

UVB에 조사된 HaCaT Keratinocytes에서의 유색미에 의한 Matrix Metalloproteinases 발현억제 메커니즘

최은영¹ · 이재봉¹ · 김도훈² · 권용삼² · 천정윤³ · 이진태¹

¹대구한의대학교 화장품약리학과

²동아대학교 생명자원과학대학 유전공학과

³(주)튜링겐코리아 품질보증팀

Mechanisms of Suppression of Matrix Metalloproteinases in UVB-Irradiated HaCaT Keratinocytes of Colored Rice Varieties

Eun-Young Choi¹, Jae-Bong Lee¹, Do-Hoon Kim², Yong-Sham Kwon²,
Jung-Yoon Cheon³, and Jin-Tae Lee¹

¹Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University

²Department of Genetics Engineering, College of Natural Resource & Life Science, Dong-A University

³Quality Assurance Team, Thuringen Korea Co., Ltd.

ABSTRACT In this study, we investigated the anti-oxidant activities [electron-donating ability (EDA), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging ability, and reactive oxygen species (ROS) inhibitory activity], anti-wrinkle activities [collagenase inhibitory activity, suppression and/or phosphorylation of matrix metalloproteinases (MMPs), and mitogen-activated protein (MAP) kinase activity], and mRNA expression levels using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in ultraviolet (UV) B ray (50 mJ/cm²)-irradiated human keratinocyte HaCaT cells. Josaengheugchal, Sinneungheugchal (SE), Shintoheug rice, Heugjinju rice, and Heugseol (HE) among colored rice varieties were reported to have excellent antioxidant properties. In the EDA and ABTS radical scavenging assays, extracts of the five colored rice varieties had scavenging activities of 72% at concentrations higher 50 µg/mL. In the collagenase inhibition assay, ethanol extracts of the five colored rice varieties showed high inhibitory effects of about 60% at concentrations higher 25 µg/mL. In the ROS inhibition assay, ethanol extracts of HE and SE showed very excellent inhibition efficacies at all concentrations. We determined molecular biological mechanisms of MMPs (MMP-1, -3, -8, and -13) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) with HE, and the results show that HE suppressed expression of MMPs and phosphorylation of MAPK and increased expression of pro-collagen type I in UVB-irradiated cells. It was also confirmed by RT-PCR that HE reduced expression of MMPs mRNA. Therefore, these results suggest that HE has anti-wrinkle and collagen production effects and may be used as a material in the development of functional food and cosmetic industries.

Key words: anti-wrinkle, collagen type I, colored rice, matrix metalloproteinases, mitogen-activated protein kinase

서 론

우리나라 주식인 쌀은 최대 농산물로 우리나라뿐 아니라 아시아, 아프리카, 라틴 아메리카 등 세계적으로 주요한 주식으로 이용되는 주요 곡물이다(1). 건강 기능성에 대한 국민의 관심이 높아지고, 건강한 식품에 대한 선호도가 증대되면서 주식인 쌀에도 현미 상태로 섭취하는 유색미 소비가 많이 증가하였다(2). 우리나라에서 유통되는 유색미는 대표

적으로 흑미와 적미 등이 있으며, 산지와 품종에 따라 여러 종류가 있다(3). 품종에 따라 과피의 색이 적갈색, 흑자색, 녹색 등에 이르는 다양한 유색미들은 다양한 천연색소를 함유하고 있는데(4), 일반적으로 흑자색 현미는 안토시아닌이 풍부하며 적갈색 현미는 탄닌이 포함된 것으로 알려져 있다. 적미는 탄닌계 색소뿐만 아니라 catechin 및 catechol tannin 등 다양한 성분을 함유한다고 보고된 바 있다(5). 흑미는 비교적 강한 free radical 제거능 및 항산화 효과가 있는 것으로 보고되었으며(6), polyphenolics, flavonoids, anthocyanins, vitamins, γ-oryzanol 등 기능성 성분들을 함유하고 있어 이러한 생리활성 성분들이 체내에서 항산화 기능을 나타내는 것으로 보고되고 있다(7). 흑미의 안토시아닌은 cyanidin, peonidin의 배당체가 주성분이고, 그중 cya-

