

Photoprotective Effect of Grape Pruning Stem Extracts on the UVB Induced HR-1 Mice Skin

Joung-Hee Kim¹, Jong Guk Kim², Sun-Gun Kim³, Seung-IL Jeong⁴, Min-Jung Jang⁵, Kil-Soo Kim⁶, Keuk-Jun Kim⁷ and Seung-Jun Kwack^{1*}

¹Department of Bio Health Science, College of Natural Science, Changwon National University, Changwon, Gyeongnam 51140, Korea

²School of Life Sciences & Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

³Traditional Korean Medicine Technology Division R&D Department Herbal Medicine Team, Gyeongsan, Gyeongbuk 38540, Korea

⁴Jeonju Agrobio-Materials Institute, Jeonju 54810, Korea

⁵Human Cosmetic Co., Ltd. R&D Center, Gyeongsan, Gyeongbuk 38578, Korea

⁶Department of Veterinary Toxicology, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

⁷Department of Biomedical Laboratory Science DaeKyeung University, Gyeongsan, Gyeongbuk 38547, Korea

Received November 14, 2016 / Revised November 16, 2016 / Accepted November 16, 2016

This study intends to analyze the contents of rutin, procyanidin B3, quercetin, kaempferol, known to have antioxidant, anti-inflammatory and anti-carcinogenic effects, among the polyphenol type contained in the grape pruning stem extracts (GPSE), utilizing grape stems being discarded after harvest, measure the effects on the skin moisture, inhibition of skin cell proliferation, anti-inflammatory on the damaged skin of a HR-1 mice induced with UVB, and verify the applicability as a material for functional food and functional cosmetics. The results of verifying the photoprotection effects through the skin proliferation control through of GPSE showed similar result to sunscreen was achieved at the GPSE concentration of 2,000 mg/kg on the epidermis ($p < 0.05$). The results showed anti-inflammatory effects on all groups applied with GPSE as compared to the control group irradiated with UVB, but at the GPSE concentration of 1,000 mg/kg, a lower COX-2 protein expression at 8%, lower than the 22% of sunscreen, was observed to achieve an excellent anti-inflammatory effect ($p < 0.05$). The results of this study confirmed the existence of active polyphenol type, such as rutin, kaempferol, quercetin and procyanidin B3, within the GPSE, and GPSE has improvement effects on moisturizing effects, skin proliferation control effect, inflammatory control effect and improvement effects on the skin barrier function through UV ray damage. GPSE is a functional ingredient with a potential for skin protection effects, and has high utilization as an ingredient for functional food and functional cosmetics.

Key words : Grape pruning stem, photoprotective effect, polyphenol, skin barrier, UVB

서론

Ultraviolet B (UVB)를 피부에 조사하면 다양한 피부세포와 조직 특히 표피에 손상을 일으키고 염증과 DNA 손상, 결국에는 apoptosis를 유도한다[6, 13]. 활성산소(ROS)는 피부에 UVB가 조사되면 염증과 apoptosis를 진행시키는 주된 역할을 하고 있다[6, 13]. Carotenoids, glutathione, vitamin C (ascorbic acid), 그리고 vitamin E (α -tocopherol)와 같은 천연 항산화제는 UVB에 조사된 피부손상을 보호한다고 보고되고 있다[6, 7, 11]. 포도전정가지는 사료용으로 소량 이용되거나 전량 폐

기되고 있으며 이를 처리하는 비용도 막대하다[10]. 국내에서 육성된 포도품종과 현재 우리나라에서 많이 재배되고 있는 캠벨엘리, Muscat Bailey A (MBA)품종의 부위별 주요 폴리페놀 화합물의 함량을 분석하여 다양한 포도 가공품의 개발 및 이용을 위한 자료도 보고되고 있다. 전체 포도 품종의 부위별 함량 비교에서는 전반적으로 송이줄기에서 가장 높은 함량을 나타내었고, 과육에서 가장 낮은 함량을 나타내었다. 따라서, 품종 또는 부위에 따라 함량의 차이가 큰 것으로 보고되었다 [2, 9]. Dragsted 등[3]은 포도의 부위별 폴리페놀 함량이 버려지는 포도부산물에서도 폴리페놀류가 다량 함유되어 있으며 폴리페놀 성분 중 항산화제(polyphenolic antioxidants)가 산화적 스트레스 및 염증과 관련된 질환의 예방 및 치료제로서 많이 연구되고 있다. 그 중 포도(*Vitis vinifera*)에서 유래되는 페놀성 화합물이 천연항산화제로서의 역할이 크게 대두되고 있다[9]. Tournour 등[12]은 포르투갈산 포도주 부산물의 총 페놀함량은 69.3 mg/GAE g이었고 주요 페놀화합물은 synerigni acid와 (+)-catechin 이었다고 보고하였다. Hwang 등[1]

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3556, Fax : +82-55-213-3550

E-mail : sjkwack@changwon.ac.kr

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.

