

녹차추출물 성분 catechin이 자외선에 의해 손상된 피부에 미치는 영향

이은희[†] · 이종권 · 홍진태 · 정경미 · 김용규 · 이선희 · 정수연 · 이용욱*
식품의약품안전청 국립독성연구소 *서울대학교 보건대학원 식품위생실

Protective Effect of Green Tea Extract, Catechin on UVB-Induced Skin Damage

Eun Hee Lee[†], Jong Kwon Lee, Jin Tae Hong, Kyoung Mi Jung, Yong Kyu Kim,
Sun Hee Lee, Soo Youn Chung and Yong Wook Lee*

**Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Ku, Seoul, 122-704, Korea, *Graduated School of public Health, Seoul National University*

ABSTRACT – The main constituent of green tea, catechins have been reported to have numerous biological activities including antimutagenic, antibacterial, hypocholesterolemic, antioxidant and antitumor properties. In the present study, we examined the protective effect of catechin on UVB-induced skin damage. Catechin (3 mg/mouse) was topically treated to dosal area of SHK-1 hairless mouse daily for 2 weeks. UVB (100 mJ/cm²) was also treated soon after application of catechin alone or with catechin for 2 weeks. Catechin reduced UVB-induced infiltration of inflammatory cells, fibrosis of cells and collagen-fiber formation. In addition, catechin also prevented UVB-induced DNA fragmentation and apoptosis cell number, but not changed p53 level. Furthermore catechin inhibited UVB-induced cell proliferation. There results showed that catechin have preventive effect aganinst UVB-induced skin damages, and these effects could contribute to the antitumor promoters activity.

Key words □ Green tea, Catechin, UVB, Skin damages

산업사회의 발달로 물질의 풍요와 문화적 혜택을 누리고 있으나 반면에 이로 인해 우리들의 생명은 직·간접적으로 위협을 받고 있다. 환경 오염의 발생으로 최근 들어 오존층의 파괴로 인한 환경변화에 의해서 지표에 도달하는 자외선이 증가¹⁾됨에 따라 자외선이 건강에 미치는 영향에 대한 관심이 커지고 있으며 특히 피부는 자외선의 영향을 가장 잘 받기 쉬운 일차적인 조직으로 활성산소 종(Reactive oxidative stress)으로 유도된 피부의 광산화적 손상 위험이 실질적으로 증가하고 있다²⁾. 일반적으로 자외선의 영역은 크게 UVA, UVB, 그리고 UVC의 3부분으로 나뉘어 지는데 각각 명백한 생물학적 특성을 가지고 있으며³⁾ 파장이 짧을수록 광에너지의 양은 증가되고, 이는 구성분자간의 결합을 파괴할 정도로 커서 인체에 많은 변화를 가져온다. UVC(200-290 nm)는 오존층에 의해 거의 흡수되고, UVA나 UVB만이 지표에 도달되며 자외선중 UVB는 1~10%를 차지한다. 피부에 대한 파장별 자외선의 영향을 살펴보면, UVA는 진피의 유두층, 망상층까지 영향을 미치고 탄력섬유(elastin)와 콜라겐(collagen)의 붕괴로 탄력감소, 조기노화, 모세혈관의 확장 및

파괴로 피부의 기저층을 와해시키며, 피부암을 일으킬 가능성이 있다. 또한 UVB는 진피 상부층까지 도달하고, 급속한 화상이나 홍반을 일으킨다. 더 진행되면 멜라닌 색소 형성, 색소침착으로 선전이 일어나고, 손상된 피부세포를 수복하여 각화이상을 일으키게 되는데 각질층 중의 수분감소와 살갗이 거칠어지므로서 만성 노출시 피부주름 및 피부암을 유발한다⁴⁾. 지구상 생물체 피부암의 주요원인은 약 90%정도가 UVB에 의한 원인으로 알려져 있다⁵⁾. 자외선은 직접적으로 DNA에 손상을 주어 cyclobutane pyrimidine dimers (thymine dimers)와 pyrimidine pyrimidone photodimers(광생성물)을 생성시켜 세포독성과 발암성 작용을 갖고 있으며⁶⁾ 활성산소종을 유발하여 세포막의 지질 및 단백질의 sulfhydryl bond와 DNA의 nucleotide에 작용하여 세포손상을 일으킨다⁷⁾. 인체는 자외선이나 DNA에 손상을 주는 요인에 노출되었을 때 유전적 기능을 유지하기 위해 세포 스스로가 손상된 DNA 제거, 세포주기 지연, p53 의존적, 비의존적인 메커니즘들에 대한 apoptosis가 일어난다. p53 단백질은 apoptosis에 관여하는 중요한 발암억제유전자로서 DNA를 손상시키는 요인으로부터 세포를 보호하는 중요한 역할을 한다^{8,9)}. DNA 손

[†]Author to whom correspondence should be addressed.