Received 9 February 2017; Accepted 10 April 2017

Corresponding author: Eun-Young Choi, Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongsan, Gyeongbuk 38578, Korea

E-mail: eychoi@dhu.ac.kr, Phone: +82-53-819-7745

nidin 3-O-glucoside(C3G)의 함량이 가장 높다고 보고된 바 있다(8). 지금까지 유색미를 활용하기 위해 항산화 기능(9), DNA 손상 회복(10) 및 발암억제 기능(11) 등과 같은 많은 연구가 보고되고 있어, 건강을 위한 기능성 식품으로써 이용 가치가 매우 높은 식품으로 알려져 있다. 또한, 흑미는 특유의 색과 향으로 인하여 다양한 형태의 식품으로 가공되고 있으며 소비 또한 증가하고 있다(12). 특히 항산화 화합물들은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 효과적으로 제거한다고 보고되고 있는데, 활성산소종은 자외선 조사 등에 의해 생성되어 인간의 피부세포에 산화 스트레스를 유도하여 염증성 질환뿐 아니라 피부 노화에 대한 원인으로 작용한다고 알려져 있다(13). 노화된 피부는 콜라겐 합성의 감소를 보이고, 이것은 matrix metalloproteinases (MMPs)의 통제와 연관이 있다(14). 즉 MMPs는 세포외기질(extracellular matrix, ECM)을 remodeling 하여 다양한 파괴적인 과정에 중요한 역할을 수행하는 기질 특이성을 가진다(15). 이 중 collagenase로 잘 알려진 MMP-1, MMP-8과 MMP-13도 산화적 스트레스에 의한 콜라겐 분해에 관여하는 주요한 효소이고, 이것은 mitogen activating protein kinase(MAPK)-extracellular signal-regulated kinase(ERK)/p38/JUN-N-terminal kinase(JNK) activation과 매개되어 있다(16). MMP-3는 기저막의 제 IV형 콜라겐을 분해하며 zymogen인 proMMP-1을 활성화시킨다(17). 2개의 gelatinases인 72 kDa type IV collagenase(MMP-2)와 97kDa type IV collagenase(MMP-9)는 암, 감염성 질병, 상처 치유, 염증 및 혈관 질환을 포함하여 병리적 상태를 유발하는 것으로 알려져 있다(18,19). 또 하나의 피부노화의 특징은 피부 진피에 구조적인 지지를 제공하는 세포외기질의 일차적인 구성요소인 collagen type I의 감소이다(20). 29가지의 콜라겐 가운데 collagen type I은 인간의 피부세포에서 가장 풍부한 단백질 중 하나이다. Collagen type I과 pro-collagen은 자외선에 의해 down-regulation 된다(14). 노화된 피부의 주름생성은 연령증가와 같은 자연적인 요인뿐 아니라 환경적 요인의 영향을 받는데, 특히 자외선에 의한 광노화에서 나타나는 대표적인 증상이다. 주름생성 과정은 피부의 기질단백질인 콜라겐의 결핍에 의해 발생되므로, 주름을 예방하기 위해서는 콜라겐의 합성을 증가시키고 콜라겐 분해 효소의 작용을 억제하는 것이 필요하다(21).

