

Research Article



미세먼지 유발 피부노화에 대한 쌍별귀뚜라미의 예방 효과

김경 ^{1,*}, 이채헌 ^{1,*}, 박은영 ², 오윤신 ¹

¹울지대학교 식품영양학과

²목포대학교 약학대학

Anti-skinaging effects of *Gryllus bimaculatus* on ERM-CZ100-exposed human diploid fibroblasts

Kyong Kim ^{1,*}, Chae-Heon Lee ^{1,*}, Eun-Young Park ², and Yoon Sin Oh ¹

¹Department of Food and Nutrition, Eulji University, Seongnam 13135, Korea

²College of Pharmacy and Natural Medicine Research Institute, Mokpo National University, Mokpo 58645, Korea

OPEN ACCESS

Received: Sep 12, 2023

Revised: Oct 20, 2023

Accepted: Nov 2, 2023

Published online: Nov 28, 2023

Correspondence to

Yoon Sin Oh

Department of Food and Nutrition, Eulji University, 553 Sanseong-daero, Sujeong-gu, Seongnam 13135, Korea.
Tel: +82-31-740-7287
Email: ysoh@eulji.ac.kr

*Kyong Kim and Chae-Heon Lee contributed equally to this article.

© 2023 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID iDs

Kyong Kim

<https://orcid.org/0000-0001-9066-8204>

Chae-Heon Lee

<https://orcid.org/0009-0001-4130-5746>

Eun-Young Park

<https://orcid.org/0000-0002-4263-201X>

Yoon Sin Oh

<https://orcid.org/0000-0003-3995-4429>

ABSTRACT

Purpose: Increasing levels of domestic fine dust (DFD) have emerged as a serious problem that threatens public health by causing chronic respiratory diseases and skin aging. The present study was performed to investigate the inhibitory effects of *Gryllus bimaculatus* (the two-spotted cricket), which has recently attracted attention as an edible insect in South Korea, on DFD-induced aging and inflammation.

Methods: To verify that DFD causes skin aging and investigate the anti-aging effect of an aqueous ethanolic-*Gryllus bimaculatus* extract (AE-GBE), human diploid fibroblasts (HDF) were treated with 100 µg/mL of European reference material (ERM)-CZ100 dust for 24 hrs in the presence or absence of 100 µg/ml AE-GBE. Aging and cellular toxicities were assessed by measuring reactive oxygen species (ROS) levels, DNA fragmentation, and β-galactosidase activity. The protein levels of cyclooxygenase (COX) 2, matrix metalloproteinase (MMP)-1, and collagen were measured by western blot, and the mRNA expressions of inflammation-related genes were assayed by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Results: Treatment with ERM-CZ100 induced an aged phenotype in HDF cells, as evidenced by increased ROS levels, DNA fragmentation, and senescence-associated β-galactosidase activity, but cotreatment with AE-GBE significantly reduced these inductions. The mRNA expressions of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1β, IL-6, and tumor necrosis factor-α, induced by ERM-CZ100 were also reduced by AE-GBE cotreatment, which also reduced COX2 expression. Moreover, ERM-CZ100-induced MMP-1 expression and reduced collagen type I expression were recovered by AE-GBE treatment.

Conclusion: These results suggest that AE-GBE is a potential treatment for domestic fine dust-induced skin inflammation and inflammaging.

Keywords: skin aging; inflammation; particulate matter; edible insects

Funding

This study was supported by Basic Science Research Program Grant (NRF-2021R1F1A1050949) provided by the National Research Foundation of Korea (NRF), which is funded by the Ministry of Science, ICT and Future Planning and supported by 2023 Eulji University Innovation Support Project grant funded.

Conflict of Interest

There are no financial or other issues that might lead to conflict of interest.

서론

동아시아를 중심으로 증가하는 미세먼지의 증가는 호흡기계 뿐 아니라 심장 기능 장애, 천식, 임신합병증, 피부알레르기 및 염증 반응을 일으키는 전신 독성을 유발한다 [1,2]. 세계보건기구에 따르면 대기 오염으로 인한 조기 사망이 심혈관 질환, 호흡기 질환 및 폐암에서 각각 80%, 14% 및 6%의 비율로 발생한다고 밝혔다. 미세먼지 particulate matter (PM)는 공기역학적 직경 (aerodynamic diameter)에 따라 2.5-10 μm 의 ‘흡입 가능한 거친 입자’의 PM10과 직경 2.5 μm 미만의 초미세입자인 PM2.5로 분류한다 [3,4].

인체에서 가장 넓은 범위를 차지하는 피부는 다양한 외부환경에 대한 1차적 방어막 역할을 하는 중요 기관이다. PM의 피부질환과의 상관관계에 대한 최근 역학 연구에 따르면 PM은 피부 질환의 발병 및 악화에 영향을 미치는 것으로 나타났으며 활성 산소 종 (ROS, reactive oxygen species)의 생성과 tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , 및 IL-8과 같은 사이토카인의 분비를 통해 산화 스트레스, 염증을 유발하는 것으로 보고되고 있다. 또한 PM 노출에 의한 superoxide, hydroxy radical 등의 ROS 생성 증가는 matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3, MMP-9 등의 MMPs를 증가시켜 콜라겐 분해를 촉진함으로써 염증성 피부 질환의 증가와 피부 노화의 주된 원인이 되고 있다. 이렇게 피부 염증 상태가 지속되어 피부 노화를 유발하는 상태를 ‘염증이 노화를 일으킨다’는 의미로 ‘인플라메이징 (Inflammaging)’이란 단어가 사용되고 있다 [5,6].

공기 오염 물질과 피부 질환 사이의 연관성을 입증한 연구 결과는 지속적으로 발표되고 있으나 [7] 미세먼지 입자가 피부에 미치는 영향에 대한 연구는 여전히 부족하다. 현대사회에서 대기오염의 최대 주범은 차량 연기 및 공장에서 배출되는 매연으로 보고 있는데 [8], 이러한 미세 입자는 유기 화합물과 무기 화합물로 구성되며 발생원과 환경 조건에 따라 크기와 구성은 다양하기 때문에 실험적 객관성, 반복성을 찾기 어려웠다. 따라서 이런 문제점을 보완하기 위하여 유럽연합 집행위원회 공동연구센터 (Joint Research Centre, JRC)는 폴란드 Wislos-trada의 터널벽에서 오염입자를 포집하였으며 ISO 17034 인증을 받아 생산 및 표준화하였고 European reference material (ERM) CZ-100 (ERM CZ100)으로 명명하였다 [9]. 이것의 미세먼지 입자는 10 μm \geq 범위의 직경을 가지며 7가지 방향족화합물 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH's): benzo [a] anthracene, benzo [k] fluoranthene, benzo [b] fluoranthene, benzo [j] fluoranthene, benzo [a] pyrene, indeno [123-c, d] pyrene, dibenzo [a,h] anthracene으로 구성되어 있다 [10].

