

## 해조류 추출물이 섬유아세포의 증식에 미치는 영향

# Cell proliferation effect of brown marine algae extracts on Mouse Fibroblast

고주영, 이지혁, 김현수, 김형호, 전유진\*

Ju-Young Ko, Ji-Hyeok Lee, Hyun-Soo Kim, Hyung-Ho Kim, You-Jin Jeon\*

제주대학교 해양생명과학과, 제주특별자치도 690-756, 대한민국

Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Republic of Korea

(Received 6 July 2015, Revised 17 July 2015, Accepted 20 July 2015)

**Abstract** We examined cell regeneration efficiency of brown marine algae living in Jeju coast for search of a novel therapeutic device with cutaneous wound healing materials. The five algae were collected and compared with epidermal growth factor (EGF) as a positive control in the assays of cell proliferation and cell migration of NIH3T3 fibroblast cells. Among the 80% methanol extracts of these brown algae, the two algal extracts from *Ishige foliacea* and *Colpomenia bullosa* showed the proliferative effects of the cells similar to the effect of EGF. Besides it was found that *Colpomenia bullosa* extract significantly enhanced cell migration of NIH3T3 cell. In the study, therefore, we confirmed that the *Colpomenia bullosa* extract improved proliferation of NIH3T3 cell and a potential candidate for cutaneous wound healing.

**Keywords :** Brown marine algae, Epidermal growth factor, Cell proliferation, Fibroblast

## 서 론

피부는 인체의 대부분을 차지하며 체온조절, 분비, 배설, 흡수 등의 다양한 작용을 하고, 특히 인체의 최 외부에 존재함으로써 외부로부터 물리적, 화학적, 생물학적으로 인체를 보호하는 기능을 가지고 있다. 피부의 구조는 크게 표피, 진피, 피하지방으로 이루어져 있으며, 표피는 인체의 외부와 내부로부터 방어작용을 하며, 기저층, 유극층, 과립층, 투명층, 각질층으로 나뉘어져 있고, 기저층에서 세포가 증식되어 위로 이동하면서 분화되어 각질을 형성하게 된다. 진피는 피부의 탄력 및 지지역할을

하며 섬유아세포가 대부분으로 collagen, elastin 등을 합성하고, 피하지방은 체온을 유지하는 기능을 갖고 있다 [4, 5].

피부 창상은 일반적으로 피부를 구성하고 있는 표피 층 및 하부 진피 층이 손상 받은 상태를 의미하며, 정상적인 창상의 치유과정은 지혈단계 (응피형성), 염증단계, 증식단계 (재상피화, 혈관형성, 섬유증식), 창상수축의 단계를 거치게 된다 [2]. 그러나 창상의 정도가 심하거나 각 단계와 여러 인자들이 균형을 이루지 못하는 경우 상처치유가 늦어져 병원균에 감염되거나 흉터가 남게 된다. 따라서 신속한 상처치유가 요구되어지며, 상처치유에 있어 섬유아세

\* Corresponding author  
Phone: +82 64 754 3475 Fax: +82 64 756 3493  
E-mail: youjin2014@gmail.com

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/bync/3.0>)

포는 상처부위로 이동하여 증식 및 상처 부위를 수축시키며, 교원질 등의 세포외 기질을 합성하는 역할을 맡고 있기 때문에 섬유아세포의 증식은 매우 중요하다.

현재, 상처치유 제제로 널리 사용되고 있는 상피세포성장인자 (Epidermal growth factor, EGF)는 정제하여 얻거나 또는 Bacteria에서 과량발현하여 얻는 방법이 사용되어 지고 있는데, 직접 정제하여 얻을 경우 시간, 돈, 노동력이 많이 소요되고, 또한 Bacteria에서 과량발현 방법은 세포내에서 낮은 발현량과 Bacteria의 protease 등에 의하여 회수 수율이 매우 낮다는 문제점이 있다 [1]. 더구나 EGF는 만성 상처 부위에는 낮은 치유효과를 나타낸다는 보고가 있었으며, 온도 및 protease에 의한 짧은 half-life로 인하여 효율대비 가격이 비싸다는 문제점이 있다 [3,

6]. 따라서 이 연구에서는 제주 자생 해조류 추출물이 섬유아세포의 증식에 미치는 영향을 확인함으로써 EGF를 대체할 수 있는 상처 치유제로써의 적용 가능성을 검토하였다.