상이 생기면 p53이라 불리는 유전자 조절단백질의 농도와 활성이 증가되고, 세포 복제와 DNA 합성이 증가되어 DNA 합성이 이루어지거나 한편으로는 apoptosis가 발생된다. 또한 apoptosis는 생리적 형태의 세포죽음으로 다양한 종류의 세포에서 apoptosis를 유발하는 신호는 달라도 nuclear condensation, membrane blebbing, apoptotic body와 같은 형태학적 특징은 같으며¹⁰⁾ 회복 불가능한 손상을 입었을 때 발생된다¹¹⁾. Apoptosis에 관여하는 암유전자와 종양억제유전자의 비정상적인 활성화 또는 불활성화에 의해서 염색체 이상과 유전자 증폭이 원인이 되어 암이 발생한다.

녹차(*Camellia sinensis* (family Theaceae))는 세계적으로 가장 널리 소비되어지고 있는 음료로서 녹차의 polyphenol 성분 중 catechin이 주요성분이다. Catechin은 (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin 3-O-gallate (ECG), (-)-epicatechin (EC) 등으로 구성되어있으며 그 작용으로는 혈압저하 및 혈소판 응집을 감소시키고, 항혈전 효과가 있어 혈액의 정상적인 순환을 돕는다¹²⁾. 또한 콜레스테롤을 저하시키고, 고혈압이나 동맥경화를 억제하며, 과산화지질의 생성을 억제하여 노화를 예방한다. 한편 혈청중의 지질농도를 저하시키며, 중성지질의 생성을 억제하여 비만을 방지하고, 모세혈관의 저항력도 증진시킨다. 그 밖에 항박테리아, 항바이러스, 항발암 작용, 위액분비 촉진, 이뇨 작용, 항염증 효과 등 다양한 생물학적 활성과 약리학적 효과를 가지는 것으로 보고되었다¹³⁾.

Catechin은 다양한 동물모델에서 화학적 발암성의 각 단계를 억제하며¹⁴⁾, 생성된 피부종양의 성장을 저해한다¹⁵⁾. UV에 의해 유도된 피부종양을 지닌 SKH-1 마우스에 녹차 polyphenol 추출물을 공급시켰을 때 억제효과가 있으며 이것은 녹차의 polyphenols류 성분의 영향이라는 보고가 있다¹⁶⁾. 또한 hairless mouse에서 UVB를 조사한 피부조직의 백혈구 침윤, 홍반, 부종 등 염증반응과 피부의 광발암성을 억제해 준다는 보고가 있다¹⁷⁾. 녹차의 polyphenol이 암발달을 저해해 준다는 정확한 기전은 밝혀져 있지 않으나 최근에 녹차의 polyphenol과 주요 구성물질인 epigallocatechin-3-gallate (EGCG)가 human epidemoid carcinoma cells, human carcinoma keratinocytes, human prostate carcinoma cells과 mouse lymphoma cells에서 apoptosis를 유도하였고, 반면에 normal human epidermal keratinocytes는 이러한 현상이 나타나지 않았다고 보고되었으¹⁸⁾, 종양세포에 EGCG를 처리하였을 때 G0-G1기 사이의 세포주기가 억제되어짐이 밝혀져 녹차와 그 구성물질인 polyphenol이 G0-G1기에서 세포주기를 억제함으로써 종양발달을 저해시키고, apoptosis의 증가로 종양세포가 제거된다는 보고가 있다¹⁹⁾. 그러나 *in vivo* skin에서 직접적인 catechin이 apoptosis에 미치는 영향에 관한 보고는

아직 없다.

본 연구에서는 *in vivo* hairless mouse skin에서 catechin이 UVB에 의해서 손상된 피부조직에 미치는 영향 및 손상된 피부세포증식과 apoptosis에 미치는 영향을 알아보코자 하였다.

실험 재료 및 방법

실험 재료

시약 및 조제

Catechin은 MITSUI NORIN Co. LTD (Shizuoka, Japan) 제품을 사용하였고, 본 실험에서 사용한 catechin의 조성구조를 Table 1과 Fig. 1에 나타내었다. Guanidine HCl, Ethylene diamine tetraacetic acid, Disodium salt, Dihydrate, Tween 20, Triton X-100, RNase, Proteinase K, Ethidium bromide, Agarose, Sodium Acetate, Phenol: Chloroform: Isoamylalcohol (25:24:1), Isoprophenol등은 Sigma사 제품을 사용하였다. Anti-BrdU (Beckman, USA), Anti-human p53는 Pharmingen (San Diego, USA)에서 구입하여 사용하였고, Anti-mouse IgG는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz,

Table 1. Composition of "crude catechins" in green tea

Catechins	Absolute %	Relative %
(+)-Gallocatechin (GC)	1.44	1.6
(-)-epigallocatechin (EGC)	17.57	19.3
(-)-epicatechin (EC)	5.81	6.4
(-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG)	53.9	59.1
(-)-epicatechin 3-O-gallate (ECG)	12.51	13.7
Total	91.23	100

