

인체 피부 섬유아세포에서 자외선 조사에 대한 녹차나무 씨 추출물의 보호효과

김옥경¹ · 남다운¹ · 이민재² · 강남길² · 임재연³ · 이정민^{1,4*}

¹경희대학교 의학영양학과, ²(주)뉴트리플랜
³연세대학교 생명공학과, ⁴경희대학교 임상영양연구소

Protective Effects of Green Tea Seed Extract against UVB-irradiated Human Skin Fibroblasts

Ok Kyung Kim¹, Da-Eun Nam¹, Min-Jae Lee², Namgil Kang²,
Jae-Youn Lim³, and Jeongmin Lee^{1,4*}

¹Dept. of Medical Nutrition, Kyung Hee University, Gyeonggi 446-701, Korea

²NutriPlan Co., Ltd., Gyeonggi 410-837, Korea

³Dept. of Biomaterials Science and Technology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

⁴Clinical Nutrition Institute, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

ABSTRACT In this study, we investigated the protective effects of green tea seed extract (GSE) against UVB-induced skin damage in human skin fibroblasts. GSE was first analyzed for antioxidant activity using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical scavenging assays. Treatment of UV-irradiated fibroblast with GSE at 10~50 µg/mL significantly increased DPPH and ABTS radical scavenging activities in a dose-dependent manner. GSE treatment inhibited matrix metalloproteinase (MMP-1, MMP-3, and MMP-9) expression and MMP-1 secretion caused by UVB irradiation. Moreover, treatment with GSE significantly increased type-1 collagen expression and production. We next examined levels of antioxidative enzymes (SOD, catalase, and GPx). Reduced antioxidative enzyme activities caused by UVB irradiation were recovered by treatment with GSE at 30 µg/mL and 50 µg/mL. In conclusion, these results show that GSE has protective effects against UVB-induced skin damage in human skin fibroblasts by regulating antioxidative defense systems and MMP expression.

Key words: green tea seed, antioxidant, photoaging, UVB, fibroblast

서 론

피부는 외부환경에 직접 노출되어 있는 조직이기 때문에 다양한 외부적 요인의 영향을 많이 받는 조직이다(1). 온도, 습도, 바람, 자외선 등의 외부적인 요인 중 자외선은 피부의 광노화를 유발한다. 피부는 항상 노출되어 자외선에 의한 영향을 지속적으로 받으면서 광노화로 인하여 중요한 피부 노화의 유발인자가 된다(2,3). 광노화에 의한 피부 노화는 굵고 깊은 주름이 많이 발생을 하며 피부가 거칠어지고 건조해지며 탄력이 감소하게 된다(4,5).

피부가 과도한 자외선에 노출이 되면 피부 표피에 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되며, 비정상적으로 활성산소종이 높아지면 체내 항산화 방어체계가 손상되어 산화적 스트레스를 일으킨다(6-8). 산화적 스트레스는 과산화지질을 형성하여 세포막을 손상시키고, 유전자 변형을 초래하여 결과적으로 세포사멸을 유도한다(9). 또한 증

가된 활성산소종은 표피의 각질형성세포에서 염증성 사이토카인 분비를 촉진시켜 진피의 섬유아세포에서의 MMPs (matrix metalloproteinases) 발현을 증가시키고 pro-collagen의 합성을 감소시킨다. 결과적으로 증가된 MMPs와 감소된 procollagen에 의하여 collagen 분해를 증가시켜 주름형성을 촉진시키고 탄력을 감소시켜 피부노화를 일으키게 한다(10-12). 따라서 이러한 기전에 근거하여 광노화에서 활성산소종의 생성이 중요한 요인으로 작용함으로, 항산화 물질에 의한 활성산소 제거와 체내 항산화 작용의 증가는 피부 노화방지와 주름개선에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다(13).

최근 피부 노화를 억제하는 기능성 물질에 대한 연구는 부작용이 적은 천연 항산화 물질에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 이들은 대부분 페놀성 물질로서 복합적인 생물학적 효과를 가진다고 보고되어 왔다(14). 천연 항산화 물질 가운데 녹차나무(*Camellia sinensis*)는 가장 널리 애용되고 있으며 높은 폴리페놀 성분을 가져 항산화(15), 항비만(16), 항암(17) 등의 다양한 생리활성을 지닌다고 알려져 있다. 이에 따라 녹차의 수요가 늘어나면서 생산량도 증가하

Received 23 September 2013; Accepted 18 November 2013

*Corresponding author.

E-mail: jlee2007@khu.ac.kr, Phone: +82-31-201-3779

였으나 녹차나무 잎 외의 다른 부위에 대한 활용과 기능성 연구는 미비한 실정이다. 일부 연구에서 녹차나무 씨 기름의 항산화(18) 효능을 입증하였으며 항비만(19), 항균 및 항종양(20) 등의 활성이 보고된 바 있다. 또한 녹차나무 씨에는 사포닌, 플라보노이드, 비타민 등의 생리활성 성분이 포함되어 있다고 보고되었다(21). 이러한 연구에 근거하여 녹차나무 씨의 광노화 억제 효능에 대해 기대할 수 있으며, 녹차나무 씨의 기능성 입증으로 녹차나무의 활용을 증가시킬 수 있다.