**재료 및 방법**

**실험 재료**

실험에 사용된 바위두둑 (*Leathesia difformis*), 반질볼레기말 (*Colpomenia peregrina*), 패 (*Ishige okamurae*), 긴볼레기말 (*Colpomenia bullosa*), 넓패 (*Ishige foliacea*)는 제주도 연안에서 채취한 것으로 깨끗이 세척한 후 세절하고 동결건조하여 분쇄 한 뒤 -70°C에 보관하면서 사용하였다 (Table 1).

**Table 1.** The list of brown marine algae from Jeju island.

| NO. | Name   | Scientific name             | Effect of cellular proliferation (of control (%) at 1 µg/ml) |
|-----|--------|-----------------------------|--|
| 1   | 바위두둑   | <i>Leathesia difformis</i>  | 116.91%  |
| 2   | 반질볼레기말 | <i>Colpomenia peregrina</i> | 123.53%  |
| 3   | 패      | <i>Ishige okamurae</i>      | 119.12%  |
| 4   | 긴볼레기말  | <i>Colpomenia bullosa</i>   | 148.68%  |
| 5   | 넓패     | <i>Ishige foliacea</i>      | 149.74%  |

**해조류 추출물 제조**

동결건조 된 해조류 5종 각각의 분말 10 g을 80% 수용성 메탄올 100 ml에 침지시켜 24시간 초음파 추출을 하였다. 추출물은 10분간 원심분리 (3,500 rpm) 한 후 상층액은 취하고 얻어진 잔사에는 다시 100 ml의 용매를 가하여 3회 반복하여 추출하였다. 3회 추출로 얻어진 여액은 filter paper (Advantec 5A, Tokyo, Japan)로 여과한 뒤 37°C water bath에서 rotary evaporator (Eyela N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 감압하에 농축하였다. 농축된 해조류 추출물들은 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

**세포증식 효능 평가**

현재 상처치료제로 많이 쓰이고 있는 상피세포성장인자 (Epidermal Growth Factor, EGF: positive control)와 해조류 추출물들의 세포증식 효능을 비교하기 위하여 EGF를 양성대조군으로 사용하였다. 양성대조군인 EGF와 해조류 추출물들의 세포증식 효능을 평가하기 위하여, 마우스 유래 피부 섬유아세포인 NIH3T3 세포주 (한국세포주은행, 한국)를 사용하였으며, 10% 소혈청 (Bovine serum, BS)과 1% antibiotics를 포함하는 L-글루타민을 DMEM (Dulbeccos modified Eagle's medium) 배지 (Gibco-BRL, 미국)를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. NIH-

3T3 세포주를 24 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/ml로 분주하고 16시간 경과 후, 1.5% 소혈청이 포함된 DMEM 배지로 교체하였다. 양성대조군인 EGF (0.00005, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) 및 5종의 해조류 추출물 (1  $\mu\text{g/ml}$ )을 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 세포 증식 결과는 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) 방법을 이용하여 실험하였다. MTT 용액 50  $\mu\text{l}$  (2 mg/ml)를 24시간 동안 배양된 각 well에 첨가하여 2시간동안 반응시켰다. 이후 상층액을 완전히 제거하고 Dimethyl sulfoxide (DMSO)를 가하여 침전물을 완전히 용해시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포 이동 효능 평가

양성대조군인 EGF와 해조류 추출물의 세포 이동을 측정하기 위하여, 세포이동 분석 (Migration assay)을 실시하였다. 6 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/ml로 분주하고 16시간 경과 후, 세포가 6 well plate에 90% 이상 배양되었을 때 멸균된 팁 (Tip)으로 6 well plate 바닥을 스크래치 (Scratch)내었다. 스크래치를 낸 후 1.5% 소혈청이 포함된 DMEM 배지로 교체하고, 양성대조군과 해조류 추출물을 처리하고 24시간 동안 배양한 다음 현미경 상에서 세포 이동률을 측정하였다.

