



Anti-aging effects of casuarictin on UVB-induced CCD-986sk cell

You Ah Kim¹ · Dong Hee Kim² · Young A Kim² · Jae Myo Yu² ·
Byoung Jun Park¹ · Jun Ho Son²

UVB유도성 CCD-986sk cell에서의 Casuarictin의 항노화 효과

김유아¹ · 김동희² · 김영아² · 유재묘² · 박병준¹ · 손준호²

Received: 17 August 2016 / Accepted: 20 October 2016 / Published Online: 31 March 2017
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2017

Abstract To develop a new functional agent for cosmetics, we investigated the anti-aging activities in fibroblasts of casuarictin. The anti-aging effect of casuarictin in CCD-986sk cell was as follows: it inhibited ROS expression increased by Ultraviolet B and suppressed pro-collagen expression. Also, casuarictin had inhibited Matrix metalloproteinase-1 expression. Therefore, the results suggested that casuarictin has considerable potential as a cosmetics ingredient with a anti-aging effect.

Keywords Anti-aging · Casuarictin · Matrix metalloproteinase-1 · Pro-collagen

서 론

피부노화는 잔주름, 피부건조증, 탄력감소 등의 경미한 임상 특

징을 나타내는 내인성 노화와 굵고 깊은 주름이 발생하며 잔주름도 많이 발생하는 광노화로 나눌 수 있다(Jean 1995; Laure와 Fisher 2002).

세포외기질(extracellular matrix)의 주요 구성성분인 collagen은 섬유아세포에 의해 합성되며, 피부의 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포접착, 세포 분할과 분화유도 등의 역할을 한다(Jeroma 등, 1998). 피부에 높은 농도로 존재하는 collagen은 트립신과 같은 단백질 분해효소의 작용은 받지 않으나 collagenase에 의해 분해된다(Grant와 Alburn 1959; Demina와 Lysenko 1996). 광노화로 인한 피부 주름은 진피의 collagen을 포함한 결합 조직 성분을 분해하는 matrix metalloproteinases (MMPs)의 활성이 증가하여 피부 조직 내의 collagen 함량이 저하되기 때문이며, 자외선 조사량이 증가할수록 MMPs의 활성이 증가하는 것으로 보고되어 있다(Park 등, 2008; So 등, 2008).

Ultraviolet B (UVB)는 피부 세포내 활성 산소를 생성하여 직접 DNA의 손상을 일으켜 항산화 방어체계의 불균형에 의한 산화적 스트레스를 유발시킨다. 또한, 활성산소종은 MMPs의 활성을 증가시켜 결합조직성분의 분해, 절단 및 비정상적인 교차결합에 의하여 주름을 생성시킨다(Afaq 등, 2007; Park과 Lee 2008). 즉 자외선에 의한 활성산소종은 피부 세포 내 여러 가지 신호 전달체계를 활성화시킴으로서 MMPs의 증가를 가져오며 이는 collagen의 생성과 탄력섬유의 합성을 감소시켜 주름을 생성하게 되는 피부노화의 주된 원인을 알 수 있다(Berneburg 등 2000).

Casuarictin은 가수분해성 tannin의 한 종류인 ellagitannin monomer로 Casuarina과 Stachyurus 종 식물에 존재한다고 알려져 있다(Okuda 등, 1983). 구조적으로 2개의 hexahydroxydiphenic acid와 1개의 gallic acid unit이 glucose molecule에 연결되어 있는 형태로 pH 8의 buffer 하에서 가수분해되어 많은 양의 ellagic acid를 생성한다고 보고되었다(Daniel 등, 1991). 현재까지 알려진 Casuarictin의 효능은 항암(Miyamoto 등, 1993), 항

Jun Ho Son (✉)
E-mail: bio115@nikom.or.kr

¹Bio Materials R&D Center, Kolmar Korea, CBTP, Future Convergent Tech Center, 76, Yeongudanji-ro, Ochang-eup, Cheongwon-gu, Cheongju-si, Chungbuk 28116, Republic of Korea