은 포도씨의 품종에 따른 총 페놀 함량과 proanthocyanidin의 함량을 측정된 결과 총 페놀 함량은 16.71~28.60 mg/100 g, proanthocyanidin 함량은 18.36~55.30 g/100 g을 나타내었다고 보고하였다[5, 15]. 본 연구는 포도전정가지로부터 폴리페놀류와 같은 유효성분을 추출, 수율 및 성분을 분석하여 자외선으로부터 발생하는 피부손상 회복에 도움을 주는 보습, 항염증, 피부증식억제 및 광보호 효과를 증명하고자 한다.

재료 및 방법

추출 및 분획

본 연구에 사용된 포도전정가지는 경상북도 경산시 오봉지길 일대에서 재배된 캠벨얼리의 전정가지를 사용하였다. 포도전정가지 1 kg에 80% EtOH을 첨가하여 60°C에서 90분 동안 추출한 후 추출액을 No. 2 filter paper로 여과하였다. 여과액을 진공회전농축기를 사용하여 농축하고, 동결 건조한 후 실험에 사용하였다.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용한 포도전정가지 성분 분석

분석에 사용된 표준물질인 Procyanidin B3, rutin, quercetin, kaempferol은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 각 표준물질의 순도는 99.0% 이상이었다. HPLC 분석을 위한 물, acetonitrile은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며, Formic acid는 특급시약으로 Junsei (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 함량분석을 위한 HPLC는 Shimadzu사의 LC-20A 시리즈(Kyoto, Japan)를 사용하였으며, 이 시스템은 pump (LC-20AT), on-line degasser (DGU-20A3), column oven (CTO-20A), autosampler (SIL-20AC) 및 PDA detector (SPDM20A)로 구성되어 있다. 분석 결과는 Shimadzu사의 software인 LC solution software (Version 1.24)를 이용하여 처리하였다. 성분의 정량 분석은 크로마토그래피 방법을 이용하여 Shimadzu사의 LC-20A 시리즈 HPLC (Shimadzu, Corp., Kyoto, Japan)로 분석하였다. 분석조건으로 column은 Waters Sunfire C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)을 사용하였으며 column 온도는 40°C, 샘플 주입량은 20 μl, 검출기는 UV detector를 이용하여 280 nm에서 측정하였다. 그리고 이동상은 0.1%(v/v) formic acid가 함유된 물(A)과 0.1%(v/v) formic acid가 함유된 acetonitrile(B)을 사용하여 다음과 같이 기울기 용매조건(2% B (0 min), 35% B (25 min), 100% B (40 min), 5% B (45.10 min), 5% B (50 min))으로 흘려주었으며 유속은 1.0 ml/min로 진행하였다.

실험동물

실험동물은 7주령의 암컷 HR/ICR Albino hairless (HOSINO Laboratory Animal, Japan SLC, Inc.)를 중앙실험

동물로부터 구입하였으며, 1주간 사육실 환경에 적응시킨 후 체중 약 32 g의 7주령 마우스를 실험에 사용하였다. 총 120마리의 마우스를 8개의 실험 군에 각 실험군당 5마리씩 무작위로 배치하였으며, polysulfone 케이지에서 사육하였다. 사료와 물은 자유로이 공급하였다. 사육실은 온도 22±1°C, 상대습도 50±5%, 조명주기 12시간씩, 환기방식 및 회수 10회/hr, 조도 150~300 lux를 유지하였다. 본 실험을 위하여 영남대학교의과대학 동물실험윤리위원회에서 승인을 받은 후 실험을 진행하였다(YUMC-AEC2014-017).

피부 손상회복을 위한 *in vivo* 응 시료 제조 및 자외선 조사

피부 손상회복 정도를 측정하기 위해 *in vivo* 실험에 사용된 GPSE와의 혼합 사용하는 serum base는 한국 콜마에서 구입하였다. GPSE를 serum base에 125, 250, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg의 농도로 용해시켜 시험물질을 제조하였다. 시험물질은 0.2 ml를 취하여 주 7회 일정한 양을 등쪽 면에 12주간 도포하였다. 실험 군은 정상군(normal control group, NC): 아무런 처치를 하지 않은 군, UVB 대조군(UVB group, UVB): 자외선 조사+serum base 도포군, 양성대조군(UVB+SC): 자외선 조사+suncream 도포군, GPSE 도포군(UVB+GPSE): 자외선 조사+GPSE 125, 250, 500, 1,000, 2,000 mg/kg 도포군 의 총 8개 실험 군으로 하였다. 실험동물의 체중은 실험 시작 직전과 실험기간 동안 매주 1회 측정하였다. UVB 조사는 광원으로 UVB lamp GL20SE (Sankyo denki, Japan)를 이용하여 제작한 UVB 조사기를 사용하였으며 광량은 Solarmeter (Solartech, USA)로 측정하였다. 자외선 조사용 cage를 이용하여 실험동물의 등부위에 균등하게 초기 1주부터 3주까지는 60 mJ/cm², 4주부터 6주까지는 90 mJ/cm², 7주부터 12주까지는 120 mJ/cm²의 광량으로 격일 간격으로 1주일에 3회, 12주 동안 조사하였다.