본 연구에서는 녹차나무 씨 추출물의 자유 라디칼 소거능을 측정하고, 인체 섬유아세포에서 자외선에 의한 MMPs와 collagen의 합성 변화 및 항산화 효소 활성에 미치는 영향을 관찰하여 광노화 억제 효능을 검증함으로써 기능성 물질로 활용하기 위한 기초자료로 사용하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

녹차나무 씨의 이물질을 제거하여 70% 에탄올에 2시간 동안 reflux한 후 회전진공농축기를 사용하여 에탄올을 제거한 후 추출물을 여과하였다. 여과된 추출물을 50°Brix까지 농축시킨 후 농축물 87.5%와 dextrin 17.5%를 혼합하여 동결건조한 다음 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)]와 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], potassium persulfate, DMSO는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 세포배양에 사용된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS(fetal bovine serum) 및 antibiotics는 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 모든 시약 및 용매는 일급 또는 특급 이상의 등급을 사용하였다.

ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능 활성은 Re 등(22)의 방법을 변형하여 측정하였다. Potassium phosphate buffer 용액(pH 7.4)에 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 용해시켜 ABTS⁺ 라디칼 용액을 만들었으며, 96-well plate 각 well에 제조된 ABTS⁺ 라디칼 용액 180 µL와 녹차나무 씨 추출물 20 µL를 넣어 잘 혼합하여 실온에 30분간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 ABTS 라디칼 소거능은 아래의 식으로 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{ABTS 라디칼 소거능(\%)} = \frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료첨가구 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}} \times 100$$

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼 소거능 측정은 Blois의 방법(23)을 변형하

여 측정하였다. 96-well plate에 녹차나무 씨 추출물 100 µL에 200 µM DPPH 용액 100 µL를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 DPPH 라디칼 소거능은 아래의 식으로 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = \frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료첨가구 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}} \times 100$$

세포배양

본 실험에 사용된 인체 피부 진피에 존재하는 섬유아세포는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 10% FBS와 penicillin(100 units/mL), streptomycin(100 g/mL)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였고, 37°C, 5% CO₂, 95% humid air로 조절된 배양기(Thermo Fisher Scientific Inc., Pittsburgh, PA, USA)에서 배양하였다.

시료처리 및 자외선 조사 후 세포 생존율

세포 생존율은 Mosmann 방법(24)을 변형하여 측정하였다. 인체 피부 섬유아세포를 5×10³ cells/well 농도로 96-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 각 well에 녹차나무 씨 추출물을 농도별로 투여하여 24시간 배양시켜 녹차나무 씨 추출물의 독성을 살펴보았다. 자외선 조사는 배지를 제거한 후 DPBS로 세척하여 UVB lamp(5 Sankyo Denky G5T5 lamps, Sankyo Denki Co., Yokohama, Japan)를 이용하여 25 mJ/cm², 50 mJ/cm² 조사한 후 녹차나무 씨 추출물을 농도별로 투여하여 24시간 배양시켜 세포 생존율을 살펴보았고 자외선에 의한 변화를 관찰하였다. 24시간 후 MTT 용액(500 µg/mL)을 첨가하고 4시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 DMSO 200 µL를 첨가하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항산화 효소 활성 측정

항산화 효소인 SOD(superoxide dismutase), GPx(glutathione peroxidase), catalase의 활성을 측정하였다. SOD 활성은 SOD assay kit-WST(Dojindo, Kumamoto, Japan)를 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 샘플을 넣고 WST-1(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, mono-sodium salt)과 xanthine oxidase working solution을 첨가한 후 37°C에서 20분간 배양하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. GPx 활성은 glutathione peroxidase activity assay kit(BioVision Inc., Mountain View, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 NADH, glutathione, glutathione reductase 용액을 첨가한 후 340 nm에서 흡광도의 변화값을 측정하였다. Catalase는 catalase assay kit(Bio-Vision Inc., Mountain View, CA, USA)을 이용하여 활성을

관찰하였다. H₂O₂를 기질로 사용하여 반응되는 변화값을 570 nm에서 사용하였다. 모든 항산화 활성의 결과값은 총 단백질 양을 보정하여 비교하였다.

Type-1 procollagen 생성량 측정

Type-1 procollagen의 생성량은 procollagen type I C-peptide EIA kit(MK101, Takara, Tokyo, Japan)를 사용하여 지시대로 진행하였다. 자외선 조사와 시료 처리 24시간 후, 배지에 유리된 type I procollagen을 enzyme linked immunosorbent assay 방법으로 측정하여 결과값을 총 단백질 양으로 보정하여 비교하였다.

MMP-1 생성량 측정

UVB 조사에 의해 합성이 증가되는 MMP-1의 측정은 ELISA kit(Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ, USA)를 이용하여 enzyme linked immunosorbent assay 방법으로 실시하였다. 자외선 조사와 시료 처리 24시간 후, MMP-1에 대한 단클론 항체로 coating된 microplate의 각 well에 배지 100 µL씩 분주하여 2시간 실온에서 배양 후 세척하였다. MMP-1에 대한 다클론 항체를 100 µL씩 분주하여 1시간 실온에서 배양시킨 뒤 세척 후 기질 용액을 분주하고 30분 후 stop 용액을 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였고 총 단백질 양으로 보정하여 비교하였다.