식물성생리활성물질을 의미하는 파이토케미컬 (phytochemical)은 주로 인체에서 항산화 역할을 하는 물질로 인식되며 항산화 작용을 통해 면역 기능을 증가시키고 노화 방지, 항암, 항염 등의 효과를 나타낸다 [11]. 실제 항산화 효과는 피부노화를 억제하는 중요한 전략 중의 하나로서 파이토케미컬을 중심으로 섭취 또는 외용제에 적용하는 방법은 널리 활용되어져 왔다 [12]. 대표적인 천연 항산화제로서 tocopherol, lecithin, cephalin, polyphenol, ascorbic acid, 탄닌, 안토시아닌, 카로티노이드, 커큐민류, resveratrol 등이 보고되고 있다 [13]. 최근에는 식물성 자원뿐만 아니라 해조류, 갑각류 등의 해양생물 및 곤충의 항산화 활성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 대표적으로 수생동물에 분포하는 아스타잔틴 (astaxanthin)은 비타민 E보다 많은 항산화력을 가진 것으로 확인되었으며 [14], 해조류의 성분인 후코이단

(fucoidan)은 화장품의 보습제로 사용되는 히알루론산보다도 높은 보습력을 갖고 있어 연구 및 활용 가능성은 높아지고 있는 추세이다 [15].

또한 척박한 자연환경에 진화하면서 개체를 유지해 온 곤충의 표피나 날개에서도 이런 페놀성 화합물은 발견되었다 [16,17]. 식용 곤충 중 보고된 생리활성물질로는 일부 나비 애벌레 종에서 발견되는 β -카로틴이 있으며, 이외에 Kaempferol-3,7-diglucoside, Kaempferol-3-O-glucoside, Kaempferol-3-O-rhamnoside, Myricetin 3-O-rhamnoside, Quercetin 3-O-rhamnoside 등이 발견된 것으로 보고되어 있다 [18,19]. Di Mattia 등 [20]의 연구에 의하면, 메뚜기와 누에, 귀뚜라미 등에서 추출한 수용성 성분의 항산화력은 (오렌지 주스의 5배 정도로) 매우 높은 것으로 발표하였다. 곤충에 함유되어 있는 폴리페놀량이 매우 낮은 수치임에도 불구하고, 곤충들의 항산화력이 높게 측정되는 것은 곤충의 항산화력이 폴리페놀 이외에 알려지지 않은 다른 물질에 기인함을 의미한다고 보고되었다. 최근 Nino 등 [21]에 따르면 곤충의 폴리페놀 성분은 식물의 잎, 줄기, 꽃잎 등의 섭취로 소화 흡수 및 대사 과정 중 생성되는 2차 대사 산물로 생성되거나 곤충의 탈피, 경화 과정 중에 합성되는 것으로 발표하였다.

메뚜기목 귀뚜라미과 (*Gryllidae*)에 속하는 아열대성 곤충인 쌍별귀뚜라미 (*Gryllus bimaculatus*)는 풍부한 불포화지방산과 함께 단백질, 키틴, 키토산이 높은 농도로 함유되어 있으며, 미래 식량자원 및 유용한 산업적 자원으로 주목받고 있다. 쌍별귀뚜라미의 생리활성물질에 대해 밝혀진 바는 없으나, 근육생성, 항암, 항염, 심장병 예방, 항노화, 치매예방, 소화기보호효과, 숙취해소 등 다양한 효능을 가지는 것으로 보고되고 있다 [22-26]. 최근 쌍별귀뚜라미는 높은 항산화 효과로 뷰티푸드 관련 식품소재로서의 활용가능성이 제시되고 있다 [27]. 자외선으로부터 유도된 광노화에 대한 쌍별귀뚜라미 추출물의 주름개선 효과가 일부 보고된 바 있으나, 미세먼지 노출에 의한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 미세먼지 표준 물질인 ERM-CZ100을 이용하여 시험관내 인체 이배체섬유아세포 (Human Diploid Fibroblast, HDF)에서 피부 손상 및 노화를 유도하고 쌍별귀뚜라미 70% 에탄올 추출물 (AE-GBE)이 ERM-CZ100 유발 피부노화에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

연구방법

실험재료 및 AE-GBE의 제조

본 연구에서 사용한 대기 미립자 포집물질인 European reference material CZ100 (ERM-CZ100)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 배지나 Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)에 현탁하여 사용하였다. 분석에 사용된 시약인 2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific, USA)에서 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)는 Duchefa (Biochemie BV, Haarlem, Netherlands)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 건조 쌍별귀뚜라미 (*Gryllus bimaculatus*)는 경상북도 예천군에 위치한 예천곤충마을에서 제공받아 사용하였다. 쌍별귀뚜라미는 분쇄기로 분쇄하여 분말화한 후, 에탄올/물 (70:30, v/v)로 20 mL/g의 비율로 60°C에서 3시간 동안 3회 추출하였다. 추출된 시료는 여과지 (Advantec no.2 Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)에 2회 여과한 후 vacuum rotary evaporator (T < 40°C)에서 농축하고 동결 건조하였으며 시료명은 AE-GBE (aqueous ethanolic-*Gryllus bimaculatus* extract)로 명명하였다.

세포배양

본 연구에 사용된 인체 이배체 섬유아세포 (human diploid fibroblast, HDF)는 서울대학교 의과대학 박상철 교수로부터 공급받았으며 [28], Dulbecco's modified Eagle Medium (Welgene, Daegu, Korea)에 10% (v/v) fetal bovine serum (Gibco, Paisley, UK)와 항생제인 1% penicillin-streptomycin (Welgene)을 첨가한 후 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 배양하였으며 20 passage 이하의 세포를 실험에 사용하였다.

세포독성평가

AE-GBE 및 ERM-CZ100을 세포 배양 배지에 희석하여 농도별로 처리하였으며 세포 독성 평가는 MTT 시약을 이용하여 측정하였다 [29]. 96 well plate (SPL Lifesciences, Pocheon, Korea)에 1.0×10^4 cell/mL의 농도로 HDF 세포를 분주한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 안정화 후 ERM-CZ100은 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 각각 처리하였으며 AE-GBE는 10-1,000 µg/mL 사이의 6 개의 농도 (10, 50, 100, 200, 500, 1,000 µg/mL)로 처리하였다. 24시간 배양 후 DPBS로 3회 세척한 후 DPBS에 100 µg/mL의 농도로 용해시킨 MTT 시약을 100 µL씩 분취하고 2시간 배양한 후 반응액을 제거하고 생성된 formazan 결정을 녹이기 위해 2-propanol을 동량 (100 µL) 첨가한 후 560 nm에서 흡광도 (TECAN Group Ltd, Shanghai, China)를 측정하였다.

세포내 활성산소 (ROS) 측정

ERM-CZ100에 의한 세포 내 활성산소의 분석을 위해 산화 환원에 민감한 형광 탐침 DCFH-DA를 사용하였다 [30]. HDF 세포를 96-well black with clear flat bottom plate (Corning, Corning, NY, USA)에 2.0×10^4 cells/well의 농도로 분주 후 24시간 안정화하고 배지에 용해시킨 ERM-CZ100 또는 AE-GBE를 제시된 농도별로 함께 처리하였다. 24시간 반응 후 세포는 DPBS로 3회 세척과정을 거친 뒤 10 µM DCFH-DA로 처리한 후 빛을 차단하고 37°C에서 30분간 반응시킨 뒤 ex. 485 nm, em. 530 nm 파장의 fluorescent microplate reader (TECAN Group Ltd, Shanghai, China)를 사용하여 세포내 형광값을 측정하였다.

