

두날리엘라 살리나 추출물의 피부 열노화 억제 효과

주 지 혜 · 석 지 현* · 홍 인 기* · 김 남 경 · 최 은 미†

(주)그린솔루션스 기업부설연구소, *(주)레이디안 기업부설연구소
(2015년 12월 17일 접수, 2016년 2월 23일 수정, 2016년 2월 24일 채택)

Inhibitory Effects of *Dunaliella salina* Extracts on Thermally-Induced Skin Aging

Ji-Hye Joo, Ji Hyun Seok*, In-kee Hong*, Nam Kyoung Kim, and Eunmi Choi†

Greensolutions Co., Ltd. R&D center, Room 207, Bioindustry Innovation Center, 32, Soyanggang-ro, Chuncheon, Gangwon-do 24232, Korea

* Radiant Co., Ltd. R&D center, Gangwon-do 24398, Korea

(Received December 17, 2015; Revised February 23, 2016; Accepted February 24, 2016)

요약: 자외선과 유사하게 열에 의한 콜라겐 분해와 비정상적인 탄력섬유의 축적을 증가시키는 현상을 열노화라 칭한다. 두날리엘라 살리나는 녹조류로 베타카로틴을 많이 함유하고 있어 건강식품으로 많이 이용되고 있으나 열에 의해 유도된 피부노화에서의 효능은 알려진 바 없다. 본 연구에서는 두날리엘라 살리나 에탄올 추출물의 항-열노화 효능을 확인하였다. 열을 가한 피부섬유아세포를 이용하여 MMP-1과 type I procollagen 발현을 ELISA를 이용해 확인하였다. 두날리엘라 살리나 추출물이 열에 의해 증가된 MMP-1 단백질 발현량을 감소시키며, type I procollagen 단백질 발현량은 증가시킨다는 사실을 확인하였다. 추가적으로, 두날리엘라 살리나 추출물에 의해 콜라겐 합성 과정에 관여하는 것으로 알려진 HSP47 mRNA의 발현이 증가함을 확인하였다. 또한, 두날리엘라 살리나 추출물이 염증매개인자(TGF- β , IL-12 등)의 발현을 감소시킴을 확인하였다. 다음으로 두날리엘라 살리나 추출물이 탄력섬유의 구성성분인 tropoelastin과 fibrillin-1 단백질 발현과 MMP-12 발현 조절을 통해 열에 의해 유도된 일광탄력섬유증을 조절하는 효능을 확인하였다. 이 결과를 통해 두날리엘라 살리나 추출물이 열에 의해 유도된 피부열노화를 효과적으로 예방함을 확인하였다.

Abstract: Just like UV radiation, heat increases collagen degradation and accumulation of abnormal elastin fiber and this is termed thermal skin aging. *Dunaliella salina* (DS), a green alga, is known for its beta-carotene accumulation, having various applications in the health and nutritional products. However, the effects of DS on heat-induced skin aging remain unexplored. In this study, we performed anti-thermal aging tests of the ethanol extract of DS (DSE). We measured the cellular levels of type I procollagen and MMP-1 using ELISA in human dermal fibroblast cells after heat shock. DSE reduced the expression of MMP-1 protein and increased the expression of type I procollagen. In addition, DSE upregulated the mRNA expression of HSP47 reduced by heat shock, which is involved in collagen synthesis. Also, DSE reduced the expression of inflammation mediator (TGF- β , IL-12, etc). We demonstrate that DSE regulates the heat-induced solar elastosis through the regulation of tropoelastin and fibrillin-1, two major proteins of elastic fibers, and MMP-12 expression. These results suggest that DSE may be effective for preventing thermally induced skin aging.

Keywords: *Dunaliella salina*, thermal aging, heat shock, type I procollagen, solar elastosis

† 주 저자 (e-mail: greensolutions.cro@gmail.com)
call: 033)258-6840

1. 서 론

피부 노화는 노화의 원인을 내부에서 찾는 내인성 노화와 외부에서 원인을 찾는 외인성 노화로 구분할 수 있다. 내인성 피부 노화는 시간이 지남에 따라 발생하는 자연적인 노화 현상으로서 활성산소가 직·간접적인 원인으로 작용한다고 알려져 있다. 외인성 피부 노화는 자외선을 포함한 여러 가지 외부 스트레스로 인해 발생하는 노화 현상으로서 굵고 깊은 주름, 피부 탄력의 감소, 색소 침착증 등을 비롯하여 피부암 발생도 증가시키는 것으로 보고되어 있다[1]. 외인성 피부 노화는 그 원인의 대부분이 햇빛이므로 광노화라고도 한다. 광노화의 임상적 특징은 내인성 노화에 비하여 심하고, 일찍부터 노화가 나타나는 것이다. 광노화는 주로 진피의 이상 소견을 가장 현저한 특징으로 하며, 교원 섬유의 감소와 탄력섬유양 물질의 축적이 두드러진다[2,3].