TEWL assay

UVB를 조사한 후 12주째 TEWAMETER TM210[®] (COURAGE +KHAZAKA Electronic GmbH, Cologne, Germany) 수화도 측정기로 분석하였다.

피부 증식의 측정을 위한 Hematoxylin & Eosin 염색

피부 손상 회복 정도를 측정하기 위해 GPSE 도포 후 UVB를 조사한 실험동물의 피부를 10% 포르말린에 24시간 동안 고정하였다. 고정된 조직을 절취하여 자동침투기에서 파라핀을 침투시킨 후 포매하여 4 μm 두께로 절편을 제작하고 60°C에서 배양한 후 탈파라핀, 함수과정을 거쳐 핵을 염색하기 위해 harris hematoxylin 용액에 7분 염색 후 수세, 감별, 청화과정을 거친 후 eosin용액에 3분간 염색 후 탈수, 투명, 봉입하였다. ImageScope (Aperio, USA)를 사용, 디지털 슬라이드로 스캔하여 Aperio imagescope viewer 프로그램을 사용, 피부 두께를 측정하였다.

COX-2 단백질 발현 정도를 분석하기 위한 면역조직화학적 염색

UVB에 의한 피부손상의 염증 회복 정도를 정량적으로 평가하기 위해 anti- Rabbit COX-2 (dilution ratio 1:100, abcam, USA) 항체를 사용, 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 조직 절편을 탈 파라핀 후 흡수과정을 거쳐 내인성과 산화효소를 제거하기 위하여 3% H₂O₂에 10분간 처리하였다. 수세 후 포름알데히드에 의해 감추어진 항원결합부위인 epitope site를 부활시키기 위해 citric acid buffer pH 6.0 용액에 슬라이드를 넣고 120℃ 10분간 autoclave 한 후 실온에 20분간 식히고 수세 후 1차 항체 COX-2 항체를 60분간 반응시킨 후 TBS buffer에 5분간 3회 수세, 2차 항체인 DAKO EnVision+HRP detection system kit를 사용 30분간 반응시킨 후 TBS buffer에 5분간 3회 수세 후 DAB (3,3'-Diaminobenzidine)로 발색 시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 하여 수세, 탈수, 투명, 봉입하였다. DP71 microscope digital camera (Olympus, Japan) 현미경 디지털 카메라를 사용, 이미지를 획득한 후 Leopard (zotos, korea) 프로그램을 사용, COX-2에 염색된 정도를 정량적으로 측정하였다.

통계학적 분석

본 연구에서 결과 자료 분석을 위해 SPSS (v12.0) 통계프로

그램을 사용하였으며, Student's t-test를 이용하여 유의수준 ($p < 0.05$)에서 통계학적 성을 검증하였다.

결과 및 고찰

포도전정가지 추출물의 유효성분 수율분석

포도전정가지의 유효성분 추출은 시료 53 kg을 전달하여 최종 포도전정가지 추출물을 2.342 kg을 추출하였다.

$$\frac{2.342 \text{ kg}}{53 \text{ kg}} \times 100 = 4.42\% \text{ 수율 결과를 얻었다.}$$

포도전정가지 추출물의 성분 분석결과

포도전정가지의 주요성분에 대한 함량분석을 위한 검량선은 상관계수(r^2)를 구하여 직선성을 판단하였으며, 4종 성분에 대한 검량선 작성 결과 상관 계수(r^2) 값이 0.9998 이상으로 1.0에 가까운 양호한 직선성을 나타내었다. 검액에서의 피크 확인은 표준물질의 피크머무름 시간과 UV 흡수 파장을 비교하여 확인하였다. Procyanidin B3, rutin, quercetin 및 kaempferol 4종의 성분은 22.48분, 33.57분, 34.21분 및 34.73분에 각각 검출되었다(Fig. 1).