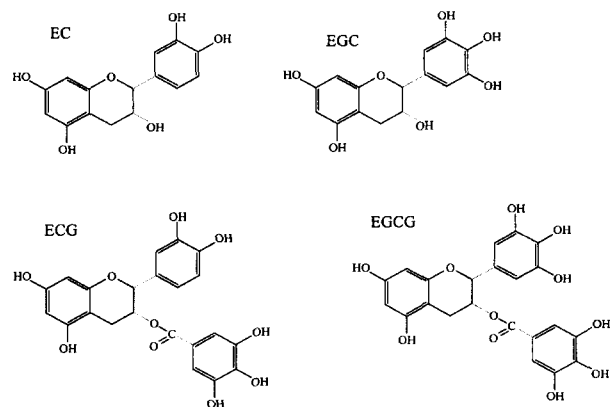


Fig. 1. Structure of (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin 3-O-gallate (ECG), (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG).

CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Hyperfilm (Kodak MR film)은 Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden)에서 구입하였고 기타 시약은 주로 Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

실험동물

단기피부 손상실험을 하기위해 8주령의 수컷 SKH-1 hairless 마우스를 식품의약품안전청 국립독성연구소 실험동물자원실로부터 구입하였고, 1주일의 적응 기간을 거쳐 실험하였다.

실험방법

Catechin과 자외선 투여

Catechin과 자외선 병용투여시의 피부에 미치는 영향을 알아보기 위하여 hairless mice를 각 군당 8마리씩 4군을 두어 실험하였다. Catechin 투여군은 마우스 등측 피부에 체중당 3 mg/mouse로 1일 1회 도포하여 2주간 투여하였으며 UV 조사군은 UVB=100 mJ/cm²의 조사량으로 solarimeter (Dong Sung Labtech Co., Korea)를 이용하여 1일 1회 2주간 조사하였다. Catechin과 자외선 병용투여군은 catechin을 마우스 등측 피부에 도포한 다음 자외선을 조사하였고, 대조군은 acetone을 catechin과 동량인 0.1 ml을 등측 피부에 도포하였다.

병리학적 검사

조직 병리학적으로 관찰하기 위하여 2주간 실험을 마친 후 부검하여 마우스의 등피부조직을 일정한 크기로 절제하여 10% 중성완충포름알린 용액에서 고정하여 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하여 4~5 µm 두께로 조직표본을 만든 다음 H&E 염색하여 현미경으로 관찰하였다.

DNA fragmentation

각군의 마우스 등피부조직 0.1 g을 채취하여 균질화(homogenization) 시킨 후 phenol/chloroform extract방법에 의해서 추출한 sample에 RNase A를 처리하여 DNA를 추출하고 2% agarose gel에서 각각 1 µg/µl씩 넣어 80 Volt에서 1시간 동안 전기영동하였다²⁰⁾.

TUNEL assay

TUNEL assay는 In Situ Cell Death Detection Kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하였다²¹⁾. 피부조직 슬라이드를 Xylene처리하여 파라핀을 제거한 후 ethanol로 탈수하였다. 내재성의 peroxidase를 없애기 위해 3% H₂O₂로 처리한 후 0.02% Proteinase K로 30분간 반응시키고 PBS로 세척하였다. 얼음위에서 permeabilisation 용액(0.1% Triton

X-100 in 0.1% sodium citrate)을 가해 2분간 반응시키고, PBS로 3번 세척하였다. TUNEL mixture (enzyme solution +label solution, Boehringer Mannheim)를 가하여 37°C에서 60분간 반응시키고 PBS로 3회 세척하였다. Horse-radish peroxidase (Boehringer Mannheim, Germany) 용액을 조직에 처리하여 37°C에서 30분간 반응시키고 PBS로 3회 세척하였다. Substrate solution (DAB; 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride)을 가해 10분간 실온에서 반응시켜 PBS로 3회 세척한 후 핵이 갈색으로 염색된 것을 apoptotic cell로 확인하고 microscope (Olympus, Japan) 상에서 200배의 배율로 관찰하여 세포 100개당 염색된 apoptotic cells의 개수를 세었다.

Western Blotting

마우스 등 피부 0.3 g을 취하여 균질화(homogenization)시켜 단백질을 추출한 후 protein assay kit (Bio-rad, USA)를 사용하여 정량하였다. 각 군의 단백질 50 µg씩을 12% polyacrylamide gel을 이용하여 stacking gel에서는 80 Volt로 30분간 전기영동한 후, 다시 separating gel에서는 120 Volt에서 1시간 30분간 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel을 nitrocellulose membrane에 80 Volt로 1시간 10분간 transfer한 후, 5% skim milk로 2시간 정도 blocking 하였으며 TBT (Tris buffered saline Tween)용액으로 여러번 세척하였다. 세척된 membrane에 1차 항체, Anti-human p53 (Pharmingen, USA)을 2시간정도 반응시킨후 2차 항체를 반응시켰다. 그리고 ECL solution (Amersham Pharmacia Biotech., Buckinghamshire, England)에 1분간 반응시킨 후 hyperfilm에 노출시켜 단백질 발현을 관찰하였다.

