

해양조류 유래 Porphyra-334의 UV 흡수능에 의한 피부세포 보호 효과

조문진¹, 정해수¹, 송미영¹, 서효현¹, 아툴 쿨카르니¹, 서승석², 이택건², 모상현^{1*}

¹(주)바이오에프디엔씨 안티에이징연구소

²한국해양과학기술원

Effect of sun screen utilizing Porphyra-334 derived from Ocean Algae for skin protection

Moon Jin Cho¹, Hae Soo Jung¹, Mi Young Song¹, Hyo Hyun Seo¹, Atul Kulkarni¹,
Seung Suk Suh², Taek Kyun Lee², Sang Hyun Moh^{1*}

¹Anti-aging Research Institute of BIO-FD&C Co.,Ltd.

²Korea Institute of Ocean Science & Technology

요약 광노화의 주요 요인인 자외선으로부터 피부를 보호하는 것은 피부노화를 막는 중요한 해결책 중 하나이다. 이를 위해 자연친화적·친환경적인 다양한 형태의 소재개발이 필요한 실정이다. 이에 본 연구는 미세조류(*Chlamydomonas hedleyi*)로부터 Mycosporine-like amino acid (MAA)를 분리 정제 하여 인간 피부세포에서 UV protection 효과를 확인하였다. MAAs 중 porphyra-334를 분리하여 피부세포에서 UV protection 및 항염 효능을 시험하였고 그 결과 porphyra-334가 UV로부터 피부세포를 보호하여 cell viability가 약 26% 정도 증가하였고 COX-2 발현 40% 이상 저해함을 통해 항염 효능을 확인하였다. 이를 통해 porphyra-334의 자외선 차단용 소재뿐 아니라 항염 관련 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

Abstract One of the most effective ways of preventing skin aging is to protect the skin from UV radiation, which was identified as the primary cause of photoaging. Therefore, it is necessary to develop natural and environment-friendly materials to the human skin. This study examined the effects of MAAs extracted from *Chlamydomonas hedleyi* on UV protection and anti-inflammation in human skin cells. The function of porphyra-334 in the skin, which was isolated and purified from MAAs mixture, was tested in terms of its UV protective ability and anti-inflammation. As a result, porphyra-334 played a role in protecting the skin from UV radiation and anti-inflammation through the suppression of COX-2 expression. These results suggest that porphyra-334 can be a useful material in cosmetic products because it can protect the skin from UV radiation and anti-inflammation.

Key Words : Anti-inflammation, *Chlamydomonas hedleyi*., Porphyra-334, Sun screen, UV protection

1. 서론

피부노화는 일반적으로 나이가 들면서 일어나는 내인성 노화와 환경요인에 장기간 노출되어 나타나는 광노화로 크게 나누어진다[1]. 광노화의 환경적인 요인 중 가장 주요한 것은 자외선 노출에 의한 것이다. 그렇기에 자외

선으로부터 피부를 보호하는 것은 광노화를 막는데 중요하다. 자외선 차단용 화장품 소재는 유기계 자외선 흡수제(Organic UV Filter)와 무기계 자외선 산란제(Physical UV Filter)로 나뉘는데 무기계 자외선 산란제는 자외선 차단제에 함유되어 있는 자외선 차단 원료가 자외선을 반사하여 자외선을 차단한다. 유기계자외선 흡수제는 자

이 논문은 2013년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(국문과제명: Metabolic engineering 및 algae culture technology를 이용한 미세조류 내 자외선 흡수물질의 분리 및 산업화)

*Corresponding Author : Sang Hyun Moh(BIO-FD&C Co.,Ltd.)

Tel: +82-10-8921-0435 email: shmoh@biofdnc.com

Received April 28, 2014

Revised May 19, 2014

Accepted July 10, 2014

외선을 흡수하는 물질을 사용하여 차단한다. 하지만 유기계자외선 흡수제 대부분이 chemical 합성으로 제조되어 화장품 원료로 사용시 피부자극성, 다른 화상료와 혼합시 난용해성, 킬레이트 형성에 의한 착색, 광분해로 인한 역가 저하 등의 여러 가지 문제점들이 있다[2,3]. 이에 자연친화적인 자외선 차단 물질 소재를 개발하는 것이 시급한 실정이다.