²Traditional Korean Medicine Technology Division, R&D Department, Applied Product Development Team, National Development Institute of Korean Medicine, 94, Hwarang ro(Gapje-dong), Gyeongsan-si, Gyeongbuk 38540, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

염(Ishii 등, 1999), 항산화(Kahkonen 등, 2012) 등이 있다. Casuarictin을 포함하는 ellagitannins은 1,2,3,4,6-pentagalloyl glucose의 galloyl groups의 산화에 의해 주로 생성되는 polyphenol의 부류를 말한다. 이는 일부 과일류와 pomegranates, black raspberries, raspberries, strawberries, walnuts 및 almonds와 같은 nuts와 seeds에 주로 존재하며(Amakura 등, 2000), 항암, 항염, 항산화 효과를 가지는 것으로 보고 되어있다(Lipińska 등, 2014). 관절염유도동물 모델에서 ellagitannin이 풍부한 red raspberries 추출물이 우수한 항염증효과를 가지는 것으로 보고 되었으며(Jean-Gilles 등, 2012), 용안씨 추출물(longan seed extracts)의 ellagitannins 계열물질은 미백효과가 있는 것이 알려져 있다(Rangkadiloka 등, 2007). 지금까지 ellagitannin계 물질에 대한 다양한 효능에 대해 연구가 진행되었으나 casuarictin에 대한 개별연구는 부족한 실정이며 특히 항암, 항염, 항산화 이외의 효능에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 따라서, 본 실험에서는 복분자 씨앗 추출물로부터 분리된 casuarictin을 이용하여 기존에 밝혀지지 않은 섬유아세포내에서의 항노화 효과를 확인하여 기능성 화장품 소재로의 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기

세포 독성 실험 및 배양을 위한 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였으며 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 Antibiotic-Antimycotic (100X)는 Gibco (Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. 유효성 평가를 위한 Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), Pro-COL1A1, β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, MMP-1, Pro-collagen kit는 각각 Abcam (Cambridge, MA, USA), TaKaRa (Shiga, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 microplate reader 장비는 Spectrostar Nano (BGM LabTech, Ortenberg, Germany)를 사용하였으며, Chemi-Doc은 LAS4000 (Fuji Film, Tokyo, Japan) 제품을 사용하였다.

세포배양

American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA)에서 구매한 CCD-986sk (Human fibroblast) 세포를 10% FBS, 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM으로 배양기에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

세포독성측정

본 실험에서 CCD-986sk 세포에 대한 시료의 유효농도를 결정하기 위해 세포독성측정(MTT assay)을 진행하였다. 배양된 CCD-986sk 세포를 48 well plate에 각각 5×10^4 cell/wells로 접종하고 24시간 배양하였다. 동일 배지로 교체한 후 casuarictin을 농도별(5, 10, 25, 50, 100 μ g/mL)로 희석하여 처리한 후 48시간 CO₂ incubator에서 배양하였다. 5 mg/mL MTT 용액과

10% FBS, 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM을 혼합하여 세포에 10 μ L씩 처리한 후 3시간 배양하였다. Demethyl sulfoxide 100 μ L 넣은 후, 10분간 교반 한 후 microplate reader 로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ROS (Reactive Oxygen Species) 생성량 측정

CCD-986sk 세포를 배양한 후 96 well white plate에 2×10^5 cell/wells로 접종하고 24 시간 배양하였다. 동일 배지로 교체한 후 UVB (20 mJ/cm²)을 조사 한 뒤, casuarictin을 5, 10, 25 μ g/mL의 농도로 희석하여 처리한 후 48시간 배양하였다. 그 후 제조사의 매뉴얼에 따라 ROS Clo H₂O₂ assay를 수행하였다.