조생종인 흑진주벼와 조생흑찰은 안토시아닌 고함유 메벼, 흑자색 찰벼이며, 흑설은 중부 평야지에 적응하고 가공용 연질미로 개발되었으며, 중만생종인 신농흑찰과 신토흑미는 각각 안토시아닌 고함유 흑색찰벼와 메벼 품종이다(22). 최근 유색미에 대한 생리활성을 과학적으로 증명하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으나 아직 유색미에 대한 항주름 활성에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았으므로, 본 연구는 흑미 가운데 *in vitro* 상태에서 높은 항산화 작용을 나타낸다고 알려진 조생흑찰, 신농흑찰, 신토흑미, 흑진

주벼, 흑설을 선별하여 이들의 자외선 조사에 의한 주름 생성을 억제하는 효능을 분석하여 주름개선 소재로서의 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 추출

본 실험에 사용된 선별된 유색미 5종인 조생흑찰(J), 신농흑찰(S), 신토흑미(SR), 흑진주벼(HR) 그리고 흑설(H)은 2015년 국립식량과학원(Miryang, Korea)에서 제공받아 열수 및 에탄올 추출을 실시하였다. 열수 추출의 경우 시료 중량의 10배 양의 증류수를 첨가하여 85°C에서 3시간 환류 냉각 추출하였으며(JW, SW, SRW, HRW, HW), 에탄올 추출의 경우 70% 에탄올에 침지하여 상온에서 24시간 방치한 후 상정액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하였다(JE, SE, SRE, HRE, HE). 각 추출물들은 여과 및 농축 후 동결건조 하여 냉장 보관하면서 실험에 사용되었다.

전자공여능 측정

전자공여능은 Blois(23)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 각 시료 용액 100 μ L에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 50 μ L 넣어 잘 혼합한 후 암소에서 30분간 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH를 이용한 항산화 활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거활성의 측정은 Park과 Kang(24)의 방법에 의해 측정하였다. 즉 7.4 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS, Sigma-Aldrich Co.) 0.5 mL와 2.6 mM potassium persulfate($K_2S_2O_8$) 88 μ L를 섞은 용액 1 mL와 에탄올 88 mL를 혼합한 ABTS 용액 1 mL를 1:1로 섞은 후 12시간 동안 라디칼을 형성시킨 용액을 99% 에탄올에 약 1:13의 비율로 섞어서 734 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7 ± 0.002 가 되도록 조절된 ABTS 용액을 사용하였다. 시료 용액 100 μ L와 ABTS 용액 100 μ L를 혼합하여 30초간 진탕한 후 1분간 상온에서 반응시키고 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical cation decolorization 효과는 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Collagenase 저해 활성

Collagenase 저해 활성 측정은 Cannell 등(25)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 즉 반응구는 0.1 M tris-HCl buffer(pH7.5)에 4 mM $CaCl_2$ 를 첨가하여 4-phenylazobenzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg(0.3 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.)를 녹인 기질액 0.25 mL 및

시료 용액 0.1 mL의 혼합액에 collagenase(0.2 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.) 0.15 mL를 첨가하여 실온에서 20분간 정치한 후 6% citric acid 0.5 mL를 넣어 반응을 정지시킨 다음, ethyl acetate 1.5 mL를 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해 활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

세포의 배양

Human 유래 keratinocyte cell line인 HaCaT cells은 German Cancer Research Center(DKFZ, Heidelberg, Germany)로부터 공급받았으며, 10% FBS와 penicillin/streptomycin(Sigma-Aldrich Co.) 100 unit/mL가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco BRL Co., Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator(MCO-18AIC, SANYO Co., Sakata, Japan)에서 배양하였으며, 2~3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다.

세포 내 활성산소종 생성 측정

UVB에 의한 세포 손상으로 인한 ROS의 생성을 측정하기 위한 실험을 진행하였다. HaCaT cells를 3×10⁵ cells/mL의 농도로 부유시켜 96-well plate에 분주하여 24시간 동안 incubation 하였다. 배지를 제거하고 형광염료인 20 μM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA, Sigma-Aldrich Co.)를 90 μL 처리하여 20분간 배양한 후 시료 용액을 농도별로 선 처리하여 1시간 동안 배양한 다음, DCFH-DA를 제거하고 PBS로 3번 washing 한 후 UVB(50 mJ/cm²)를 조사하고 30분간 다시 배양한 다음 형광도를 측정하였다. DCF 형광도는 excitation 485 nm, emission 530 nm의 파장에서 infinite PRO(INFINITE F200 PRO, TECAN, Grödig, Austria)로 분석하여 측정된 ROS에 결합된 형광 DCF-DA를 측정하여 대조군에 대한 상대적인 수치로 나타내었다.