최근 자외선에 의한 광노화뿐만 아니라 적외선을 포함한 열노화에 대한 관심이 고조되고 있는데, 찜질방, 사우나, 컴퓨터 또는 핸드폰의 사용, 헤어드라이기 등의 생활 속에서 발생하는 열들 또한 열노화의 주요 원인이 되고 있다[4,5].

피부의 이상적인 온도는 체온보다 낮은 섭씨 30 ~ 31 °C로 알려져 있다. 정상체온인 사람은 30 min 간 강렬한 햇빛에 노출 시 최대 섭씨 43 °C까지 피부온도가 상승한다[6]. 피부 온도가 올라가면 피부의 주요 구성 물질인 콜라겐을 분해하는 효소가 활성화되어 피부 손상과 노화를 촉진하고 이는 곧 주름으로 이어진다[7-10,12,13]. 보고된 논문에 의하면 열에 의해서 mitogen-activated protein kinases (MAPK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 MAPK의 활성 및 interleukin-6 (IL-6), interleukin-12 (IL-12), transforming growth factor- β (TGF- β) 발현 증가를 통해 matrix metalloproteinase (MMP)-1 과 MMP-3의 발현이 증가한다고 보고된 바 있다[7]. 또한 열에 의해 증가된 reactive oxygen species (ROS)에 의한 신호전달체계에 의해 MMP 발현이 증가한다고 보고된 바 있다[11,16].

지속적으로 열에 노출되었을 시 피부 주름 형성 및 피부두께가 얇아지는 현상을 동물모델 및 사람 조직을 이용한 연구에서 확인된 바 있다[14].

광노화된 피부의 대표적인 현상인 일광탄력섬유증

(solar elastosis)은 열에 의해서도 발생한다고 알려져 있다. 열에 의해 탄력섬유를 구성하는 elastin은 급격히 증가하고, 또 다른 단백질인 fibrillin이 감소하여 비정상적인 탄력섬유가 쌓이게 되면서 피부가 노랗고 울퉁불퉁하게 보이는 현상이 발생하게 된다. 또한 열은 탄력섬유를 분해하는 효소인 MMP-12 발현을 증가시켜 피부 탄력을 감소시킨다[15].

미세조류는 현미경으로 관찰 가능한 크기가 작은 단세포 모양을 가진 원핵 또는 진핵 조류를 지칭하며, 식물과 마찬가지로 광합성 기작을 가지고 있고 광 독립 생장을 할 수 있다. 이러한 미세조류는 환경조건에 따라 폭발적인 증식력을 가지고 있으며, 배양이 가능하기 때문에 기존 생태계를 손상시키지 않고 유용한 물질을 생산하거나 환경문제 해결 등 다각적 방면에 이용될 수 있다. 특히 *Spirulina*, *Dunaliella*, *Chlorella*, *Schizochytrium*, *Euglena*와 같은 미세조류 중들은 식품 첨가제, 화장품, 건강식품, 의약품, 항산화제의 원료가 되는 카로티노이드(carotenoid), 피코시아닌(phycoyanin), 지질(EPA, DHA)과 같은 고부가 가치 생산물의 생산에 이용되기도 한다.

두날리엘라 살리나(*Dunaliella salina*)는 광합성을 하는 녹조류에 속하는 진핵생물로서, 세포 부피 50 ~ 100 μm^3 에 이르는 단세포 녹조류이다. 이들의 세포는 탄성이 있는 얇은 점막질로 둘러싸여 있고 일반 식물과 같은 단단한 다당류 세포벽을 갖고 있지는 않다. 두날리엘라 살리나는 베타카로틴을 다량 함유하고 있다고 알려져 있으며, 강한 빛의 조사와 같이 배양 환경이 악화되면, 광합성에 중요한 엽록소인 클로로필 A(chlorophyll A)를 보호하기 위해 베타카로틴을 합성하여 세포벽 아래에 베타카로틴 막을 형성한다고 알려져 있다. 두날리엘라 살리나의 주요 성분으로 알려진 베타카로틴은 염료로 사용될 뿐만 아니라 항산화 및 항암 효능이 있는 것으로 알려져 있어 식품 및 화장품, 의약품에 적용하여 사용하고 있다[19-21]. 그러나 열에 의한 피부 노화에 대한 연구는 없어 본 연구자들은 두날리엘라 살리나 추출물을 이용하여 열에 의한 피부 노화 억제 효능을 확인하고자 했다.

2. 재료 및 방법

2.1. 두날리엘라 살리나 추출물 제조

본 실험에 사용된 두날리엘라 살리나는 한국미세조류은행에서 분양받아 사용하였다. 두날리엘라 살리나 30 g에 70% 에탄올 600 mL을 처리한 후, 상온 조건에서 3 h 동안 추출하였다. 이후, 제조된 추출물을 여과하여 얻어진 여액을 감압농축기를 이용하여 용매를 제거한 후 동결건조하여 1.87 g의 시료를 수득하였으며, 이 분말을 -20°C 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 동결건조분말은 실험 시 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, USA)에 용해시킨 후 사용하였다.

