

호염 미생물(*Haloarcula vallismortis*) 용해물의 자외선유발 피부변화에 대한 효과

김지형[†] · 신재영[†] · 황승진 · 김윤선 · 김유미 · 길소연 · 진무현 · 이상화

LG 생활건강 기술연구원 피부과학연구소
(2015년 11월 16일 접수, 2015년 12월 9일 수정, 2015년 12월 11일 채택)

Effect of Halophilic Bacterium, *Haloarcula vallismortis*, Extract on UV-induced Skin Change

Ji Hyung Kim[†], Jae Young Shin[†], Seung Jin Hwang, Yun Sun Kim,
Yoo Mi Kim, So Yeon Gil, Mu Hyun Jin, and Sang Hwa Lee

Skin Research Center, Research Park, LG Household & Healthcare Ltd., 84 Jang-dong, Youseong-gu, Daejeon 305-343, Korea
(Received November 16, 2015; Revised December 9, 2015; Accepted December 11, 2015)

요약: 피부는 외부 유해물질로부터 내부기관을 보호하는 장벽기능을 하는 대표적인 기관으로 자외선 (ultraviolet radiation, UV), 중금속, 각종 산화 물질들과 같은 외부의 위협에 항상 노출되어 있어 손상을 받기 쉽다. 특히 자외선 B (UVB)는 진피의 상부까지 도달하여 화상이나 홍반과 같은 염증반응을 일으키며 멜라닌 생성을 촉진시켜 색소 침착을 유발한다. 지나친 자외선 B의 피부세포로의 유입은 각질세포 및 진피 섬유아세포의 DNA손상을 야기하고, 세포외기질의 합성을 방해하여 피부탄력감소, 주름생성, 진피 결합조직의 손상과 함께 피부장벽을 붕괴시켜 노화를 일으키며, 장기간 노출 시 심각한 피부 병변으로 이어져 피부세포 사멸 및 종양의 발생으로까지 이어진다. *Haloarcula vallismortis*는 사해로부터 분리 동정한 미생물로 호염성 고생물의 생장적 특징은 아직 자세히 연구된 바는 없다. 대개 10% 이상의 염도에서 자라는데 실제 생장염도는 평균 20 ~ 25% 염도에서 자란다. 염도가 높은 호수나 염전에서 주로 발견되기 때문에 강한 햇빛에 대한 방어기작이 존재한다. 그중 하나로 다른 ATP를 생성하기 위한 bacteriorhodopsin외에 halorhodopsin이라는 색소를 이용, 광자(photon)를 흡수하고 염화이온 채널을 개방시켜 생기는 전위차를 이용해 추가로 에너지를 생산한다. 또 carotenoid 색소로 인해 농도가 높을시 분홍색 또는 빨간색을 띠는 특징이 있는데 이것이 강한 자외선에 대한 방어기작을 할 것이라고 여겨진다. 본 연구는 호염성 고세균이 자외선을 에너지 소스로 이용하는 특성을 이용하여 자외선으로부터 피부를 방어하는 방법을 개발하고자 이들의 피부각질세포에서 자외선에 의한 항염 효과 및 DNA 손상 방어 효과를 확인하였다. 그리고 이들을 천연 자외선 차단제의 소재로서 사용할 수 있음을 확인하였다.

Abstract: Skin carries out protective role against harmful outer environment assaults including ultraviolet radiation, heavy metals and oxides. Especially, ultraviolet-B (UVB) light causes inflammatory reactions in skin such as sun burn and erythema and stimulates melanin pigmentation. Furthermore, the influx of UVB into skin cells causes DNA damage in keratinocytes and dermal fibroblasts, inhibition of extracellular matrix (ECM) synthesis which leads to a decrease in elasticity of skin and wrinkle formation. It also damages dermal connective tissue and disrupts the skin barrier function. Prolonged exposure of human skin to UVB light is well known to trigger severe skin lesions such as cell death and carcinogenesis. *Haloarcula vallismortis* is a halophilic microorganism isolated from the Dead Sea, Its growth characteristics have not been studied in detail yet. It generally grows at salinity more than 10%, but the actual growth salinity usually ranges between 20 to 25%. Because *H. vallismortis* is found mainly in saltern or salt lakes, there could exist defense mechanisms against strong sunlight. One of them is generation of additional ATP using halorhodopsin which

[†] 주 저자(e-mail: skylover@lgcare.com, sjy2811@lgcare.com)
call: 042)860-8774

absorbs photons and produces energy by potential difference formed by opening the chloride ion channel. It often shows a color of pink or red because of their high content of carotenoid pigments and it is considered to act as a defense mechanism against intense UV irradiation. In this study, the anti-inflammatory effect of the halophilic microorganism, *H. vallismortis*, extract was investigated. It was found that *H. vallismortis* extract had protective effect on DNA damage induced by UV irradiation. These results suggest that the extract of halophilic bacterium, *H. vallismortis* could be used as a bio-sunscreen or natural sunscreen which ameliorate the harmful effects of UV light with its anti-inflammatory and DNA protective properties.

Keywords: ultraviolet B, *Haloarcula vallismortis*, DNA damage, anti-inflammatory, bio-sunscreen

1. 서 론

자외선은 태양에서 발산되는 400 nm 이하의 파장을 가지는 광선으로 UVA, UVB, UVC로 나누어지며 이들은 피부에 광생물학적 반응을 일으켜 일광화상, 색소 침착, 광노화, 피부암 등을 유발하며 파장에 따라 다양한 피부손상을 유발한다. 이 중 UVB는 피부 광노화의 대표적인 원인으로 피부에서 염증반응을 일으키며, 축적된 UV자극은 피부 당화(glycation)산물을 조직에 축적시켜 장벽손상 및 노화를 촉진시킨다[1]. 또 표피 기저층과 진피 상부까지 도달하여 피부각화를 지속시키고 각질세포 및 섬유아세포의 DNA pyrimidine 잔기에 손상을 주어 cyclobutane pyrimidine dimer (CPD)를 형성한다[2]. 형성된 CPD는 피부에서 여러 중요한 반응을 일으키는데 각종 염증반응을 유도하고 면역억제반응을 일으켜 보호장벽으로서의 기능을 약화시킨다[3]. 누적된 DNA손상은 DNA 전사와 번역시 nucleotide excision repair (NER)과정에서 수정되지 않고 전사 또는 번역되어 변형된 단백질을 형성하게 된다. 또 손상된 DNA를 보호하기 위해 melanocyte로부터 tyrosinase의 활성이 증가되어 멜라닌합성이 증가되어 흑화가 진행된다[4]. 더 나아가 심각한 UVB 노출은 홍반, 수포 등의 일광화상과 색소 침착을 유발하며 세포막손상, 피부암을 유발한다[5].

