

<단보>

각종 해조류 추출물들의 인간 피부세포주 HaCaT에 대한 활력 영향

윤승제 · 조연숙¹ · 남주현² · 이형호 · Eliya Kim³ · 홍용기*

부경대학교 생물공학과 및 수산과학연구소, ¹영남대학교 식품외식학부, ²대구공업대학 식품영양조리과

³Fisheries and Oceans Canada, Pacific Biological Station

Effects of Several Seaweed Extracts on the Viability of Human Keratinocyte HaCaT Cells

Seung-Je YOON, Yeon Sook CHO¹, Ju-Hyun NAM², Hyung-Ho LEE, Eliya KIM³ and Yong-Ki HONG*

Department of Biotechnology and Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Namku, Busan 608-737, Korea

¹School of Food Science and Food Service Industry, Yeungnam University, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-749, Korea

²Division of Food Nutrition and Culinary Arts, Daegu Technical College, Dalseogu, Daegu 704-721, Korea

³Fisheries and Oceans Canada, Pacific Biological Station, Nanaimo, B.C., V9R 5K6, Canada

The cellular viability of the human keratinocyte cell line HaCaT was compared after adding seaweed extracts to the culture medium. The viability was measured using a quick, quantitative, spectrophotometric crystal violet inclusion method. Of 36 common seaweed species tested, methanol extracts from *Sargassum sagamianum* and *Gigartina tenella* enhanced the viability of HaCaT cells by 1.6-fold, as compared to control cells, while methanol extracts from *Dictyota dichotoma*, *Pachymeniopsis elliptica*, and *Enteromorpha linza* decreased the viability to less than half that of controls.

Key words: Crystal violet inclusion method, HaCaT, Keratinocyte, Seaweed extract, Viability

서론

최근 들어서 해조류로부터 다양한 생리활성물질들이 알려지면서 새로운 생리활성물질들의 개발 자원으로서 생체량이 풍부한 해조류들의 잠재성이 재인식 되어지고 있다 (Lincoln et. al., 1991; Cannell et al., 1993). 많은 해조류들이 전세계 다양한 지역에서 소량이나마 전통 약재, 식품, 건강 보조품 등으로 사용 되어져 왔다 (Smit, 2004). 특히, 우리나라 (Donguibogam Committee, 1999), 일본 (Matsuzaki and Iwamura, 1980), 중국 (Tseng and Chang, 1984) 등지에서는 식품으로서 뿐만 아니라 전통 약제로서도 많이 사용 되어져 왔으며, 서양에서는 최근에 주로 식품 및 의약품에 사용 할 다당류 (agar, alginate, carrageenan, 등)의 원료로 사용되었다 (Indegaard and Ostgaard, 1991).

본 연구에서는 향후 각종 생리활성물질들의 탐색에 주로 많이 이용되어 질 가능성이 높은 생체생산량이 풍부한 해조류들을 주 대상으로 하여, 이들 해조류 추출물들이 인간 피부세포주인 HaCaT 세포의 활력에 어떤 증진 혹은 억제효과를 나타내는지 조사하였다. 이는 손상된 피부세포에 대한 해조

류의 활용 혹은 정상적인 피부세포에 대한 해조류의 독성 등을 간접적으로 파악할 수 있는 자료가 될 수 있다. 따라서 우선 신속하고 간편한 활력측정방법을 선택하기 위하여 기존의 4가지 활력측정방법들을 비교하였으며, 그 중 가장 신속한 방법을 사용하여 각종 해조류 추출물들에 의한 세포활성 증진 및 억제효과를 측정하였다.

재료 및 방법

해조류 추출물

해조류는 한국 연안에서 비교적 자원량이 많은 종들을 대상으로 채집하고 분류하였다. 그 중 녹조류는 4종, 갈조류 18종, 홍조류 14종이었다. 해조류 시료는 우선 수돗물로 염분과 epiphyte를 제거하고 통풍이 잘되는 음지에서 일주일간 충분히 건조시킨 후 분쇄하였다. 추출물 제조는 80% 메탄올 1 L 당 해조류 분말 20 g을 암실에서 하루 동안 진탕 (80 rpm) 추출하였고 이 과정을 3회 반복하였다. 추출액은 상층액만을 회수한 다음 37℃에서 메탄올과 물을 증발 제거시켰다. 추출 원액은 추출물 40 mg 당 dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 mL의 비율로 녹인 다음 0.22 μm 필터로 여과하여 -20℃에서 보관하면서 사용하였다.