Pro-collagen 합성 및 MMP-1 발현 측정

CCD-986sk 세포를 배양한 후 6 well plate에 1×10^5 cell/wells로 접종하고 24시간 배양하였다. 동일 배지로 교체한 후 UVB (20 mJ/cm²)을 조사 한 뒤, casuarictin을 5, 10, 25 μ g/mL 희석하여 처리한 후 48시간 배양하였다. Blank와 control group은 sample의 처리없이 배양하였으며 그 후 각 well의 상등액을 이용하여 procollagen type C-peptide assay kit와 MMP-1 human ELISA kit을 사용하여 실험을 진행한 뒤, microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western Blot을 이용한 단백질의 발현 측정

CCD-986sk 세포를 1×10^5 cell/wells로 6 well plate에 분주하여 24시간 배양한 후에 UVB (20 mJ/cm²)를 조사한 뒤 casuarictin을 처리하여 48시간 배양하였다. 세포를 RIPA buffer (Pierce, Rockford, IL, USA)로 용해하고 원심분리한 후 얻은 상등액을 10% SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 PVDF membrane으로 이전시켰다. 5% skim milk가 함유된 tris 완충 용액으로 1시간 blocking 한 후, Pro-collagen, MMP-1, β -actin 각각의 1차 및 2차 항체와 반응시켰다. 반응 후 Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, Billerica, MA, USA)를 이용하여 60분간 반응시킨 후 Chemi-Doc을 이용하여 현상하였다.

통계처리

본 실험의 통계처리는 SPSS 12.0을 사용하였다. 각 실험군의 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 각 실험군의 간의 결과는 2-표본 t 검정을 사용하여 분석하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 검정하였다. 실험군 간의 차이는 95% 수준(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)에서 유의성 있는 것으로 하였다.

결과 및 고찰

세포독성 평가

Casuarictin의 세포 독성측정과 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해 MTT assay를 수행하였다. CCD-986sk 세포에 casuarictin을 5, 10, 25, 50, 100 μ g/mL 농도로 처리한 결과, 25 μ g/mL 이하의 농도에서 세포생존율이 90% 이상으로 나타내어 CCD-986sk 세포의 생존율에 큰 영향을 나타내지 않음을 확인 할 수 있었다(Fig. 1).

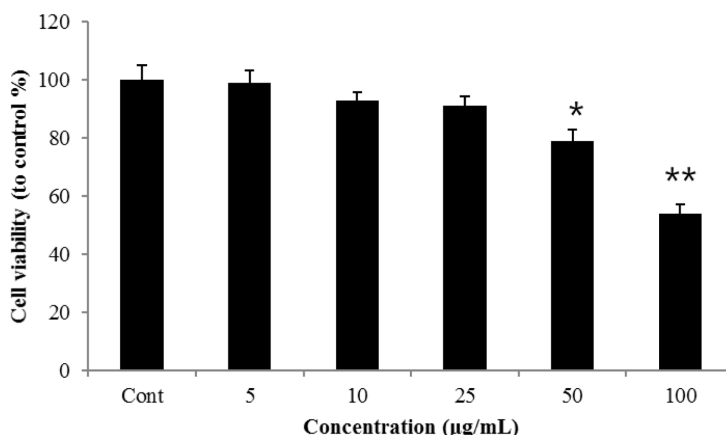


Fig. 1 Cell viability of casuarictin on CCD-986sk human fibroblast cells by MTT assay. The cells were treated various concentrations of sample. The results were expressed as the average of triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control

