유도된 섬유아세포의 산화적 손상 및 독성에 대한 해양소재 추출물들의 보호효과를 검토하기 위하여, 우선 해양소재 추출물들을 단독으로 처리하고 세포생존에 미치



**Figure 1.** Free radical scavenging activity of marine natural products. The radical scavenging activity (%) was calculated as described in the Materials and Methods. Values are represented as mean ± S.D. (n=3). Water extracts (WE) of *Porphyra Thalli* (PT), *Laminariae japonicae thallus* (LJ), *Ostreae Concha* (OC), *Sargassum Thallus* (ST), *Undaria thallus* (UT), *Halotidis Concha* (HC), *Codium thalli* (CT), *Syngnathoides biaculeatus* (SB), *Hippocampus* (Hc), *Stichopus Stichopus* (SS), *Thalli* (Th), *Hizikia fusiforme thalli* (HF) have been tested.

는 영향을 살펴보았다. 다양한 농도(0, 0.1, 0.3, 1 mg/mL)의 해양소재 추출물을 HB86 세포주에 24 h 동안 처리하고 MTT reduction assay로 세포생존 정도를 정량하였다. 해양소재 추출물들은 해삼(SSWE)을 제외하고 1 mg/mL 이하의 농도에서 세포 독성을 보이지 않아 상대적으로 높은 안전성을 보였다(Figure 2). 하지만, 해삼(SSWE)의 경우 다른 해양소재 추출물들과 비교한 경우 0.1 mg/mL의 농도에서도 세포 생존율이 15 % 이하로 상대적으로 강한 독성을 나타내었다.

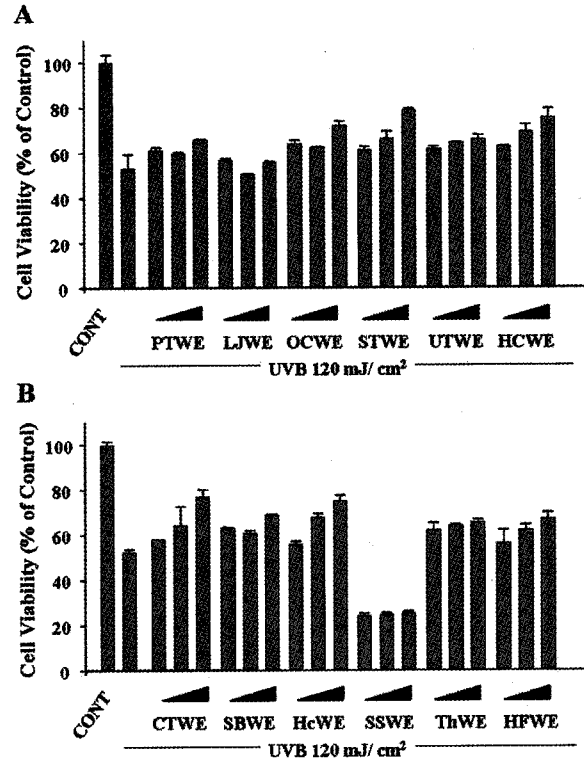
이를 바탕으로 해양소재 추출물들의 농도를 0.1, 0.3, 1 mg/mL로 고정한 다음 자외선 B를 조사하여 세포독성



**Figure 2.** Effect of marine natural products on the cell viability in HS68 cells. HS68 cells were treated with various concentrations (0, 0.1, 0.3, 1 mg/mL) of marine natural products for 24 h and cell viability was measured by MTT dye reduction assay. Values are represented as mean ± S.D. (n=3).

에 미치는 해양소재 추출물들의 보호효과를 검토하였다. 자외선 B를 조사한 경우 세포생존율이 55 % 정도로 감소하였으며, 1 mg/mL의 모자반(STWE), 석결명(HCWE), 청각(CTWE), 해마(HcWE) 열수 추출물을 함께 처리한 그룹에서 세포생존율이 각각 78.63, 81.82, 83.74, 81.2 %로 증가됨을 확인할 수 있었다(Figure 3). 이는 모자반, 석결명, 해마, 청각 열수 추출물이 섬유아세포에서 자외선 B 조사로 인한 세포독성 및 사멸을 감소시키는 효과가 있다는 것을 나타낸다.