RNA 추출 및 실시간 정량 PCR

배양한 섬유아세포의 RNA의 추출은 RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 추출하였다. cDNA 합성은 각 시료에 대하여 1 µL의 RNA를 이용하여 iScript cDNA Synthesis kit(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)로 합성하였다. 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green(iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR(real time quantitative PCR)을 실시하였고, 기기는 Real-Time PCR(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였다. 모든 유전자의 PCR 산물의 크기는 100 bp 내외로 하였고, T_m(melting temperature) 값도 54°C 부근으로 디자인하였다. 각각의 유전자에 대한 PCR primer의 염기서열은 다음과 같다: GAPDH forward primer 5'-GGA CCT GAC CTG CCG TCT AG-3', reverse primer 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA-3'; MMP-1 forward primer 5'-CCT CGC TGG GAG CAA ACA-3', reverse primer 5'-TTG GCA AAT CTG GCG TGT AAT-3'; MMP-3 forward primer 5'-GAG GCA TCC ACA CCC TAG GTT-3', reverse primer 5'-ATC AGA AAT GGC TGC ATC GAT-3'; MMP-9 forward primer 5'-GGA CGA TGC CTG CAA CGT-3', reverse primer 5'-TCA AAT ACA GCT GGT TCC CAA TCT-3'; type 1 collagen forward primer 5'-CTG TTC TGT TCC TTG

TGT AAC TGT GTT-3', reverse primer 5'-GCC CCG GTG ACA CAT CAA-3'. Real-time PCR 반응은 총 20 µL 내에 cDNA 1 µL와 10 µL의 2X SYBR mix, primer는 각각 100 pmol/µL를 1 µL씩 첨가하였고, 나머지는 증류수로 채워주었다. 모든 유전자에 대하여 PCR 증폭 단계는 다음과 같고 증폭 cycle은 40 cycle을 실시하였다. Hot start를 위해 95°C에서 10분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 55°C에서 30초, extension을 72°C에서 30초간 반복하며, 각 cycle의 extension 후에 값이 기록되었다. 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve 분석을 실시하였다. 결과의 분석은 Applied Biosystems에서 제공하는 One step system software v2.1로 분석하였다.

통계처리

본 실험결과는 SPSS(Statistical Package for the Social Science) version 20.0 프로그램(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다. 모든 측정 항목의 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였고 실험군간 평균의 차이는 Student t-test와 one-way ANOVA로 유의성을 확인한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후 검증하였으며, P<0.05 수준에서 유의성의 여부를 검증하였다.

결과 및 고찰

라디칼 소거능 측정

세포 실험에 앞서 녹차나무 씨 추출물의 라디칼 소거능 측정을 Vit C와 비교하여 살펴보았다. 세포 실험과는 별개로 녹차나무 씨 추출물의 라디칼 소거능의 농도별에 따른 변화를 관찰하기 위하여 라디칼 소거능이 적절하게 나타났던 농도인 100 µg/mL, 300 µg/mL, 500 µg/mL를 비교 관찰하였다.

양성대조군으로 사용한 Vit C와 비교하여 녹차나무 씨 추출물의 농도별 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 녹차나무 씨 추출물 100 µg/mL, 300 µg/mL, 500 µg/mL는 각각 31.42±0.71%, 78.82±0.41%, 94.00±0.13%의 소거 활성능을 보여 농도 의존적으로 증가하였다. Vit C의 10 µg/mL 농도의 소거 활성능과 비교하였을 때 녹차나무 씨 추출물 300 µg/mL와 유의적인 차이를 보이지 않았다. 반면 DPPH 라디칼 소거능은 녹차나무 씨 추출물 100 µg/mL, 300 µg/mL, 500 µg/mL는 각각 21.43±2.08%, 33.14±5.56%, 42.41±3.45%로 ABTS보다 낮은 소거능을 보였지만 ABTS의 결과처럼 농도 의존적으로 증가하였다(P<0.05)(Fig. 2).

ABTS는 양이온 라디칼(cation radical)로 유리기(hydroxyl, peroxy, alkoxy)들과 반응하여 상대적으로 안정한 ABTS⁺를 형성한다. 항산화 물질과 반응하여 청록색이

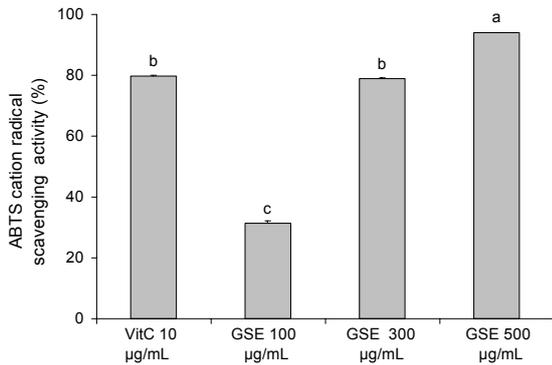


Fig. 1. Effect of green tea seed extract (GSE) on ABTS cation radical scavenging activity. Values are mean±SD. Different letters (a-c) on bars show a significantly difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

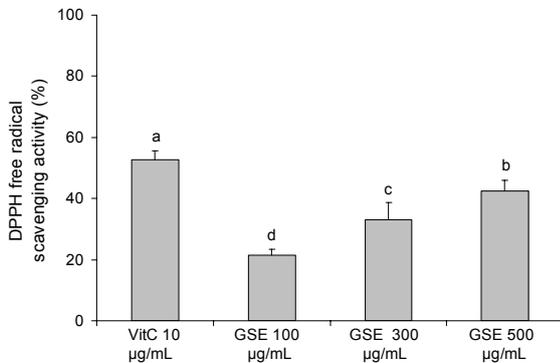


Fig. 2. Effect of green tea seed extract (GSE) on DPPH free radical scavenging activity. Values are mean±SD. Different letters (a-d) on bars show a significantly difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

탈색되어 흡광도 값을 변화시켜 항산화능을 측정할 수 있다. 반면 DPPH는 안정적인 자유 라디칼(free radical)로, 함유 황아미노산과 ascorbic acid, aromatic amine 등에 의해 diphenylpicrylhydrazine으로 환원되어 보라색에서 무색으로 변하는 원리로 ABTS 라디칼 소거능과 함께 항산화능 측정에 유용한 방법이다(25). DPPH 라디칼 소거능과 ABTS 라디칼 소거능 측정은 인위적으로 라디칼을 제거하는 작용 기작으로 유의적인 상관성을 보이는 것으로 알려져 있는데, DPPH가 친수성 항산화제에 제한적으로 반응하는 반면 ABTS는 친수성 항산화제와 소수성 항산화제 모두에서 반응을 하기 때문에 ABTS의 소거능이 높게 측정된다(26,27). 녹차나무 씨 추출물의 모든 농도보다 Vit C의 10 µg/mL 그룹이 유의적으로 가장 높은 소거능을 보인 것으로 보아 녹차나무 씨 추출물의 소수성 항산화제 존재를 예상할 수 있다.