MTT assay

세포 생존을 측정하는 Mosmann(26)의 방법에 따라 측정하였다. HaCaT cell을 96-well plate에 1×10⁶ cells/well이 되게 0.18 mL 분주하고, 시료를 농도별로 조제하여 0.02 mL 첨가하여 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co.) 용액 0.02 mL를 첨가하여 4시간 배양한 후 상층액을 제거하고, 형성된 formazan에 각 well당 0.1 mL의 DMSO 용액을 가하여 실온에서 차광하여 30분간 반응시킨 뒤 ELISA reader(PowerWave XS, Biotek, Winooski, VT, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot을 통한 단백질의 발현 측정

단백질의 발현을 보기 위하여 HaCaT cell을 96-well culture plate에 cell seeding 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화시켰다. 배지를 제거한 후 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24시간 배양한 다음 UVB(50 mJ/cm²)를 처리하고 일정시간 배양 후 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척하였다. Cell lysate로 Bradford assay 방법으로 단백질 정량하여 10 μL의 단백질을 10%의 SDS-PAGE에서 전기영동하여 분리하고 원하는 부위의 gel을 잘라 3시간 동안 nitrocellulose(NC) membrane에 옮긴 다음, 4°C에서 1시간 동안 5% skim milk로 blocking 한 후 primary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)를 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 overnight 한 다음, 다시 30분 간격으로 TBST로 3회 washing 하고 각각의 HRP-conjugated secondary antibody(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 희석하여 상온에서 1시간 동안 처리하고 3회 washing 한 후 ECL 용액을 가한 다음 Western imaging system (EZ-Capture MG, ATTO, Tokyo, Japan) 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

RNA 추출 및 RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction) 과정

RNA는 High Pure RNA Isolation Kit(Roche, Basel, Switzerland)을 이용하였으며 제조회사의 방법에 따라 total RNA를 추출하였으며, 1 μg/μL의 농도로 정량하고 추출된 total RNA는 Transcriptor first Stand cDNA synthesis kit(Roche)을 이용하여 역전사를 진행시켜 cDNA를 합성시켰다. 유전자 발현은 Fast start Essential DNA Green Master kit(Roche)을 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 이 분석에서 internal control은 β-actin을 사용하였고 primer의 sequences는 다음과 같다. Human MMP-1(forward, 5'-ATT CTA CTG ATA TCG GGG CTT TGA-3'; reverse, 5'-ATG TCC TTG GGG TAT CCG TGT AG-3'), MMP-3(forward, 5'-TTG TTC TTT GAT GCA GTC AGC-3'; reverse, 5'-GAT TTG CGC CAA AAG TGC-3'), MMP-9(forward, 5'-CCC GGA CCA AGG ATA CAG-3'; reverse, 5'-GGC TTT CTC TCG GTA CTG-3'), β-actin(forward, 5'-CTG GCA CCC AGC ACA ATG AAG-3'; reverse, 5'-ACC GAC TGC TGT CAC CTT CA-3'). PCR의 증폭 조건은 다음과 같다. 95°C에서 5분간 초기 denaturation 시킨 후 40 cycle을 증폭시켰다. 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 60초간 extension 시켰다. RT-PCR 증폭으로 생산된 DNA는 0.5 μg/mL의 ethidium bromide가 포함된 1% metaphor agarose gel에 전기영동하여 cooled CCD camera system EZ-Capture II와 CA analyzer ver. 3.00 software(ATTO, Tokyo, Japan)를 이용하여 mRNA의 발현 정도를 확인하였다.