Bromodeoxyuridine (BrdU)

Hairless mouse를 부검하기 1시간 전에 BrdU를 복강 투여하였다. 파라핀에 포매된 조직을 4~5 µm의 두께로 박절하여 슬라이드 글래스에 접착시킨 다음 에탄올로 탈수하였다. 내재성의 peroxidase를 없애기 위해 3% H₂O₂로 처리한 후 정상 말혈청(Vectastain Kit, USA)으로 blocking한 다음 항 BrdU는 0.5% BSA가 첨가된 PBS로 희석하여 사용하였고, PBS로 3회 정도 세척한 후, block serum solution으로 희석한 2차 항체와 반응시켰다. 이어 Avidin-Biotin complex를 30분간 반응시킨 후 세척하여, DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride)를 기질로 사용하였다. 증류수로 세척하고 hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다.

통계처리

시험결과치는 Sigmastat 프로그램(Version 2.03, Jandal

Scientific Co.)을 이용하여 one-way ANOVA 검정을 실시한 후 multiple comparison test (Student-Newman-Keuls Method)를 실시하여 $p < 0.05$ 인 것을 유의성있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

자외선에 의한 피부손상에 미치는 catechin의 영향

자외선에 의한 피부손상의 정도를 관찰하기 위해 hairless mouse를 대조군과 3개의 실험군 즉 catechin군, 자외선군, 자외선과 catechin을 처리한 군으로 나누어 catechin을 3 mg/mouse 농도로 2주간 국소 도포하였다. 자외선 조사량은 UVB를 100 mJ/cm²로 2주간 매일 처리하였다. 사람이 실외에서 작업시 UV 노출량이나 여름에 해수욕시 노출량은 하

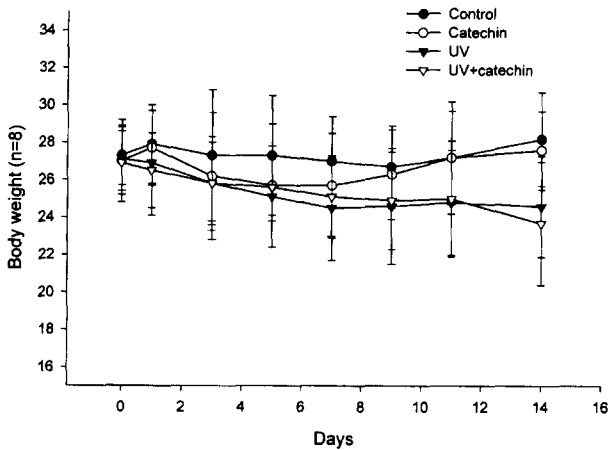


Fig. 2. Effect of daily topical application of catechin (3 mg/mouse) for 2weeks alone or combined with UVB (100 mJ/cm²) on body weight change.

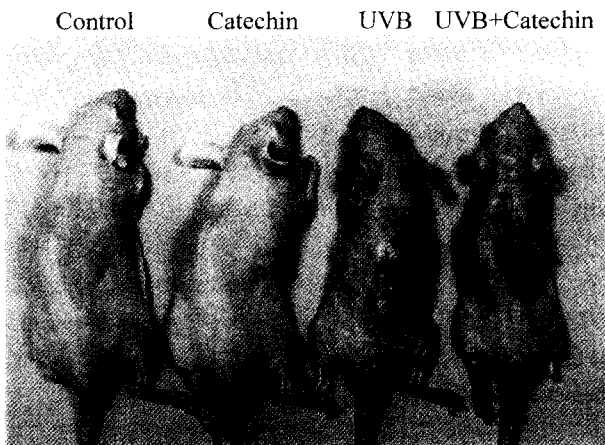


Fig. 3. Effect of catechin (3 mg/mouse) for 2 weeks treatment on UVB-induced skin damage.

루에 50~100 mJ/cm²이라는 보고가 있다²²⁾. Fig. 2 에서는 자외선 처리에 의해 몸무게의 변화가 감소하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 없었다 ($p < 0.05$). Fig. 3은 2주간 처리 후 조직을 부검하기전 찍은 사진이다. 대조군과 catechin군은 육안으로 보았을 때 별차이가 없었으며 자외선을 조사한 군에서는 catechin을 도포해주었을 때 sun burn, sun tan, erythema등 손상이 적음을 확인할 수 있었다. 아무것도 처리하지 않은 대조군의 hairless mouse 피부는 다른 동물과 유사하게 2~3층의 표피상피와 불규칙하게 배열된 교원섬유, 피지선, 모낭과 hairless mouse에서 특징적으로 나타나는 각화된 낭(keratinized cyst)이 관찰되었다(Fig. 4A). Catechin만을 도포한 군의 mouse도 대조군과 비슷한 조직소견을 보였다(Fig. 4B). UVB를 2주간 조사한 피부는 진피층이 교원섬유의 증가에 의하여 정상피부보다 2~3배 비후되었고, 섬유화세포가 관찰되었다. 표피층은 두꺼워졌으나 상피세포가 소실되어 1~2층으로 되었고, 상피세포는 핵이 농축되고 호산성의 세포질로 이루어져 UVB 조사에 의해 손상되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 4C). UVB 조사와 catechin을 2주간 처리한 후의 mouse의 피부는 표피층이 9~12층으로 이루어져 있었고, 세포의 핵은 과염색성을 보이며 커져있어 손상된 표피층 상피세포가 재생되고 있었다(Fig. 4D). 이 결과 catechin의 세포재생 능력을 증명하여 주었고 UVB에 대한 보호효과를 알 수 있었다.