시료처리 및 자외선 조사 후 세포 생존율

인체 피부 섬유아세포를 이용하여 녹차나무 씨 추출물의 세포 독성을 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 인체 피부 섬유아세포에 대한 녹차나무 씨 추출물의 농도별 세포

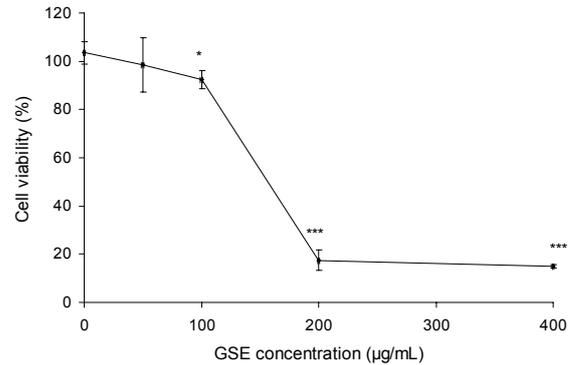


Fig. 3. Viability of human skin fibroblasts following 24 h of treatment with different concentrations of green tea seed extract (GSE). The results were presented mean±SD at least three independent experiments, each performed in triplicate (n=3). Asterisks indicate statistically significant differences from GSE 0 µg/mL group (* $P<0.05$, *** $P<0.001$).

생존율은 Fig. 3에 나타내었다. 녹차나무 씨 추출물 100 µg/mL에서 $92.29\pm3.82\%$ 생존율을 보이면서 유의적인 차이를 보이기 시작하였고($P<0.05$), 200 µg/mL 이상의 농도에서 유의적으로 크게 생존율이 감소하여 독성을 보였다($P<0.001$). 따라서 녹차나무 씨 추출물의 자외선 조사에 의한 보호 효과를 살펴보기 위해 독성을 보이지 않은 농도인 50 µg/mL를 가장 높은 농도로 정하여 실험을 진행하였다.

자외선 25 mJ/cm²와 50 mJ/cm²를 조사 후 녹차나무 씨 추출물 50 µg/mL의 처리가 세포 생존율에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Fig. 4와 같다. 자외선 조사를 하지 않고 녹차나무 씨 추출물 50 µg/mL를 처리한 군과 자외선 25 mJ/cm² 조사하여 시료를 처리하지 않은 군, 시료를 처리한 군 모두 유의적인 차이를 보이지 않았다. 반면 자외선 50 mJ/cm²를 조사하였을 때 유의적으로 세포 생존율이 낮아져 자외선 조사량 의존적으로 독성을 보였다($P<0.05$). 따라서 이러한 독성 시험 결과 추후 진행하는 인체 피부 섬유아세포를 사용하는 실험에서 자외선 조사량을 25 mJ/cm²로 정하고 녹차나무 씨 추출물의 최고 농도를 50 µg/mL로 정하여 10 µg/mL,

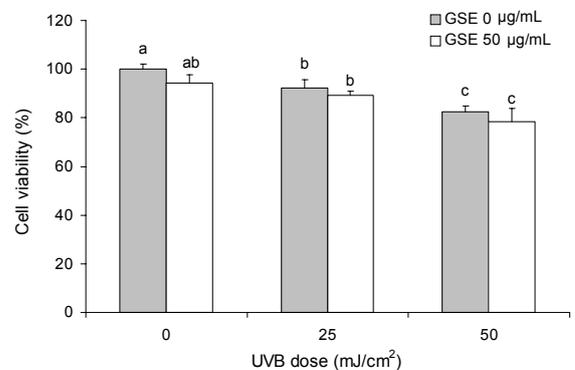


Fig. 4. Effect of green tea seed extract (GSE) on human skin fibroblasts viabilities under UVB irradiation. Values are mean±SD. Different letters (a-c) on bars show a significantly difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

30 µg/mL와 함께 진행하여 비교 분석하였다.

항산화 효소 활성

흡연, 음주, 약물, 오염물질, 자외선 등의 외부요인이나 체내 에너지대사 과정 중 생성되는 활성산소종은 체내 항산화 방어 체계에 의해 제거되어 균형을 유지한다(28). 하지만 비정상적으로 활성산소종의 농도가 높아지면 산화적 스트레스를 유발시켜 세포 손상과 사멸에 의하여 질병을 일으키게 된다(29). 체내에는 항산화 효소계인 SOD, catalase, GPx 등이 존재하여 인체를 보호하는 것으로 알려져 있다. SOD는 슈퍼옥사이드를 산소와 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이며, 합성된 과산화수소는 GPx에 의해 물과 산소로 분해되고(30) 과산화수소의 농도가 증가하면 CAT도 작용하여 분해되어 해독화시킨다(30,31). 따라서 본 실험에서는 자외선에 의한 활성산소종의 증가와 산화적 스트레스를 유발시킨 인체 피부 섬유아세포에서 녹차나무 씨 추출물의 처리가 항산화 방어체계에 미치는 영향을 살펴보기 위해 SOD, GPx, catalase의 활성도를 측정하였다.