해양식물은 육상식물에 비해 직접적으로 UV 조사에 영향을 받는다. 직접적인 영향으로 인해 UV protection과 관련된 물질을 많이 함유하고 있다고 알려져 있다. 홍조류, 산호 등의 다양한 해양식물에서 Mycosporine-like amino acids (MAAs)가 발견되었다. MAAs는 자연에서 얻을 수 있는 UV 흡수능 (310-360nm) 높은 물질로 작은 분자량을 갖고 높은 용해도를 가지는 물질이다. 이러한 성질로 인해 MAAs를 중심으로 UV protection에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[4-6].

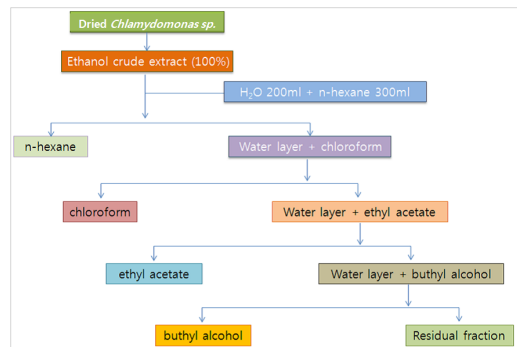
미세조류에서 유래한 MAAs는 아미노산과 iminoalcohol기 종류에 따라 20여종으로 분류되며 대표적으로 Asterina, Shinorine, Porphyra가 있으며, 이들은 조류 내에서 UV 등에 의해 세포 내 손상방지를 위해 생겨나는 방어물질로 자외선 흡수능이 우수한 물질이다 [7,8]. 이물질은 UV에 노출되는 시간이 증가할수록 세포 내 농도가 증가한다는 연구가 보고되었다[9]. 홍조류 Porphyra umbilicalis에서 porphyra-334, shinorine가 생성된다[10]. 특히 MAAs 중에 porphyra-334가 주요한 물질로 알려져 있다.

본 연구에서는 MAAs 중 대표적인 물질인 Porphyra-334를 분리정제 하고 이를 이용하여 UV에 의한 인간 피부세포 손상을 방지함으로 자연친화적인 자외선 차단용 화장품 소재로써 가능성을 연구하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 미세조류(*Chlamydomonas hedleyi*.) 배양 및 Porphyra-334(P334)의 분리 및 정제

미세조류 *Chlamydomonas hedleyi*는 BBM(Bold's Basal Medium)배지에서 온도 25°C, 광량 60 μ E/m/s, 12:12 LD의 광주기로 배양하였고, 200 ~ 300ml의 접종으로 시작해서 3L, 10L, 20L까지 대량배양하고, Fig. 1의 과정을 거쳐 분리하고 정제하였다.



[Fig. 1] Separation and purification of water from *Chlamydomonas* sp.

2.2 HPLC를 이용한 P334 분리정제

*Chlamydomonas hedleyi*로부터 분리정제 된 P334를 HPLC를 사용하여 순도를 높여 분리정제 하였다.

Waters 1525 μ Binary HPLC pump, Waters 996 photodiode array detector를 사용하였고 분리정제를 위해 Gemini 5 μ C18 110 A(5 μ m, 4.6 \times 250nm, Phenomenex) column을 사용하였다. 분석을 위한 용매는 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)를 포함한 water(용매 A)와 acetonitrile(용매B)를 사용하였고 1ml/min의 유속으로 332nm 파장에서 검출하였다.

2.3 ESI MS/MS 분석

추출해서 건조된 P334 1mg을 정제수 1ml에 녹인 후, 0.1% Formic acid 가 함유된 50% Methanol을 사용하여 희석하여 최종농도 100ppm(100 μ g/1ml)을 만든 후, 0.45 μ m membrane filter를 사용하여 필터하였다. 준비된 샘플은 AB SCIEX 3200 QTRAP MS/MS (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 기기의 ESI-MS/MS system을 사용하여 positive mode에서 product ion(MS2) scan으로 분석하였다.

2.4 인간 각질형성세포주 배양

인간 각질형성 세포주(HaCaT, keratinocyte)를 DMEM, 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic(GIBCO)의 배지에서 dish에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다.