자외선에 의한 apoptosis에 미치는 catechin의 영향

UV로 인해 유발되는 피부암을 포함한 많은 암들이 발암 유전자(oncogene)나 발암억제유전자(tumor suppressor gene)와 같은 중요한 유전자들의 DNA가 손상되고, 손상된 DNA

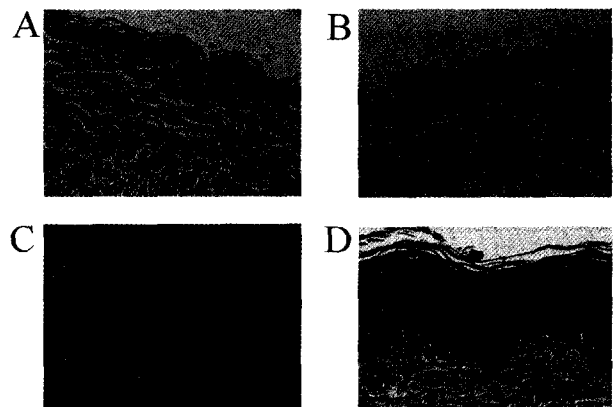


Fig. 4. A photomicrograph of skin of hairless mouse exposed to UVB=100 mJ/cm², catechin concentration = 3 mg/mouse for 2 weeks. H&E, × 400. A;Control, B; Catechin, C;UVB, D;UVB + Catechin.

가 축적되어 발생된다. 자외선으로 인한 발암성은 중요한 유전자의 변이와 면역반응의 억제등 DNA 손상으로 일어난다²³⁾. 본 연구에서도 피부세포에서 DNA를 추출하여 2% agarose gel에서 전기연동하여 본 결과 UVB를 처리한 군에서는 DNA ladder가 관찰되었으나 UVB와 catechin을 처리한 군에서는 관찰되지 않아 catechin이 DNA 손상을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 5). 이와는 달리 Xiaohua Tan의 연구에서는 대장암세포인 LoVo cell에 catechin의 주요성분인 EGCG, EGC, ECG, EC를 각각 처리하였을 때 EGCG와 EGC에서 강한 DNA ladder가 생성되어 apoptosis를 유도한다고 하였다. 본 연구와의 차이를 살펴볼 때 본 연구에서는 정상세포인 반면에 LoVo cell은 대장암세포로서 양상의 차이가 있을 것으로 생각된다. TUNEL LI (Labelling Index)는 대조군이 26 ± 5(n=5), catechin 군은 26 ± 6(n=5)으로 유의한 차이는 없었다. UVB군은 56 ± 4(n=5)으로 대조

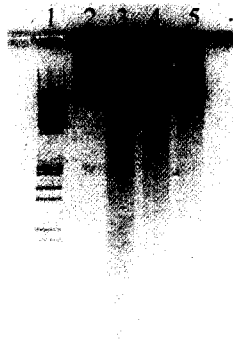


Fig. 5. DNA fragment pattern. : Lane 1, DNA size marker (1 Kb ladder); lane 2, UVB+catechin; lane 3, UVB; lane 4, catechin; lane 5, vehicle control (acetone).

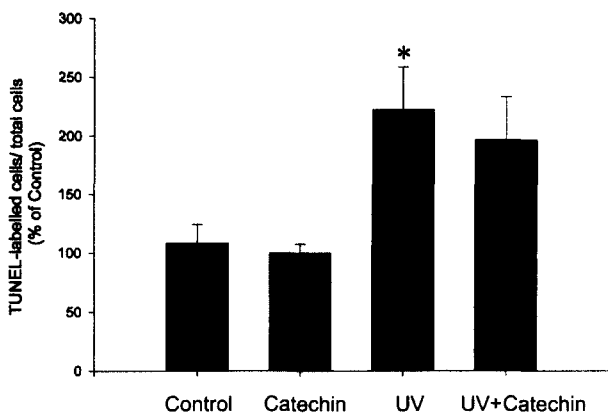


Fig. 6. TUNEL-labelled cells per total keratinocyte cells. Each value represents mean ± S.D. (n=5) * significant different for other group.