녹차나무 씨 추출물이 SOD 효소 활성도에 미치는 효과를 관찰한 결과는 Fig. 5와 같다. 자외선을 조사하지 않은 normal control군(51.34±1.07%)에 비하여 자외선을 조사한 control군(42.83±3.41%)에서 SOD 효소 활성도가 유의적으로 감소하였음을 관찰하였다. 양성대조군으로 선택한 Vit C 10 µg/mL군이 65.15±2.76%로 유의적으로 가장 높은 활성을 보였으며, 녹차나무 씨 추출물을 농도별로 처리한 그룹에서는 농도 의존적인 결과는 나타나지 않았지만 가장 높은 농도인 50 µg/mL에서 Vit C 10 µg/mL군과 유의적인 차이가 없을 정도로 SOD 효소 활성도가 높았다(*P*<0.05).

GPx 효소 활성도 결과에서도 SOD 효소 활성도와 마찬가지로 자외선을 조사한 control군이 normal control군보다 유의적으로 감소하였으며 Vit C 10 µg/mL군에서 감소된 활성을 유의적으로 증가시켰음을 확인하였다. 녹차나무 씨

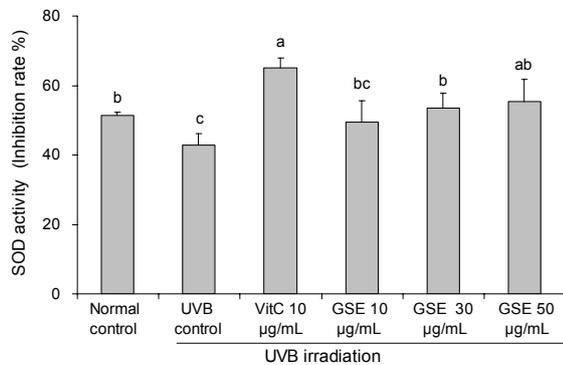


Fig. 5. Effects of green tea seed extract (GSE) on superoxide dismutase activity against UVB-irradiated human skin fibroblasts. Values are mean±SD. Different letters (a-c) on bars show a significantly difference at *P*<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

추출물 10 µg/mL의 처리는 자외선을 조사한 control군과 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 50 µg/mL에서 GPx 효소 활성도가 증가하여 control군과 유의적인 차이를 보이면서 Vit C 10 µg/mL군과는 유의적인 차이를 보이지 않았다 (*P*<0.05)(Fig. 6).

Catalase 효소 활성도에 미치는 영향을 살펴본 결과, SOD와 GPx의 활성도의 변화와 마찬가지로 normal control군과 비교하여 자외선을 조사한 control군이 유의적으로 감소하였으며, Vit C 10 µg/mL군에서 유의적으로 증가되었다. 또한 녹차나무 씨 추출물의 처리는 Vit C 10 µg/mL군과 유의적인 차이가 없을 정도로 활성도를 증가시켰으며, 그중 50 µg/mL군에서 유의적으로 가장 높았다(*P*<0.05) (Fig. 7).

따라서 이상의 결과를 살펴보았을 때, 자외선 조사에 의하여 항산화 효소 활성도가 낮아졌음을 확인하였고 낮아진 활성도를 Vit C와 녹차나무 씨 추출물의 처리로 증가되었음을 확인하였다. 이는 Vit C와 녹차나무 씨 추출물의 처리가 자외선 조사로 인하여 증가된 활성산소종을 제거하기 위한

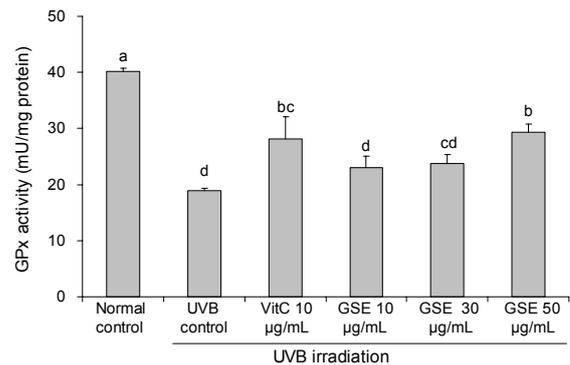


Fig. 6. Effects of green tea seed extract (GSE) on glutathione peroxidase (GPx) activity against UVB-irradiated human skin fibroblasts. Values are mean±SD. Different letters (a-d) on bars show a significantly difference at *P*<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

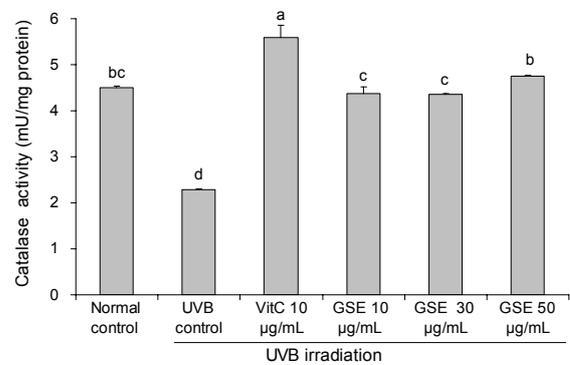


Fig. 7. Effects of green tea seed extract (GSE) on catalase activity against UVB-irradiated human skin fibroblasts. Values are mean±SD. Different letters (a-d) on bars show a significantly difference at *P*<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

활성에 긍정적인 영향을 미쳤으며 산화적 스트레스로부터 보호할 수 있다고 사료된다.