*Corresponding author: ykhong@pknu.ac.kr

세포배양

인간 피부세포 유래의 HaCaT 세포주는 부산대학교 의과대학에서 분양받았으며, 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS) 과 penicillin 및 streptomycin (각 100 units/mL)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)을 사용하였다. 배양은 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였고 일주일에 2번씩 계대 배양하였다.

Trypan blue exclusion 방법에 의한 활력측정

각종 해조류 추출물들의 첨가에 의한 HaCaT 세포의 활력에 미치는 영향을 측정하기 위해, 우선 세포활력을 측정하는데 주로 많이 이용되는 4가지 방법들을 비교하고자 한다. 그 중 trypan blue exclusion 방법에 의한 활력측정은 HaCaT 배양액 (2.5×10⁵ cells/mL) 100 μL를 각각 900 μL DMEM 배지가 들어 있는 24-well plate에 분주하고 24시간 동안 세포를 안정화시킨 후, 미역 추출물 원액 (40 mg/mL-DMSO) 5 μL를 첨가하였다. 이를 24시간 배양한 후, plate의 배지를 조심스럽게 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 2회 세척하였다. 다음 trypsin (0.5 mg/mL) 및 EDTA (0.2 mg/mL)를 녹인 PBS 용액을 처리해 single cell로 분산시킨 후 PBS로 원심분리 하여 trypsin-EDTA를 제거했다. 세포를 1 mL의 serum-free DMEM에 현탁한 후 세포현탁액 20 μL에 0.4% trypan blue solution 20 μL를 더하여 10분이 경과한 다음 hemocytometer로 현미경 하에서 계측하였다. 추출물을 처리하지 않은 대조구를 100%로 하여 상대활력 (%)으로 표현하였다 (Berry et al., 1991).

Crystal violet inclusion 방법에 의한 활력측정

상기와 같이 미역 혹은 각종의 해조류 추출물 원액 (40 mg/mL-DMSO) 5 μL를 세포 배양액 1 mL에 첨가하고 이를 24시간 배양한 후, plate의 배지를 조심스럽게 제거하고 배양 세포들을 고정시키기 위하여 96% 에탄올 1 mL를 10분 동안 처리하였다. 다음 0.05% crystal violet이 함유된 20% 에탄올 1 mL를 처리하여 30분 동안 염색시켰다. 염색 후 이 용액을 깨끗이 제거하고 0.1% acetic acid가 함유된 50% 에탄올 2 mL를 처리해서 세포 내에 침착된 crystal violet을 녹인 다음 이를 비색계를 사용하여 585 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물을 처리하지 않은 대조구를 100%로 하여 상대활력 (%)으로 표현하였다 (Ito, 1984).

AlamarBlue™ reduction 방법에 의한 활력측정

상기와 같이 미역 추출물을 첨가하고 24시간 배양한 후, plate의 배지를 조심스럽게 제거하고 배양세포에 10% AlamarBlue™ solution이 포함된 새로운 배지 1 mL로 대체한 후 4시간 동안 반응시켰다. 반응 후 570 nm와 600 nm에서 흡광도를 측정하였고, 활력은 제품 manual에 따라 계산하였다. 추출물을 처리하지 않은 대조구를 100%로 하여 상대활력 (%)으로 표현하였다 (Ahmed et al., 1994).

Tetrazolium salt reduction 방법에 의한 활력측정

상기와 같이 미역 추출물을 첨가하고 24시간 배양한 후, 각 well에 5 mg/mL의 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) solution을 배양액의 1/10이 되도록 첨가하고 4시간 동안 반응시켰다. 배지를 제거하고 각 well에 DMSO 100 μL를 첨가하여 세포 내에 생성된 formazan을 20분 동안 추출시킨 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물을 처리하지 않은 대조구를 100%로 하여 상대활력 (%)으로 표현하였다 (Denizot and Lang, 1986).