통계처리

실험 결과에 대한 통계처리는 SPSS 22.0(IBM SPSS Inc., New York, NY, USA)을 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 ANOVA를 이용하여 유의성을 확인한 후, $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

전자공여능

DPPH는 자체가 매우 안정한 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. 만일 시료가 항산화 활성을 가지고 있다면 DPPH가 갖고 있는 지질 산화에 관여하는 free radical의 비공유결합을 소거하여 DPPH의 환원성을 높일 것이고, DPPH가 환원이 많이 될수록 보라색을 잃게 되어 UV 측정 시 그 수치도 낮아진다(27,28). 선별된 유색미 5종에 대한 전자공여능 활성 결과를 Fig. 1A에 나타내었다. 유색미 5종의 에탄올 추출물 대부분이 25 µg/mL 농도에서 66% 이상의 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보였으며, 특히 SRE와 HE는 100 µg/mL에서 84% 이상의 소거능을 보였으며 양성대조군인 BHT가 100 µg/mL에서 95.9%의 소거능을 보인 것과 비교하여 유의할만한 효과라고 볼 수 있다. Song 등(29)은 유색보리 40계통의 평균값이 69.82±10.21%의 전자공여능을 나타내었다고 보고하였고, Woo 등(30)은 수원511호 및 일품쌀의 70% 에탄올 추출물에 대한 DPPH 라디칼 소거활성은 1 mg/mL의

농도에서 각각 14.16%와 10.92%, 5 mg/mL의 농도에서 각각 42.00%와 30.10%의 활성을 보고하였으며, Lee 등(31)은 고아미 2호벼, 큰눈벼 및 흑광벼의 70% 에탄올 추출물이 5 mg/mL의 농도에서 22.6%, 26.3% 및 32.5%의 활성을 가진다고 보고한 것과 비교하였을 때 유색미의 free radical 소거활성이 매우 우수함을 알 수 있었다.

ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼을 이용한 항산화력의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS^{•+} free radical이 추출물 내의 항산화력 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 측정방법이다. 선별된 유색미 5종의 열수 추출과 에탄올 추출물에 대한 ABTS 라디칼 소거활성 결과는 Fig. 1B에 나타내었다. SRW와 HW가 전 농도에서 양성 대조군인 BHT보다 모두 높은 ABTS 라디칼 소거능을 보였고, 50 µg/mL 이상에서는 유색미 5종의 열수와 에탄올 추출물 모두 72% 이상의 우수한 소거능을 보였다. Park 등(22)이 보고한 남부 평야지에서 생산된 유색미 18종에 대한 항산화 활성을 연구한 결과에서는 흑진주가 14.70±0.62 µg/mL의 IC₅₀ 값을 나타내었고, 신토흑미와 신토흑찰이 각각 16.79±1.56 µg/mL 및 17.01±2.72 µg/mL의 순으로 항산화 활성이 높았다고 보고하였으며, Seo 등(32)은 건강홍미, 적진주벼, 남평벼의 에탄올 추출물이 0.2 mg/mL의 농도에서 약 63.2%, 52.2% 그리고 32.1%라고 보고하였다. 이러한 기존의 연구 결과와 비교하였을 때 선별된 유색미 5종의 우수한 항산화 활성을 확인할 수 있었