*H. vallismortis*는 사해로부터 분리 동정한 미생물로 햇빛이 강한 염도가 높은 호수나 염전에서 주로 발견되는데 다른 광영양생물의 클로로필을 이용하는 대신 로돕신 단백질(rhodopsin protein)에 의한 광 이용기작이 존재한다[6]. 6가지 유형의 로돕신 단백질 중 bacteriorhodopsin은 고생물의 대표적인 세포막단백질로 50% 정도의 분포를 보인다[7]. 이는 광에너지를 흡수하여 양성자를 세포막 밖으로 배출하고, 이로 인한 전위차를 이용해 ATP를 생성한다[8]. Halorhodopsin은 호염성

세균에서 발견되는 것으로 세포막에 존재하며 bacteriorhodopsin과 높은 상동성을 갖는다. 광에너지를 흡수하여 염화이온(Cl⁻) 특이적인 이온펌프를 통해 세포 외부와 내부의 염화이온 수송을 담당하여 생긴 전위차로 ATP를 합성한다[9].

본 연구에서는 자외선을 에너지원으로 이용하는 호염성 고생물, *H. vallismortis*를 *in vitro* 실험을 통하여 자외선에 의한 항염증, DNA 손상 회복능력을 피부세포에서 확인해 보았다. 더 나아가 피부에 자극적인 기존의 자외선 차단제를 대체할 수 있는 천연유래의 자외선 차단소재로서의 가능성을 확인하였다.

2. 실험방법

2.1. 균주(*H. vallismortis*) 분리

본 실험에 사용한 *H. vallismortis*는 2014년 6월에 전라남도 서해안에 위치한 신안군의 비금면의 M 염전에서 시료를 수집하여 사용하였다.

분석 시료에서 각각 1 g 또는 1 mL를 취하여 생리식염수 용액 10 mL와 혼합하여 30 s 간 vortex하였고, 이를 균질화한 후 10⁻¹ ~ 10⁻⁷으로 십진 희석하였다. 희석액은 고염분 배지인 halophilic archaeal 고체배지(1 L 기준) yeast extract 5 g, casamino acids 5 g, Na-glutamate 1 g, KCl 2 g, Na₃-citrate 3 g, MgSO₄ · 7H₂O 20 g, NaCl 200 g, FeCl₂ · 4H₂O 36 mg, MnCl₂ · 4H₂O 0.36 mg, agar 20 g에 각각 도달하여 35 ~ 40 °C에서 5일간 배양하였다. 본 연구에 사용된 미생물 배양에 이용된 배지 및 무기물들은 모두 DIFCO™ Co. (USA)에서 구입하였다. 배양 후 형성된 집락(colony)은 크기, 모양과 색 등의 형태학적 특성에 따라 분류, 무작위로 다수의 콜로니를 선택하였으며, 3회의 계대 배양을 통해 미생물을 순수 분리하였다.

2.2. 균주(*H. vallismortis*) 동정

순수 분리한 colony를 한국생명공학연구원(Korea research institute of bioscience and biotechnology)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 방법은 16S rRNA gene sequence를 분석하기 위하여 제공 시료로부터 genomic DNA를 추출 정제한 후, 27F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') primer와 1492R (5'-CGT TACCTT GTT ACG ACT T-3') primer를 이용하여 유전자를 증폭시킨 다음, DNA sequence 분석을 실시하였다. 계통분자분류학적 분석을 위한 phylogenetic tree는 BioEdit (Ver 7.2.3)와 MEGA 6 (molecular evolutionary genetics analysis) 프로그램을 사용하여 분석하였다.

16S rRNA gene sequence를 토대로 EXtaxon DB를 통해 분석하였으며, 미생물 분류 체계상 16S rRNA 염기서열의 상동성이 99% 이상이면 기존에 보고된 미생물을 참고하여 동일 균주로, 97% 미만이면 계통학적으로 가장 유연관계가 높은 속으로 분류하였다.

2.3. 균주(*H. vallismortis*) 배양

*H. vallismortis*는 고염분 배지인 halophilic archaeal 액체배지(1 L기준) : yeast extract 5 g, casamino acids 5 g, Na-glutamate 1 g, KCl 2 g, Na₃-citrate 3 g, MgSO₄ · 7H₂O 20 g, NaCl 200 g, FeCl₂ · 4H₂O 36 mg, MnCl₂ · 4H₂O 0.36 mg를 사용하였다. 적정 pH는 5 N NaOH를 이용하여 7.0 ~ 7.2를 맞춰주었다. *H. vallismortis* LG halophilic microorganism을 약 10⁵ ~ 10⁷ cells/mL의 농도로 상기 배지에 접종한 후, 온도 35 ~ 40 °C, 통기량 0.05 ~ 0.5 vvm (volume of air added to liquid volume per minute)의 조건을 유지하면서 7일 배양하였다.