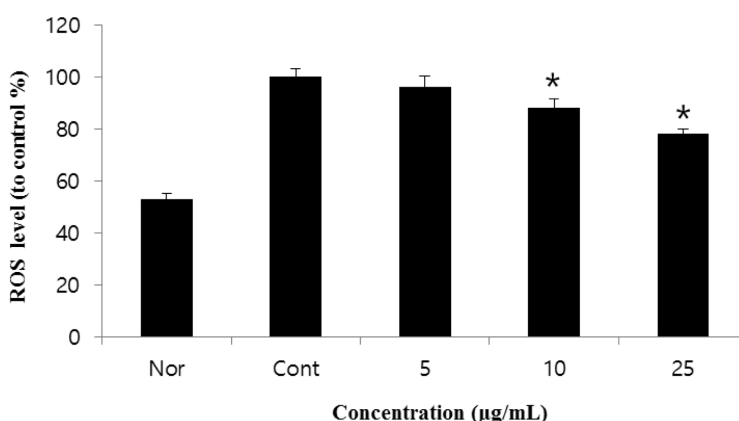


Fig. 2 Effect of casuarictin in the expression of ROS in the UVB-induced CCD-986sk human fibroblast cells. Cells were treated for 48 h with casuarictin (5, 10, 25 µg/mL) during UVB (20 mJ/cm²) activation. The results were expressed as the average of triplicate. * $p < 0.05$ compared with control

ROS 생성 억제 효과

피부에 UVB의 노출은 활성산소종 생성을 야기시키며(Fisher 등, 1997; Yoon 등, 2003; Han 등, 2013), 이때 생성되는 ROS는 피부세포 내에서의 신호전달 과정화에 영향을 미쳐 피부 주름과 관련된 전사인자들을 활성화 시킨다(Pentland 등, 1995; Park 등, 2010). CCD-986sk 세포에서의 UVB 조사에 따른 ROS 생성을 측정 한 결과, UVB로 유도된 그룹에서는 정상군에 비해 2배 가까이 ROS 생성률이 증가하였으며, casuarictin을 농도별로 처리한 결과 농도 의존적으로 ROS 생성을 감소시키는 것을 확인하였다(Fig. 2).

Pro-collagen 합성 및 MMP-1 발현 측정 결과

피부 세포의 주름과 관련된 collagens은 pro-collagen이라는 전구물질의 형태로 합성된다. 따라서 pro-peptide의 양을 측정함으로써 세포내에서의 collagen의 합성 정도를 파악할 수 있다(Parfitt 등, 1987). Pro-collagen의 합성을 촉진 시킬 수 있는 소재는 탄력 있는 피부를 만들어 주는 화장품 원료로서 사용 가능성이 높다고 생각되며 이에 casuarictin을 이용하여 pro-collagen 합성 실험을 수행하였다. 그 결과, casuarictin은 농도

의존적으로 pro-collagen 생성을 증가 시켰으며, 특히 최고 농도인 25 µg/mL의 농도에서는 대조군에 비해 20% 이상의 높은 생성률을 나타내었다. 또한 MMP-1은 type collagen을 분해하는 인자로 알려져 있으므로(Talwar 등, 1995; Nagase와 Woessner 1999) 이 인자의 발현을 저해하는 것이 피부의 탄력유지에 효과를 줄 수 있을 것으로 예측되는바 casuarictin의 MMP-1의 발현 저해를 측정 실험을 수행하였다. 그 결과, UVB로 발현된 MMP-1을 control과 비교하였을 때 casuarictin이 5, 10, 25 µg/mL의 농도에서 각각 14, 15, 22%의 발현을 저해하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

Pro-collagen 및 MMP-1 protein 측정 결과

ELISA를 통해 Pro-collagen의 합성능과 MMP-1의 발현 저해를 정량적으로 확인 하였으며, CCD-986sk 세포에서 단백질을 추출하여 protein level에서의 casuarictin의 효과를 확인하기 위하여 western blot을 실행 하였다. UVB를 조사한 그룹에서는 pro-collagen 발현이 UVB를 조사하지 않은 그룹에 비해 40% 이상 발현이 저해 되었으며, MMP-1의 발현은 UVB 조사한 그룹이 조사하지 않은 그룹에 비해 2배 이상 발현률이 증가하였