2.5 UV 유도성 세포손상 보호능 측정 시험

HaCaT을 24well plate에 1X10⁵개의 세포를 분주하여

배양하였다. 24시간 후 FBS를 포함하지 않는 배지로 교체하고 24시간동안 starvation하고, 시료를 농도별로 처리하였다. 그 후 UVA(330-340nm) 조사 (10mJ/cm²)하여 24시간동안 배양하였다. 배지를 제거한 뒤 5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT, Sigma) 시약을 각 well당 40μl씩 처리 후 4시간 동안 추가 배양하였다. 4시간 뒤 배지를 제거하고, dimethylsulfoxide(DMSO, Amresco)를 1ml씩 넣고 10분간 흔들어 준 다음 200μl씩 96well에 취하여 spectrophotometer(Thermo)로 540nm에서 흡광도를 측정하였다[11,12].

Cell viability(%)

$$= (\text{시험군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100(\%)$$

2.6 DPPH 자유 라디칼 소거능을 통한 항산화능 시험

에탄올 0.4ml에 0.1mM의 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma) 용액 0.5ml, 일정농도로 희석된 P334 0.1ml를 첨가하고 10초간 강하게 vortexing 후 냉암소에서 30분간 반응시켰다. spectrophotometer(Thermo)로 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 vitamin C(Sigma)를 사용하였다[13-15].

DPPH 라디칼 소거능(%)

$$= \{1 - (\text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군의 흡광도})\} \times 100(\%)$$

2.7 Real-time PCR를 이용한 Cyclooxygenase-2(COX-2) 발현 영향 시험

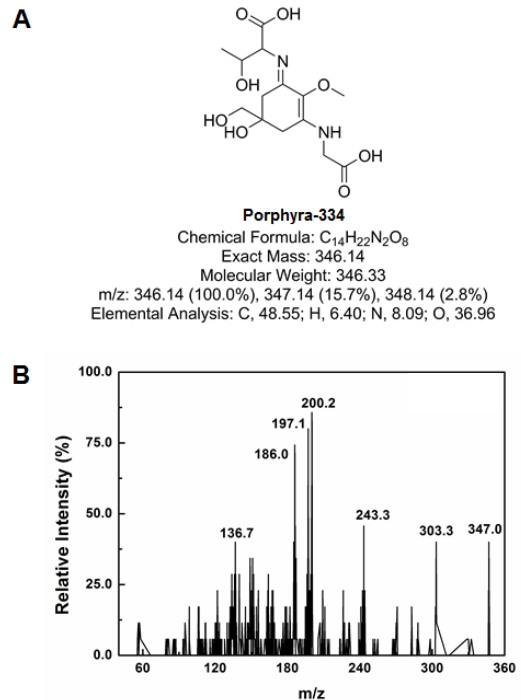
HaCaT을 96 well plate에 5×10⁴ 개의 세포를 분주하여 배양하고, 80% 이상의 confluence가 되면 배지를 제거한 다음 DMEM 배지로 교환하고 시료를 농도별로 처리한 후 50mJ/cm²의 UVB를 조사하여 염증을 유도하였다. 4시간동안 추가 배양한 후 FastLane cell one-step buffer set(Qiagen)를 사용하여 RNA를 추출하고 이를 template으로 하여 2X Quantitect SYBR green RT-PCR master mix kit(Qiagen) 매뉴얼에 따라 Rotor gene Q real-time PCR machine(Qiagen)으로 진행하였다. 그 결과는 glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase(GAPDH)의 gene 발현양으로 normalization 하였다. 양성대조군으

로 hydrocortisone을 사용하였다. 실험에 사용한 primer는 Quantitect primer assays(Qiagen)를 사용하였다[11,16].

3. 결과 및 고찰

3.1 HPLC를 이용한 P334 분리정제

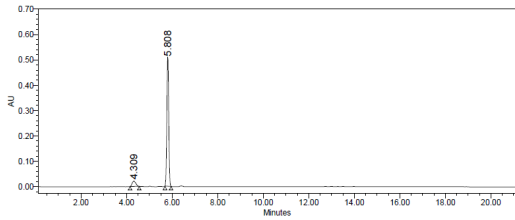
미세조류 *Chlamydomonas hedleyi*. 배양하여 분리정제한 P334를 ESI-MS/MS를 이용하여 확인하였다. Fig. 2은 분리정제한 P334 추출물을 분석한 결과이다.