한편, 자외선 B로 인해 세포가 손상을 받는 경우 아포토시스(apoptosis)를 통하여 세포사멸이 일어나게 되며 이는 다양한 생화학적 지표로 측정이 가능하다[14]. 일반적으로 apoptosis가 진행되는 과정에서 미토콘드리아는 손상을 받아 막전압(mitochondrial transmembrane potential, MMP)이 감소되며, 이후 apoptosis를 매개하는 다양한 단백질들이 mitochondria로부터 세포질(cytosol)로 유출되는 과정을 촉진하게 된다[15]. 그 중 대표

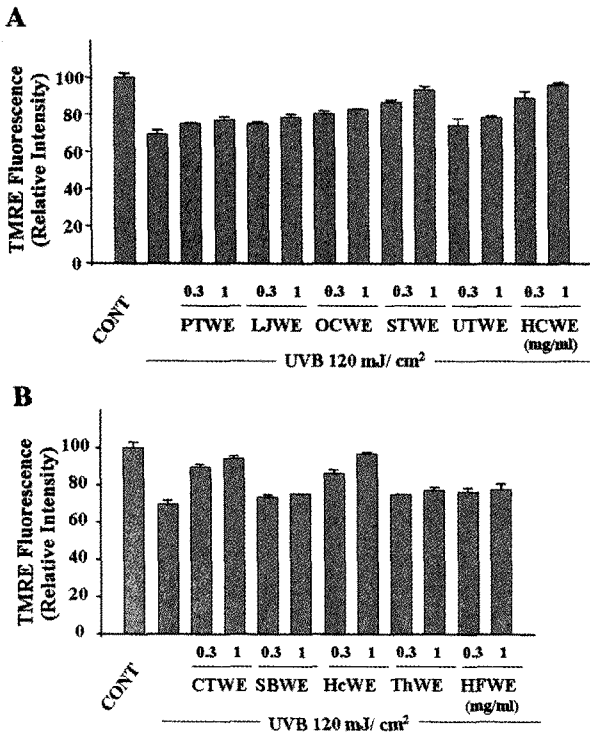


**Figure 3.** Protective effect of marine natural products on the UVB-induced cytotoxicity. HS68 cells were exposed to UVB (120 mJ/cm<sup>2</sup>) and treated with various concentrations (0, 0.1, 0.3, 1 mg/mL) of marine natural products for additional 24 h. Viable cells were determined by MTT reduction assay. Values are represented as mean ± S.D. (n=3).

적인 것이 cytochrome c인데, 이는 다양한 하위 caspase를 활성화시켜 궁극적으로 apoptosis를 매개하게 된다. 그러므로, 이후 실험에서는 세포사멸의 지표중의 하나로 자외선 B로 인하여 손상된 세포 내 미토콘드리아 막전압을 TMRE 형광염색시약을 사용하여 측정하였다. 자외선 B를 조사한 경우 MMP가 30 % 정도 감소된 것에 반하여 모자반(STWE), 석결명(HCWE), 청각(CTWE), 해마(HcWE) 열수 추출물을 1 mg/mL로 처리한 그룹에서는 MMP가 93.38, 96.13, 94.43, 96.56 %로 대조군과 유사한 수준으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4).

### 3.3. 자외선 B로 인한 세포 내 활성산소 축적에 대한 해양소재 추출물의 보호 효과

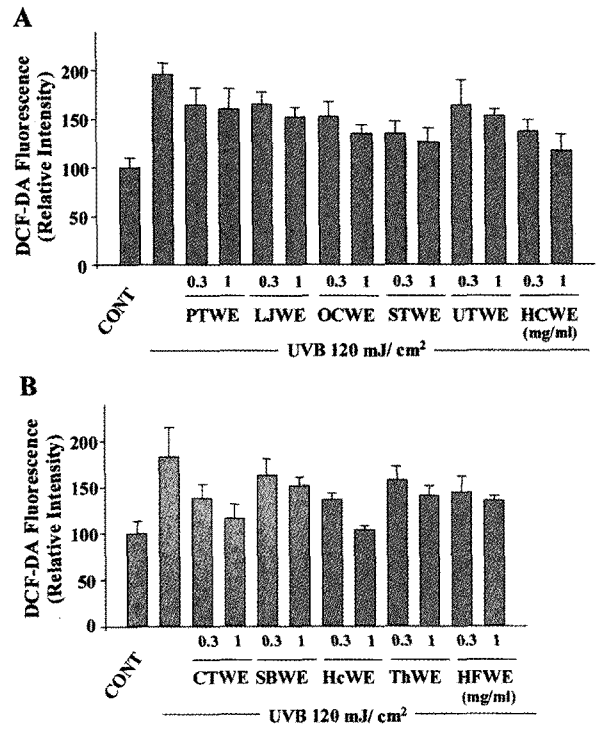
자외선이 피부에 조사되는 경우 hydrogen peroxide (과산화수소, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)와 같은 활성산소의 생성이 증가하게 되며 반대로 세포 내 내인성 항산화 효소들의 발현은 감