2.4. 균주(*H. vallismortis*) Lysate 제조

배지를 제거하고 상온의 1% PBS로 두 번 행군다. 10 cm plate 당, 1 mM PMSF가 포함된 차가운 1 × cell lysis buffer 500 μL를 첨가한다. Cell을 긁어 모아 적당한 tube에 옮긴다. 얼음에 거치된 상태로 sonication 한다. 4 °C, 10 min 원심분리하여 상등액(cell lysate)을 새 tube에 옮긴다. -20 °C, 48 h로 동결 건조한다.

2.5. NO (Nitric Oxide) Assay

Raw 264.7 세포주(ATCC number: CRL-2278)를 이용한 Griess법으로 NO 형성억제력 실험을 실시하였다.

생쥐의 대식세포인 Raw 264.7 세포주를 3 × 10⁵ cells/well의 농도로 24 well 플레이트에 10% 농도의 우태아혈청이 포함된 DMEM 배지로 깔고, 24 h 동안 배양시켰다. 이어서, 최종농도 1, 10, 100 ppm의 농도로 시료를 희석한 세포 배지로 교체하였다. 이때, NO생성 억제물질인 NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA)를 양성 대조군으로 함께 처리하여 30 min 동안 배양하였고, 자극원으로 LPS (lipopolysaccharide)를 1 μg씩 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 상층액을 100 μL씩 취해 96 well 플레이트에 옮기고, Griess 용액을 100 μL씩 가해 상온에서 10 min 간 반응시키고, 540 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 시료의 NO 억제 효과를 판단하였다.

2.6. 당화억제효과

당화 저해 효과를 확인하기 위하여, L-아르기닌과 포도당을 이용하여 하기와 같이 당화 저해 활성을 테스트하였다. 먼저, 1 M L-아르기닌과 1 M 인산 완충용액(pH 7.4)을 1:4의 부피비로 혼합한 다음 96 well plate에 80 μL씩 분주하였다. 여기에 1 M 인산 완충용액을 이용하여 *H. vallismortis* lysate를 각각 100, 1000 ppm으로 희석한 용액을 100 μL씩 well에 첨가한 후 잘 섞어 주었다. 이후, 포도당의 최종농도가 0.1 M이 되도록 1 M 인산 완충용액으로 희석한 포도당 용액을 각 well에 첨가한 후, 70 °C에서 4 h 동안 반응시켰다. 그 후, 분광 광도계로 420 nm에서 96 well plate의 흡광도를 측정하고, 당화 실험군 대비 반응 전, 후 시료의 흡광도 차이를 이용해 당화 저해율을 계산하였다[10-12].

2.7. 사람피부 유래 각질세포 배양

본 실험 전반에서 사용된 사람피부 유래 각질세포(HaCaT)는 ATCC (USA)에서 구입하였다. 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)에 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum)과 1% penicillin/streptomycin solution이 첨가된 배양액 조건에서 배양하였다. 세포가 배양용 플라스크에 약 80% 찼을 때 0.25% trypsin-EDTA (Invitrogen, USA)를 이용하여 계대 배양을 진행하였다.

2.8. Real-Time PCR (qPCR)

UVB에 의한 DNA 손상정도를 평가하기 위해 인간 유래 각질세포주(HaCaT)를 사용하여 CPD assay를 진

행하였다. 35 mm 배양용 플레이트에 2×10^5 cells/well의 각질세포를 배양액 조건에서 깔고 *H. vallismortis* lysate를 증류수에 녹여 6 h 동안 해당 농도로 선 처리하고 물질을 제거한 뒤 UVB를 20 mJ/cm^2 로 조사하였다. 다시 *H. vallismortis* lysate를 증류수에 녹여 처리하고 24 h 후 세포를 거두어 RNA easy mini kit (Qiagen, USA)으로 RNA를 분리하여 정량 후, $1.5 \mu\text{g}$ 의 RNA를 GeneAmp[®] RNA PCR kit (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 역전사(reverse transcription)하였다. 역전사 반응은 Mycycler[®] PCR 기기(Biorad, USA)를 이용하여 수행하였다. 합성된 cDNA를 Taqman universal master mix (Applied biosystems, USA)와 유전자 특이적인 프라이머를 이용하여 real-time PCR system (Applied biosystems, USA)으로 발현을 측정하였다. Real-time PCR에 사용된 프라이머는 GAPDH, XPA, XPC, ERCC4, ERCC5이다.

2.9. CPD (Cyclobutane Pyrimidine Dimer) Assay

UVB에 의한 DNA 손상 정도를 평가하기 위해 인간 유래 각질세포주(HaCaT)를 사용하여 CPD assay를 진행하였다. HaCaT 세포주를 2×10^5 cells/well 농도로 12 well plate에 깔고 37°C , 5% CO_2 인큐베이터에서 24 h 배양하였다. *H. vallismortis* lysate를 증류수에 녹여 6 h 동안 해당 농도로 선처리 하고 물질을 제거한 뒤 UVB를 20 mJ/cm^2 로 조사하였다. 다시 *H. vallismortis* lysate를 증류수에 녹여 처리하고 24 h 후 세포를 거두어 genomic DNA를 정제하였다. 정제한 DNA를 농도를 측정하고 OxiSelect[™] UV-induced DNA damage ELISA Kit (cell bilolabs, STA-322)을 이용하여 DNA손상 정도를 측정하였다.

2.10. In Vitro SPF 차단효과 및 UVB 흡수능 평가

SPF 50, PA+++인 제형에 *H. vallismortis* lysate와 butyloctyl salicylate를 3%중량 첨가하여 제조하였다. 그리고 35 cm^2 의 vitroskin을 수화 챔버(hydration chamber; 15% 글리세린 용액으로 수화시킨 desicator)에서 20 h 동안 수화시켰다. 상기 대조군 및 실험군을 각각 70 mg (2 mg/cm^2)씩 취하여 vitroskin 위에 최대한 고르게 도포한 뒤 상온에 10 min 방치하였다. 도포는 검지손가락에 일회용 고무 골무를 낀 상태로 실시하였다. 도포되지 않은 vitroskin을 대조군으로 사용하

고, SPF-290S기기를 이용하여 자외선 파장의 빛의 투과 정도를 통하여 샘플의 SPF와 PA 수치를 측정하였다.