MMP-1과 type-1 collagen 생성량 변화

피부는 표피, 진피 및 피하지방의 3개층으로 구성되어 있다. 표피는 각질형성세포(keratinocyte), 멜라닌세포(melanocyte), Langerhans세포 등으로 구성되어 있고, 진피는 주로 collagen fiber, elastin fiber로 구성되는 결합조직과 기질(derma matrix)로 이루어지며, 이들은 모두 섬유아세포에 의해 만들어진다(3). 진피의 대부분을 차지하는 collagen은 피부의 탄력과 강도를 관장하여 피부를 보호하고 유지시키는 역할을 하며 피부 collagen 중 대부분을 차지하는 것은 type-1 collagen이다. 따라서 피부의 collagen 감소는 주름생성과 탄력감소에 영향을 미치게 된다(32). 자외선 조사에 의하여 피부 진피의 섬유아세포에서는 NF- κ B pathway와 AP(activator protein)-1의 DNA binding이 촉진되어 MMPs를 증가시킨다(10,11,32). MMP-1은 collagen을 분해하는 효소로 type-1 procollagen으로부터의 합성된 collagen을 분해하여 피부 주름형성에 영향을 미친다(33). 본 연구에서는 인체 피부 섬유아세포에서 자외선 조사에 의하여 변화되는 collagen과 MMP-1 생성량이 녹차나무 씨 추출물의 처리에 의해 어떠한 변화를 일으키는 지 살펴보고 자 배양액의 collagen과 MMP-1을 측정하였다.

Collagen의 생성량을 측정하기 위하여 procollagen type-1 C-peptide EIA kit를 사용하였다. 세포 표면의 procollagen peptidase에 의하여 procollagen이 C-peptide와 분해되어 collagen이 생성되는 원리를 사용하여 C-peptide의 함량을 측정함으로써 collagen 생성량을 측정하였다. 그 결과 자외선을 조사하지 않은 군(439.06 ± 2.12 ng/mL)과 비교하여 자외선을 조사한 control군(298.53 ± 19.98 ng/mL)에서 유의적으로 collagen 생성량이 감소되었다. 반면 자외선 조사에 의해 감소된 collagen 생성량을 Vit C의 처리로 인하여 379.41 ± 16.72 ng/mL로 증가시켰다. 또한 녹차나무 씨 추출물의 처리도 Vit C군과 유의적인 차이를 보이지 않을 정도로 증가시켰다. 녹차나무 씨 추출물 50 μ g/mL군이 407.93 ± 27.73 ng/mL로 collagen 생성량이 가장 유의적으로 증가되었다($P < 0.05$)(Fig. 8).

인체 피부 섬유아세포에서 자외선에 의한 MMP-1의 변화를 살펴본 결과는 Fig. 9와 같다. Collagen을 분해하는 MMP-1은 자외선 조사에 의하여 생성량(16.09 ± 1.03 ng/mL)이 유의적으로 증가하였다. 반면 Vit C 처리한 군에서 증가된 MMP-1이 유의적으로 감소되었으며, 녹차나무 씨 추출물 10 μ g/mL와 30 μ g/mL는 Vit C 10 μ g/mL와 유의적인 차이가 없을 정도로 감소되었다. 녹차나무 씨 추출물 50 μ g/mL군이 Vit C 10 μ g/mL군보다 유의적으로 낮은 MMP-1 생성량을 보여 높은 농도에서 활성이 컸음을 살펴볼 수 있었다($P < 0.05$).

이상의 결과를 보았을 때, 자외선 조사에 의하여 collagen

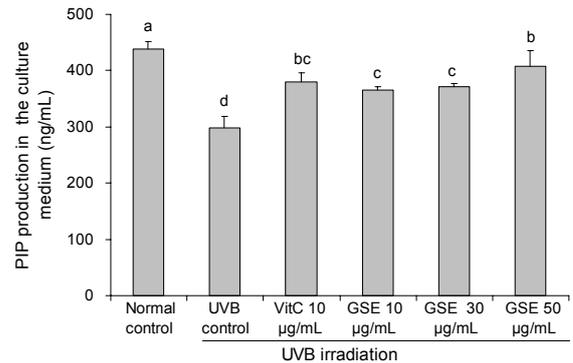


Fig. 8. Effects of green tea seed extract (GSE) on procollagen type-1 C-peptide (PIP) production against UVB-irradiated human skin fibroblasts. Values are mean \pm SD. Different letters (a-d) on bars show a significantly difference at $P < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

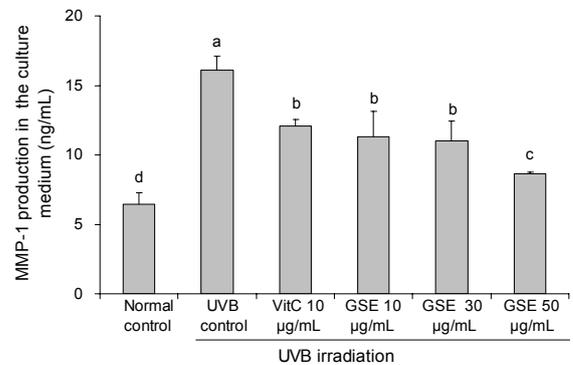


Fig. 9. Inhibition of UVB-irradiated MMP-1 production by green tea seed extract (GSE) in human skin fibroblasts. Values are mean \pm SD. Different letters (a-d) on bars show a significantly difference at $P < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

의 생성량은 감소하고 MMP-1의 생성량은 증가하였음을 살펴볼 수 있었으며, 녹차나무 씨 추출물이 자외선에 의해 증가된 MMP-1의 생성을 감소시킴으로써 collagen이 분해되는 것을 보호하여 collagen 생성량을 증가시켰음을 알 수 있었다.