[Fig. 2] ESI-MS/MS spectra of porphyra-334.

A. structure of porphyra, B. mass spectrum of porphyra-334.

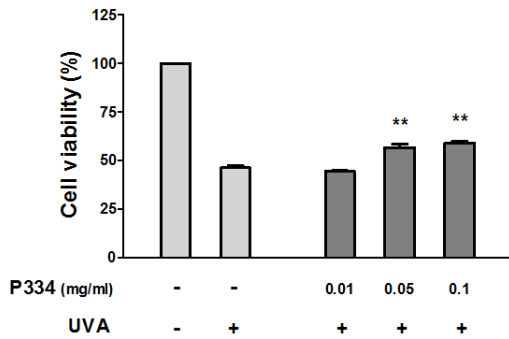
또한 미세조류로부터 분리정제한 수용추출물을 HPLC로 분석하여 P334의 retention time이 5.808분으로 나타났고, P334가 수용추출물의 주요한 MAA임을 확인하였다[Fig. 3].



[Fig. 3] HPLC chromatogram of porphyra-334

3.2 P334의 UV 유도성 세포손상 보호능

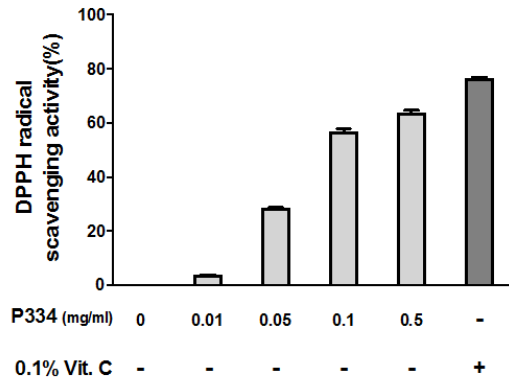
분리 정제한 P334의 자외선 흡수능을 통한 세포손상을 방지하는지를 확인하고자 MTT assay를 이용하여 실험하였다. HaCaT cell에 MAA 물질인 P334를 처리하고 UVA를 조사하여 cell viability를 확인하였다. Fig. 4의 결과를 보면 자외선 흡수능 가진 P334를 처리한 실험군이 대조군에 비해 cell viability가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 0.1mg/ml의 농도로 P334를 처리한 실험군에서 약 26% 정도 증가하였다. 이 결과를 통해 피부세포에서 P334에 의한 UV protection 효과가 있음을 확인하였다.



[Fig. 4] UV protection effect of Porphyra-334. **p<0.005 versus UVA-stimulated group.

3.3 P334의 자유 라디칼 소거능

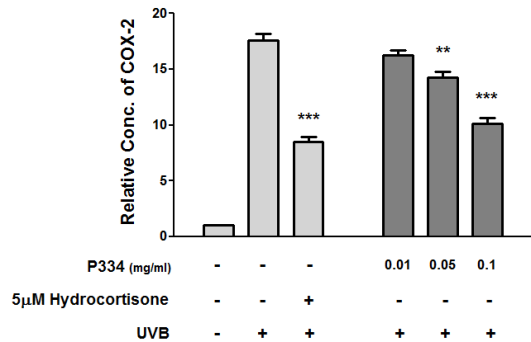
DPPH는 화학적으로 안정화 된 수용성 자유 라디칼로 이를 이용해 P334에 의한 라디칼 소거 능력을 측정하였다. Fig. 5는 P334의 라디칼 소거능을 보여준다. P334의 농도가 높아질수록 라디칼 소거능이 증가함을 확인하였고, 0.1mg/ml의 농도에서는 60%정도의 라디칼 소거능을 보였다. 양성대조군인 0.1% vitamin C의 라디칼 소거능과 비슷한 효과를 보였다.



[Fig. 5] DPPH radical scavenging activity.