UVB 흡수능 평가를 위해 *H. vallismortis* lysate와 ethylhexyl salicylate를 1000 ppm이 되도록 정제수로 희석한 후 UV/Vis 분광기를 이용해 자외선 파장 230 nm부터 400 nm 구간에서 흡광도와 투과도를 측정하였다.

2.11. 통계적 분석

실험 결과는 평균값과 표준편차로 나타내었고, Student's *t*-test법을 이용하여 *p*-value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 균주(*H. vallismortis*) 분리, 동정

염전에서 채취한 시료를 NaCl 20%인 고염분 배지인 halophilic archaeal 고체배지에서 5일간 배양했을 때, 간상의 매끄럽고 진한 붉은색을 나타내는 호염성 균주를 선발하였다. 분리한 호염성 균주에 대해 분자생물학적 유전자 염기서열(16S rDNA gene sequence)을 토대로 EZtaxon DB를 통해 계통분자분류학적 기법으로 분석한 결과, 기존에 보고된 국제공인 표준균주인 *H. vallismortis* CGMCC1.2048/rnB^T (= ATCC 29715, = JCM 8877)와 99.84%의 상동성을 나타내어(Figure 1), 이를 *H. vallismortis* LG halophilic microorganism 으로 명명하고[13], 2015년 6월 3일자로 KCTC (한국생명공학연구원)에 기탁하여 수탁번호 KCTC 12830 BP를 부여받았다. *H. vallismortis*는 형태학적으로 간상으로 불규칙적인 다형성의 군집의 형태로 자라난다[14]. 또한, 그람음성 간균으로서 편모에 의한 운동성을 나타내며, 균체 중앙부의 수축에 의하여 균체의 분리가 이루어지며, 성장과 더불어 붉은 색소를 나타낸다[15].

3.2. *H. vallismortis* Lysate의 항염효과

자외선에 의한 피부의 염증반응은 그 뒤의 많은 세포적 반응들을 유발한다[16]. *H. vallismortis* lysate의 UVB에 의한 피부염증반응 진정 효과를 보기 위해 Raw 264.7 대식세포에서 NO 생성억제율을 측정하였다. Raw 264.7 대식세포에 LPS (lipopolysaccharide)로 NO 생성을 유발한 뒤 최종농도 1, 10, 100, 1000

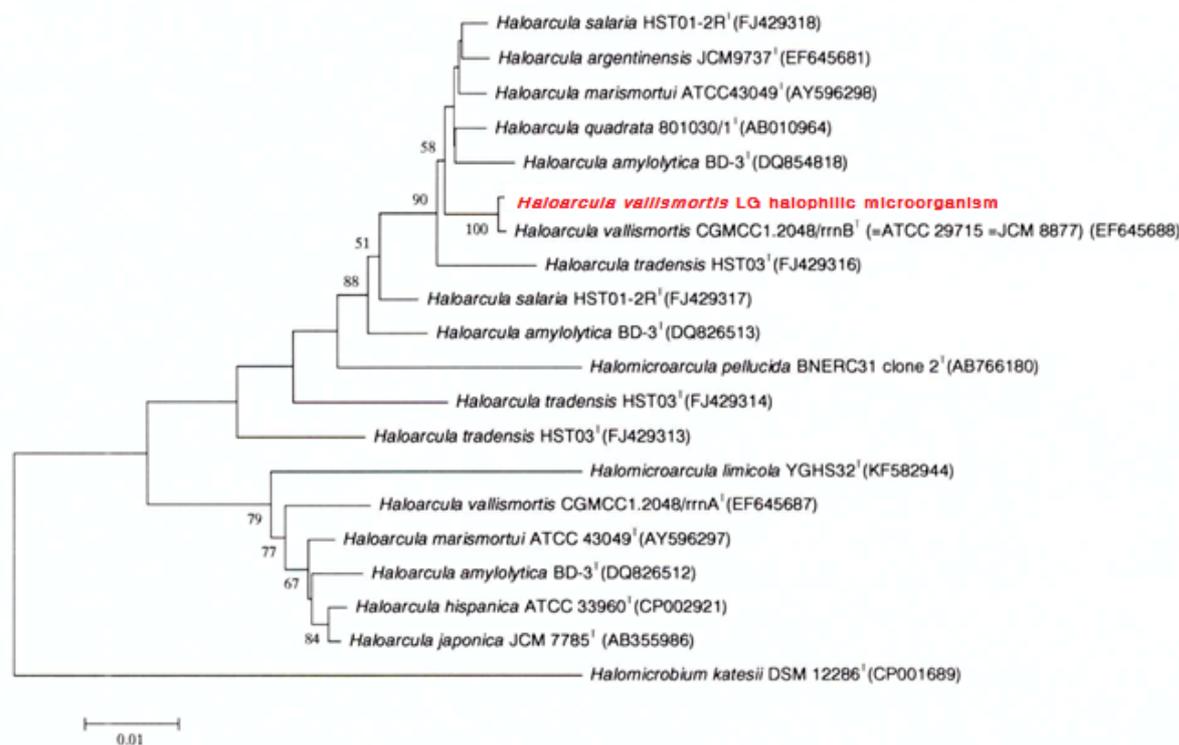


Figure 1. Homology of isolated halophilic microorganism from salt pond to *H. vallismortis*.

ppm의 농도로 *H. vallismortis* lysate를 처리를 하였다. 양성대조군으로는 NO생성 억제물질인 L-NMMA (L-NG-monomethylarginine)를 처리해 양성대조군 대비 얼마나 우수한 효과를 나타내는지 측정하였다. 비교 결과 *H. vallismortis* lysate는 100 ppm 농도 이상에서 양성대조군보다 우수한 NO생성 억제율을 보였다 (Figure 2A). 또, *H. vallismortis* lysate의 항염효과가 일광조건, UV 조건, 고온조건에서도 유지됨을 확인하기 위해 각각의 조건에서 실험을 진행하였다. 일광에서 1 week 방치 후 처리하였을 때, 100 ppm 농도 이상에서 양성대조군보다 높은 수준의 항염효과를 확인하였고 (Figure 2B), UVB 4 h 조사 후 처리하였을 때, 100 ppm 농도 이상에서 양성대조군보다 높은 수준의 항염효과를 확인하였다(Figure 2C). 또, 고온조건(50 °C, 80 °C)에서 4 h 방치 후 처리하였을 때, 50 °C에서 4 h 동안의 열자극에는 항염 효과가 100 ppm 농도 이상에서 유지되는 것을 확인하였지만, 80 °C 이상의 고온자극에서는 항염활성이 떨어지는 것을 확인하였다(Figure 2D).