설정된 HPLC PDA 분석법으로 포도전정가지의 4종 성분에 대한 함량 분석을 실시한 결과, Procyanidin B3, 0.28 mg/g,

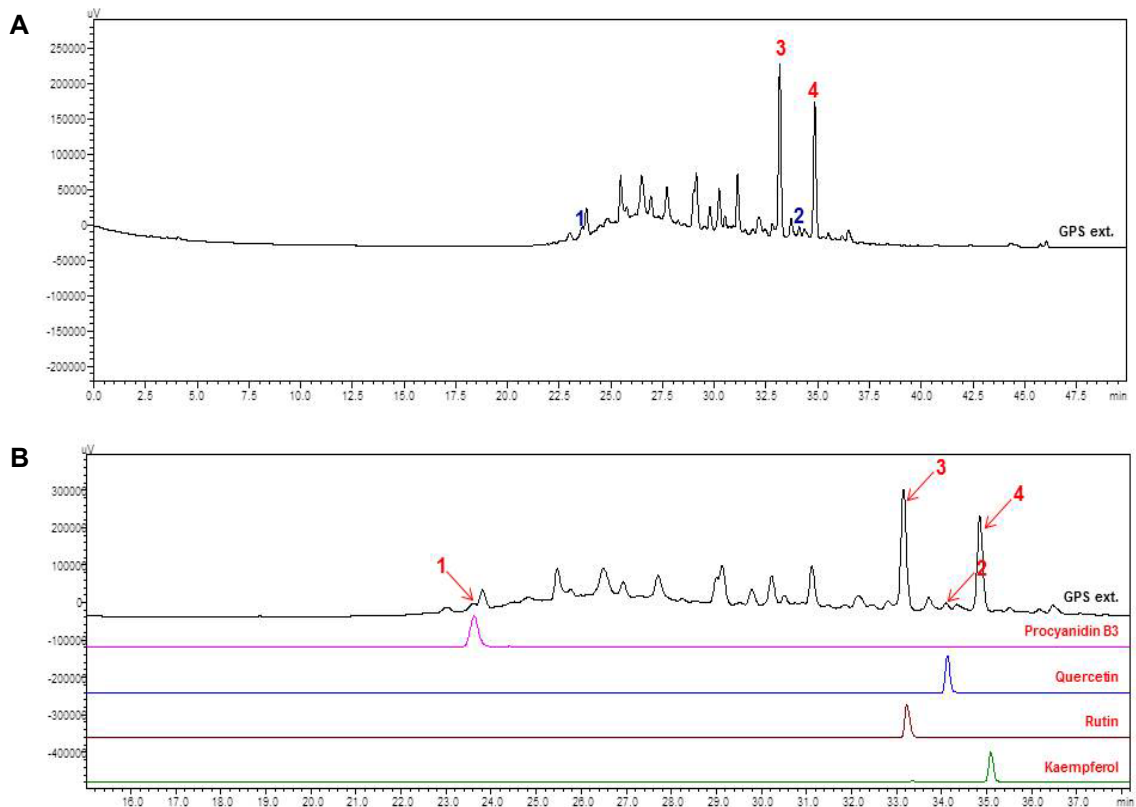


Fig. 1. HPLC chromatograms of EBT and marker compounds. (A) The pattern of standard compounds. (B) The pattern of EBT (1. Procyanidin B3; 2. Rutin; 3. Quercetin; 4. Kaempferol).

Table 1. Results of chemical composition analysis of Grape pruning stem extract

Components	Area (%)			
	Procyanidin B3	Rutin	Quercetin	Kaempferol
Grape pruning stem extract	0.28	12.81	0.51	8.24

rutin 12.81 mg/g, quercetin 0.51 mg/g 및 kaempferol 8.24 mg/g로 나타났다(Table 1).

수화도(transepidermal water loss) 측정 결과

UVB를 조사한 후 12주째 TEWAMETER TM210[®] (COURAGE+KHAZAKA Electronic GmbH, Cologne, Germany) 수화도 측정기로 분석 하였다. 결과 정상군(NC)과 비교하였을 때 UVB를 조사한 군에서는 건조도가 약 99 g/m²/jh로 높았고 수화도는 약 39 g/m²/jh로 낮게 나타나 자외선을 조사하면 피부가 건조해지고 수화도가 낮다는 것을 알 수 있다. 반면 suncream을 도포한 그룹과 포도전정가지 추출물 혼합물을 농도의존적으로 도포한 군에서 수화도가 좋은 결과를 나타내었다. Suncream과 비교하였을 때 큰 차이는 없지만, 포도전정가지 추출물과 serum base만으로도 UVB 조사에 대한 방어능력이 있음을 알 수 있었다. Suncream을 도포하지 않고 serum base와 포도전정가지 추출물(GPSE)을 농도 의존적으로 도포하였을 때, GPSE와 serum base의 혼합물 농도 2,000 mg/kg~125 mg/kg 모두에서 수화도가 좋은 결과를 얻었다 ($p<0.05$) (Fig. 2).

포도전정가지 추출물의 피부증식 억제를 통한 광보호 효과

포도전정가지추출물(GPSE)과 serum base와 혼합하여 GPSE의 피부증식 억제 효과를 관찰하기 위하여 UVB를 12주 동안 조사한 후 생검하여 10% 포르말린 고정 후 파라핀 포매, Hematoxylin and Eosin 염색을 하여 표피의 두께와 진피의 두께를 측정하였다. 표피와 진피의 두께 측정 결과 정상군

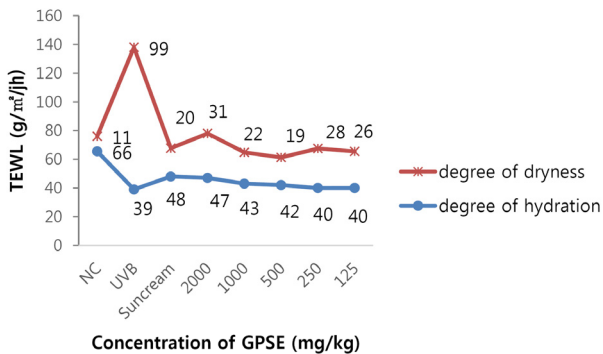


Fig. 2. The change of TEWL of GPSE in UVB-induced HR-1 hairless mice.