2.2. 세포주 및 세포배양

세포는 피부각질형성세포(human epidermal keratinocytes)주인 HaCaT과 피부섬유아세포(human dermal fibroblasts, HDF)를 이용하였다. HaCaT은 Cell Line Service (CLS, Germany)에서 구입하였으며, HDF는 세포바이오(Cell Engineering for Origin (CEFO), Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 구입한 세포를 DMEM 배지에 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone Lab., USA), 1% penicillin/streptomycin (Hyclone Lab., USA)을 첨가하여 37°C , 5% CO_2 조건하에서 배양하여 실험에 이용하였다.

2.3. 세포독성 측정

96-well plate에 HaCaT은 1×10^4 cells/well의 농도로 접종하였으며, HDF는 5×10^3 cells/well의 농도로 접종하였다. 두 세포주 모두 24 h 후에 FBS를 첨가하지 않은 배지로 교환한 후, 추출물을 처리하여 24 h 배양하였다. 이후에 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 농도의 MTT (Sigma, USA) 용액 $20 \mu\text{L}$ 을 각각의 well에 첨가하고 4 h 동안 결정화한 후 isopropanol (Merck, Millipore, Germany)에 용해하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. 열 자극 및 시료처리

60 mm 플레이트에 HaCaT은 8×10^5 cells/well의 농도로 접종하였으며, HDF는 5×10^5 cells/well의 농도로 접종하였다. 열 처리 전에 배양배지 제거 후 FBS를 첨가하지 않은 배지가 들어있는 상태에서 플레이트를 parafilm을 이용하여 sealing해준다. 이후 37°C 및 42°C

$^{\circ}\text{C}$, 44°C 에서 열을 가해주었다. HaCaT의 경우, 44°C 에서 15 min 동안 열처리를 진행하였으며, HDF의 경우 42°C 에서 30 min 간 열처리를 진행하였다. 그 후 FBS를 첨가하지 않은 배지에 추출물을 희석하여 처리한 후 24 h 추가 배양하였다[7].

2.5. 효소 면역 분석법(Enzyme-link Immunosorbent Assay, ELISA)

60 mm 플레이트에 HaCaT은 8×10^5 cells/well의 농도로 접종하였으며, HDF는 5×10^5 cells/well의 농도로 접종하였다. 열을 가한 세포에 추출물을 FBS가 첨가되지 않은 배지에 희석한 후 24 h 동안 추가배양하였다. 배양이 끝난 배지의 상층액을 이용하여 효소면역분석법을 MMP-1 ELISA kit (Abnova, Taiwan), type I procollagen EIA kit (Takara, Japan), IL-6 ELISA kit (R&D system, USA), IL-12 ELISA kit (R&D system, USA)를 이용하여 시행한 후, 450 nm 에서 측정하였다. MMP-1과 type I procollagen발현 확인은 HDF를 이용하였으며, IL-6, IL-12 발현은 HaCaT을 이용하여 확인하였다.

2.6. RT-PCR

HaCaT을 60 mm 플레이트에 8×10^5 cells/well의 농도로 접종하였다. 그 후 열을 가해준 다음 FBS가 첨가되지 않은 배지에 희석한 후 24 h 동안 추가 배양하였다. Total RNA를 추출하기 위해 각 well에 TRIzol reagent (Ambion, USA) 1 mL 를 첨가하고 5 min 간 방치하여 세포를 용해시켰다. 그 후 chloroform $200 \mu\text{L}$ 를 첨가하여 $12,000 \text{ rpm}$ 에서 15 min 동안 원심분리하였다. 상층액을 취하여 새로운 tube에 옮기고 같은 양의 isopropanol을 첨가한 후 10 min 간 상온에 방치하였다. 그 후 $12,000 \text{ rpm}$ 에서 10 min 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 75% 에탄올을 이용하여 $7,500 \text{ rpm}$ 에서 5 min 간 원심분리하여 세척하고 공기 중에서 건조시킨 후, nuclease-free water를 이용하여 녹였다. UV-spectrophotometer (Biochrom, USA)를 이용하여 RNA를 정량하였고 First Strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA는 EmeraldAmp GT PCR Master Mix (Takara, Japan)와 프라이머를 이용하여 타겟유전자를 증폭시켰다. 반응조건은 95°C 5 min 반응 후, 94°C 30 s, 62°C 30 s, 72°C 40 s를 30

회 반복하여 증폭시켰다. 각 PCR 산물은 1.5 ~ 2% 아가로즈 겔에 로딩하여 100 V 조건에서 20 min 동안 전기영동을 통하여 분석하였다. 증폭하고자 하는 유전자들의 primer 염기서열은 다음과 같다.