MMPs와 type-1 collagen mRNA 발현 변동

인체 피부 섬유아세포에서 자외선 조사가 MMPs(MMP-1, MMP-3, MMP-9)와 type-1 collagen의 mRNA 발현에 미치는 영향을 실시간 정량 PCR을 통하여 측정하였다. 그 결과 자외선은 조사하지 않은 normal control군에 비하여 자외선을 조사한 control군에서 MMP-1, MMP-3, MMP-9 모두 발현이 증가하였음을 살펴볼 수 있었다. 자외선 조사에 의하여 증가한 MMPs의 발현이 Vit C와 녹차나무 추출물의 처리로 감소되었다. MMP-1의 발현 변화에서는 자외선 조사에 의해 증가된 발현량(4.137 ± 0.110)을 녹차나무 씨 추출물 50 μ g/mL(1.581 ± 0.080)의 처리로 인하여 유의적으로 가장 감소시켰다. proMMP-1을 활성화시키는 효소인

Table 1. Effects of green tea seed extract (GSE) on mRNA expression of MMP-1, MMP-3, MMP-9 and type-1 collagen against UVB-irradiated human skin fibroblasts

Groups	mRNA expression relative to GAPDH (fold of normal control)			
	MMP-1	MMP-3	MMP-9	Type-1 collagen
Normal control	1.000±0.231 ^d	1.000±0.524 ^c	1.000±0.344 ^d	1.000±0.078 ^a
UVB control	4.137±0.110 ^a	9.743±0.949 ^a	3.395±0.324 ^a	0.314±0.041 ^c
Vit C 10 µg/mL	2.002±0.194 ^b	3.289±0.386 ^b	1.875±0.230 ^c	0.757±0.090 ^c
UVB GSE 10 µg/mL	2.161±0.187 ^b	3.692±0.285 ^b	2.154±0.255 ^{bc}	0.547±0.060 ^d
GSE 30 µg/mL	2.016±0.270 ^b	3.564±0.339 ^b	2.123±0.220 ^{bc}	0.564±0.062 ^d
GSE 50 µg/mL	1.581±0.080 ^c	3.148±0.468 ^b	2.295±0.248 ^b	0.891±0.040 ^b

Values are mean±SD. Different superscript letters (a-e) within the same column show a significantly difference at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

MMP-3 발현에서는 자외선 조사에 의해 증가된 발현량(9.743±0.949)을 Vit C(3.289±0.386)와 녹차나무 추출물의 모든 농도(10 µg/mL: 3.692±0.285, 30 µg/mL: 3.564±0.339, 50 µg/mL: 3.148±0.468)에서 유의적으로 감소시켰다($P<0.05$). 하지만 Vit C 10 µg/mL군과 녹차나무 씨 추출물의 모든 농도에서 유의적인 차이가 없었다. Collagen 분해효소를 조절함으로써 collagen의 분해를 촉진시켜 위의 MMP-1, MMP-3와 함께 주름형성을 촉진시키고 탄력을 감소시키는 MMP-9의 발현 변화에서는 자외선 조사에 의하여 증가된 발현량(3.395±0.324)을 Vit C 10 µg/mL(1.875±0.230)의 처리에 의하여 유의적으로 가장 감소시켰다. 녹차나무 씨 추출물의 처리 또한 유의적인 감소를 보였지만 농도 의존적인 감소는 보이지 않았다($P<0.05$)(Table 1).

Type-1 collagen의 발현의 변화를 관찰한 결과, 자외선 조사에 의해 발현(0.314±0.041)이 유의적으로 크게 감소하였음을 관찰하였다($P<0.05$). 반면 녹차나무 씨 추출물 50 µg/mL군(0.891±0.040)에서 유의적으로 가장 크게 발현되었으며, 10 µg/mL와 30 µg/mL군 모두에서도 자외선을 조사한 control군과 비교하여 type-1 collagen의 발현이 증가되었음을 살펴볼 수 있었다($P<0.05$)(Table 1)

따라서 자외선 조사에 의하여 MMP-1, MMP-3, MMP-9의 mRNA 발현이 증가되었고 감소량은 정도의 차이가 있었으나 녹차나무 씨 추출물의 처리가 발현을 유의적으로 감소시켰으며 특히, 녹차나무 씨 추출물 50 µg/mL에서 MMP-1 mRNA 발현을 크게 감소되었음을 살펴볼 수 있었다.

Park 등(18)은 녹차나무 씨의 kaempferol에 의하여 항산화 효능을 지녔음을 입증한 바 있으며, Rah 등(21)의 연구에 의하여 사포닌, 플라보노이드, 토코페롤 등의 생리활성 성분 에 대해 분석된 바 있다. 본 연구 결과에서 녹차나무 씨 추출물의 자외선 조사에 의한 보호 효과는 이러한 항산화 활성을 지닌 성분에 의한 효능으로 예상된다. 따라서 녹차나무 씨 추출물의 항산화 효소 활성의 증가에 의하여 자외선 조사로 증가한 활성산소종을 감소시켜 산화적 스트레스를 억제시켰음을 알 수 있다. 이러한 효과로 증가된 MMPs의 발현과 생성을 감소시키고 collagen 분해를 억제시켜 생성을 증가시켰음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 녹차나무 씨 추

출물은 자외선에 의한 광노화로부터 보호하여 주름형성을 억제할 수 있을 것이라고 기대할 수 있다.