(NC) 표피 20.18 mm, 진피 351 μm의 두께로 나타났고, sun-cream 을 도포한 그룹의 표피 두께 33.72 μm, 진피 539.4 μm의 두께로 나타나 정상군에 가장 근접한 결과로 나타났다. sun-cream을 도포하지 않고 serum base와 포도전정가지 추출물 (GPSE)을 농도 의존적으로 도포하였을 때, GPSE와 serum base의 혼합물 농도 2,000 mg/kg (표피 38.67 μm, 진피 539.3 μm)에서 가장 효과가 좋은 결과를 얻었다. 표피는 GPSE의 농도 의존적인 결과가 나타나지 않았지만, 진피는 농도 의존적으로 두께가 감소하는 결과를 보였다(* $p<0.05$, ** $p<0.01$) (Fig. 3).

포도전정가지 추출물의 항 염증 효과

UVB를 조사한 후 12주째 생검하여 10% 포르말린 고정 후 파라핀 포매, 면역조직화학적 염색을 하여 염증시 과발현하는 COX-2의 단백발현을 관찰하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 정상군(NC)과 비교하였을 때 UVB를 조사한 그룹에서 COX-2가 과 발현하였고, serum base와 포도전정가지추출물(GPSE)을 농도 의존적으로 도포하였을 때, GPSE와 serum base의 혼합물 농도 1,000 mg/kg에서 가장 좋은 결과를 얻었다($p<0.05$)(Fig. 4).

본 연구는 경상지역 포도농가에서 포도 수확 후 버려지는 포도전정가지에서 폴리페놀류와 같은 항산화 물질을 추출하여 유효성분을 분석하고 UVB로 유도된 피부장벽 손상에 대한 보습, 피부증식 억제, 항염증효과를 증명하고자 *in vitro* 실험 후 *in vivo* 실험 결과를 관찰하였다. 선행연구에서는 포도 부위별 폴리페놀류 함량이 품종과 부위에 따라 차이가 있다고 나타났고, 과피에서는 캄벨얼리(0.26 mg/g)와 흑보석(0.61 mg/g) 품종에서만 검출되었고, 포도전정가지에서는 MBA 품종 (1.76 mg/g)에서 가장 높은 catechin 함량이 있다고 보고된 바 있다[2]. 본 연구는 포도전정가지의 유효성분 분석 결과, procyanidin B3 (0.28 mg/g), rutin (12.81 mg/g), quercetin (0.51 mg/g) 및 kaempferol (8.24 mg/g)로 나타나 폴리페놀류 중 Rutin (12.81 mg/g)의 함량이 가장 높은 것으로 나타나(Fig. 1), 포도나무 품종과 부위에 따라 차이가 있음을 확인하였다. 포도나무 어린가지로부터 resveratrol, viniferin 등의 페놀성 화합물이 항산화효과[14], 항염증효과, 항암효과 등 기능성 식품, 화장품 등의 원료로서의 활용성이 높다고 보고된 바 있다 [4]. 본 연구 결과 페놀성 화합물이 보습효과가 있음을 확인하였고(Fig. 2), GPSE가 UVB로 유도된 피부장벽 손상에 대한 증식 억제효과(Fig. 3)와 염증시 과발현하는 COX-2 단백발현 역시 억제하는 효과도 얻을 수 있었다(Fig. 4). 이상의 결과로 포도전정가지로부터 rutin, kaempferol, quercetin, procyanidin B3 등의 페놀성 화합물이 화장품 기초원료인 serum base에 함유되도록 제조된 GPSE는 보습효과, 피부증식억제효과, 염증발현억제효과 및 자외선에 의한 피부손상 기능개선효과의 결과를 보여, 항염증제로서의 가능성이 있으며, 원료물질, 기