TGF- β (Forward: 5'-ACCTGCCACAGATCCCCTAT-3',
Reverse: 5'-AACACGGGTTTCAGGTA-3'),
HSP47 (Forward: 5'-TCGTCTCGACTCCTGGAATG-3',
Reverse: 5'-ACATGGCGTTGACTAGCAGG-3').

2.7. Western Blot

HaCaT을 60 mm 플레이트에 8×10^5 cells/well의 농도로 접종하였다. 그 후 열을 가해준 다음 FBS가 첨가되지 않은 배지에 시료를 희석한 후 24 h 동안 추가 배양하였다. 배양한 세포를 회수하여 radioimmuno-precipitation assay buffer (RIPA buffer; Thermo Scientific, USA)를 이용하여 단백질을 추출하고 bicinchoninic acid (BCA) assay에 따라 정량한 후, sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 하여 분리하였다. 전기영동 후 단백질을 gel에서 polyvinylidene difluoride (PVDF) 막으로 transfer 한 뒤, COX-2 (Santacruz, USA), goat anti-rabbit IgG-HRP (Santacruz, USA) 항체를 결합하여 타겟 단백질을 표지하고 필름 감광하였다.

2.8. 통계처리

모든 통계분석은 *t*-test를 시행하여 *p*-value를 구하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 *, $p < 0.01$ 인 경우 **로 유의성이 있다고 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 두날리엘라 살리나 추출물의 세포독성

두날리엘라 살리나 추출물의 세포독성을 측정하기 위하여 MTT assay를 통해 확인하였다. 그 결과, 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 약간의 세포 독성이 확인되었으며, 이보다 낮은 농도에서는 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다(Figure 1). 이 결과는 두 세포에서 모두 동일하게 나타났다. 이후 실험은 50 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 진행하였다.

3.2. MMP발현 억제 및 Type I Procollagen 생성 회복 효과

열에 의해 활성화되는 MMP의 발현에 두날리엘라 살리나 추출물이 주는 영향을 보기 위해, 열을 가한 섬

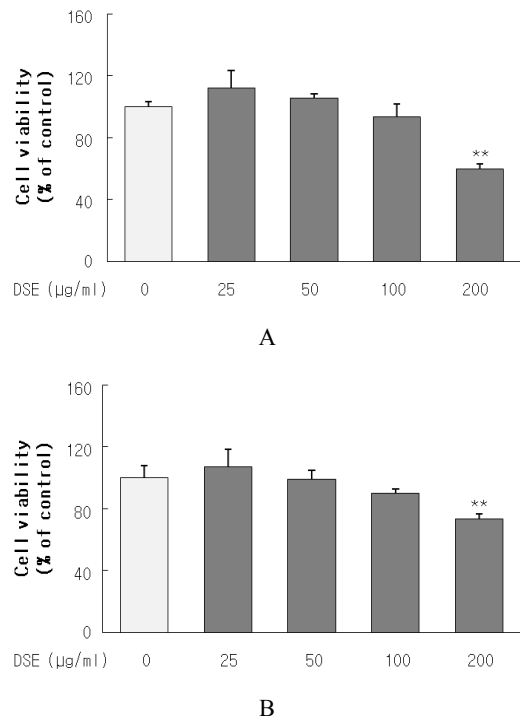


Figure 1. Cytotoxic effect of *Dunaliella salina* extract (DSE) on HaCaT (A) and HDF (B) by MTT assay. After HaCaT and HDF cells were treated with various concentration of DSE for 24 h, the MTT assay was performed. Data are shown as a percentage of control from the three independent experiments in triplicate and values represent as the mean \pm S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

유아세포에 두날리엘라 살리나 추출물을 처리하여 MMP-1에 대한 발현량을 측정하였다. 그 결과 열을 주었을 때 MMP-1의 발현 증가를 확인하였고, 양성대조군인 epigallocatechin gallate (EGCG)에 의해 그 발현이 감소한 것을 확인하였다. 두날리엘라 살리나 추출물의 경우 50 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 열에 의한 MMP-1 증가를 억제시킴을 확인하였다(Figure 2A). 이는 EGCG와 비슷한 수준으로 감소하였다.