군에 비해 2.16배이고, UVB+catechin 군은 49 ± 2로 관찰되어 대조군에 비해 1.89배 증가하였다. UVB군과 UVB+catechin군을 비교하였을 때 유의성 있는(p<0.05) 차이를 보였다(Fig. 6). 따라서 catechin이 UVB에 의해 손상된 DNA에 대한 보호효과가 있는 것으로 생각된다. 자외선에 의해 손상된 피부조직에서의 p53 변화를 살펴보기 위해 catechin이 자외선에 의한 보호효과를 Western blot에 의해서 해석하였다. p53은 tumor suppressor gene으로서 UV에 의해 변이되어지는 가장 대표적인 유전자로서 UV에 노출되었을 때 p53의 함량이 증가하여 cell cycle에서 G1-S transition 단계를 조절한다고 알려져 있기 때문이다. 따라서 UV에 대한 catechin의 보호효과가 p53에서도 영향이 있는지 관찰하기 위해 2주간 처리한 후 부검하여 조직을 얻어 단백질을 추출하여 western blot을 실시하였다. UV에 의해 p53 단백질의 발현을 조사한 결과 control에 비해 2.18배 현저하게 p53의 발현이 불활성화 되었다. 그러나 UV+catechin군에서는 p53의 발현이 UV을 조사한 군의 결과와 비슷하게 2.17배를 나타내었다(Fig. 7). 이 결과는 catechin이 UV에 의해 손상된 DNA를 복구하는 DNA polymerase 같은 enzyme이 미처 활성화되지 못한 것에 기인되는 것으로 생각되며 앞으로 catechin의 DNA repair enzyme 활성화 연구가 추후에 필요하다고 생각된다.

자외선에 의한 cell proliferation에 미치는 catechin의 영향

Catechin의 UV-induced apoptosis의 보호효과가 인정되었지만 한편으로는 UV가 cell proliferation을 일으킨다는 보고가 있기 때문에 본 연구에서는 cell proliferation 관련

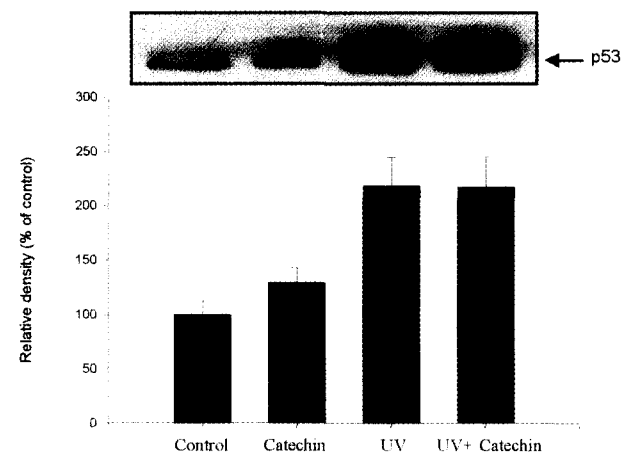


Fig. 7. Effect of topical application of catechin on UVB-induced expression of p53.

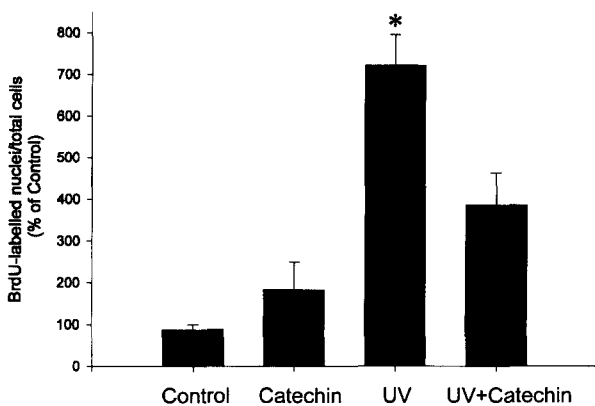


Fig. 8. BrdU-labelled cells per total keratinocyte cells. Each value represents mean \pm S.D. (n=5). *significant different for other group.

DNA 합성의 변화를 관찰하였다. 본 연구에서는 UVB에 의해 손상된 세포가 세포증식이 일어나는지 또한 catechin을 처리하였을 때 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 immunohistochemical 염색법을 이용한 BrdU를 측정하였다. BrdU는 세포의 DNA 합성 검색법으로 세포주기(cell cycle) 중 S기(S phase)만 표지되어 세포증식의 지표로 많이 사용되고 있다. 그 결과 BrdU LI (Labelling Index)는 대조군이