### 통계 분석

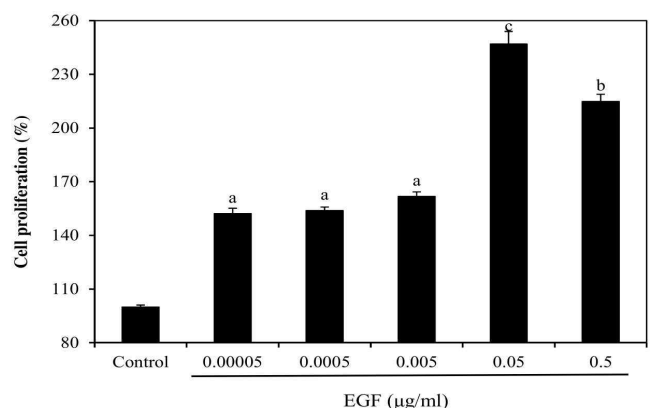
실험결과와 통계처리는 각각의 시료에 대한 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. SPSS 프로그램 (SPSS Inc., Ver.12.0)을 사용하여 One-way ANOVA-test를 실시하여 조사 항목들 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test으로  $P < 0.05$  수준에서 실시하였다.

### 결과 및 고찰

#### 상피세포성장인자(EGF)의 세포증식 효능

이 연구에서는 상피세포성장인자 (EGF)의 세포증식 효능 및 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위하여 농도별 (0.00005, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5  $\mu\text{g/ml}$ )로 세포에 처리하여 24시간 배양 후, MTT assay를 시행하였다. NIH3T3 세포는 EGF 0.05  $\mu\text{g/ml}$ 에서 가장 높은 세포증식율을 보였고, 농도별 간에도 통계학적으로 유의성을 나타내었다 (Figure 1). 따라서 다음의 실험들에서는 EGF 0.05  $\mu\text{g/ml}$  농도로 실험을 진행하였다.

이전 연구들을 살펴보면, EGF는 섬유아세포의 세포 증식을 유도한다고 알려져 있으며, 0.01  $\mu\text{g/ml}$ 의 EGF 농도에서 세포증식 효능이 확인되었으나, 이 연구에서는 그보다 높은 농도인 0.05  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 가장 알맞은 세포증식 효능을 보였다. 이러한 세포증식 효능 결과는 EGF가 온도 등 환경적 요인에 민감하기 매우 민감하여 세포증식 효능에 영향을 받은 것으로 사료된다 [3, 6]. 그러므로 이 연구에서는 0.05  $\mu\text{g/ml}$  EGF를 Positive control로서 사용하였다.

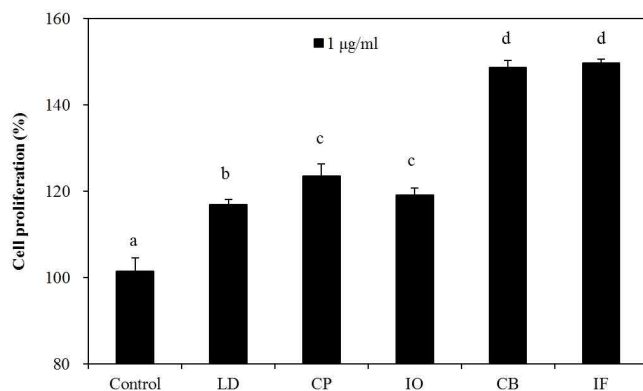


**Figure 1.** Evaluation of cell proliferation effects of EGF by a MTT assay on NIH3T3 fibroblasts. Mean  $\pm$  SD from triplicate determinations. a,b,c Values having different superscripts are significantly different at  $P < 0.05$ .

#### 해조류 추출물들의 세포증식 효능

해조류 추출물들의 섬유아세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 제주 자생 해조류인, 바위두둑, 반질불레기말, 패, 긴불레기말 및 넓패의 80% 수용성 메탄올 추출물 1  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 결과, 긴불레기말과 넓패 추출물에서 가장 높은 증식효능을 보였다 (Figure 2). 이전 연구에서 살펴보면 넓패는 항산화, 항염 그리고 항당뇨 등 다양한 효능이 있다고 알려져 있으며, 특히 이 주요성분 중 플로로탄닌 계열인 Octaphloretol A (OPA)가 잘 알려져 있으나, 아직까지 섬유아세포의 증식에 영향을 미친다는 보고는 없었다 [8, 10, 13]. 하지만, OPA는 항산화, 항염증 [8, 13] 등의 효능을 가지고 있어, 상처치유에 있어서 염증의 감소는 상처의 치유과정 중 염증단계 다음인 세포증식 단계로 신속히 넘어갈 수 있게 하여 상처 치유 속도를 가속화 할 수 있을 것이라 판단된다. 반면에 긴불레기말은 섬유아세포의 증식에 영향을 미친다는 연구결과와 보고는 없었지만, 일본에서 긴불

레기말의 추출물이 상처 치유 촉진 작용을 갖는다는 내용의 특허가 공개된 바 있다. 하지만 보고된 긴불레기말 추출물은 유기 용매 추출이 아니라는 점과 그에 대한 명확한 유용성분에 대한 보고된바가 없어, 차후 긴불레기말의 세포증식에 관여하는 명확한 유용성분의 규명 연구가 필요할 것으로 사료된다.