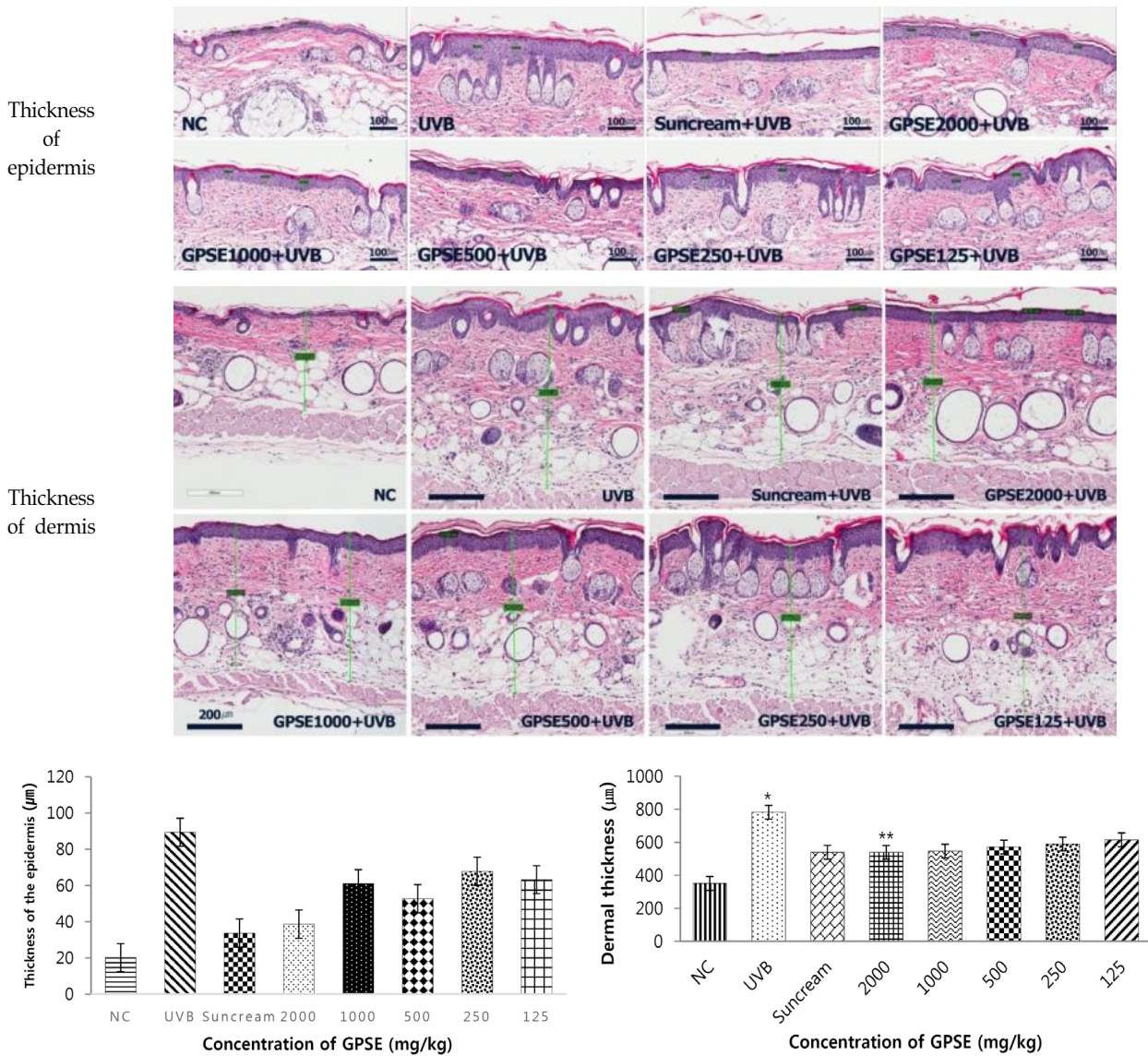


Fig. 3. GPSE diminishes UVB-induced epidermal and dermal thickness in HR-1 hairless mice. Skin tissue sections were stained with H&E in epidermal skin (x200). Skin thickness was measured with a ScanScope Image Analyzer (Aperio, USA) between the neck and hips at 12 weeks. Hematoxylin and eosin staining of the dorsal skin from sharm (NC), UVB-irradiated (UVB), UVB-irradiated and treated with suncream (Suncream+UVB), UVB-irradiated and treated with GPSE dose dependently (GPSE 2,000, 1,000, 500, 250, 125+UVB). Scale bars, 100 µm (epidermis image), 200 µm (dermis image). error bars indicate the means and standard deviations for three independent measurements. The statistical analysis data was carried out by use of a t-test . * $p<0.05$, ** $p<0.01$ compared to control (each experiment's, n=5).

능성 식품, 화장품 등의 원료로서의 활용성이 높을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2013년도 기술혁신개발사업(No. S2085017)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

1. Baek, J. Y. and Lim, S. Y. 2016. Flavonoid and phenol contents and antioxidant effect of wine by-product extracts. *J. Life Sci.* 8, 948-954.
2. Chang, E. H., Jeong, S. M., Park, K. S. and Lim, B. S. 2013. Contents of phenolic compounds and trans-resveratrol in different parts of Korean new grape cultivars. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 6, 708-713.
3. Dragsted, L. O. 1998. Natural antioxidants in chemoprevention. *Arch. Toxicol.* 20, 209-226.