**Figure 4.** Protective effect of marine natural products on the UVB-induced dissipation of mitochondrial membrane potential (MMP). HS68 cells were exposed to UVB (120 mJ/cm<sup>2</sup>) and treated with various concentrations (0, 0.3, 1 mg/mL) of marine natural products for additional 24 h. MMP was assessed based on the TMRE fluorescence as described in the Materials and Methods. Values are represented as mean ± S.D. (n=3).

소하게 된다. 일차적으로 superoxide anion이 만들어지고 이는 superoxide dismutase (SOD)에 의해 hydrogen peroxide를 형성하게 된다. hydrogen peroxide는 이후 철 및 구리와 같은 전이금속과 반응하여 Fenton reaction을 통해 더욱더 반응성이 강한 hydroxyl radical을 형성하게 된다.

이후 실험에서는, 자외선 B로 유도된 세포독성 및 사멸에 실질적으로 이러한 활성산소종이 관여하는지 규명하기 위하여 세포 내 축적된 활성산소종의 양을 DCF-DA 시약을 사용하여 측정하였다. DCF-DA는 세포밖에서는 형광을 띄고 있지 않지만, 굉장히 지용성 높아 세포 내로 쉽게 들어가며, 이후 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 DCFH를 형성하여 세포 내에 머무르게 된다. DCFH는 세포 내 생성된 peroxide류와 반응하여 형광인 강한 물질인 DCF를 형성하며, 이는 형광측정기(fluorometer)로 쉽게 관찰이 가능하다.



**Figure 5.** Inhibitory effect of marine natural products on the UVB-induced intracellular accumulation of ROS. HS68 cells were exposed to UVB (120 mJ) and treated with various concentrations (0, 0.3, 1 mg/mL) of marine natural products for additional 3 h. Intracellular ROS levels were monitored and calculated by DCF fluorescence as described in the Materials and Methods. Values are represented as mean ± S.D. (n=3).

자외선 B를 3 h HS68 세포에 처리한 결과 세포내 강한 형광을 나타내는 세포의 수가 증가 되어 형광강도가 진해진 것을, 즉 세포 내 활성산소종이 축적됨을 확인 할 수 있었으며, 이는 모자반(STWE), 석결명(HCWE), 청각(CTWE), 해마(HcWE) 열수 추출물(0.3, 1 mg/mL) 처리함으로써 현저히 감소되었다(Figure 5).

### 3.4. 해조류 추출물의 항산화 보호기전

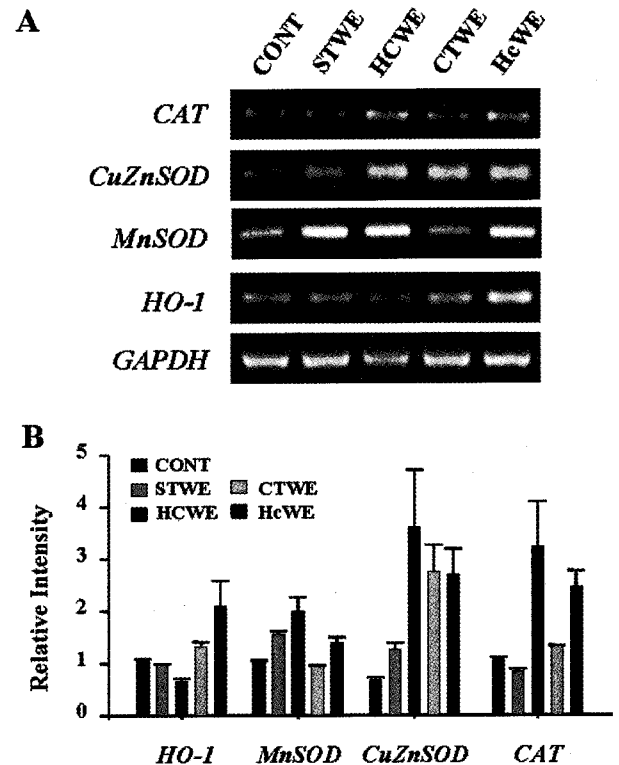
우리 몸에는 이러한 활성산소로 인한 손상에 대응하는 항산화 방어 시스템을 갖추고 있어 산화적 스트레스에 대하여 대응하며 손상된 세포를 회복하여 항상성(homeostasis)을 끊임없이 유지하려고 한다. 이러한 항산화 방어 시스템은 항산화 효소에 의한 방어기전과 비효소성 항산화 방어기전의 두 가지 형태로 구분된다[16]. 특히, 효소에 의한 방어기전은 catalase (CAT)와 superoxide dismutase (SOD) 등을 대표적으로 들 수 있다.