결 과

활력측정방법 비교

대부분의 해조류 추출물들은 다양한 색소를 함유하고 있으므로 각종 염색시약들의 사용에 의한 HaCaT 세포 활력측정방법에 있어서의 색소의 영향과 측정방법 편리성 등을 파악하고자, 우선 갈색색소 등을 많이 함유한 미역 추출물을 대표적으로 사용하여 세포 활력측정에 주로 많이 이용되는 4가지 방법들을 비교하였다. 먼저 trypan blue exclusion 방법에 의한 활력측정은 죽은 세포의 경우 푸른색, 생 세포는 탈색에 의하여 이들의 구별이 가능하나, trypsin에 의한 배양세포의 분리, trypan blue 염색 정도에 따른 차이, 많은 세포들을 현미경 하에서 세포 계측 등 기술적인 숙련이 요구된다. Crystal violet inclusion 방법에 의한 활력측정은 세포막을 투과한 crystal violet의 DNA 염색으로 나타나므로 생 세포의 양에 따른 염색 정도를 비색계를 사용하여 정량적으로 쉽게 측정할 수 있으며 또한 세척과정에 의하여 유리 세포들을 제거할 수 있다는 장점도 가진다. 전체 측정에 소요되는 시간도 1시간 이내로서 간단하고 신속한 장점을 가진다. 다음 AlamarBlue™ reduction 방법에 의한 활력측정은 세포독성이 거의 없고 추출과정이 필요 없으므로 세포배양 중에도 연속적으로 세포활력 정도를 측정할 수가 있다. 또한 형광광도계 혹은 비색계를 사용하여 정량할 수도 있다는 장점도 있다. Tetrazolium salt reduction 방법에 의한 활력측정은 생 세포의 미토콘드리아 탈수소효소에 의하여 연노랑 MTT 화합물이 진한 푸른색의 formazan 화합물로 환원되며 이를 DMSO로 추출하여 비색계로 정량한다. 이와 같이 4가지 방법 모두 생 세포의 활력측정을 정량적으로 할 수 있으며, 미역과 같은 해조류의 추출물에 색소들이 많이 혼입되어있는 경우에도 Fig. 1과 같이 농도 별로 거의 비례하여 활력이 감소하는 비슷한 경향을 보여준다. 따라서 이들 4가지 방법들 중 어느 방법이나 모두 정량적으로 활력측정에 사용되어도 무방할 것이나, 본 해조류 종류별 비교 실험에서는 그 중 측정시간이 가장 신속하고 배양 plate에 흡착된 세포들만을 대상으로 활력 측정이 가능한 crystal violet inclusion 방법을 사용하였다.

해조류 비교

각종 해조류 추출물들을 HaCaT 세포 배양액에 40 mg/mL 농도의 추출물 5 μL를 첨가하고 24시간 동안 반응시킨 후 그 활력의 변화 정도를 정량 비교하였다. 대조구의 경우 585