**Figure 2.** Screening of cell proliferation effects of marine algae extracts by a MTT assay on NIH3T3 fibroblasts. Mean ± SD from triplicate determinations. a,b,c Values having different superscripts are significantly different at  $P < 0.05$ . (LD: *Leathesia difformis*, CP: *Colpomenia peregrina*, IO: *Ishige okamurae*, CB: *Colpomenia bullosa*, IF: *Ishige foliacea*)

### 긴불레기말과 넓패 추출물의 세포 이동 효능

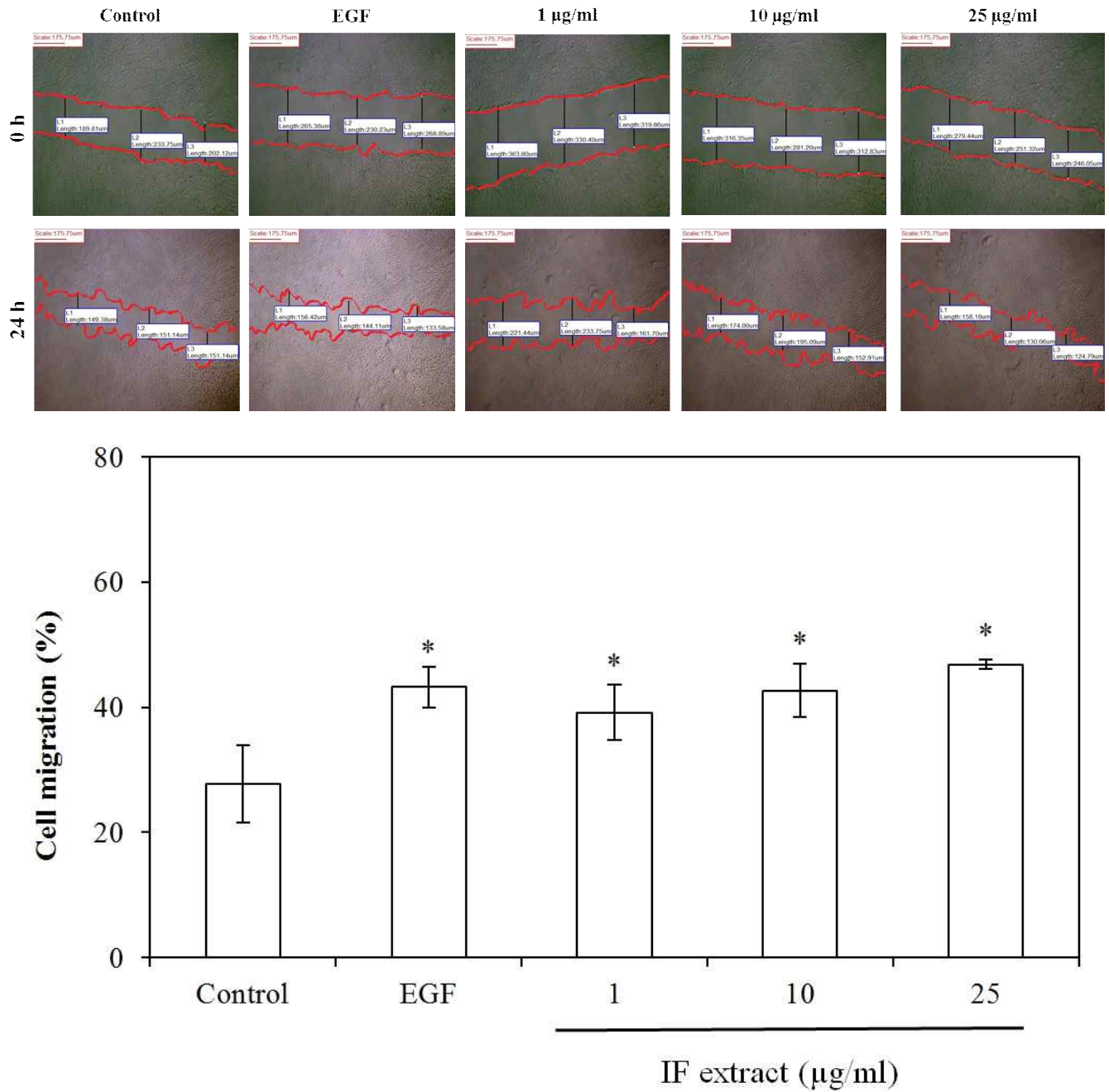
상처치유 단계는 총 4단계로 나눌 수 있으며, 그 중 증식단계에서는 섬유아세포의 이동과 증식이 일어나며 섬유아세포에 의해서 콜라겐 및 엘라스틴 등의 조직구성 단백질을 생성하며, 손상된 조직내로 새로운 혈관이 증식하는 단계이다. 따라서 상처치유에 있어 세포이동 (cell migration)은 매우 중요하다고 할 수 있다. 따라서 세포증식에서 가장 효능이 우수하였던 긴불레기말과 넓패 추출물의 섬유아세포의 세포이동에 미치는 영향을 알아보기 위하여 농도별 (1, 10, 25 µg/ml)로 섬유아세포에 처리하여 24시간 배양 후 세포이동 거리를 계산하였다. 그 결과 넓패 추출물은 농도 의존적으로 세포이동 거리가 증가한 것을 확인할 수 있었지만, 농도별 간에 유의적인 차이는 확인할 수 없었다. 하지만 양성대조군인 EGF와 비슷한 세포이동 효능을 나타냄을 확인하였다. 긴불레기말 추출물의 경우도 농도 의존적으로 세포