다음으로 type I procollagen의 합성 효과를 알아보기 위하여 열을 가한 섬유아세포에 두날리엘라 살리나 추출물을 처리하여 type I procollagen에 대한 발현량을 측정하였다. 그 결과 열을 주었을 때 type I procollagen의 발현 감소를 확인하였고, 양성대조군인 epidermal growth factor (EGF)에 의해 그 발현이 증가한 것을 확인하였다. 두날리엘라 살리나 추출물의 경우 50 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도

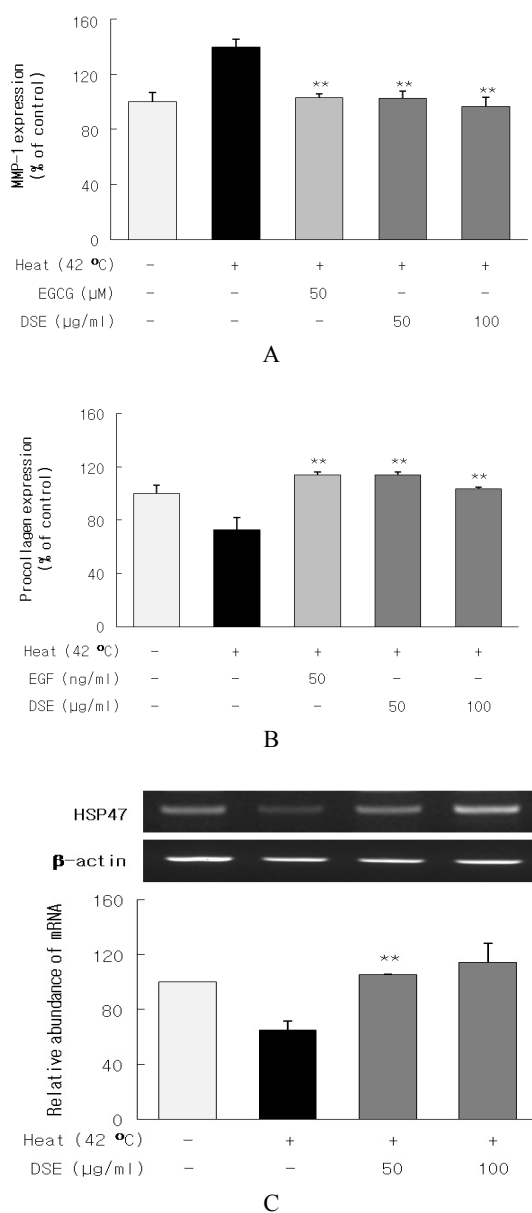


Figure 2. Effect of DSE on expression of MMP-1 (A), type I procollagen (B) and HSP47 (C). HDF cells were incubated with 50 ~ 100 µg/mL of DSE for 24 h. MMP-1 (A) and type I procollagen (B) contents were measured by absorbance values at the wavelength 450 nm. EGCG (50 µM) and EGF (20 ng/mL) was used as a positive control. (C) Total RNA was extracted from cells and was subjected to RT-PCR with primer against HSP47. The relative mRNA intensity was normalized by β-actin signal. Data are shown as a percentage of control from the three independent experiments in triplicate and values represent as the mean ± S.D. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 compared with the heat-treated control group.

에서 열에 의한 type I procollagen 감소를 EGF와 비슷한 수준으로 증가시킴을 확인하였다(Figure 2B).

Heat shock protein 47 (HSP47)은 콜라겐-특이적 분자 샤페론(collagen-specific molecular chaperone)으로서 콜라겐 합성 과정에 관여하는 열충격 단백질로 알려져 있다. 이 HSP47은 콜라겐 합성 과정 중 triple-helix procollagen의 접힘(folding)과 안정화를 도와주는 역할을 한다고 보고된 바 있다[17,18]. 이에 Figure 2C에서는 두날리엘라 살리나 추출물이 HSP47 발현에 미치는 영향을 알아보았다. 열을 가한 섬유아세포에 두날리엘라 살리나 추출물을 처리하여 HSP47 발현 변화를 확인하였다. 그 결과, 열에 의해 HSP47의 발현이 감소한 것을 확인할 수 있었으며, 두날리엘라 살리나 추출물에 의해 감소된 HSP47 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

3.3. 염증성사이토카인 및 염증매개인자 발현 억제 효과

열에 의한 MMP의 발현에 영향을 주는 것으로 알려져 있는 IL-6, IL-12, TGF-β, COX-2에 대해[7] 두날리엘라 살리나의 조절효과를 평가하기 위해 열을 가한 각질형성세포에 두날리엘라 살리나 추출물을 처리하여 IL-6, IL-12, TGF-β, COX-2에 대한 발현량을 측정하였다. 먼저, ELISA를 통해 IL-6, IL-12 발현량을 확인해본 결과, 열에 의해 IL-6, IL-12 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 양성대조군으로 사용한 dexamethasone (Dex)에서 열에 의해 증가된 IL-6, IL-12 발현이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 두날리엘라 살리나 추출물의 경우, 열에 의해 증가된 IL-6, IL-12 발현을 감소시키는 것을 확인하였다(Figure 3A, B).

또한 두날리엘라 살리나 추출물이 TGF-β 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 두날리엘라 살리나 추출물이 열에 의해 증가된 TGF-β 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3C).