3.4 UV protection에 의한 항염효능

UV protection 효과를 보인 P334가 UV 조사에 의해 유도된 염증 관련 유전자인 COX-2의 발현에 어떠한 영향이 있는지 real-time PCR을 이용하여 mRNA level에서 확인하였다. Fig. 6은 상대적인 COX-2의 발현을 비교한 결과이다. 양성대조군으로 5μM hydrocortisone을 처리하였다. UVB를 조사하기 전에 P334를 농도별로 처리하여 UV protection에 의한 COX-2의 발현을 확인하였다. 그 결과 처리한 농도가 증가할수록 COX-2의 발현이 감소하는 경향을 보였다. 특히 0.1mg/ml 농도로 처리한 실험군에서 5μM hydrocortisone을 처리한 대조군만큼 현저하게 COX-2의 발현이 감소하였다. 이를 통해 P334에 의한 UV protection 효과를 확인하였다.



[Fig. 6] Anti-inflammation effect of porphyra-334. Results are expressed as the mean±s.e.m. of three independent experiments, **p<0.005, ***p<0.0005 versus UVB-stimulated group.

4. 결론

*Chlamydomonas hedleyi*로부터 자외선 흡수능을 지닌 추출 분획물을 분리정제하여, 피부세포에서 P334의 자외선 흡수능에 의한 UV protection 효과를 연구하였다. 그 결과 인간 각질형성 세포주인 HaCaT cell에 P334를 전처리하고 UVA를 조사하였을 때 UV에 의해 발생하는 세포손상이 감소함을 확인하였다. 특히 UV에 의해 유도되는 염증관련 유전자인 COX-2의 발현을 감소시킴으로 항염증효과를 관찰할 수 있었다. 또한 우수한 자유 라디칼 소거능을 보였다. 이러한 우수한 UV protection 효과를 보이는 미세조류 자원에서 추출한 P334를 활용하여 자외선 흡수능을 지닌 자연친화적이고 친환경적인 신소재 개발함으로 다양한 자외선 차단 제품 보급에 기여할 것이다.

6. References

- [1] Yin Wu, Prem Kalra, Laurent Moccozet, Nadia Magnenat-Thalmann, "Simulating wrinkles and skin aging", *The Visual Computer* 15, 183-198, 1999.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s003710050171>
- [2] Han, T., Y.-S. Han, G. S. Park, S. M. Lee. "Development of marine ecotoxicological standard methods for *Ulva* sporulation test", *The Sea* 13(2), 121-128, 2008.
- [3] Smith R C, Prezelin B B, Baker K S, Bidigare R R, Boucher N P, Coley T, Karentz D, McIntyre S, Matlick H A, Menzies D, Ondrusek M, Wan Z & Waters K J, "Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic water", *Science*, 255, 952, 1992.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1546292>
- [4] Leach C M, "Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi", *Can J Bot*, 43, 185, 1965.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1139/b65-024>
- [5] Sinha R P, Ambasht N K, Sinha J P, Klish M & Hader D-P, "UV-B-induced synthesis of mycosporine-like amino acids in three strains of *Nodularia* (cyanobacteria)", *J Photochem Photobiol B: Biol*, 71, 51, 2003.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2003.07.003>
- [6] S. P. Singh, M. Klisch, R. P. Sinha and D-P. Hader, "Genome mining of mycosporine-like amino acid (MAA) synthesizing and non synthesizing cyanobacteria: a bioinformatics study", *Genomics*, 95, 120-128, 2010.
- [7] S. P. Singh, S. Kumari, R. P. Rastogi, K. L. Singh and R. P. Sinha, "Mycosporine-like amino acids (MAAs): chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds", *Ind J. Exp. Biol.* 46, 7-17, 2008.
- [8] J. M. Shick, W. C. Dunlap, "Mycosporine-like amino acids and related gadusols: Biosynthesis, Accumulation, and UV-Protective Functions in Aquatic Organisms", *Annu Rev. Physiol.* 64, 223-262, 2002.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.155802>
- [9] Wood, W. F. "Photoadaptive responses of the tropical red alga *Eucheuma striatum* Schmitz (Gigartinales) to ultraviolet radiation", *Aquat. bot.* 33, 41-51, 1989.
- [10] Groniger A, Sinha R. P., Klish M., Hader D. P. "Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae - a database, *J Photochem*", *Photobiol.* 58, 115-122, 2002.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(00\)00112-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(00)00112-3)
- [11] E. M. Middleton and A. H. Teramura, "The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage", *Plant Physiol.* 103, 741-752, 1993.
- [12] van Meerloo J1, Kaspers GJ, Cloos J, "Cell sensitivity assays: the MTT assay", *Methods Mol Biol.* 731, 237-45, 2011.
DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- [13] Fotakis G, Timbrell JA, "In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride", *Toxicol Lett.* 160, 171-177, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>
- [14] Potapovich AII, Lulli D, Fidanza P, Kostyuk VA, De Luca C, Pastore S, Korkina LG, "Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NFκB and AhR and EGFR-ERK pathway", *Toxicol Appl Pharmacol.* 255, 138-149, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.06.007>
- [15] Huang D, Ou B, Prior RL, "The chemistry behind antioxidant capacity assays", *J Agric Food Chem* 53, 1841-1856, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf030723c>
- [16] Kim SJ, Han D, Moon KD, Rhee JS, "Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants", *Biosci Biotechnol Biochem.* 59, 822-826, 1995.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.59.822>