3.2 ± 0.7 (n=5), catechin 군은 5.3 ± 2.1 (n=5)으로 유의한 차이는 없었다. UVB군은 25.2 ± 4.4 (n=5)으로 대조군에 비해 7.74배이고, UVB+catechin 군은 13.3 ± 2.8 (n=5)으로 관찰되어 대조군에 비해 4.1배 증가하였다. UVB군과 UVB+catechin 군을 비교하였을 때 유의성 있는 ($p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 8). 따라서 이 연구에서는 UVB의 영향으로 cell proliferation이 발생하고, UVB와 catechin을 처리하였을 때 감소하는 경향이 나타남을 알 수 있었다. Ouhtil은 UVB가 죽은 세포들을 대체하기 위해 피부에서 hyperplasia가 유발하며 apoptosis와 세포증식 과정은 밀접하게 연관되어 있어 조절되어지고 만성 UVB 조사시에는 이러한 apoptosis와 세포증식의 관계가 조화의 불균형으로 피부암을 일으킬 수 있다고 보고하였다²⁹). Tea polyphenol은 발암의 다양한 단계에서 세포의 생존과 세포증식을 억제할 수 있다고 보고되었다³⁰). 본 연구 결과에 의하면 catechin이 UVB에 의한 피부의 손상과 apoptosis를 억제하고 세포증식을 유의하게 감소시켰다($p < 0.05$). 본 연구에서는 정상세포인 hairless mouse의 피부세포를 이용하여 UVB로 인해 손상된 세포에 catechin을 처리하였을 때 apoptosis를 억제하였고, 손상된 세포증식도 감소시킴이 밝혀졌다. 따라서 UVB에 의해 유도된 세포증식 억제 및 세포사 억제능력이 catechin의 항암작용의 일부작용기전으로 생각된다.

국문요약

녹차의 주요 성분인 catechin은 항돌연변이, 항종양, 항균, 항바이러스 활성 및 콜레스테롤 저하, 혈압 상승 억제, 해독, 방사선 차단 작용 등과 같은 다양한 생물학적 작용들이 보고되고 있다. 최근 환경 오염의 급증으로 인한 오존층의 파괴로 지표에 도달하는 자외선이 증가됨에 따라 피부노출 위험이 증가하고 있다. 따라서 피부암의 발생이 증가하는 추세이며 역학적 및 실험실적 연구에서 자외선 조사가 가장 큰 원인이라고 보고되고 있다. 이에 본 연구는 catechin이 UVB에 의해서 손상된 피부조직에 미치는 영향을 연구하였고 광발암과정에서 catechin의 억제효과가 apoptosis에 어떤 영향을 주어 작용하는지를 *in vivo* hairless mouse skin에서 연구하였다. 녹차잎에서 추출한 catechin을 hairless mouse를 대조군, catechin을 처리한 군, 자외선을 처리한 군, catechin과 자외선을 처리한 군으로 나누었으며 catechin의 농도는 3 mg/mouse로 피부에 도포한 후 자외선을 UVB 100 mJ/cm² 조사하였다. 자외선에 의한 피부조직에 미치는 catechin의 영향을 H&E stain을 실시하여 확인하였고, apoptosis에 미치는 catechin의 보호효과를 알아보기 위해 DNA laddering 형성 여부와 TUNEL assay로 확인하였으며 western blot을 이용하여 apoptotic activity와 관련된 단백질인 p53연구하였다. 또한 자외선에 의한 세포증식에 미치는 catechin을 영향을 bromodeoxyuridine(BrdU) 면역염색방법을 이용하여 살펴보았다. 본 연구결과 자외선에 의하여 피부는 진피층의 교원섬유의 증가가 정상피부보다 2-3배 비후되었고, 염증세포의 침윤과 섬유화세포 등이 관찰되었으며 표피층은 두꺼워졌으나 상피세포가 소실되어 1-2층으로 되었다. UVB 조사와 catechin을 2주간 처리한 후의 mouse의 피부는 표피층이 9-12층으로 이루어져 있었고, 세포의 핵은 과염색성을 보이며 커져있어 손상된 표피층 상피세포가 재생되고 있음을 확인하였다. Apoptosis에 미치는 결과에서 UVB 조사군은 apoptosis의 대표적 특징인 DNA fragmentation이 관찰되었고, UVB와 catechin을 처리한 군에서는 생성되지 않아 뚜렷한 보호효과를 나타내었다. TUNEL assay를 실시한 결과 UVB군과 UVB+catechin 군을 비교하였을 때 UVB+catechin군에서 apoptotic cells이 유의성 있는 차이 ($p < 0.05$)를 보였다. Apoptosis 관련 단백질인 p53발현을 살펴본 결과 대조군과 비교해볼 때 UVB군과 UVB와

catechin을 처리한 군간에서는 차이가 없었다. 자외선에 의한 세포증식에 미치는 catechin의 영향을 살펴본 결과 BrdU 에서는 UVB군과 UVB+catechin 군을 비교하였을 때 UVB+catechin군에서 BrdU 세포수가 유의성 있는($p<0.05$) 감소를 보였다. 본 연구 결과에 의해 녹차의 주요성분인 catechin은 자외선에 의해 유도되는 세포증식 및 apoptosis를 억제하고, 세포손상, 세포증식 및 apoptosis를 억제시킴을 확인하였다.