이동 거리가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 넓패 추출물과는 다르게 긴불레기말 추출물 농도별 간에 유의적인 차이가 있었으며, 양성대조군인 EGF보다 더 우수한 세포이동 효능을 나타내는 것을 확인하였다 (Figure 3, 4). 긴불레기말의 이전 연구를 살펴보면 긴불레기말의 클로로포름 추출물이 비장 세포 및 T 세포 (Thymus cell)의 증식에 영향을 미치고 [16], *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Serratia liquefaciens* 및 *Staphylococcus aureus* 등의 세균에 항균효과 [11]가 있다고 알려져 있다. 이러한 연구결과들은 직접적으로 섬유아세포의 증식에 영향을 미친다고는 할 수 없으나 상처치유과정에 있어 면역세포들의 증식 및 항균효과는 상처치유과정에서 수반되는 염증들을 감소시켜 섬유아세포의 증식 및 이동에 영향을 미칠 것이라 사료되어진다.

### 결론

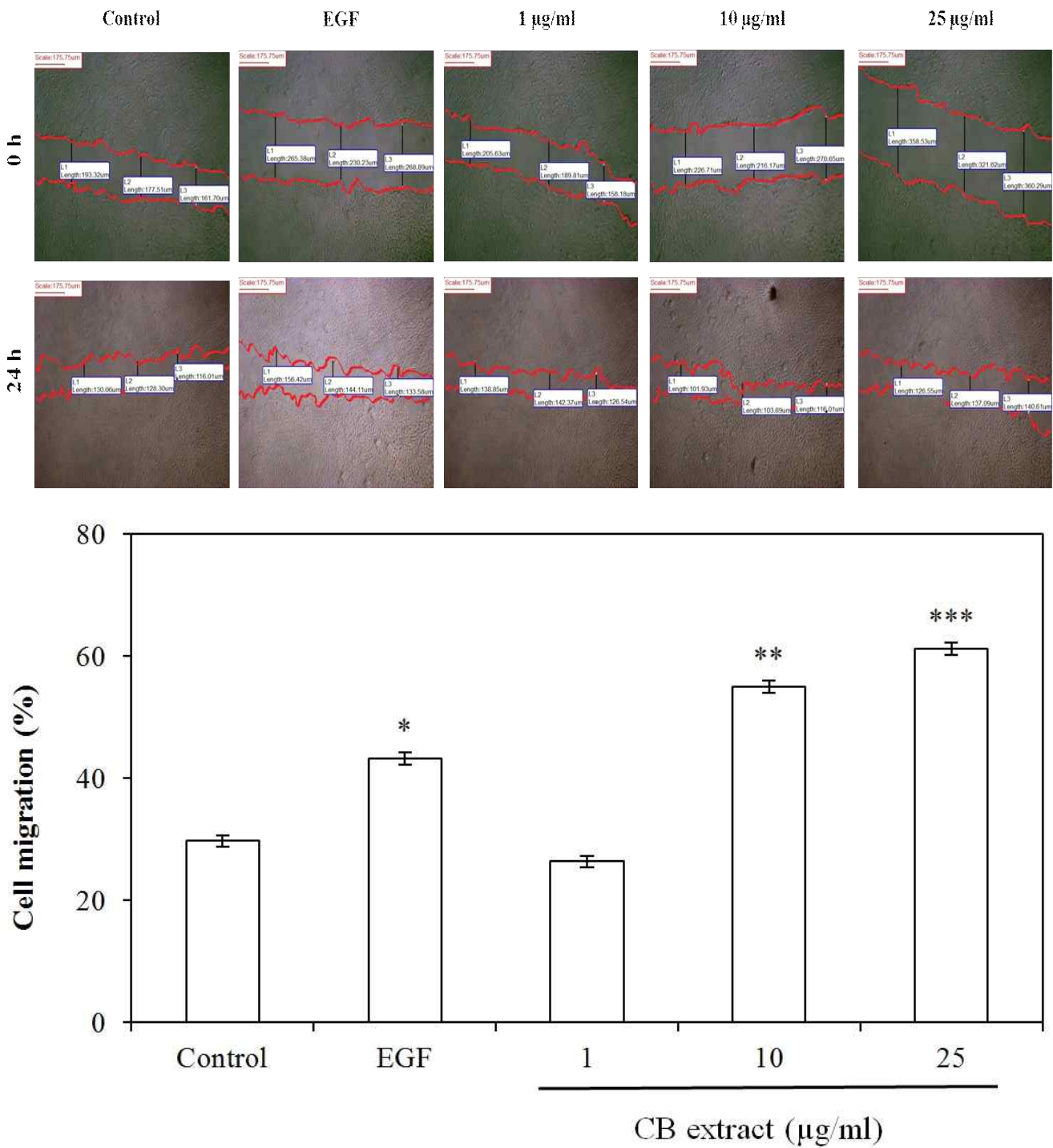
제주도 자생 해조류 중 갈조류 5종 (바위두독, 반질불레기말, 패, 긴불레기말, 넓패)의 80% 수용성 메탄올 추출물들이 섬유아세포 증식 및 이동에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 수행한 결과, 넓패와 긴불레기말 추출물 1 µg/ml 농도에서 가장 세포 증식 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 세포증식 효능을 나타낸 넓패와 긴불레기말 추출물이 섬유아세포의 세포이동에도 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 실시한 세포 이동 효능평가에서 넓패 추출물은 양성대조군인 EGF와 비슷한 세포 이동 효능이 나타났지만 농도 의존적으로 유의적인 차이는 없었다. 그에 반해 긴불레기말 추출물은 세포 이동 효능에서 농도 의존적으로 유의적인 차이를 보였으며, 양성대조군인 EGF보다 우수한 세포이동 효능을 나타내었다.

따라서, 넓패와 긴불레기말 추출물이 섬유아세포의 증식 및 이동에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 기능성 화장품 천연 원료로써 가능성을 제시할 수 있고, 향후 유용성분의 명확한 규명과 동물실험에서 상처치유 효능 연구가 필요할 것으로 사료된다.



**Figure 3.** *Ishige foliacea* extract treatment increases the migratory behavior of NIH3T3 cells. The migratory behavior of non-treated (control), EGF-treated (positive control) or *Ishige foliacea* extract-treated (1, 10 and 25 μg/ml) cells was analysed in an in vitro model. Photographs of the cultures were taken immediately after the incision (0 h), after 24 h and wounds measured in wide. Mean ± SD from triplicate determinations.

\* Significantly different from only non-treated control ( $P < 0.05$ ).



**Figure 4.** *Colpomения bullosa* extract treatment increases the migratory behavior of NIH3T3 cells. The migratory behavior of non-treated (control), EGF-treated (positive control) or *Colpomения bullosa* extract-treated (1, 10 and 25 μg/ml) cells was analysed in an in vitro model. Photographs of the cultures were taken immediately after the incision (0 h), after 24 h and wounds measured in wide. Mean ± SD from triplicate determinations.  
 \* Significantly different from only non-treated control ( $P < 0.05$ );  
 \*\* Significantly different from only non-treated control ( $P < 0.01$ );  
 \*\*\* Significantly different from only non-treated control ( $P < 0.005$ ).