3.3. *H. vallismortis* Lysate의 항당화효과

UVB에 의해 피부세포는 당화과정이 일어나게 되며 조직에 축적된 당화산물들은 세포노화 및 염증을 유발하게 된다[17]. L-아르기닌과 포도당을 이용하여 *H. vallismortis* lysate의 당화 억제 활성을 측정하였다. 실험 결과 각각 100 ppm, 1000 ppm의 *H. vallismortis* lysate를 첨가한 군들은 음성대조군에 비해 각각 약 59.5%, 38.9% 정도의 당화만 일으키는 것을 확인하였고, 약 40.5%, 61.1%의 항당화 효과를 확인하였다 (Figure 3).

3.4. *H. vallismortis* Lysate DNA손상 억제 및 DNA수선 효과

UVB에 의한 각질세포의 DNA손상을 억제하는 효과를 확인하기 위해 각질세포에 UVB 조사 전, 후로 *H. vallismortis* lysate를 처리하여 DNA상의 피리미딘 잔기의 dimer 형성정도를 측정하였다. *H. vallismortis* lysate를 0.1, 10 ppm의 농도로 처리하였을 때 미처리군에 비해 각각 30%, 61% CPD 생성억제 효능을 보

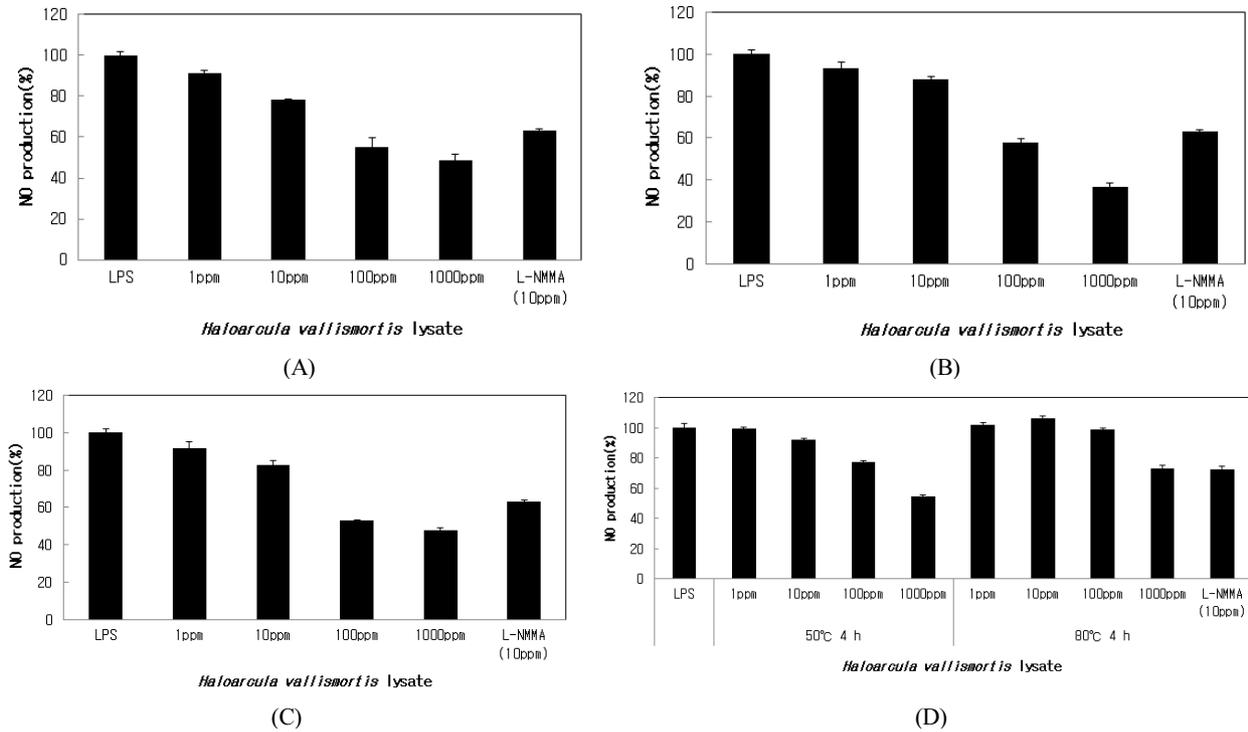


Figure 2. NO suppression effect of *H. vallismortis* lysate. (A) The NO suppression activity of *H. vallismortis* lysate was evaluated by NO assay. (B) *H. vallismortis* lysate sample were made in 1 week sun exposure condition. After sun exposure, the NO suppression activity of *H. vallismortis* lysate was evaluated by NO assay. (C) *H. vallismortis* lysate sample were made in 4 hours UVB exposure condition. After UVB exposure, the NO suppression activity of *H. vallismortis* lysate was evaluated by NO assay. (D) *H. vallismortis* lysate sample were made in high temperature exposure (50 °C, 80 °C). After thermal exposure, the NO suppression activity of *H. vallismortis* lysate was evaluated by NO assay. Each bar in the graph represents mean ± S. D.