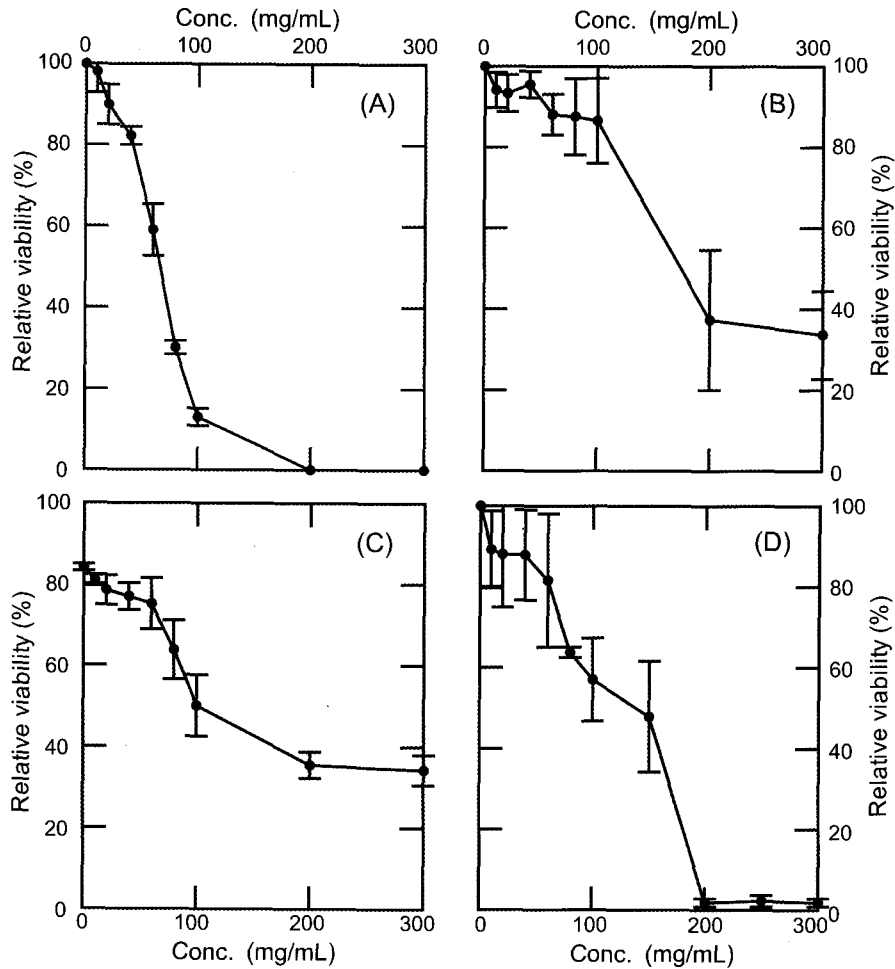


Fig. 1. Comparison of viability measurement of the keratinocyte HaCaT cells cultured in DMEM containing the *Undaria pinnatifida* extract. Viability was measured by trypan blue exclusion method (A), crystal violet inclusion method (B), alamarBlue™ reduction method (C), and tetrazolium salt reduction method (D).

nm에서 0.09 ± 0.02 의 흡광도 값을 보였다. 36종의 해조류 들 중에서 비틀대모자반 (*Sargassum sagamianum*) 및 돌가사리 (*Gigartina tenella*) 추출물들은 대조구에 비하여 각각 약 1.6배의 활력 증가 효과를 나타내었다 (Table 1). 반면에 참그물바탕말 (*Dictyota dichotoma*), 참도박 (*Pachymeniopsis elliptica*), 및 잎파래 (*Ulva linza*)의 추출물들은 대조구에 비하여 각각 약 0.2배, 0.4배 및 0.4배 정도의 비율로 세포 활력을 억제시켰다.

고 찰

의약품이나 화장품의 성분 중 피부 과민반응 및 피부 세포 독성을 측정하기 위하여 HaCaT 세포 활력측정방법들이 많이 활용된다 (Sanchez et al., 2006). 그리고 팬지 식물 (*Viola tricolor*) 뿌리에서의 펙틴 유사 다당류가 이 세포활성을 증진시킨다고 알려져 있으며 (Deters et al., 2005), 미역고사리 속 식물 (*Polypodium leucotomos*)의 수용성 추출물도 HaCaT 세포의 생존 및 활력을 약 2배 증진시켰다 (Alonso-Lebrero et al., 2003). 따라서 본 실험에서의 세포활성을 증진시키는 효과를

나타낸 비틀대모자반 및 돌가사리의 추출물 중에서 유효 성분의 분리가 기대되며, 이들의 주 효능물질들은 자외선 및 화학 물질 등에 의하여 손상된 피부세포의 회복촉진, 건강한 피부 세포의 유지 등의 목적으로도 사용되어 질 수 있을 것이다. 또한 비틀대모자반은 납 및 크롬 이온의 생체 흡착율이 매우 높은 것으로도 알려져 있으며 (Suh et al., 1999), 돌가사리는 지질 함량이 건조중량으로 0.9% 정도로 아주 높으며 수용성 추출물 중에서는 황산 함량이 19% 정도로 매우 많은 특성을 가진다 (Do et al., 1997). 반면에 은행나무 (*Ginkgo biloba*) 잎의 60% acetone 추출물의 경우 HaCaT 세포에 대하여 neutral red uptake 방법으로 측정하였을 경우 IC_{50} 농도는 $900 \mu\text{g/mL}$ 에서 억제시켰다 (Hecker et al., 2002). 본 실험에서 최종농도가 $200 \mu\text{g/mL}$ 되게 첨가한 경우 세포활성을 대조구에 비하여 24% 정도의 비율로 억제시킨 참그물바탕말은 은행나무 추출물보다도 더 강력하게 억제시켰다. 이 참그물바탕말은 diterpenoid 화합물인 dichotenol-A, B, C (Ali et al., 2004), dolastane (Ali and Perez, 2003)를 생성하는 것으로도 알려져 있다. 또한 세포

Table 1. Effect of seaweed extracts on viability of the human keratinocyte HaCaT. Cells were grown up to 50% confluence, and then treated with 5 μ L seaweed extracts (40 mg/mL) in 1 mL of culture medium. Cell viability was estimated by crystal violet exclusion after 24 h incubation. The mean OD value at 585 nm of the control cells was 0.09 \pm 0.02. Data are mean \pm SD from three independent assays. The statistical significance is *P<0.01 as compared to control