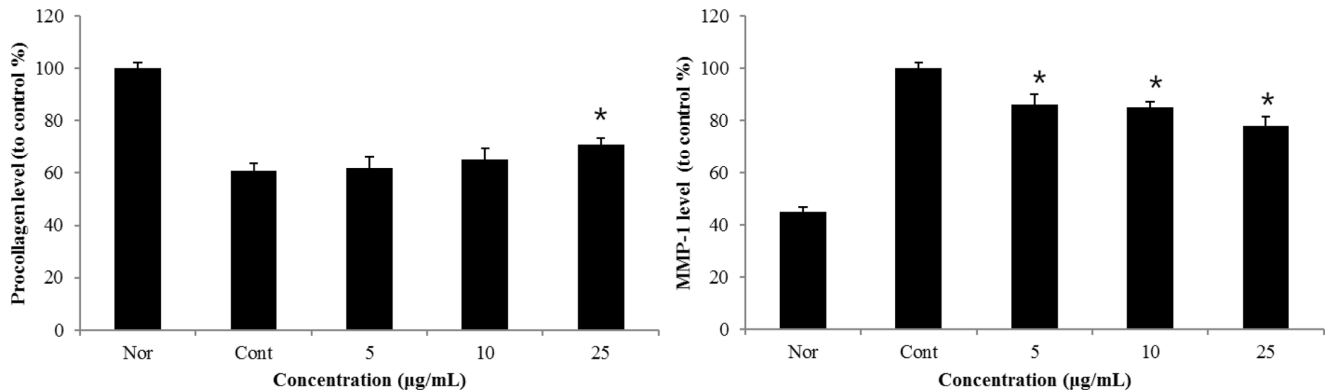


Fig. 3 Effect of casuarictin on UVB-induced pro-collagen (A) and MMP-1 (B) production in CCD-986sk human fibroblast cells. The cells were treated various concentrations of sample. The protein levels of pro-collagen and MMP-1 were determined by ELISA. The results were expressed as the average of triplicate. * $p < 0.05$ compared with control