다음으로 열에 의해 활성화되는 염증매개인자인 COX-2의 단백질 발현 변화에 두날리엘라 살리나 추출물이 미치는 영향을 western blot을 통해 확인하였다. 그 결과 열에 의해 증가된 COX-2의 단백질 발현이 두날리엘라 살리나 추출물에 의해 감소한 것을 확인할 수 있었다(Figure 3D).

3.4. 일광탄력섬유증 억제 효능

광노화의 대표적인 현상으로 알려져 있는 일광탄력섬유증은 진피 상층에 비정상적인 노란색의 탄력섬유

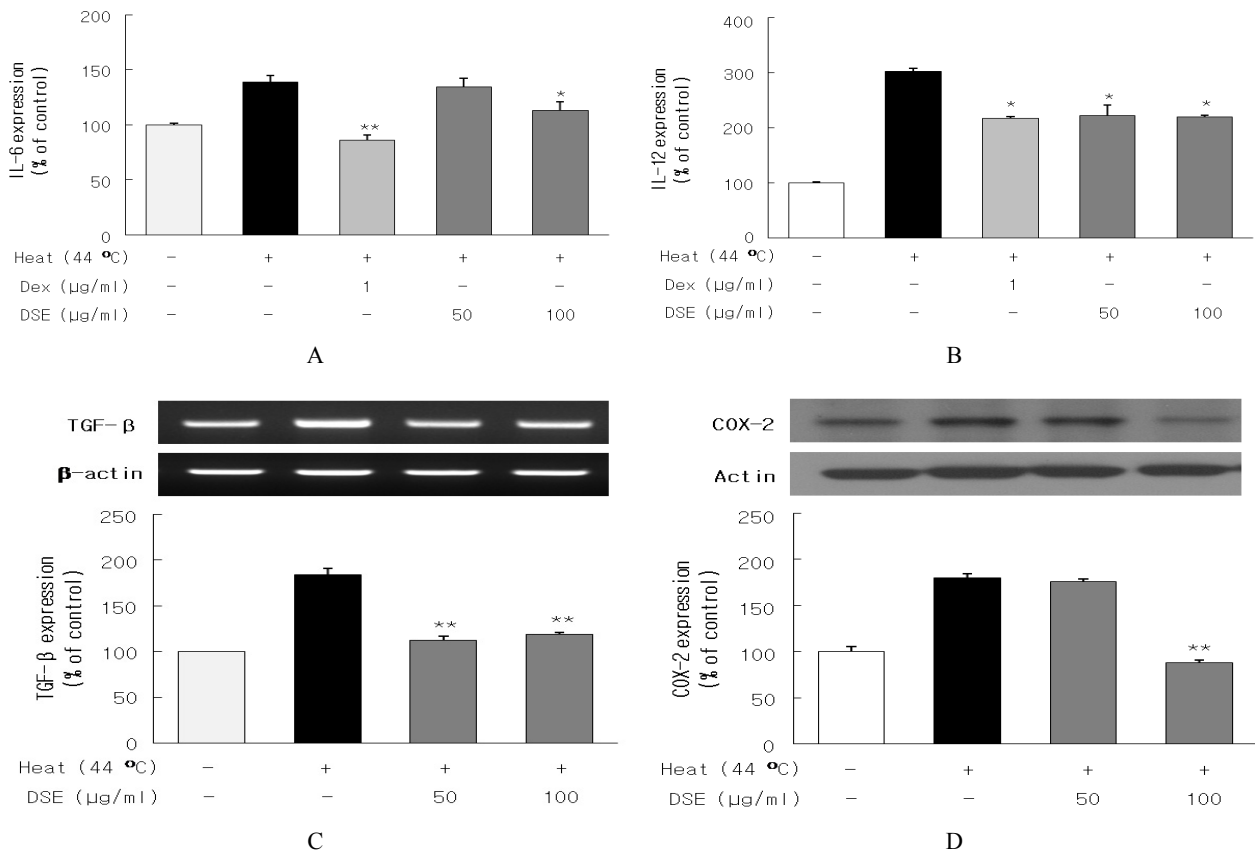


Figure 3. Inhibitory effect of DSE on inflammation in HaCaT. HaCaT cells were incubated with 50 ~ 100 μg/mL of DSE for 24 h. IL-6 (A) and IL-12 (B) contents were measured by absorbance values at the wavelength 450 nm. (C) Total RNA was extracted from cells and was subjected to RT-PCR with primer against TGF-β. The relative mRNA intensity was normalized by β-actin signal. (D) Total protein was extracted from cells and was subjected to Western blotting with antibody against COX-2. The relative protein intensity was normalized by actin signal. Data are shown as a percentage of control from the three independent experiments in triplicate and values represent as the mean ± S.D. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 compared with the heat-treated control group.