DNA 단편화 측정

Cytoplasmic histone-associated DNA fragments는 세포자멸사 세포의 정량화를 위해 Cell death detection ELISA plus kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 사용하여 분석하였다. 추출된 세포질 분획은 제조사의 방법에 따라 처리하였다. 6 well plate에서 5.0×10^5 cells/well의 농도로 분취된 HDF 세포를 24시간 안정화한 후 배지에 용해시킨 ERM-CZ100 (50, 100, 200 µg/mL) 또는 AE-GBE (100 µg/mL)로 24시간 처리하였다. 종료 후 세포는 trypsin 처리로 분리, 세척한 후 세포에 200 µL의 lysis buffer (0.3% nonylphenol (v/v))를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액 20 µL를 streptavidin이 코팅된 96 well plate에 옮기고 제시된 방법에 따라 반응시켰다. 간단히 설명하면, 80 µL의 면역시약 (4 µL anti-histone-biotin, 4 µL anti-DNA-POD, 72 µL incubation buffer)을 각 well에 첨가 후 상온에서 2시간 반응시킨 다음 incubation buffer로 5회 세척하였다. 이후 ABTS용액 100 µL를 각 well에 분취 후 20분간 반응시킨 후 405 nm에서 측정하였다.

노화관련 beta (β)-galactosidase 활성 측정

세포 노화 측정의 바이오마커로 사용되는 β-galactosidase 활성 측정은 Mammalian β-galactosidase assay kit (Thermoscientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 제시된 방법에 따라 실시하였다 [31]. 간략하게 직경 100 mm dish에 HDF세포를 2.5 × 10⁶ cell을 분취하고 24시간 안정화한 후 배지에 용해시킨 ERM-CZ100 (50, 100, 200 μg/mL) 또는 AE-GBE (100 μg/mL)로 24시간 처리하였다. 종료 후 DPBS로 2회 세척한 후 kit에 제공된 방법에 따라 500 μL M-PER™ mammalian protein extraction reagent로 상온에서 5분간 교반 반응시킨 후 동량의 β-galactosidase assay reagent를 넣고 37°C, 30분간 반응시켰다. 반응 종료를 위해 각 well에 100 μL β-galactosidase assay stop solution을 넣은 후 405 nm에서 측정하였다.

염증 및 노화 관련 유전자 발현 분석

6 well plate에 5.0 × 10⁵ cells/well의 농도로 분취된 HDF 세포를 24시간 안정화한 후 HDF 세포에 100 μg/mL ERM-CZ100과 100 μg/mL AE-GBE를 동시에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. DPBS로 세포를 3회 이상 세척하여 세포만 수거한 뒤 total RNA 추출을 위해 Trizol 시약 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)을 첨가하였다. 정제과정을 거친 뒤 추출된 RNA는 Primescript™ 1st strand cDNA synthesis kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)로 cDNA를 합성하였으며 SYBR Premix Ex Taq II, ROX plus (Takara Bio Inc.)와 반응시켜 applied biosystem 사 (Forster City, CA)의 ABI real-time polymerase chain reaction (PCR) system을 이용하여 각 유전자의 발현 패턴을 분석하였다. Real-time PCR 수행조건은 90°C에서 10분, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분 총 40주기로 수행하였다. 각 유전자의 전사 수준은 내부 대조군으로 사용된 cyclophilin의 전사 수준으로 정량 비교하였으며 본 연구에 사용된 quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)의 프라이머 서열은 Table 1과 같다.

단백질 발현 분석

세포의 단백질은 protease inhibitor cocktail (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)과 phenyl methane sulfonyl fluoride (Sigma)가 첨가된 mammalian protein extraction buffer (Sigma)에 용해한 후 4°C에서 12,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 수거된 단백질의 함량은 protein assay dye reagent concentrate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량했고, 적정량의 단백질을 SDS-PAGE에 전개하고 nitrocellulose membrane (Amersham, GE Healthcare Life science, München, Germany)에 옮긴 후 항원/항체 반응을 실시하였다. 사용된 항체는 다음과 같다: anti-collagen type I alpha 1 chain (COL1A1) (1:1,000; cell signaling), anti-MMP-1 (1:1,000; cell signaling), anti-cyclooxygenase-2 (COX2) (1:1,000; cell signaling), anti-β-actin (1:1,000; cell signaling). 단백질 밴드는 ELC 키트 (Millipore, Burlington, MA, USA)를 사용하여 향상된 화학발광 방법으로 가시화하였다.

Table 1. Primer sequences for real-time polymerase chain reaction

Gene	Forward	Reverse
MMP-1	5'-ATTCTACTGATATCGGGGCTTTGA-3'	5'-ATGTCCTTGGGGTATCCGTGTAG-3'
COL1A1	5'-CTCGAGGTGGACACCCCT-3'	5'-CAGCTGGATGGCCACATCGG-3'
TNF-α	5'-TGCTCCTCACCCACACCAT-3'	5'-GGAGTTGACCTTGGCTGGTA-3'
IL-6	5'-GCTGCAGGCACAGAACA-3'	5'-TAAAG TGCGCAGAATGAGATG-3'
IL-1β	5'-ACGATGCACCTGTACGATCACT-3'	5'-CACCAAGCTTTTTTGTCTGTGAGT-3'
Cyclophilin	5'-TGCCATCGCCAAGGAGTAG-3'	5'-TGCACAGACGGTCACTCAAA-3'

MMP, matrix metalloproteinase; COL1A1, collagen type I alpha 1 chain; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin.

통계처리

상기의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복 실험하였으며 모든 실험값은 mean ± SD로 나타내었다. 통계 분석은 SPSS 20.0 소프트웨어 (IBM SPSS ver. 20.0.0 for Windows; IBM Co., Armonk, NY, USA)를 사용하였다. 그룹 간 유의성 검정은 ANOVA (one way analysis of variance) 및 Student's *t*-test를 이용하여 분석되었으며 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과

쌍별귀뚜라미 에탄올 추출물(AE-GBE)의 세포독성 여부 조사

HDF 세포에 AE-GBE를 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1,000 µg/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양 후 세포 생존율을 확인하였다. 비처리군의 생존율을 100%로 할 때, 처리된 전 농도에서 세포 독성은 관찰되지 않았다. 그러나 실험된 농도 범위에서 독성은 보이지 않지만 500 µg/mL 이상의 농도에서는 세포의 증식률을 120% 이상으로 촉진시키는 결과를 보였다. 이는 쌍별귀뚜라미의 풍부한 영양 성분 [27]이 HDF세포의 증식에 영향을 줄 수 있어 이후 실험에 적용된 농도는 증식 촉진에 영양을 주지 않는 100 µg/mL로 진행하였다 (Fig. 1A).