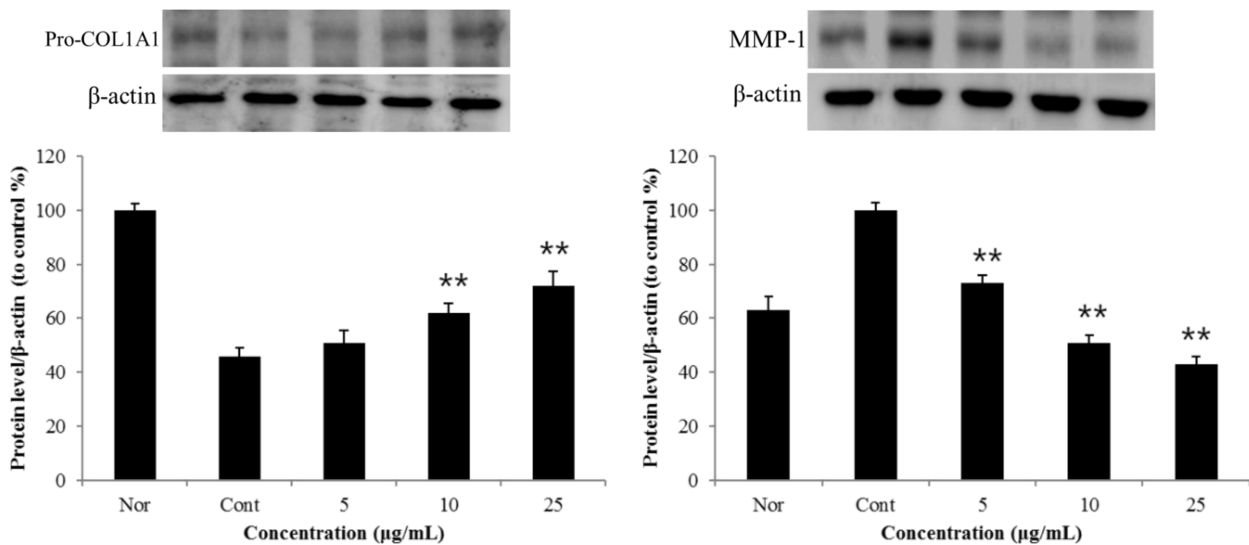


Fig. 4 Effect of casuarictin on UVB-induced pro-COL1A1 (A) and MMP-1 (B) protein expression in CCD-986sk human fibroblast cells. Cells were treated for 48 h with casuarictin (5, 10, 25 µg/mL) during UVB (20 mJ/cm²) activation. Cell lysates were prepared and the protein levels of pro-COL1A1, MMP-1 and β-actin were determined by western blotting. The results were expressed as the average of triplicate samples. ** $p < 0.01$ compared with control

다. 여기에 casuarictin을 농도별로 처리한 결과 pro-collagen protein 발현에서 대조군에 비해 20% 이상 생성량이 증가 하였으며, MMP-1 protein 발현이 최고 농도인 25 µg/mL에서 57%의 저해율을 나타내어 casuarictin의 높은 저해능을 확인하였다(Fig. 4). 따라서 casuarictin은 CCD-986sk 세포내에서 ROS와 같은 노화 인자의 생성을 억제함과 동시에 피부의 주요 구성성분인 collagen의 합성 및 분해억제 효능을 나타냄으로써 항노화 소재로서의 활용가치가 있는 것으로 판단된다.

초 록

본 연구는 새로운 기능성 화장품 소재 개발을 위해 복분자 씨

앗의 구성성분인 casuarictin을 이용하여 섬유아세포내에서의 항노화 효과를 확인 하고자 하였다. Casuarictin의 항노화 효과를 CCD-986sk 세포를 이용하여 측정한 결과, casuarictin은 UVB에 의해 증가된 ROS 발현을 억제하였으며, pro-collagen의 발현을 증가시키고 MMP-1의 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 이는 노화 인자인 활성산소종의 생성 억제와 주름과 밀접한 관련이 있는 콜라겐의 합성 및 분해억제를 통해 항산화 및 주름 개선 효과가 있는 것으로 판단되며, 따라서 casuarictin은 화장품 분야에서 항노화 소재로서의 활용가치가 있을 것으로 사료된다.

Keywords 기질금속단백질분해효소-1· 카수아릭틴· 프로콜라겐· 항노화

감사의 글 본 연구는 보건복지부 한의약선도기술개발사업(HI13C0556) 연구비 지원에 의해 수행 되었으며 이에 감사 드립니다.