물질들이 축적되는 현상이다. 자외선에 의해 피부의 elastin 성분은 증가하고, fibrillin 성분이 줄어들면서 비정상적인 elastin material이 진피상층에 형성되면서 피부가 노랗게 보이는 현상이 나타난다. 이런 일광탄력 섬유증이 열에 의해서도 나타난다고 보고된 바 있으며 [11], 두날리엘라 살리나 추출물이 일광탄력 섬유증에 관여하는 인자들 중 tropoelastin, fibrillin-1, MMP-12 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해서 RT-PCR을 수행하였다. 열에 의해 증가된 tropoelastin 발현이 두날리엘라 살리나 추출물에 의해 감소된 것을 확인할 수 있었다. Fibrillin-1의 경우, 열에 의해 감소되는 경향을 보였으며, 이는 *in vivo*에서도 같은 결과를 보였다[15]. 감소

된 fibrillin-1 발현은 두날리엘라 살리나 추출물에 의해 증가된 것을 확인할 수 있었다. Elastinase인 MMP-12의 발현은 열에 의해 증가되었으며 두날리엘라 살리나 추출물에 의해 감소된 것을 확인할 수 있었다(Figure 4).

4. 결 론

본 연구는 미세조류인 두날리엘라 살리나의 피부 열노화 억제 효능을 알아봄으로써 피부노화 화장품원료로서의 가능성을 알아보았다. 열을 가한 섬유아세포를 이용하여 두날리엘라 살리나 추출물의 항주름 효능을 확인해 본 결과, 열에 의해 증가한 MMP-1 발현 감소

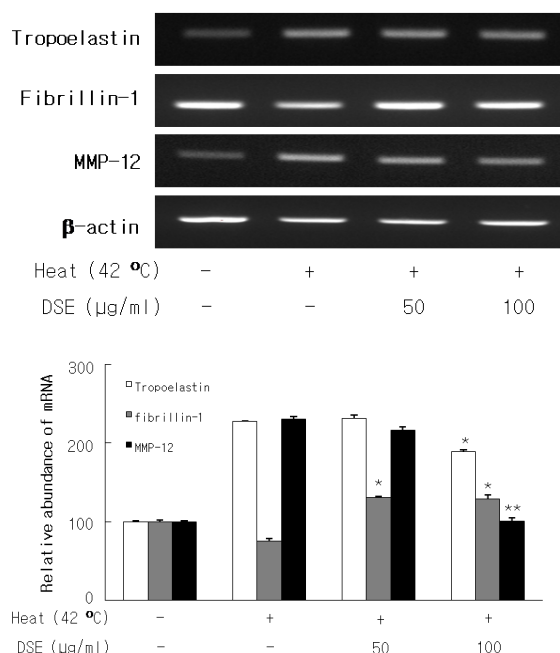


Figure 4. Regulatory effect of DSE on solar elastosis in HDF. HDF cells were incubated with 50 ~ 100 µg/mL of DSE for 24 h. Total RNA was extracted from cells and was subjected to RT-PCR with primer against tropoelastin, fibrillin-1 and MMP-12. The relative mRNA intensity was normalized by β-actin signal. Data are shown as a percentage of control from the three independent experiments in triplicate and values represent as the mean ± S.D. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the heat-treated control group.

및 HSP47 발현 조절을 통한 콜라겐 합성 과정에 관여하는 것으로 판단된다. 또한 열에 의해 증가한 염증성 사이토카인(IL-6, IL-12, TGF-β)과 염증매개인자(COX-2) 발현 억제 효능을 확인하였다. 추가적으로 일광탄력섬유증에 관여하는 인자들(tropoelastin, fibrillin-1, MMP-12)의 발현 조절을 통해 일광탄력섬유증 억제 효능을 확인할 수 있었다. 따라서 두날리엘라 살리나 추출물은 항주름 효능 및 항염, 일광탄력섬유증 억제 효능을 나타내는 물질이 함유된 것으로 생각되며, 효능 성분에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 최종적으로 본 연구 결과를 통해 볼 때, 두날리엘라 살리나 추출물은 열에 의해 나타나는 피부노화를 타겟으로 한 항노화 화장품 원료로서도 활용가능성이 있다고 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 산업통상자원부 생산기술사업지원사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제 고유번호 : 1415135932).