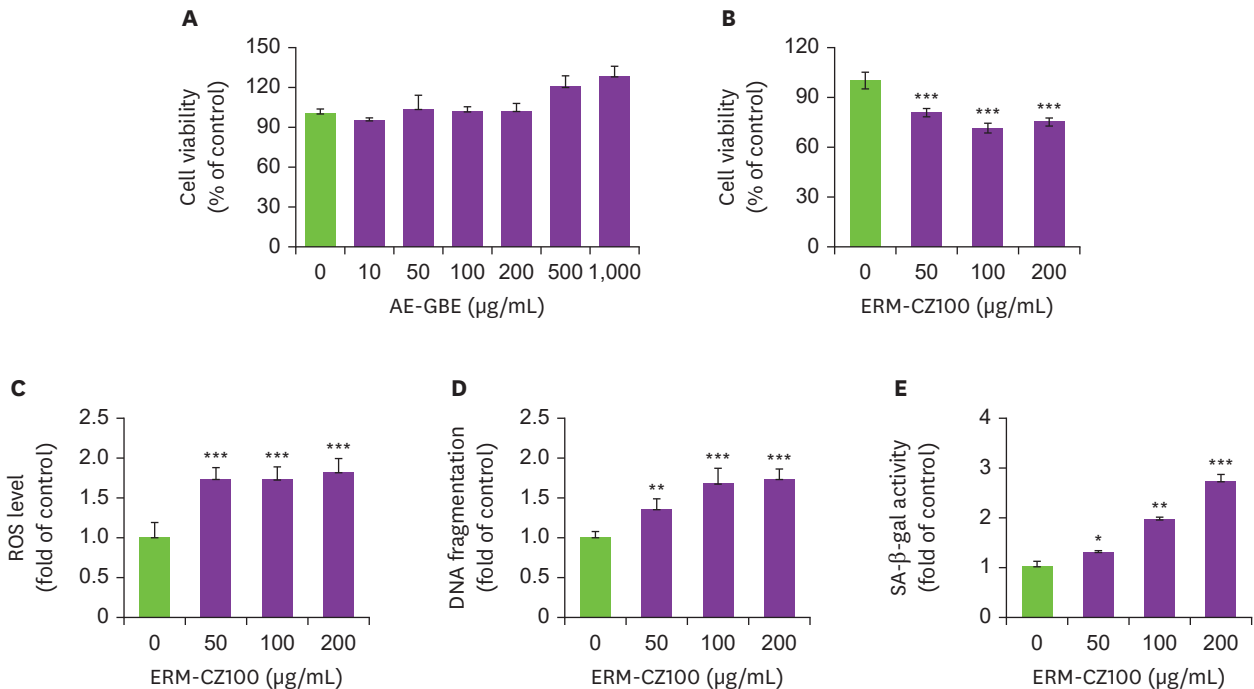


Fig. 1. Cytotoxicity of AE-GBE and ERM-CZ100 on human diploid fibroblasts cells.

Cells were incubated with or without AE-GBE (A) or ERM-CZ100 (B) as indicated doses for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. Intracellular ROS levels were assayed by detecting the fluorescence intensity of the oxidant-sensitive fluorescent probe DCFH-DA at 485 nm/535 nm (C). Quantification of apoptosis by fragmented DNA analysis using the Cell Death Detection ELISA kit (D). Beta-galactosidase activity was assayed by mammalian β-galactosidase assay kit (E). Data presented are the mean ± SD (n = 3) ERM-CZ100 refers to the European standard material for fine dust (PM10-like) containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's).

AE-GBE, aqueous ethanolic *Gryllus bimaculatus* extract; ERM, European reference material; ROS, reactive oxygen species.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with untreated control.

미세먼지에 의한 피부세포 손상 및 노화 촉진 여부 조사

HDF 세포에 미세먼지 포집물인 ERM-CZ100 현탁액을 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후, 세포 생존율을 관찰하고 ROS 생성, β -galactosidase 활성, DNA 단편화 분석을 실시하였다. 먼저 미세먼지 ERM-CZ100의 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 처리는 세포생존율을 유의적으로 감소시켰다 (Fig. 1B). 그리고 세 농도 처리구는 비처리군 대비 1.7배 ($p < 0.001$)로 세포 내 ROS의 생성을 유도했다 (Fig. 1C). Fig. 1D에서와 같이 세포손상의 대표적 특징인 DNA 단편화 정도 측정에서도 유의적 증가를 관찰할 수 있었다. β -galactosidase 활성 측정 결과 ERM-CZ100의 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 처리는 각각 1.3배 ($p < 0.05$), 2.0배 ($p < 0.01$), 2.7배 ($p < 0.001$) 증가되었다 (Fig. 1E). 그러나 ERM-CZ100을 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상 농도로 증가하여 처리해도 HDF 세포의 생존율, DNA 손상 및 ROS의 생성에서 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리했을 때와 유의적인 차이를 보이지 않아, 이후 실험에 적용된 ERM-CZ100의 적정 농도는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 선정하여 실시하였다.

미세먼지로 유도된 산화 손상에 대한 쌍별귀뚜라미 에탄올 추출물 (AE-GBE)의 효과

미세먼지가 HDF 세포에 산화적 손상을 유도하는 Fig. 1 결과를 바탕으로 ERM-CZ100으로 자극된 HDF 세포에서 AE-GBE가 세포 사멸 및 세포내 활성 산소종 (ROS) 생성에 미치는 영향을 측정했다. Fig. 2A와 같이, ERM-CZ100을 처리한 세포의 생존율은 대조군과 비교하여 유의적으로 감소했으나, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 AE-GBE를 함께 처리했을 때 생존율이 79% 증가하였다 ($p < 0.001$ vs. ERM-CZ100 단독처리군). 또한 ERM-CZ100에 의해 170% 증가된 세포 내 ROS 생성은 AE-GBE 처리에 의해 57% 유의하게 ($p < 0.01$ vs. ERM-CZ100 단독처리군) 감소되었다 (Fig. 2B). ERM-CZ100에 의해 일어나는 DNA 단편화 정도에 대한 AE-GBE의 억제효과를 측정한 결과, 1.7배 정도 증가되었던 수치는 AE-GBE 처리에 의해 1.1배 정도로 낮게 나타났으며 이는 DNA 단편화를 약 85% 억제함을 보였다 (Fig. 2C). 다음으로 미세먼지에 의해 유도된 β -galactosidase 활성을 측정하여 AE-GBE가 세포노화 저해 효능이 있는지 조사하였다. 그 결과 ERM-CZ100에 의해 160% 증가된 β -galactosidase 활성은 AE-GBE 처리에 의해 약 67% 유의하게 ($p < 0.001$ vs. ERM-CZ100 단독처리군) 감소되었다 (Fig. 2D).

미세먼지로 유도된 염증반응에 대한 쌍별귀뚜라미 에탄올 추출물 (AE-GBE)의 효과

COX2는 면역 반응이 유도될 때 과발현되는, 잘 알려진 전염증 유전자이므로 [32] HDF 세포에서 미세먼지 처리 시 COX2의 단백질 발현량 변화를 조사하였다. HDF세포에 ERM-CZ100을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 첨가했을 때 COX2 단백질의 발현은 대조군 (CON)보다 4.4배 유의하게 ($p < 0.001$) 높았으나, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 AE-GBE와 동시 처리한 경우 51% 발현이 감소되었다 ($p < 0.01$) (Fig. 3A). 이상의 결과로, 우리는 AE-GBE가 ERM-CZ100에 의해 유발된 염증반응을 감소시킬 수 있음을 알 수 있었고, 추가적으로 전염증성 사이토카인의 mRNA 발현 수준의 변화를 qRT-PCR로 평가하였다. 그 결과 HDF 세포에 ERM-CZ100에 노출은 IL-6, TNF- α , IL-1 β 의 전사 수준을 각각 4.7배 ($p < 0.001$), 2.1배 ($p < 0.001$), 2.1배 ($p < 0.001$) 증가시켰으나, AE-GBE를 동시에 처리하였을 경우 IL-6, TNF- α , 그리고 IL-1 β mRNA 발현량이 각각 30% ($p < 0.05$), 65% ($p < 0.01$), 44% ($p < 0.01$)로 감소하였다 (Fig. 3B).