References

- Afaq F, Syed DN, Malki A, Hadi N, Sarfaraz S, Kweon MH, Khan N, Zaid MA, Mukhtar H (2007) Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB mediated oxidative stress and apoptosis. *J Invest Dermatol* 127: 222–232
- Amakura Y, Okada M, Sumiko T, Tonogai Y (2000) High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J Chromato A* 896: 87–93
- Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J (2000) Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16: 239–244
- Daniel EM, Ratnayake S, Kinstle T, Stoner GD (1991) The effects of pH and rat intestinal contents on the liberation of ellagic acid from purified and crude ellagitannins. *J Nat Prod* 54: 946–952
- Demina NS, Lysenko SV (1996) Collagenolytic enzymes synthesized by microorganism. *Mikrobiologiya* 65: 293–304
- Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ (1997) Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *New Engl J Med* 337: 1419–1428
- Grant NH, Alburn HE (1959) Studies on the collagenases of *Clostridium histolyticum*. *Arch Biochem Biophys* 82: 245–255
- Han SB, Kwon SS, Kong BJ, Kim KJ, Park SN (2013) Antioxidative effect and tyrosinase inhibitory activity of the unripened fruit extract of *Rubus coreanus* Miquel. *J Soc Cosmet Sci Kor* 39: 295–302
- Ishii R, Saito K, Horie M, Shibano T, Kitanaka S, Amano F (1999) Inhibitory effects of hydrolyzable tannins from *Melastoma dodecandrum* Lour. on nitric oxide production by a murine macrophage-like cell line, RAW264.7, activated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Bio Pharm Bulletin* 22: 647–653
- Jean-Gilles D, Li L, Ma H, Yuan T, Chichester CO, Seeram NP (2012) Anti-inflammatory effects of polyphenolic-enriched red raspberry extract in an antigen-induced arthritis rat model. *J Agri Food Chem* 60: 5755–5762
- Jean LB (1995) Aging skin. *Am J Med* 8: S99–S103
- Jeroma SP, Gabrielle L, Raul F (1998) Identification of collagen fibrils in scleroderma skin. *J Invest Dermatol* 90: 48–54
- Kahkonen M, Kylli P, Ollilainen V, Salminen J, Heinonen M (2012) Antioxidant activity of isolated ellagitannins from red raspberries and cloudberrries. *J Agri Food Chem* 60: 1167–1174
- Laure RG, Fisher J (2002) UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 1: 705–720
- Lipińska L, Klewicka E, Sójka M (2014) The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 13: 289–299
- Miyamoto K, Murayama T, Nomura M, Hatano T, Yoshida T, Furukawa T, Koshiura R, Okuda T (1993) Antitumor activity and interleukin-1 induction by tannins. *Anticancer Res* 13: 37–42
- Nagase H, Woessner JF (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274: 21491–21494
- Okuda T, Yoshida T, Ashida M, Yazaki K (1983) Tannins of Casuarina and Stachyurus species. I: Structures of pendunculagin, casuarictin, strictinin, casuarinin, casuariin, and stachyurin. *J Chem Soc* 8: 1765–1772
- Parfitt AM, Simon LS, Villanueva AR, Krane SM (1987) Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. Correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J Bone Miner Res* 2: 427–436
- Park K, Lee JH (2008) Protective effects of resveratrol on UVB-irradiated HaCaT cells through attenuation of the caspase pathway. *Oncol Rep* 19: 413–417
- Park SH, Hong YM, Choi YJ, Choi JH, Kim BK (2008) Antiwrinkle effects of Mugwort (*Artemisia vulgaris*) extracts on UVB-irradiated hairless mouse skin. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1136–1141
- Park SH, Lee KH, Han CS, Kim KH, Kim YH (2010) Inhibitory effects of *Carex humilis* extract on elastase activity and matrix metalloproteinase-1 expression. *J Soc Cosmet Sci Kor* 36: 129–136
- Pentland AP, Shapiro SD, Welgus HG (1995) Agonist-induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases and metalloproteinases by human macrophages is regulated by endogenous prostaglandin E2 synthesis. *J Invest Dermatol* 104: 52–57
- Rangkadiloka N, Sithimonchaib S, Worasuttayangkurma L, Mahidolc C, Ruchirawatb M, aSatayavivad J (2007) Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract. *Food and Chem Toxicol* 45: 328–336
- So SH, Lee SK, Hwang EI, Koo BS, Han GH, Lee MJ, Kim NM (2008) Mechanism of Korea red ginseng and herb extract (KTNG0345) for anti-wrinkle activity. *J Ginseng Res* 32: 39–47
- Talwar HS, Griffiths CE, Fisher GJ, Hamilton TA, Voorhees JJ (1995) Reduced type I type III procollagens in photodamaged adult human skin. *J Invest Dermatol* 105: 285–290
- Yoon I, Wee JH, Moon JH, Ahn TH, Park KH (2003) Isolation and identification of quercetin with antioxidative activity from the fruits of *Rubus coreanus* Miquel. *Kor J Food Sci Technol* 35: 499–502