Catalase는 hydrogen peroxide를 물과 산소로 분해하여 제거하는 역할을 하며, superoxide dismutase는 superoxide anion을 hydrogen peroxide로 전환시킨다. 체내에 존재하는 SOD는 세포질에 있는 CuZnSOD, 미토콘드리아에 있는 MnSOD, 그 외 SOD의 3종류로 나뉜다. 이러한 항산화 효소들 이외에 최근 피부세포 보호과정에 있어 heme oxygenase-1 (HO-1)에 대한 관심이 높아지고 있다. HO-1은 heme catabolism의 속도결정단계에 작용하는 효소로, 반응산물로 monoxide (CO), biliverdin, free iron ( $Fe^{2+}$ )을 생성하며, 다양한 종류의 세포에서 자외선, hydrogen peroxide, 사이토카인(cytokine), glutathione (GSH) 고갈 등에 의해 일종의 스트레스에 대한 방어 작용기전으로 증가되는 것으로 보고되었다[17]. 반응산물 중 CO는 염증관련 인자들을 억제 하며, heme 또는 다른 금속이온을 가지고 있는 효소들과 반응하여 구조를 변형시켜 활성의 변화를 일으키며, 능동적 세포사멸을 억제 한다. biliverdin은 biliverdin reductase의 작용에 의하여 bilirubin으로 전환되며, 이는 모두 강한 항산화 작용을 가짐으로써 대부분의 HO-1의 보호작용을 매개한다.

이를 바탕으로, 이후 실험에서는 해양소재 추출물이 산화적 세포 손상 및 사멸에 대한 보호 효과를 갖는 작용기전을 규명하기 위하여 생체 내에 존재하는 대표적인 항산화 효소들의 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정하였다. 모자반(STWE), 석결명(HCWE), 청각(CTWE), 해마(HcWE) 열수 추출물(1 mg/mL)을 단독으로 24 h 처리하고 mRNA를 분리하여 대표적인 항산화 효소들의 발현을 측정한 결과, CAT의 경우 석결명 > 해마 > 청각, CuZnSOD의 경우 석결명 > 청각 > 해마 > 모자반, MnSOD의 경우 석결명 > 모자반 > 해마, HO-1의 경우 해마 > 청각의 순으로 높은 항산화 효소의 발현을 보였다(Figure 6).

#### 4. 결 론

자외선 B는 특히 활성산소종을 생성하여 산화적 스트레스를 유발함으로써 다양한 피부 구성 세포에 손상을 유발하는 것으로 알려져 있으며 이는 궁극적으로 광노화 과정을 가속화 시킨다. 그러므로, 본 연구에서는 다양한 해양소재 추출물(김, 다시마, 모려, 모자반, 미역, 석결명, 청각, 해룡, 해마, 해삼, 파래, 툇) 12종을 이용하여 자유라디칼 소거능, 자외선 B 조사로 인한 세포독성 및 산화적 사멸 억제능, 세포 내 항산화능을 비교하는 일련의 실험



**Figure 6.** Effect of marine natural products on the mRNA expression of antioxidant enzymes. HS68 cells were treated with marine natural products (1 mg/mL) for 24 h and total mRNA was isolated and amplified by using specific primers indicated in the Materials and Methods. Equal amount of mRNA loading was verified by comparing GAPDH levels. Representative images (A) and quantitative analysis of specific band/GAPDH ratio (B) were shown.