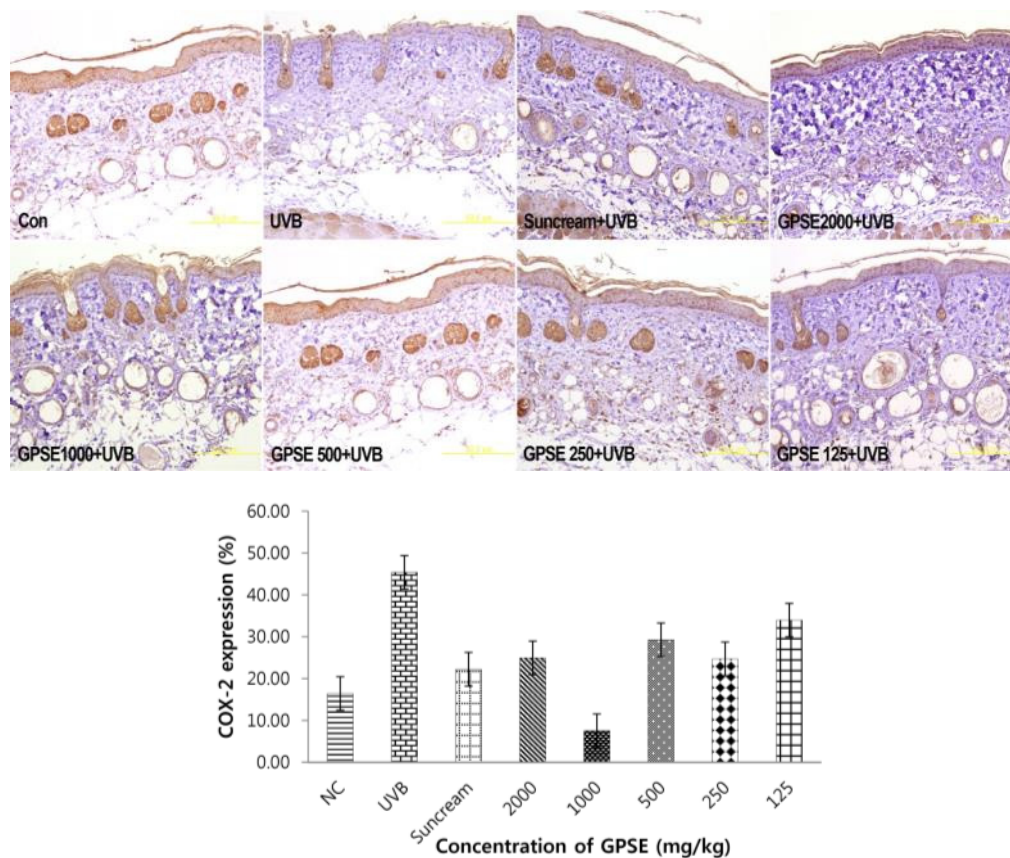


Fig. 4. GPSE diminishes UVB-induced inflammation in HR-1 hairless mice. Skin tissue sections were stained with COX-2 immunohistochemical stain in skin (x200). COX-2 expression was measured with a Leopard Image Analyzer (zootos, Korea) between the neck and hips at 12 weeks. Immunohistochemical staining of the dorsal skin from sham (NC), UVB-irradiated (UVB), UVB-irradiated and treated with suncream (Suncream+UVB), UVB-irradiated and treated with GPSE dose dependently (GPSE 2,000, 1,000, 500, 250, 125+UVB). Scale bars, 500 μ m. error bars indicate the means and standard deviations for three independent measurements. The statistical analysis data was carried out by use of a t-test. $p < 0.05$, compared to control (each experiment's, $n=5$)

- Hur, S. K., Kim, S. S., Heo, Y. H., Ahn, S. M., Lee, B. G., and Lee, S. K. 2001. Effect of the grapevine shoot extract on free radical scavenging activity and inhibition of pro-inflammatory mediator production in RAW264.7 macrophages. *J. Appl. Pharmacol.* **9**, 119.
- Hwang, I. W., Lee, H. R., Kim, S. K., Zheng, H. Z., Choi, J. U., Lee, S. H., Lee, S. H. and Chung, S. K. 2008. Proanthocyanidin content and antioxidant characteristics of grape seeds. *Kor. J. Food Preserv.* **15**, 859-863.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyo, A., Bito, T. and Oka, M., et al. 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology* **189**, 21-39.
- Kang, J. S., Kim, H. N., Jung, D. J., Kim, J. E. and Mun, G. H., et al. 2007. Regulation of UVB-induced IL-8 and MCP-1 production in skin keratinocytes by increasing vitamin C uptake via the redistribution of SVCT-1 from the cytosol to the membrane. *J. Invest Dermatol.* **127**, 698-706.
- Mukhtar, H. and Agarwal, R. 1996. Skin cancer chemoprevention. *J. Invest. Dermatol. Sym. Proc.* **1**, 209-214.
- Ruggieri, L., Cadena, E., Martinez-Blanco, J., Gasol, C. M., Rieradevall, J., Gabarrell, X., Gea, T., Sort, X. and Sanchez, A. 2009. Recovery of organic wastes in the spanish wine industry. Technical, economic and environmental analyses of the composting process. *J. Cleaner Prod.* **17**, 830-838.
- Shin, H. J., Kang, B. S., Ahn, J. B. and Kim, B. H. 2007. Isolation and purification of resveratrol from a grape twig. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **22**, 351-355.
- Stahl, W. and Sies, H. 2012. beta-Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. *Am. J. Clin. Nutr.* **96**, 1179S-1184S.
- Tournour, H. H., Segundo, M. A., Magalhaes, L. M. and Barreiros, L. 2015. Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Ind. Crops Prod.* **74**, 397-406.
- Yaar, M. and Gilchrist, B. 2007. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br. J. Dermatol.* **157**, 874-887.
- Yang, J. H., Baek, S. H., Park, D. W., Jun, D. H., Kim, G. J. and Jang, M. J. 2014. *In vitro* activities of grape pruning stems for application of cosmetic ingredients. *J. Life Sci.* **24**, 651.