## 감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다.(No.2014R1A1A2007015).

## References

- Chen, X., Cen, P. and Chen, J. 2005. Enhanced production of human epidermal growth factor by a recombinant *Escherichia coli* integrated with in situ exchange of acetic acid by macroporous ion-exchange resin. *J. Biosci. Bioeng.* **5**, 579-581.
- Cho, A. R. 2002. Effect of silver sulfadiazine on the skin cell proliferation and wound healing process in hairless mouse 2<sup>nd</sup> degree burn model. *J. Kor. Pharm. Sci.* **32(2)**, 133-117.
- Chung, K. H., Park, S. H., Kim, M. K., Park, H. D. and Son, T. I. 2006. Stabilization of epidermal growth factor on thermal and proteolytic degradation by conjugation with low molecular weight chitosan. *J. App. Polym. Sci.* **102**, 5072-5082.
- Elias, P. M. 1983. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* **80**, 44-49.
- Harding, C. R. 2004. The stratum corneum: Structure and function in health and disease. *Dermatol. Ther.* **17**, 6-15.
- Hardwicke, J., Schmaljohann, D., Boyce, D. and Thomas, D. 2008. Epidermal growth factor therapy and wound healing-past, present and future perspective. *Surgeon.* **6**, 172-177.
- Jung, Y. and Li, S. H. 2013. The effects of Er-miao-San extract on cell proliferation in normal human dermal fibroblasts. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **11(5)**, 943-949.
- Kang, M. C., Kim, K. N., Lakmal, H. H. C., Kim, E. A., Wijesinghe, W. A. J. P., Yang, X., Heo, S. J. and Jeon, Y. J. 2014. Octaphlorethol A isolated from *Ishige foliacea* prevents and protects against high glucose-induced oxidative damage in vitro and in vivo. *Environ. Toxicol. Phar.* **38(2)**, 607-615.
- Kim, M. J., Kim, J. Y., Jung, T. K., Choi, S. W. and Yoon, K. S. 2006. Skin anti-aging effect of *Forsythia viridissima* L. extract. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **21(6)**, 444-450.
- Lee, S. H., Kang, S. M., Ko, S. C., Lee, D. H. and Jeon, Y. J. 2012. Octaphlorethol A, a novel phenolic compound isolated from a brown alga, *Ishige foliacea*, increases glucose transporter 4-mediated glucose uptake in skeletal muscle cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **420(3)**, 576-581.
- Lee, S. Y., Kim, J. H., Song, E. J., Kim, K. B. W. R., Hong, Y. K., Lim, S. M. and Ahn, D. H. 2009. Investigation of antimicrobial activity of brown algae extracts and the thermal and pH effects on their activity. *Food. Sci. Biotechnol.* **18(2)**, 506-512.
- Lim, N. Y., Kim, D. S., Ko, K. S., Mun, Y. J. and Woo, W. H. 2011. Effect of Fructus Ligustri Lucidi H<sub>2</sub>O extract on cell proliferation in human dermal fibroblast. *Kor. J. Acupuncture.* **28(3)**, 43-51.
- Manzoor, Z., Mathema, V. B., Chae, D., Kang, H. K., Yoo, E. S., Jeon, Y. J. and Koh, Y. S. 2013. Octaphlorethol A inhibits the CpG-induced inflammatory response by attenuating the mitogen-activated protein kinase and NF- $\kappa$ B pathways. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77(9)**, 1970-1972.
- Moon, S. H., Kim, H. S. and Lee, H. M. 2001. Growth factors and their clinical applications. *J. Kor. Spine. Surg.* **8(3)**, 372-377.
- Oh, E. J., Shin, J. H., Choi, J. H. and Chung, H. Y. 2010. Biological effect of placenta extract on human fibroblast. *Tissue. Eng. Regen. Med.* **7(2)**, 217-222.
- Seo, Y., Kang, S. H., Lee, H. J., Kim, Y. A., Youn, H. J., Lee, B. J. and Chung, H. 2006. In vitro screening of seaweed extract on the proliferation of mouse spleen and thymus cell. *Biotechnol. Bioproc. E.* **11(2)**, 160-163.