험을 통하여 천연 항산화 피부보호 소재를 발굴하고자 하였다. 우선 해양소재 추출물의 라디칼 소거능을 DPPH를 사용하여 비교 측정한 결과 미역, 모자반, 다시마, 해마, 석결명, 모려, 해룡의 순으로 항산화력을 나타내었다. 또 다른 실험에서, 인간 피부 섬유아세포종인 HS68 세포에 자외선 B (120 mJ/cm<sup>2</sup>)를 노출시킨 경우 세포 내 활성산소종이 증가되고, 산화적 손상을 받아 세포사멸이 유발되었다. 한편, 이러한 자외선 B로 인한 산화적 세포 손상 및 사멸은 모자반, 석결명, 청각, 해마 열수 추출물을 처리함으로써 현저히 억제되었으며, 이들 물질은 특히 대표적인 내인성 항산화 효소인 catalase, superoxide dismutase 및 heme oxygenase-1을 높은 수준으로 발현하였다. 즉, 이상의 결과는 해양소재인 모자반, 석결명, 청각, 해마 등이 다양한 항산화 작용을 가짐으로써 특히



산화적 스트레스가 매개하는 피부손상 및 노화과정을 보호하는 새로운 기능성 화장품 천연소재로 활용될 수 있음을 시사한다. 이를 토대로 향후 제품 개발을 위해서는 각 해양소재 추출물의 항산화 및 항노화 기능을 매개하는 성분 규명 및 표적단백을 검증하는 분석화학 및 분자생물학적 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것이다.

### 감 사

본 연구는 농림수산식품부 수산특정연구개발사업의 연구비지원에 의해 수행되었습니다.

### 참 고 문 헌

1. 이해영, 김귀정, 김영순, 이성내, 이성욱, 피부과학, 군자출판사, 서울 (2007).
2. M. Gilca, I. Stoian, W. Atanasiu, and B. Virgolici, The oxidative hypothesis of senescence, *J. Prost-grad. Med.*, **53**(3), 207 (2007).
3. 홍재기, 활성산소에 의한 피부노화와 항산화비타민의 효능에 대한 이론적 고찰, 대한피부미용학회지, **7**(2), 51 (2009).
4. 박수남, 피부노화와 활성산소, 서울산업대학교 논문집, **50**, 329 (1999).
5. P. Brenneisen, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **31**, 973 (2002).
6. M. Yaar and B. A. Gilchrist, Photoageing: mechanism, prevention and therapy, *Br. J. Dermatol.*, **157**(5), 874 (2007).
7. S. W. Lim, H. C. Ryoo, and S. H. Lee, Understanding of skin aging and its prevention and care, *JSBR*, **4**(1), 71 (2002).
8. 이홍금, 해양으로부터 기능성 화장품소재 개발동향, 보건사업기술동향, **42** (2001).
9. H. S. Lee, H. A. Lee, C. O. Hong, S. Y. Yang, S. Y. Hong, S. Y. Park, H. J. Lee, and K. W. Lee, Quantification of caffeic acid and rosmarinic acid and antioxidant activities of Hot-water extracts from leaves of *Perilla frutescens*, *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **41**(3), 302 (2009).
10. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Sci. Technol.*, **28**(1), 25 (1995).
11. D. Harman, Free radical theory of aging: Alzheimer's disease pathogenesis, *AGE*, **18**(3), 1574 (1995).
12. L. Rittie and G. J. Fisher, UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Ageing Research Reviews*, **1**(4), 705 (2002).
13. M. Ichihashi, M. Ueda, A. Budiyo, T. Bito, M. Oka, M. Fukunaga, K. Tsuru, and T. Horikawa, UV-induced skin damage, *Toxicology*, **189**(1-2), 21 (2003).
14. D. Kulms and T. Schwarz, Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis, *Biochem. Pharmacol.*, **64**(5-6), 837 (2002).
15. M. J. Arends and A. H. Wyllie, Apoptosis: mechanisms and roles in pathology, *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **32**, 223 (1991).
16. O. Blokhina, E. Virolainen, and K. W. Fagerstedt, Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review, *Ann. Bot.*, **91**, 179 (2003).
17. L. E. Otterbein, M. P. Soares, K. Yamashita, and F. H. Bach, Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme, *Trends Immunol.*, **24**, 449 (2003).