Seaweed	Viability (OD at 585 nm)
Chlorophyta	
<i>Codium fragile</i> (Suringar) Hariot	0.11 \pm 0.03
<i>Ulva compressa</i> (L.) Greville	0.09 \pm 0.02
<i>Ulva linza</i> (L.) J. Agardh	0.04 \pm 0.02*
<i>Ulva pertusa</i> Kjellman	0.06 \pm 0.01
Phaeophyta	
<i>Colpomenia bullosa</i> (Saunders) Yamada	0.10 \pm 0.04
<i>Colpomenia sinuosus</i> (Roth) Derbes et Solier	0.08 \pm 0.02
<i>Costaria costata</i> (C. Agardh) Saunders	0.08 \pm 0.01
<i>Dictyota dichotoma</i> (Hudson) Lamouroux	0.02 \pm 0.01*
<i>Ecklonia stolonifera</i> Okamura	0.09 \pm 0.02
<i>Ecklonia kurome</i> Okamura	0.11 \pm 0.02
<i>Hizikia fusiformis</i> (Harvey) Okamura	0.09 \pm 0.01
<i>Ishige okamurae</i> Yendo	0.10 \pm 0.03
<i>Ishige sinicola</i> (Setchell et Gardner) Chihara	0.11 \pm 0.02
<i>Laminaria japonica</i> Areschoug	0.10 \pm 0.01
<i>Sargassum confusum</i> C. Agardh	0.10 \pm 0.02
<i>Sargassum horneri</i> (Turner) C. Agardh	0.11 \pm 0.02
<i>Sargassum fulvellum</i> (Turner) C. Agardh	0.10 \pm 0.02
<i>Sargassum ringgoldianum</i> Harvey	0.10 \pm 0.04
<i>Sargassum sagamianum</i> Yendo	0.14 \pm 0.03*
<i>Sargassum thunbergii</i> (Roth) Kuntze	0.12 \pm 0.04
<i>Scytosiphon lomentaria</i> (Lyngbye) Link	0.06 \pm 0.02
<i>Undaria pinnatifida</i> (Harvey) Suringar	0.05 \pm 0.02
Rhodophyta	
<i>Carpopeltis cornea</i> (Okamura) Okamura	0.06 \pm 0.01
<i>Chondrus ocellatus</i> Holmes	0.09 \pm 0.01
<i>Corallina pilulifera</i> Postels et Ruprecht	0.09 \pm 0.01
<i>Gigartina tenella</i> Harvey	0.14 \pm 0.02*
<i>Gracilaria verrucosa</i> (Hudson) Papenfuss	0.09 \pm 0.01
<i>Gymnogongrus flabelliformis</i> Harvey	0.08 \pm 0.02
<i>Helminthocladia australis</i> Harvey	0.06 \pm 0.02
<i>Hypnea charoides</i> Lamouroux	0.10 \pm 0.02
<i>Lomentaria catenata</i> Harvey	0.10 \pm 0.03
<i>Meristotheca papulosa</i> (Montagne) Kylin	0.09 \pm 0.02
<i>Pachymeniopsis elliptica</i> (Holmes) Yamada	0.04 \pm 0.01*
<i>Pachymeniopsis lanceolata</i> (Okamura) Yamada	0.08 \pm 0.02
<i>Porphyra yezeensis</i> Ueda	0.09 \pm 0.01
<i>Symphyocladia latiuscula</i> (Harvey) Yamada	0.06 \pm 0.01

활성을 44% 정도 비율로 억제시킨 참도박은 혈액 항응고성의 다당류를 생성하며 (Yoon et al., 2000), 메탄올 추출물은 지질 성분의 함량을 감소시키는 효과를 나타내는 것으로도 알려져 있다 (Park et al., 1996). 그리고 세포활성을 46% 비율로 억제시킨 잎파래는 allelopathic 화합물을 생성하는 것으로도 알려져 있다 (Jin et al., 2005). 그러나 참그물바탕말, 참도박, 잎파래에 서의 세포활성억제 작용의 주요 활성성분은 추후 물질의 분리 및 구조확인이 필요하다.