미세먼지로 유도된 MMP-1 발현에 대한 쌍별귀뚜라미 에탄올 추출물 (AE-GBE)의 효과

HDF 세포에서 미세먼지에 의한 MMP-1의 발현과 함께 ECM 구성의 대표적 단백질인 콜라겐 (COL1A1)의 발현을 조사하고 AE-GBE가 미치는 영향을 살펴보았다. ERM-CZ100 처리는 HDF 세포에서 MMP-1의 mRNA 발현을 12배 ($p < 0.001$), 단백질 발현량을 3.6배 ($p < 0.001$) 증

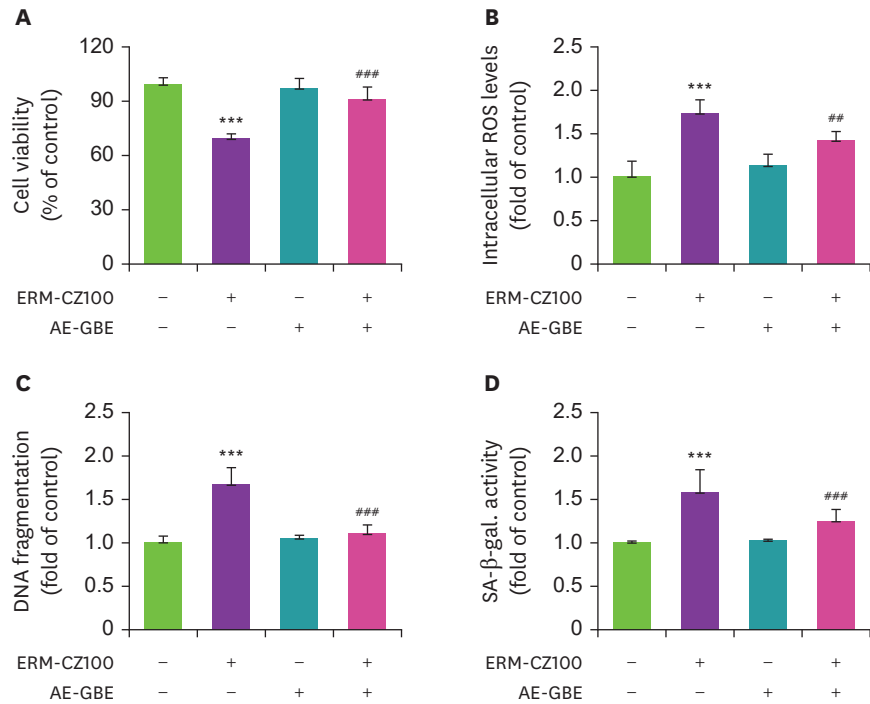


Fig. 2. Protective effect of AE-GBE against ERM-CZ100-damaged HDF cells.

HDF cells were treated with 100 µg/mL ERM-CZ100 with or without 100 µg/mL AE-GBE for 24 hrs, and (A) cell viability was determined by MTT assay. Intracellular ROS level was measured by DCFH-DA fluorescence probe (B). Quantification of apoptosis by fragmented DNA analysis using the cell death detection ELISA kit (C). Beta-galactosidase activity was assayed by mammalian β-galactosidase assay kit (D). Data presented are the mean ± SD (n = 3). ERM-CZ100 refers to the European standard material for fine dust (PM10-like) containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's).

ERM, European reference material; AE-GBE, aqueous ethanolic *Gryllus bimaculatus* extract; ROS, reactive oxygen species; HDF, human diploid fibroblasts.

***p < 0.001 compared with untreated control, **p < 0.01, and ###p < 0.001 as compared to the ERM-CZ100 treated only.

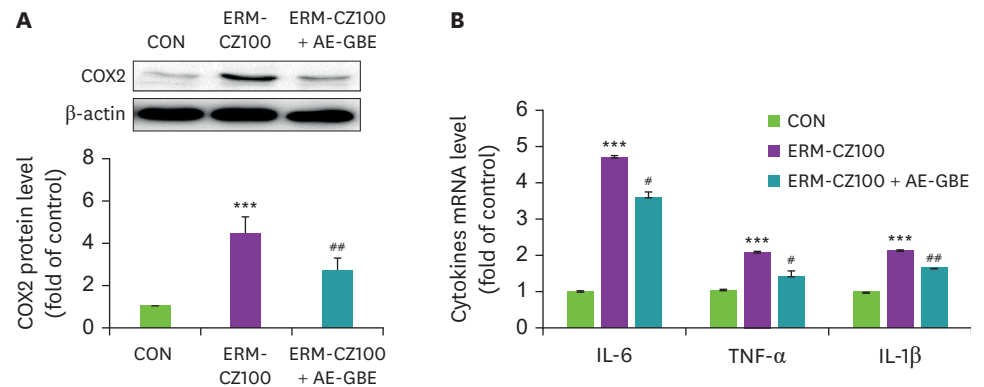


Fig. 3. Protective effect of AE-GBE on ERM-CZ100-induced proinflammatory expression on HDF cells.

HDF cells were treated with 100 µg/mL ERM-CZ100 with or without 100 µg/mL AE-GBE for 24 hrs. COX2 protein expression was measured by western blot analysis. The intensity of band was measured with CS analyzer 4 version 2.4.5 software, and the relative quantity was calculated over β-actin (A). The mRNA levels of pro-inflammatory cytokines were determined by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis (B). The mRNA levels were normalized with those of cyclophilin. Data presented are the mean ± SD (n = 3-5). ERM-CZ100 refers to the European standard material for fine dust (PM10-like) containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's).

ERM, European reference material; AE-GBE, aqueous ethanolic *Gryllus bimaculatus* extract; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; HDF, human diploid fibroblasts.