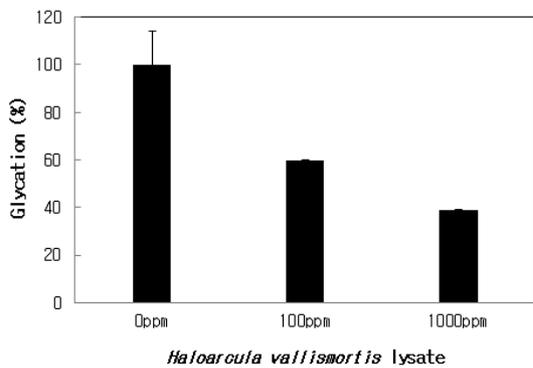


Figure 3. Glycation suppression by treating *H. vallismortis* lysate. L-arginine and glucose were used to establish glycation experimental model. Glycation suppression ratio was calculated by following formula. (absorbance before reaction - absorbance after reaction) / glycation group absorbance. Each bar in the graph represents mean ± S. D.

였다(Figure 4A). 또 UVB에 의한 DNA손상에 대해 *H. vallismortis* lysate가 DNA 수선을 담당하는 NER pathway 관여인자들의 발현에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 mRNA 발현을 측정하였다. 각질세포에 UVB 조사 전, 후로 *H. vallismortis* lysate를 처리하여 DNA 수선단백질인 XPA, XPC, ERCC4, ERCC5 유전자의 발현을 측정한 결과 무처리군에 비해 *H. vallismortis* lysate 처리군은 농도 의존적으로 DNA수선 단백질의 mRNA 발현양이 증가하는 것을 볼 수 있었다(Figure 4B). *H. vallismortis* lysate를 UVB조사 전 처리를 하였을 때 DNA손상 방지 효과가 있는 것으로 나타났고, 이는 UVB에 의한 DNA손상을 NER 수선 단백질 유전자의 발현을 증가시킴으로 이루어짐을 알 수 있었다. 이로써 *H. vallismortis* lysate는 자외선에 대한 예방효과를 기대할 수 있는 것으로 생각된다. 결과적으로 *H. vallismortis* lysate는 UVB에

Table 1. SPF/PA Validation Performed by SPF-290S

UV type	Vitroskin			
	SPF value	Increase ratio	PA value	Increase ratio
Control	57.94 ± 3.02	-	16.75 ± 2.50	-
<i>H. vallismortis</i> lysate (3%)	65.76 ± 16.74	13%	20.55 ± 5.87	22%
Butyloctyl Salicylate (3%)	64.34 ± 14.76	11%	20.22 ± 2.11	20%

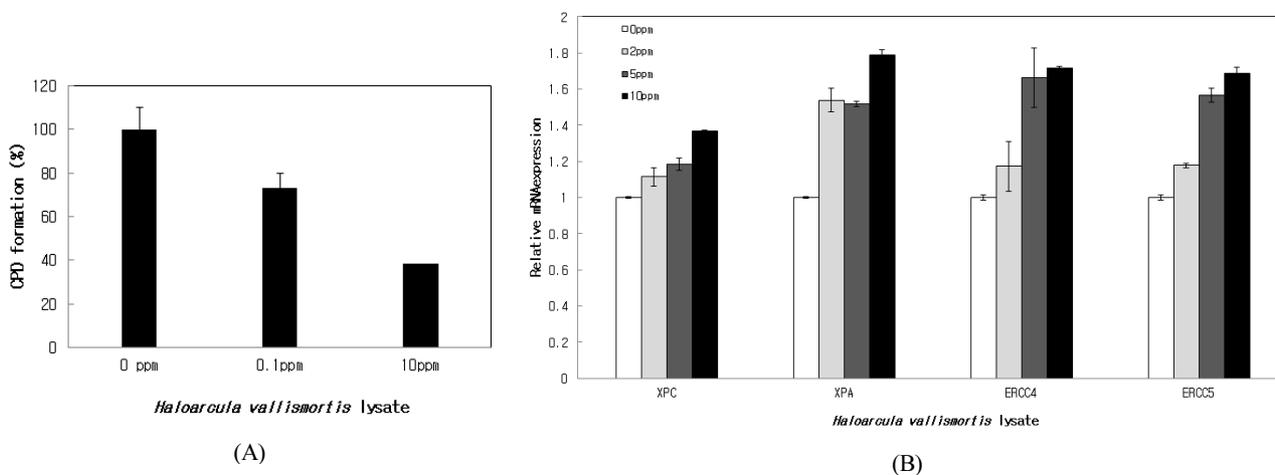


Figure 4. DNA damage prevention effect of *H. vallismortis* lysate and relative NER protein expression. *H. vallismortis* lysate was pre-treated before 20 mJ of UVB exposure to HaCaT. (A) DNA damage was evaluated by measuring CPD formation. (B) Relative mRNA expression of XPA, XPC, ERCC4, ERCC5 was measured by RT-qPCR. Each bar in the graph represents mean ± S. D.

의한 DNA손상에 대해 DNA 수선단백질의 발현을 늘리고, 이를 통해 DNA손상을 줄이는 것을 확인할 수 있었다.