15. Yoon, Y. M., Bae, S. H., An, S. K., Choe, Y. B., Ahn, K. J. and An, S. 2013. Effects of ultraviolet radiation on the

skin and skin cell signaling pathways. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **3**, 417-426.

초록 : 포도전정가지 추출물이 UVB에 유도된 HR-1 mice의 피부손상에 대한 광보호 효과

김정희¹ · 김종국² · 김선건³ · 정승일⁴ · 장민정⁵ · 김길수⁶ · 김극준⁷ · 곽승준^{1*}

(¹창원대학교 생명공학과정 향장미용전공, ²경북대학교 생명과학부, ³한약진흥재단 연구개발부, ⁴전주농생명소재 연구원, ⁵㈜휴먼 코스메틱 피부과학 연구소 ⁶경북대학교 수의과대학, ⁷대경대학교 임상병리과)

본 연구는 포도수확 후 버려지는 가지를 이용한 포도전정가지 추출물(Grape Pruning Stem Extracts, GPSE)에 함유된 polyphenol류 중 항산화, 항염증, 항암 등의 효과가 있다고 알려진 rutin, procyanidin B3, quercetin, kaempferol의 함량을 분석하고, UVB로 유도된 HR-1 mice의 손상된 피부에 대한 피부 보습, 피부 증식 억제, 항염증 등의 효과를 측정하여 기능성식품, 기능성 화장품 소재로서의 응용 가능성을 확인하고자 하였다. 포도전정가지에서 polyphenol 성분을 80% EtOH로 추출하고 여과하여 농축한 후, 동결건조하여 -20℃에 보관하면서 사용하였다. GPSE의 유효성분 함량은 HPLC를 사용하여 분석하였다. 피부손상을 유도하기 위해 UVB를 실험동물에 조사하였고, GPSE의 효능을 확인하기 위하여 TEWL assay, 피부조직의 H&E staining 및 COX-2 단백질 발현 측정을 위한 면역조직화학적염색(immunohistochemical stain) 등을 실시하였다. 포도전정가지 시료 53 kg에서 EtOH 분획 추출물 2.34 kg을 추출하여 4.42%의 수율 결과를 얻었다. 유효성분 분석 결과, procyanidin B3, 0.28 mg/g, rutin 12.81 mg/g, quercetin 0.51 mg/g 및 kaempferol 8.24 mg/g로 나타났다. TEWL assay 결과 대조군과 비교, GPSE와 serum base의 혼합물이 도포된 그룹(농도 2,000 mg/kg~125 mg/kg)에서 모두 보습효과가 있는 것을 확인하였다($p < 0.05$). GPSE의 피부증식억제를 통한 광보호 효과를 확인한 결과 epidermis에는 GPSE 농도 2,000 mg/kg의 농도에서 suncream과 유사한 결과를 얻을 수 있었고($p < 0.05$), dermis의 두께를 측정한 결과 GPSE 농도 2,000 mg/kg~125 mg/kg 모든 농도에서 UVB 조사한 그룹 두께 800 μ m와 비교하여 suncream 도포군이 580 μ m, GPSE 2,000 mg/kg~125 mg/kg 모든 농도에서 600 μ m이하로 나타나 UVB에 의해 손상된 HR-1 mice의 피부증식억제를 확인할 수 있었다($p < 0.05$). GPSE가 UVB에 의해 손상된 HR-1 mice 피부에 항염증 정도를 확인하기 위해 COX-2 단백질 발현을 보기위해 immunohistochemical stain한 결과 UVB를 조사한 대조군에 비해 GPSE를 도포한 그룹 모두에서 항염증 효과를 보였지만, GPSE의 농도 1,000 mg/kg에서는 suncream 22%보다 낮은 8%에서 COX-2의 단백질 발현이 낮은 것으로 나타나 우수한 항염증효과를 얻을 수 있었다($p < 0.05$). 본 연구 결과에서, GPSE 내 rutin, kaempferol, quercetin, procyanidin B3와 같은 유효성 폐놀성 화합물이 확인되었으며, GPSE는 보습효과, 피부증식억제효과, 염증발현억제효과 및 자외선 손상에 의한 피부장벽 기능 개선효과 등이 있는 것으로 확인되었다. 결론적으로 GPSE는 피부보호 효과의 가능성이 있는 기능성 물질로서 기능성 식품 및 기능성 화장품 등의 원료로 활용성이 높을 것으로 판단된다.