Reference

1. B. A. Gilchrest, Skin aging and photoaging: an overview, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**(3), 610 (1989).
2. I. M. Braverman and E. Fonferko, Studies in cutaneous aging: I. the elastic fiber network, *J. Invest. Dermatol.*, **78**(5), 434 (1982).
3. W. Montagna, S. Kirchner, and K. Carlisle, Histology of sun-damaged human skin, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**(3), 907 (1989).
4. S. Cho, M. H. Shin, Y. K. Kim, J. E. Seo, Y. M. Lee, C. H. Park, and J. H. Chung, Effects of infrared radiation and heat on human skin aging *in vivo*, *J. Invest. Derm. Symp P.*, **14**(1), 15 (2009).
5. S. Cho, M. J. Lee, M. S. Kim, S. Lee, Y. K. Kim, D. H. Lee, C. W. Lee, K. H. Cho, and J. H. Chung, Infrared plus visible light and heat from natural sunlight participate in the expression of MMPs and type I procollagen as well as infiltration of inflammatory cell in human skin *in vivo*, *J. Dermatol. Sci.*, **50**(2), 123 (2008).
6. J. H. Seo and J. H. Chung, Thermal aging: a new concept of skin aging, *J. Dermatol. Sci.*, **2**, S13 (2006).
7. C. H. Park, M. J. Lee, J. Ahn, S. Kim, H. H. Kim, K. H. Kim, H. C. Eun, and J. H. Chung, Heat shock-induced matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 are mediated through ERK and JNK activation and via an autocrine interleukin-6 loop, *J. Invest. Dermatol.*, **123**, 1012 (2004).
8. P. Brenneisen, R. Blaudschun, M. Bernards, J. Wenk, M. Wlaschek, W. Meyer-Ingold, M. Schauen, T. Krieg, and K. Scharffetter-Kochanek, Increased temperature: a potentially important side-effect of ultraviolet radiation treatment leading to induction of in-

- terstitial collagenase/matrix metalloproteinase-1, *Br. J. Dermatol.*, **139**(3), 537 (1998).
9. E. G. Hitraya, J. Varga and S. A. Jimenez, Heat shock of human synovial and dermal fibroblasts induces delayed up-regulation of collagenase-gene expression, *Biochem. J.*, **308**(3), 743 (1995).
 10. B. A. Vance, C. G. Kowalski, and C. E. Brinckerhoff, Heat shock of rabbit synovial fibroblasts increases expression of mRNAs for two metalloproteinases, collagenase and stromelysin, *J. Cell. Biol.*, **108**, 2037 (1989).
 11. M. H. Shin, Y. J. Moon, J. E. Seo, Y. Lee, K. H. Kim, and J. H. Chung, Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase, xanthine oxidase and mitochondrial electron transport system mediate heat shock-induced MMP-1 and MMP-9 expression, *Free. Radic. Biol. Med.*, **44**(4), 635 (2008).
 12. W. H. Li, Y. M. Lee, J. Y. Kim, S. Kang, S. Kim, K. H. Kim, C. H. Park, and J. H. Chung, Transient receptor potential vanilloid-1 mediates heat-shock-induced matrix metalloproteinase-1 expression in human epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 2328 (2007).
 13. Y. M. Lee, W. H. Li, Y. K. Kim, and J. H. Chung, Heat-induced MMP-1 expression is mediated by TRPV1 through PKC α signaling in HaCaT cells, *Exp. Dermatol.*, **17**(10), 864 (2008).
 14. M. H. Shin, J. E. Seo, Y. K. Kim, K. H. Kim, and J. H. Chung, Chronic heat treatment causes skin wrinkle formation and oxidative damage in hairless mice, *Mech. Ageing. Dev.*, **133**(2-3), 92 (2012).
 15. Z. Chen, J. Y. Seo, Y. K. Kim, S. R. Lee, K. H. Kim, K. H. Cho, H. C. Eun, and J. H. Chung, Heat modulation of tropoelastin, fibrillin-1, and matrix metalloproteinase-12 in human skin *in vivo*, *J. Invest. Dermatol.*, **124**, 70 (2005).
 16. G. Park and M. S. Oh, Acceleration of heat shock-induced collagen breakdown in human dermal fibroblasts with knockdown of NF-E2-related factor 2, *BMB. Rep.*, **48**(8), 467 (2015).
 17. T. Taguchi and M. S. Razaque, The collagen-specific molecular chaperone HSP47 is there a role in fibrosis?, *Trends. Mol. Med.*, **13**(2), 45 (2006).
 18. Y. Zhang, M. Ghazwani, J. Li, M. Sun, D. B. Stolz, F. He, J. Fan, W. Xie, and S. Li, MiR-29b inhibits collagen maturation in hepatic stellate cells through down-regulating the expression of HSP47 and lysyl oxidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **446**(4), 940 (2014).
 19. D. Tran, N. Doan, C. Louime, M. Giordano, and S. Portilla, Growth, antioxidant capacity and total carotene of *Dunaliella salina* DCCBC15 in a low cost enriched natural seawater medium, *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, **30**(1), 317 (2014).
 20. B. Mogedas, A. Salgueto, C. Casal, and C. Vilachez, Beta-carotene production enhancement by UV-A radiation in *dunaliella bardawil* cultivated in laboratory reactors, *J. Biosci. Bioeng.*, **108**(1), 47 (2009).
 21. F. F. Madkour and M. M. Abdel-Daim, Hepato-protective and antioxidant activity of *Dunaliella salina* in paracetamol-induced acute toxicity in rats, *Indian. J. Pharm. Sci.*, **75**(6), 642 (2013).