***p < 0.001 compared with untreated control (CON), *p < 0.05 and ##p < 0.01 as compared to the ERM-CZ100 treated only.

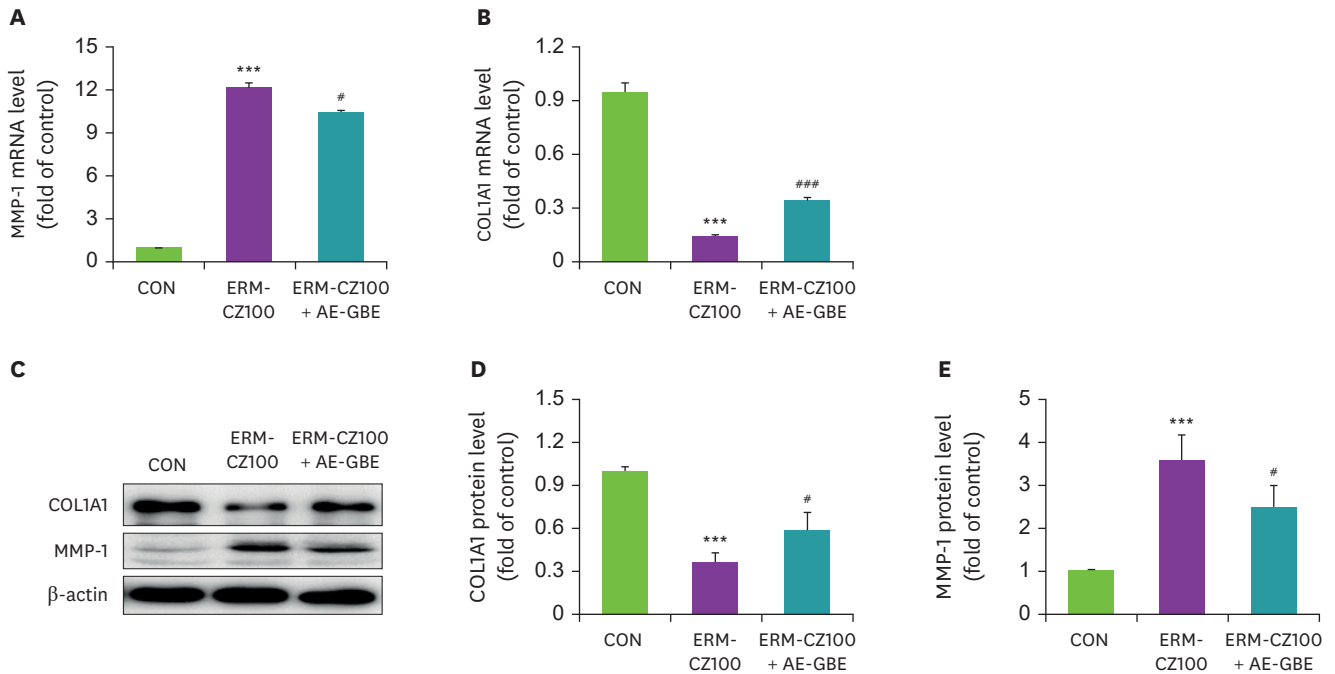


Fig. 4. Effect of AE-GBE on ERM-CZ100-induced MMP-1 and COL1A1 expression on HDF cells.

HDF cells were treated with 100 µg/mL ERM-CZ100 with or without 100 µg/mL AE-GBE for 24 hrs. The mRNA levels (A and B) and protein expression (C-E) of MMP-1 and COL1A1. The mRNA levels were determined by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis, normalized with those of cyclophilin. Protein expression levels were measured by western blot analysis. The intensity of each band was measured with CS analyzer 4 version 2.4.5 software, and the relative quantity was calculated over β-actin. Data presented are the mean ± SD (n = 3). ERM-CZ100 refers to the European standard material for fine dust (PM10-like) containing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's).

ERM, European reference material; AE-GBE, aqueous ethanolic *Gryllus bimaculatus* extract; HDF, human diploid fibroblasts.

***p < 0.001 compared with untreated control, *p < 0.05 and ***p < 0.001 as compared to the ERM-CZ100 treated only.

가시켰다 (Fig. 4A, C, and E). 그리고 COL1A1의 mRNA 발현량은 85.1% (p < 0.001), 단백질 발현량은 65.2% (p < 0.001) 감소되었다 (Fig. 4B-D). 반면 ERM-CZ100에 의해 증가된 MMP-1은 AE-GBE 처리에 의해 mRNA 및 단백질 발현량은 각각 15% (p < 0.05), 44% (p < 0.05) 감소하였고, COL1A1의 mRNA 및 단백질 발현량은 각각 2.4배 (p < 0.001), 1.7배 증가 (p < 0.05)되는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 AE-GBE가 미세먼지 노출로 상향 조절되는 콜라겐분해효소인 MMP-1 수준을 감소시키고 콜라겐 발현을 회복시킴으로써 피부 보호 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

고찰

지속적으로 미세먼지에 노출될 경우, 세포내 과도한 ROS 생산에 의해 산화스트레스가 유발되어 아토피, 노화 등 다양한 피부질환이 유발되는 것으로 알려져 있다 [33,34]. 현재까지 ROS가 매개하는 신호 전달경로가 명확하게 알려져 있지 않지만, 일반적으로 장기간 미세먼지 노출은 단백질 카르보닐화, 지질 과산화, 세포사멸 관련 단백질 발현, DNA 손상, 핵산 손상, 미토콘드리아 손상, 소포체 스트레스를 유발하여 세포사멸 (apoptosis) 및 자가포식 (autophagy)을 일으키며, 피부 항상성 및 장벽 기능을 방해하여 결국 피부 염증, 기능장애 및 노화를 초래한다 [35,36]. 특히 미세먼지에 의한 피부세포의 DNA 손상은 콜라겐 및 엘라스틴 생성의 감소를 가져오며, 표피 방어막 유지와 상처 치유에 악영향을 주며 노화방어기전을

방해함으로써 피부 본연의 기능을 상실시킨다고 보고된 바 있다 [37-39]. 본 연구결과에서도 HDF세포에 미세먼지를 노출했을 때, 세포내 산화스트레스를 증가시켜 세포사멸을 유도하며 노화의 생화학적 진단 마커로 알려진 β -galactosidase의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 그리고 AE-GBE가 미세먼지에 의해 유도된 세포내 ROS 수준을 감소시키고 DNA 손상을 막아 세포 죽음을 억제함으로써 피부 노화 지연에도 기여할 수 있음을 확인하였다.

스트레스에 노출되면 TNF- α 와 IL1, IL-6, IL-1 β 와 같은 염증성 사이토카인 등을 분비하여 염증반응을 일으켜 세포의 증식속도를 감소시키고, 외부 자극에 의한 회복속도를 저하시킨다 [40]. 여러 연구에서 미세먼지가 염증성 사이토카인 분비 및 단백질 발현을 증가시켜 피부 염증 반응을 유도하는 중요한 촉발인자 (trigger) 중의 하나가 될 수 있음을 보고하였다 [41,42]. 피부 세포에 미세먼지 노출 후 총 1,977개의 유전자를 분석한 결과, 염증을 유발시키는 IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-33 등과 같은 사이토카인의 발현이 증가하였다 [43]. 또한 Kim 등 [44]의 연구에 따르면, 미세먼지가 각질세포에서 인산화효소를 자극하고 염증반응을 증가시키며, 인터루킨의 분비를 통해 피부 진피의 콜라겐 분해를 촉진하여 주름 생성 등의 피부 노화를 유발한다고 보고했다. 본 연구에서도 전염증 조절 단백질인 COX2와 사이토카인이 미세먼지 자극에 의해 유의하게 증가하였고, AE-GBE가 피부세포에서 미세먼지에 의해 유발된 COX2의 단백질 수준과 염증인자인 IL-6, TNF- α , IL-1 β 와 같은 사이토카인의 하향조절에 기여할 수 있음을 확인하였다.