사 사

본 연구는 부경대학교 수산과학연구소와 캐나다 Fisheries and Oceans Canada, Pacific Biological Station과의 협력사업 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Ahmed, S.A., R.M. Gogal Jr. and J.E. Walsh. 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: An alternative to H3-thymine incorporation assay. *J. Immunol. Methods*, 170, 211-224.
- Ali, M.S. and M.K. Pervez. 2003. Ring-A hydroxylated dolastanes from the marine brown alga *Dictyota dichotoma* (Huds.) Lamour. *Nat. Prod. Res.*, 17, 281-286.
- Ali, M.S., M.K. Pervez, F. Ahmed and M.Saleem. 2004. Dichotenol-A, B and C: The C-16 oxidized seco-dolastanes from the marine brown alga *Dictyota dichotoma* (Huds.) Lamour. *Nat. Prod. Res.*, 18,

- 543-549.
- Alonso-Lebrero, J.L., C. Dominguez-Jimenez, R. Tejedor, A. Brieva and J.P. Pivel. 2003. Photoprotective properties of a hydrophilic extract of the fern *Polypodium leucotomos* human skin cells. *J. Photochem. Photobiol.*, 70, 31-37.
- Berry, M.N., A.M. Edwards and G.J. Barritt. 1991. Isolated hepatocytes. Preparation, Properties and Applications. Elsevier, New York, 1-47.
- Cannell, J.P.R. 1993. Algae as a source of biologically active products. *Pest. Sci.*, 39, 147-153.
- Denizot, F. and R. Lang. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol. Methods*, 89, 271-277.
- Deters, A.M., C. Lengsfeld and A. Hensel. 2005. Oligo- and polysaccharides exhibit a structure-dependent bioactivity on human keratinocytes in vitro. *J. Ethnopharm.*, 102, 391-399.
- Do, J.R., Y.J. Nam, J.H. Park and J.H. Jo. 1997. Studies on chemical composition of red algae. *J. Kor. Fish. Soc.*, 30, 428-431.
- Donguibogam Committee. 1999. Translated Donguibogam. Bubinmunwha Press, Seoul, 1-2198.
- Hecker, H., R. Johannisson, E. Koch and C.P. Siegers. 2002. In vitro evaluation of the cytotoxic potential of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L. *Toxicology*, 177, 167-177.
- Indegaard, M. and K. Ostgaard. 1991. Polysaccharides for food and pharmaceutical uses. In: *Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential*. Guiry, M.D. and G. Blunden, eds. Wiley & Sons Ltd., 169-183.
- Ito, M. 1984. Microassay for studying anticellular effects of human interferon. *J. Interf. Res.*, 4, 603-608.
- Jin, Q., S. Dong and C. Wang. 2005. Allelopathic growth inhibition of *Prorocentrum micans* (Dinophyta) by *Ulva pertusa* and *Ulva linza* (Chlorophyta) in laboratory cultures. *Eur. J. Phycol.*, 40, 31-37.
- Lincoln, A.R., K. Strupinski and M.J. Walker. 1991. Bioactive compounds from algae. *Life Chem. Rep.*, 8, 97-183.
- Matsuzaki, S. and K. Iwamura. 1980. Application of seaweeds to human nutrition and medicine. In: *Proceedings of the International Symposium for Food from the Sea*. Noell, H., ed. Bremerhaven, Germany, 162-185.
- Park, J.C., Y.I. Jang, M.S. Doo, S.H. Kim and J.W. Choi. 1996. Effect of methanolic extract of *Pachymeniopsis elliptica* lipids components of hyperlipidemic rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 25, 958-962.
- Sanchez, L., M. Mitjans, M.R. Infante and M.P. Vinardell. 2006. Potential irritation of lysine derivative surfactants by hemolysis and HaCaT cell viability. *Toxicol. Lett.*, 161, 53-60.
- Smit, A.J. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *J. Appl. Phycol.*, 16, 245-262.
- Suh, K.H., K.H. Ahn, H.S. Lee, H.G. Lee, J.K. Cho and Y.K. Hong. 1999. Biosorption of Pb and Cr by using *Sargassum sagamianum*. *J. Kor. Fish. Soc.*, 32, 399-403.
- Tseng, C.K. and C.F. Chang. 1984. Chinese seaweeds in herbal medicine. *Hydrobiologia*, 116/117, 152-154.
- Yoon, J.A., K.W. Yu, W.J. Jun, H.Y. Cho, Y.S. Son and H.C. Yang. 2000. Purification of blood anticoagulant polysaccharide from *Pachymeniopsis elliptica*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, 29, 908-916.

2007년 11월 16일 접수
2008년 2월 1일 수리