요 약

본 연구는 아직 기능성 입증 미비한 녹차나무 씨 추출물을 사용하여 자외선을 조사한 인체 피부 섬유아세포에서 항산화 효능과 MMPs 및 collagen의 변화를 살펴봄으로써 광노화 억제 효능을 평가하였다. 녹차나무 씨 추출물 농도별 라디칼 소거능을 살펴보기 위하여 ABTS와 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과 녹차나무 씨 추출물 농도 의존적으로 소거능을 증가시켰다. 25 mJ/cm² 자외선을 조사한 인체 피부 섬유아세포에서 녹차나무 씨 추출물의 농도별(10 µg/mL, 30 µg/mL, 50 µg/mL) 처리가 미치는 영향을 살펴보았다. 항산화 효소(SOD, GPx, catalase) 활성의 변화를 측정 한 결과에서 자외선 조사에 의하여 감소한 활성을 녹차나무 씨 추출물의 처리가 유의적으로 증가시켰음을 확인하였다. 또한 녹차나무 씨 추출물의 처리는 MMP-1의 합성을 감소시키고 collagen의 합성을 증가시켰으며, MMP-1, MMP-3, MMP-9의 mRNA 발현을 감소시키고 type-1 collagen의 mRNA 발현을 증가시켰다. 따라서 녹차나무 씨 추출물은 항산화 활성을 지녔으며 자외선 조사에 의한 활성산소종으로부터 보호하여 MMPs 발현을 감소시키고 collagen 분해를 억제시켜 피부 노화억제에 긍정적인 영향을 미쳤으며, 이러한 기능성 입증으로 녹차나무의 활용 증가를 기대할 수 있다.

REFERENCES

1. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Voorhees JJ. 2002. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 138: 1462-1470.
2. Chung JH. 2003. Photoaging in asians. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 19: 109-121.
3. Rittie L, Fisher GJ. 2002. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 1: 705-720.
4. Seite S, Zucchi H, Septier D, Igondjo-Tchen S, Senni K, Godeau G. 2006. Elastin changes during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20: 980-987.

5. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. 1997. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 337: 1419-1428.
6. Castanet J, Ortonne JP. 1997. Pigmentary changes in aged and photoaged skin. *Arch Dermatol* 133: 1296-1299.
7. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. 1996. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 379: 335-339.
8. Kovacs D, Raffa S, Flori E, Aspite N, Briganti S, Cardinali G, Torrisi MR, Picardo M. 2009. Keratinocyte growth factor down-regulates intracellular ROS production induced by UVB. *J Dermatol Sci* 54: 106-113.
9. Halliwell B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14.
10. Shephard P, Martin G, Smola-Hess S, Brunner G, Krieg T, Smola H. 2004. Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte fibroblast co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor- β and interleukin-1. *Am J Pathol* 164: 2055-2066.
11. Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. 2002. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann NY Acad Sci* 973: 31-43.
12. Ito S, Itoga K, Yamato M, Akamatsu H, Okano T. 2010. The co-application effects of fullerene and ascorbic acid on UV-B irradiated mouse skin. *Toxicology* 267: 27-38.
13. Darr D, Fridovich I. 1994. Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol* 102: 671-675.
14. Masteikova R, Muselik J, Bernatoniene J, Majiene D, Savickas A, Malinauskas F, Bernatoniene R, Peciura R, Chalupova Z, Dvorackova K. 2008. Antioxidant activity of tinctures prepared from hawthorn fruits and motherwort herb. *Ceska Slov Farm* 57: 35-38.
15. Ruch RJ, Cheng SJ, Klaunig JE. 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis* 10: 1003-1008.
16. Zheng G, Sayama K, Okubo T, Juneja LR, Oguni I. 2004. Anti-obesity effects of three major components of green tea, catechins, caffeine and theanine, in mice. *In Vivo* 18: 55-62.
17. Peng G, Dixon DA, Muga SJ, Smith TJ, Wargovich MJ. 2006. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits cyclooxygenase-2 expression in colon carcinogenesis. *Mol Carcinog* 45: 309-319.
18. Park JS, Rho HS, Kim DH, Chang IS. 2006. Enzyme preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 54: 2951-2956.
19. Kim NH, Choi SK, Kim SJ, Moon PD, Lim HS, Choi IY, Na HJ, An HJ, Myung NY, Jeong HJ, Um JY, Hong SH, Kim HM. 2008. Green tea seed oil reduces weight gain in C57BL/6J mice and influences adipocyte differentiation by suppressing peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Pflugers Arch* 457: 293-302.
20. Yoon WH, Choi JH, Lee KH, Kim CH. 2005. Antimicrobial and antitumor activities of seed extracts of *Camellia sinensis* L. *Korean J Food Sci Technol* 37: 108-112.
21. Rah HH, Baik SO, Han SB, Bock JY. 1992. Chemical compositions of the seed of Korean green tea plant (*Camellia sinensis* L.). *J Korean Agric Chem Soc* 35: 272-275.
22. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
23. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
24. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
25. Sanchez-Moreno C. 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int* 8: 121-137.
26. Cano A, Acosta M, Arnao MB. 2000. A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins. *Redox Rep* 5: 365-370.
27. Arnao MB, Cano A, Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem* 73: 239-244.
28. Gutiérrez RMP, Mitchell S, Solis RV. 2008. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol* 117: 1-27.
29. Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.
30. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17: 235-248.
31. Deisseroth A, Dounce AL. 1970. Catalase physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiol Rev* 50: 3-24.
32. Talwar HS, Griffiths CEM, Fisher GJ, Hamilton TA, Voorhees JJ. 1995. Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin. *J Invest Dermatol* 105: 285-290.
33. Fisher GJ, Voorhees JJ. 1998. Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo. *J Invest Dermatol Symp Proc* 3: 61-68.