본 실험에 사용된 섬유아세포 (Fibroblast)는 세포외기질 (ECM)과 콜라겐을 합성하는 세포의 일종으로, 동물 조직의 구조적 골격을 생성하고 상처 치유에 중요한 역할을 하는 세포이다 [45]. 세포외기질은 주로 콜라겐, 엘라스틴, 당단백질, 성장 인자 등으로 구성되며 신체의 세포와 조직에 구조와 지지를 담당하는 삼차원적 망구조체 (network structure)이다 [46]. 이 중, 피부에서 가장 풍부한 단백질인 콜라겐은 건강한 피부상태에서 피부 재생 및 복구의 균형을 맞추는 중요한 단백질로서, MMP-1에 의해 조절되는 것으로 알려져 있으나, 나이, ultra violet (UV), 미세먼지와 같은 다양한 외부적 스트레스 상태에 의해 비정상적으로 증가하는 것으로 보고되었다 [47]. 과도한 MMP-1의 발현은 콜라겐 분해를 유도하고 피부 탄력저하, 수분부족, 주름형성 등을 촉진하기 때문에, MMP-1 발현 증가는 피부 노화의 주요 바이오 마커 인자 중의 하나로 인식되고 있다 [48]. 또한 MMP는 물리적 장벽의 조절과 함께 사이토카인 및 케모카인과 같은 염증 매개체의 조절에 관여한다고 알려져 있다 [49]. 본 연구에서도 섬유아세포에 미세먼지 노출이 콜라겐분해효소인 MMP-1의 유전자 및 단백질 발현의 증가와 동시에 콜라겐 분해를 현저하게 유도함을 확인할 수 있었다. 그리고 AE-GBE는 미세먼지 노출로 증가된 MMP-1 수준을 감소시켜 콜라겐 분해를 억제함으로써 주름 예방 및 탄력적인 피부를 유지하는 데 기여할 수 있음을 확인했다.

전세계적으로 증가되는 미세먼지는 체내 산화 스트레스 및 염증성 사이토카인의 유도로 노화를 포함한 다양한 피부 질환의 발병율을 증가시키고 있으며, 항산화제와 항염증제는 미세먼지로 유발되는 이러한 질환의 치료에 유용할 수 있다. 곤충은 인류의 미래식량자원으로서 가치뿐만 아니라, 생명공학과 연계된 의학이나 미용 등 다양한 산업분야에서도 높은 부가 가치를 가진 자원이다. 본 연구결과를 통해서 미세먼지에 의해 증가 혹은 악화되는 피부 염증 및 노화 촉진에 대하여 쌍별귀뚜라미 추출물이 피부의 염증반응을 완화하며 MMP 발현을 억제하여 콜라겐 생합성을 촉진할 수 있는 피부 항염증노화 (anti-inflammaging) 소재로서의 가능성을 제시하는 바이다.

다양한 효능의 활성 성분을 포함하고 있을 것으로 추정되는 쌍별귀뚜라미를 피부노화와 관련된 뷰티푸드 소재로써 활용하기 위하여, 현재 성분 분리를 위한 용매별 분획화 및 미생물 발효 등의 저분자 생리활성물질의 분리과정과 함께 동정 (identification)을 위한 연구를 진행 중이며 유효성분에 대한 항노화 기작과 함께 임상실험 등이 진행되어야 할 것으로 판단된다.

요약

국내 미세먼지의 증가는 만성 호흡기 질환과 피부 염증 및 노화를 유발하여 국민 전체의 건강을 위협하는 심각한 문제로 대두되었다. 본 연구는 미세먼지 유발 피부 염증과 노화에 대해 식용곤충인 쌍별귀뚜라미 70% 에탄올 추출물 (AE-GBE)의 미세먼지에 대한 활성산소 소거능, 세포내 β -galactosidase 효소 활성, MMP-1 발현, 콜라겐 생성, 그리고 염증성 반응에 대해 알아보았다. AE-GBE는 HDF 세포에서 ERM-CZ100에 의해 유도될 수 있는 활성산소종, DNA 단편화 수준 및 β -galactosidase 활성을 유의하게 감소시켰다. 또한 IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인의 생성과 이들 사이토카인에 의해 발현되는 것으로 알려진 COX2 단백질의 발현을 현저히 감소시켰으며, MMP-1을 억제하여 콜라겐 분해를 막았다. 따라서 본 연구 결과는 쌍별귀뚜라미 추출물이 미세먼지 유발 피부 염증에 대한 잠재적인 치료 표적이 될 수 있으며 더 나아가 피부 노화를 늦추는 데 긍정적인 효과를 가질 수 있음을 시사한다.

REFERENCES

1. Savitz DA, Elston B, Bobb JF, Clougherty JE, Dominici F, Ito K, et al. Ambient fine particulate matter, nitrogen dioxide, and hypertensive disorders of pregnancy in New York City. *Epidemiology* 2015; 26(5): 748-757.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
2. Kim KE, Cho D, Park HJ. Air pollution and skin diseases: adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases. *Life Sci* 2016; 152: 126-134.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
3. Lundgren DA, Hlaing DN, Rich TA, Marple VA. PM10/PM2.5/PM1 data from a trichotomous sampler. *Aerosol Sci Technol* 1996; 25(3): 353-357.
[CROSSREF](#)
4. Song SH, Paek D, Lee YM, Lee CW, Park CH, Yu SD. Ambient fine and ultrafine particle measurements and their correlations with particulate PAHs at an elementary school near a highway. *Asian J Atmos Environ* 2012; 6(2): 96-103.
[CROSSREF](#)
5. Pilkington SM, Bulfone-Paus S, Griffiths CE, Watson RE. Inflammaging and the skin. *J Invest Dermatol* 2021; 141(4): 1087-1095.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
6. Lee YI, Choi S, Roh WS, Lee JH, Kim TG. Cellular senescence and inflammaging in the skin microenvironment. *Int J Mol Sci* 2021; 22(8): 3849.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
7. Dooms-Goossens AE, Debusschere KM, Gevers DM, Dupré KM, Degreef HJ, Loncke JP, et al. Contact dermatitis caused by airborne agents. A review and case reports. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15(1): 1-10.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
8. Jeong SC, Shin CY, Song MK, Cho Y, Ryu JC. Gene expression profiling of human alveolar epithelial cells (A549 cells) exposed to atmospheric particulate matter 2.5 (PM2.5) collected from Seoul, Korea. *Mol Cell Toxicol* 2014; 10(4): 361-368.
[CROSSREF](#)