조 문 진(Moonjin Cho)

[정회원]

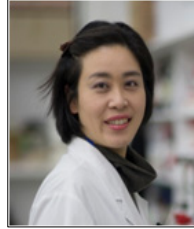


- 2007년 8월 : 수원대학교 화학전공 (이학학사)
- 2009년 11월 ~ 현재 : (주)바이오 에프디엔씨 근무

<관심분야>
화학

서 효 현(Hyo Hyun Seo)

[정회원]



- 1999년 12월~2007년 3월 : ㈜금호 석유화학 금호생명환경과학연구소 선임 연구원
- 2004년 8월 : 광주과학기술원 생명과학과 (이학석사)
- 2007년 6월 ~ 현재 : (주)바이오 에프디엔씨 근무

<관심분야>
생명과학

정 해 수(Haesoo Jung)

[정회원]



- 2012년 2월 : 청운대학교 화장품과학 전공 (이학학사)
- 2011년 8월 ~ 현재 : (주)바이오 에프디엔씨 근무

<관심분야>
화장품 과학

아틀 쿨카르니(Atul Kulkarni)

[정회원]



- 2003년 8월 : 광주과학기술원 생명과학과 (이학석사)
- 2013년 2월 : 성균관대학교 나노과학기술협동학부 (이학박사)
- 2005년 11월 ~ 현재 : (주)바이오 에프디엔씨 대표이사

<관심분야>
생명과학, 나노과학

송 미 영(Miyoung Song)

[정회원]



- 2008년 2월 : 건국대학교 화학전공 (이학학사)
- 2012년 8월 : 건국대학교 일반대학원 의생명과학전공 (이학석사)
- 2013년 9월 ~ 현재 : (주)바이오 에프디엔씨 근무

<관심분야>
생명과학, 화학

서 승 석(Sung-Suk Suh)

[정회원]



- 2002년 9월 : 서울대학교 생물학과 (이학석사)
- 2012년 3월 : 오하이오 주립대 생화학 (이학박사)
- 2012년 3월 ~ 2013년 8월 : 오하이오 주립대 의과대 (포닥)
- 2013년 8월 ~ 현재 : 한국해양과학기술원 연수연구원

<관심분야>
해양환경독성학, 해양분자생물학

이택견(Taek-Kyun Lee)

[정회원]



- 1991년 2월 : 성균관대학교 생물학 (이학석사)
- 1998년 2월 : 성균관대학교 식물분자생리학 (이학박사)
- 1998년 9월 ~ 2000년 8월 : 한국해양연구원 연수연구원
- 2000년 9월 ~ 현재 : 한국해양과학기술원 책임연구원

<관심분야>

환경분자생리학, 해양환경독성학

모상현(Sang Hyun Moh)

[정회원]



- 2003년 8월 : 광주과학기술원 생명과학과 (이학석사)
- 2013년 2월 : 성균관대학교 나노과학기술협동학부 (이학박사)
- 2005년 11월 ~ 현재 : (주)바이오에프디엔씨 대표이사

<관심분야>

생명과학, 나노과학