3.5. *H. vallismortis* Lysate의 SPF/PA수치 측정

천연유래 자외선 차단제로서의 적용가능 여부를 보기위해 자외선 차단율 및 SPF/PA수치를 측정하였다. *H. vallismortis* lysate와 ethylhexyl salicylate의 농도가 각각 1000 ppm이 되도록 정제수로 희석한 후, 자외선 흡수 및 투과 스펙트럼을 측정하였다. 그 결과 *H. vallismortis* lysate는 258 nm에서 ethylhexyl salicylate는 306 nm에서 최대흡수력을 보였고(Figure 5A), 자외선 투과율의 경우 *H. vallismortis* lysate는 258 nm 자외선 파장에서 최대로 자외선 투과를 약 67% 이상 억제하였으며, ethylhexyl salicylate는 306

nm 자외선 파장에서 최대로 자외선 투과를 약 31% 이상 억제하였다(Figure 5B). 또 SPF/PA 수치를 측정하기 위해 *H. vallismortis* lysate와 butyloctyl salicylate를 각각 3%씩 포함하는 제형을 SPF-290S 기기를 이용하여 SPF와 PA 수치를 측정하였다. Butyloctyl salicylate는 UV로부터 피부 보호를 위해 보편적으로 사용되며 광 안정성을 향상시키는 특성을 가지고 있다 [18]. 그 결과 *H. vallismortis* lysate를 포함하는 제형은 음성대조군에 비해 SPF는 13%, PA는 22% 증가한 것을 볼 수 있었다. 이는 양성대조군으로 사용한 butyloctyl salicylate를 포함한 제형의 SPF와 PA 수치 실험한 결과, 음성대조군에 비해 SPF는 11%, PA는 20% 증가한 것과 비교했을 때도 우수한 효과로 생각된다(Table 1).

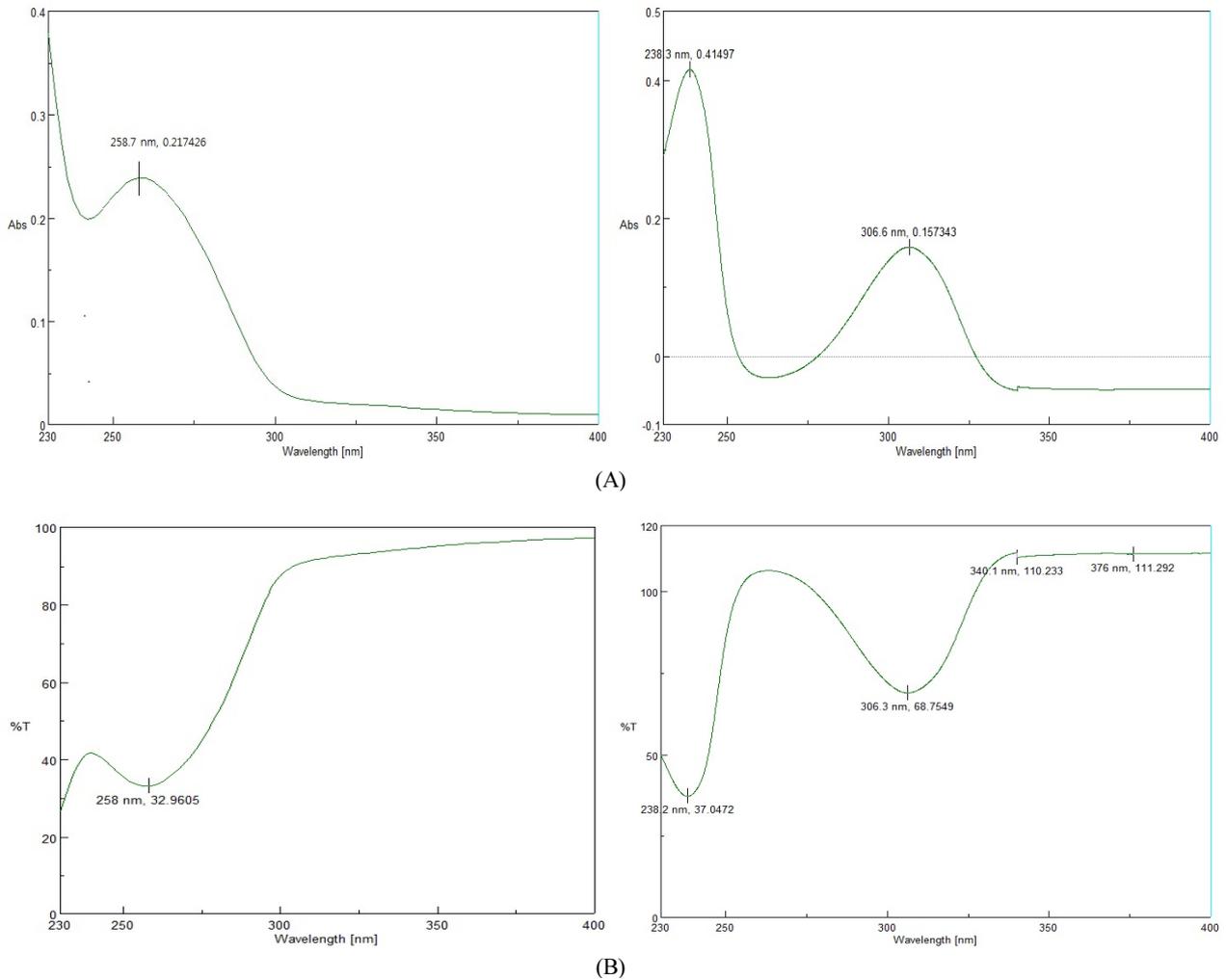


Figure 5. *In vitro* SPF/PA validation. (A, B) UVB absorbance and transmission ratio of *H. vallismortis* lysate and ethylhexyl salicylate were evaluated by UV/Vis spectrophotometer in 230 nm to 400 nm wavelength.