9. Charoud-Got J, Emma G, Seghers J, Tumba-Tshilumba MF, Santoro A, Held A, et al. Preparation of a PM_{2.5}-like reference material in sufficient quantities for accurate monitoring of anions and cations in fine atmospheric dust. *Anal Bioanal Chem* 2017; 409(30): 7121-7131.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
10. Fernando IP, Kim HS, Sanjeeva KK, Oh JY, Jeon YJ, Lee WW. Inhibition of inflammatory responses elicited by urban fine dust particles in keratinocytes and macrophages by diphlorethohydroxycarmalol isolated from a brown alga *Ishige okamurae*. *Algae* 2017; 32(3): 261-273.
[CROSSREF](#)
11. Saraltın SY, Acikara OB. Assessment of correlation analysis, phytochemical profile, and biological activities of endemic *Scorzonera* species from Turkey. *Chem Biodivers* 2022; 19(10): e202200007.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
12. Na EJ, Jang HH, Kim GR. Review of recent studies and research analysis for anti-oxidant and anti-aging materials. *Asian J Beauty Cosmetol* 2016; 14(4): 481-491.
[CROSSREF](#)
13. Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem* 2005; 89(1): 27-36.
[CROSSREF](#)
14. Ambati RR, Phang SM, Ravi S, Aswathanarayana RG. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications--a review. *Mar Drugs* 2014; 12(1): 128-152.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
15. Lee JH, Yun CW, Hur J, Lee SH. Fucoïdan rescues p-cresol-induced cellular senescence in mesenchymal stem cells via FAK-Akt-TWIST axis. *Mar Drugs* 2018; 16(4): 121.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
16. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: a review. *Curr Res Food Sci* 2021; 4: 200-214.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
17. Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Machi M, Cianciosi D, Navarro-Hortal MD, Battino M. Edible insects: a novel nutritious, functional, and safe food alternative. *Food Frontiers* 2022; 3(3): 358-365.
[CROSSREF](#)
18. Kouřimská L, Adámková A. Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal* 2016; 4: 22-26.
[CROSSREF](#)
19. Aiello D, Barbera M, Bongiorno D, Cammarata M, Censi V, Indelicato S, et al. Edible insects an alternative nutritional source of bioactive compounds: a review. *Molecules* 2023; 28(2): 699.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
20. Di Mattia C, Battista N, Sacchetti G, Serafini M. Antioxidant activities in vitro of water and liposoluble extracts obtained by different species of edible insects and invertebrates. *Front Nutr* 2019; 6: 106.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
21. Nino MC, Reddivari L, Osorio C, Kaplan I, Liceaga AM. Insects as a source of phenolic compounds and potential health benefits. *J Insects Food Feed* 2021; 7(7): 1077-1087.
[CROSSREF](#)
22. Hee Sun C, Su Yeon K, Sung Ryun C, Hyeon Il P, Ji Eun B, Ji Su K, et al. Characteristics of quality and antioxidant activation of the cookies adding with mealworm (*Tenebrio molitor*) and black bean powder. *J Food Hyg Saf* 2017; 32(6): 521-530.
[CROSSREF](#)
23. Lim HJ, Byun EH. Evaluation of anti-cancer activity of *Gryllus bimaculatus* water extract on non-small cancer lung cell via apoptosis. *Prev Nutr Food Sci* 2021; 26(4): 453-458.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
24. Han JS. Nutritional value and anti-inflammation activity of misutkaru with added *Gryllus bimaculatus* powder. *Asian J Beauty Cosmetol* 2021; 19(3): 467-476.
[CROSSREF](#)
25. Ahn MY, Hwang JS, Yun EY, Kim MJ, Park KK. Anti-aging effect and gene expression profiling of aged rats treated with *G. bimaculatus* extract. *Toxicol Res* 2015; 31(2): 173-180.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
26. Hwang BB, Chang MH, Lee JH, Heo W, Kim JK, Pan JH, et al. The edible insect *Gryllus bimaculatus* protects against gut-derived inflammatory responses and liver damage in mice after acute alcohol exposure. *Nutrients* 2019; 11(4): 857.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
27. Kim SH, Kim Y, Han JS. Antioxidant activities and nutritional components of cricket (*Gryllus bimaculatus*) powder and protein extract. *Asian J Beauty Cosmetol* 2020; 18(2): 163-172.
[CROSSREF](#)

28. Cho KA, Ryu SJ, Oh YS, Park JH, Lee JW, Kim HP, et al. Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *J Biol Chem* 2004; 279(40): 42270-42278.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
29. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res* 1991; 51(10): 2515-2520.
[PUBMED](#)
30. Rosenkranz AR, Schmaldienst S, Stuhlmeier KM, Chen W, Knapp W, Zlabinger GJ. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J Immunol Methods* 1992; 156(1): 39-45.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
31. Satoh M, Nagasu H, Morita Y, Yamaguchi TP, Kanwar YS, Kashihara N. Klotho protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 303(12): F1641-F1651.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
32. Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, et al. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2009; 8(1): 18-30.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
33. Kim J, Kim EH, Oh I, Jung K, Han Y, Cheong HK, et al. Symptoms of atopic dermatitis are influenced by outdoor air pollution. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132(2): 495-8.e1.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
34. Huss-Marp J, Eberlein-König B, Breuer K, Mair S, Ansel A, Darsow U, et al. Influence of short-term exposure to airborne Der p 1 and volatile organic compounds on skin barrier function and dermal blood flow in patients with atopic eczema and healthy individuals. *Clin Exp Allergy* 2006; 36(3): 338-345.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
35. Vierkötter A, Krutmann J. Environmental influences on skin aging and ethnic-specific manifestations. *Dermatoendocrinol* 2012; 4(3): 227-231.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
36. Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, Mills N, et al. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol* 2005; 2(1): 10.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
37. Piao MJ, Ahn MJ, Kang KA, Ryu YS, Hyun YJ, Shilnikova K, et al. Particulate matter 2.5 damages skin cells by inducing oxidative stress, subcellular organelle dysfunction, and apoptosis. *Arch Toxicol* 2018; 92(6): 2077-2091.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
38. Farah MA, Ali MA, Chen SM, Li Y, Al-Hemaid FM, Abou-Tarboush FM, et al. Silver nanoparticles synthesized from *Adenium obesum* leaf extract induced DNA damage, apoptosis and autophagy via generation of reactive oxygen species. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016; 141: 158-169.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
39. Wei H, Feng Y, Liang F, Cheng W, Wu X, Zhou R, et al. Role of oxidative stress and DNA hydroxymethylation in the neurotoxicity of fine particulate matter. *Toxicology* 2017; 380: 94-103.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
40. Larsen CG, Anderson AO, Oppenheim JJ, Matsushima K. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology* 1989; 68(1): 31-36.
[PUBMED](#)
41. Amaro-Ortiz A, Yan B, D'Orazio JA. Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation. *Molecules* 2014; 19(5): 6202-6219.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
42. Jin SP, Li Z, Choi EK, Lee S, Kim YK, Seo EY, et al. Urban particulate matter in air pollution penetrates into the barrier-disrupted skin and produces ROS-dependent cutaneous inflammatory response in vivo. *J Dermatol Sci* 2018; 91(2): 175-183.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
43. Park SY, Byun EJ, Lee JD, Kim S, Kim HS. Air pollution, autophagy, and skin aging: impact of particulate matter (PM₁₀) on human dermal fibroblasts. *Int J Mol Sci* 2018; 19(9): 2727.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
44. Kim M, Kim JH, Jeong GJ, Park KY, Lee MK, Seo SJ. Particulate matter induces pro-inflammatory cytokines via phosphorylation of p38 MAPK possibly leading to dermal inflammaging. *Exp Dermatol* 2019; 28(7): 809-815.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)

45. Cole MA, Quan T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging. *J Cell Commun Signal* 2018; 12(1): 35-43.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
46. Roh E, Kim JE, Kwon JY, Park JS, Bode AM, Dong Z, et al. Molecular mechanisms of green tea polyphenols with protective effects against skin photoaging. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; 57(8): 1631-1637.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
47. Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligel SE, Kang S, Fisher GJ, et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol* 2006; 168(6): 1861-1868.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
48. Fernandes A, Rodrigues PM, Pintado M, Tavora FK. A systematic review of natural products for skin applications: targeting inflammation, wound healing, and photo-aging. *Phytomedicine* 2023; 115: 154824.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)
49. Borg M, Brincat S, Camilleri G, Schembri-Wismayer P, Brincat M, Calleja-Agius J. The role of cytokines in skin aging. *Climacteric* 2013; 16(5): 514-521.
[PUBMED](#) | [CROSSREF](#)