참고문헌

- McKenzie, R., Connor, B., and Bodeker, G. Increased summertime UV radiation in New Zealand in response to ozone loss. *Science*(Washington DC), **285**, 1709-1711, (1999).
- 박수남, 천연물의 피부세포에 미치는 영향, *대한화장품학회지* 제25권 2호 77-128, (1999).
- Shea, C.R., and Parrish, J.A.(1991) in *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin*(Goldsmith, L.A., ed) pp. 910-927, Oxford University Press, New York.)
- Donald, L.B., Daniel, P.H. and Thomas, V.O.: An animal model of solar aged skin : Histological, physical, and visible change in UV irradiated hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.*, **46**, 367-378 (1987).
- Koh HK. Preventative strategies and research for ultraviolet-associated cancer. *Environ. Health Perspect.* 103(suppl):255-257, (1995).
- De Grujil, F.R., Sterenborg, H. J. C. M., Forbes, P. D., Davies, R. E., Cole, C., Kelfkens, G., van Weelden, H., Slaper, H., and van der Leun, J. C. Wavelength dependence of skin cancer induction by ultraviolet irradiation of albino hairless mice. *Cancer Res.*, **53**:53-60, (1993).
- Beehler, B.C., Przybyszewski, J., Box, H.B., and Kulesz-Martin, M.F. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture of UVB and H₂O₂. *Carcinogenesis*, **13**, 2003-2007, **1992**., 정혜영, 한국노화학회지(1992) 제2권 제1호 pp1-11
- Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Craig, R. W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.*, **51**, 6304-6311, (1991).
- Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, Walsh, W. V., and Kastan, M. B. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 7491-7495, (1992).
- Irina stoian, Andra oros, Elena Moldoveanu. Apoptosis and Free Radicals. *Biochemical and molecular medicine* **59**, 93-97, (1996).
- Zambetti, G.P., and Levine, A.J.A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB J.*, **7**, 855-865, (1993).
- 윤여표, 강원식, 이미애, *J. Food Hygiene Safety* **11**, 77-82, (1996).
- Santosh, K.K., Rajesh, A., Susan, E. Gary, S.W. and Hasan, M.: Protection against 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-caused inflammation in SENCAR mouse ear skin by polyphenolic fraction isolated from green tea. *Carcinogenesis*, **14**, 361 (1993).
- Huang M-T, Xie J-G, Wang ZY, Ho C-T, Lou Y-R, Wang C-X, Hard GC, Conney AH: Effects of tea, decaffeinated tea, and caffeine on UVB light-induced complete carcinogenesis in SKH-1 mice: demonstration of caffeine as a biological important constituent of tea. *Cancer Res* **57**, 2623-2629, (1997).
- Wang ZY, Huang MT, Ho CT, et al: Inhibitory effect of green tea on the growth of established skin papillomas in mice. *Cancer Res* **52**, 6657-6665, (1992b).
- Wang, Z.Y., Agarwal, R., Bickers, D.R., and Mukhtar, H. Protection against ultraviolet B radiation-induced photocarcinogenesis in hairless mice by green tea polyphenols *Carcinogenesis*(Lon.), **12**, 1527-1530, (1991).
- Record IR, Dreosti IE: Protection by black tea and green tea against UVB and UVA+B induced skin cancer in hairless mice. *Mutat Res* **422**, 191-199, (1998a).
- Ahmad N, Feyes DK, Nieminen A-L, Gaward R, Mukhtar H: Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* **89**, 1881-1886, (1997).
- Ji F, Zhao, Yu J, Zhang, Xin H, Jin, Mohanmmad Athar, Regina M. Santella, David R. Bickers and Zhi Y. Wang: Green tea protects against Psoralen Plus ultraviolet A induced photochemicals damage to skin. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 1070-1075, (1991).
- Sambrook, Fritsch, Maniatis. *Molecular Cloning*, 6.3 Chapter, second edition.
- Gold, R. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques. *Lab. Invest.* **71**, 219, (1994).
- Diffey, B. L. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. *Phys. Med. Biol.*, **36**, 299-328, (1991).
- Chikako Nishigori. UV-induced DNA damage in carcinogenesis and its repair. *J. Dermatological Science* **23** Sipp1, S41-44, (2000).
- Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462, (1995).
- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821-1828, (1994).
- Blattner C, Bender K, Herrlich P, Rahmsdorf HJ. Photoproducts in transcriptionally active DNA induce signal trans-

- duction to the delayed UV-responsive genes for collagenase and metallothionein. *Oncogene* **16**, 2827-2844, (1998).
27. Liu M, Dhanwada KR, Birt DF, Hecht S, Pelling JC. Increase in p53 protein half-life in mouse keratinocytes following UV-B irradiation. *Carcinogenesis* **15**, 1089-1092, (1994).
 28. Harwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821-1828, (1994).
 29. Allal Ouhtit, H. Konrad Muller, Darren W. Davis, Stephen E. Ullfich, David McConkey, and Honnavara N. Ananthaswamy. Temporal Events in skin injury and the early adaptive responses in ultraviolet-irradiated mouse skin. *Am J Pathol* **156**, 201-207, (2000).
 30. G.Y. Yang, Z. Liu, D.N. Seril, J. Liao, W. Ding, S. Kim, F. Bondoc, C.S. Yang. Black tea constituents, theaflavins, inhibit 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Carcinogenesis* **18**, 2361-2365, (1997).