4. 결 론

본 연구에서는 극한의 환경에서 사는 미생물 중 많은 일조량 때문에 염도가 높은 수중환경에서 사는 *H. vallismortis*를 이용해 천연유래 자외선 차단제로서의 적용가능 여부를 항염, DNA 손상방지 측면에서 확인하였다. UVB에 의해 피부는 염증반응을 일으키고 그로 인한 DNA손상과 DNA손상을 막기 위한 멜라닌의 과 합성을 통해 흑화가 일어난다. *H. vallismortis* lysate는 염증반응을 매개하는 대식세포에서 NO생성을 억제하는 효과를 나타냈다. 100 ppm에서 양성대조군인 L-NMMA보다 우수한 효과를 나타내었다. 또 다른 피

부염증 및 피부노화요인이 될 수 있는 당화산물에 대하여 각각 100 ppm과 1000 ppm 농도에서 음성대조군에 비해 약 40.5%, 61.1%로 당화산물 생성을 억제하는 효능을 확인하였다. 그리고 피부각질세포에 UVB를 조사하여 그로 인한 DNA손상을 *H. vallismortis* lysate를 0.1, 10 ppm의 농도로 처리하였을 때 미처리군에 비해 각각 30%, 61% CPD 생성을 줄여주는 것을 확인하였다. 이와 관련하여 DNA손상을 회복하는 단백질 유전자의 발현이 *H. vallismortis*에 의해 증가되는 것을 확인하였는데 이는 *H. vallismortis*에 의해 DNA수선 메커니즘이 활성화되어 UVB로부터 입은 손상을 예방 또는 빠르게 복구할 수 있음을 나타낸다. 이는 *H. vallismor-*

tis lysate를 포함한 제형을 SPF와 PA 수치 실험한 결과에서도 음성대조군에 비해 SPF는 13%, PA는 22% 증가한 것을 볼 수 있었다. 본 실험에서 양성대조군으로 쓰인 단일물질들에 비해 *H. vallismortis*는 용해물의 형태이기 때문에 그 효과가 미미할 수 있다. 앞으로 메커니즘의 추적과 효과증대의 측면에서 *H. vallismortis* 용해물의 어떤 단일성분이 이 같은 효능을 하는지 추가적으로 단일성분 추적 실험을 진행할 예정이다.

본 연구를 통하여 *H. vallismortis*의 자외선에 대한 항염, 자외선차단 소재로서의 가능성을 확인하였고, 추가 실험분석 및 임상 실험을 통하여 천연 자외선 차단제로의 연구 및 적용을 진행할 것이다.

Reference

1. M. Ichihashi, M. Yagi, K. Nomoto, and Y. Yonei, Glycation stress and photo-aging in skin, *Anti-Aging medicine*, **8**, 23 (2011).
2. F. Yamazaki, H. Okamoto, H. Miyauchi-Hashimoto, Y. Matsumura, T. Itoh, K. Tanaka, T. Kunisada, and T. Horio, XPA gene-deficient, SCF-transgenic mice with epidermal melanin are resistant to UV-induced carcinogenesis, *J. Invest. Dermatol.*, **137**, 220 (2004).
3. F. R. D. Gruijl, H. J. V. Kranen, and L. H. F. Mullenders, UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer, *J. Photochem. Photobiol.*, **63**, 19 (2001).
4. S. Premi and D. E. Brash, Unanticipated role of melanin in causing carcinogenic cyclobutane pyrimidine dimers, *Mol. Cell. Oncol.*, 2372 (2015).
5. E. Lee, J. Koo, and T. Berger, UVB phototherapy and skin cancer risk: a review of the literature, *Int. J. Dermatol.*, **4**, 355 (2005).
6. J. Yagasaki, D. Suzuki, K. Ihara, K. Inoue, T. Kikukawa, M. Sakai, M. Fujii, M. Homma, H. Kandori, and Y. Sudo, Spectroscopic studies of a sensory rhodopsin I homologue from the archaeon *Haloarcula vallismortis*, *Biochemistry*, **49**, 1183 (2010).
7. O. Beja, L. Aravind, E. V. Koonin, M. T. Suzuki, A. Hadd, L. P. Nguyen, S. B. Jovanovich, C. M. Gates, R. A. Feldman, J. L. Spudich, E. N. Spudich, and E. F. DeLong, Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea, *Science*, **289**, 1902 (2000).
8. J. M. Kim, P. J. Booth, S. J. Allen, and H. G. Khorana, Structure and function in bacteriorhodopsin: the role of the interhelical loops in the folding and stability of bacteriorhodopsin, *J. Mol. Biol.*, **2**, 409 (2001).
9. B. Schoberts and J. K. Lanyi, Halorhodopsin is a light-driven chloride pump, *J. Biol. Chem.*, **17**, 10306 (1982).
10. H. S. Lee and J. A. Yoon, Inhibitory activity of advanced glycation endproducts (AGE) formation of edible plants for development of anti-wrinkle ingredients, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **39**(2), 186 (2010).
11. Y. S. Kim, J. H. Moon, I. W. Choi, and H. D. Choi, Physicochemical properties and antioxidant activities of maillard reaction products from hydrolyzed wheat gluten, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **41**(2), 122 (2009).
12. N. Matsuura, T. Aradate, C. Sasaki, H. Kojima, M. Ohara, J. Hasegawa, and M. Ubukata, Screening system for the maillard reaction inhibitor from natural product extracts, *J. Health Sci.*, **48**, 520 (2002).
13. N. S. Baliga, R. Bonneau, M. T. Facciotti, M. Pan, G. Glusman, E. W. Deutsch, P. Shannon, Y. Chiu, R. S. Weng, R. R. Gan, P. Hung, S. V. Date, E. Marcotte, L. Hood, and W. V. Ng, Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the dead sea, *Genome Research*, **14**, 2221 (2005).
14. S. Fendrihan, A. Legat, M. Pfaffenuemer, C. Gruder, G. Weidler, F. Gerbl, and H. S. Lotter, Extremely *Halophilic archaea* and the issue of long-term microbial survival, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, **5**, 203 (2006).
15. H. S. Park and M. J. Jung, Isolation and identification of an extremely halophilic bacterium from solar salts, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 671 (1996).

16. S. Pillai, C. Oresajo, and J. Hayward, Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review, *Int. J. Cosmetic Sci.*, **10**, 1111 (2005).
17. N. Matsuura, N. Matsuura, C. Kurosaka, M. Ubukata, S. Kittaka, and M. Ohara, Potent protein glycation inhibition of plantagoside in plantago major seeds, *Biomed Res. Int.*, **10**, 1155 (2014).
18. S. S. Kumbhar and R. D. Nikhate, A review on sunscreen formulation, *PhTechMed.*, **4**, 1 (2015).