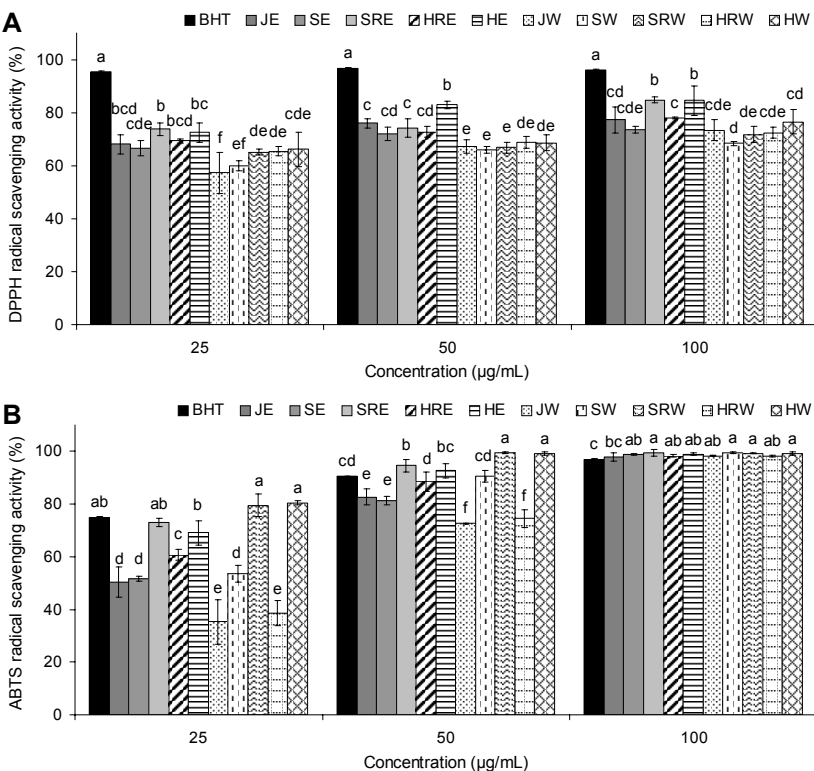


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity (A) and ABTS radical scavenging activity (B) of colored rice extracts. JE, 70% ethanol extract of Josaengheugchal; SE, 70% ethanol extract of Sinneungheugchal; SRE, 70% ethanol extract of Shintoheug rice; HRE, 70% ethanol extract of Heugjinju rice; HE, 70% ethanol extract of Heugseol; JW, water extract of Josaengheugchal; SW, water extract of Sinneungheugchal; SRW, water extract of Shintoheug rice; HRW, water extract of Heugjinju rice; HW, water extract of Heugseol; BHT, butylated hydroxy toluene (positive control). Results are mean±SD of triplicate data. Means with different letters (a-f) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.

다.

Collagenase 저해 활성

Collagen은 피부에서 탄력과 결합에 중요한 역할을 하고 있는데 트립신과 같은 단백질 분해효소의 작용을 받지 않고 collagenase에 의해 분해된다(33). 따라서 collagenase는 세포외기질 단백질을 분해하는 효소로 피부의 주름생성을 촉진시키는 요인이 된다. 이러한 collagenase 억제능 실험 결과는 Fig. 2와 같다. 유색미 에탄올 추출물 모두 25 µg/mL의 농도에서 약 58% 이상의 효소 저해능을 나타내었고, 특히 HE는 25, 50 및 100 µg/mL의 농도에서 각각 약 76%, 89% 및 92%로 고르게 높은 저해효능을 보였다. 유색미에 대한 collagenase 저해능의 보고는 미흡한 실정이며, Min 등(34)이 보고한 단삼의 에탄올 추출물에 대한 분획물 가운데 chloroform fraction 1%의 농도에서 88.2±2.1%의 저해 활성을 나타낸 결과와 비교했을 때, 본 결과가 낮은 농도에서 높은 collagenase 저해 효능을 나타내고 있음을 확인할

수 있었다.

UVB에 유도된 세포의 활성산소종 생성 소거

DCFH-DA는 쉽게 세포막을 뚫고 세포 안으로 확산되어 세포 안의 esterase에 의해 형광을 잃은 DCFH로 가수분해되고, 이후 ROS가 존재하는 환경에서 높은 형광을 띄는 DCF로 빠르게 산화된다. 따라서 DCF의 형광 강도는 세포 안의 ROS의 양과 비례한다. HaCaT 세포에 DCF-DA를 적용시킨 후 UVB를 이용하여 ROS를 발현시켜 유색미가 ROS 발현에 대한 영향을 실험한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 선별된 유색미 5종 가운데 에탄올 추출물들은 대부분 농도의존적으로 높은 활성산소종 저해효능을 보였으며 그중 SE, HE가 전 농도에서 매우 효과적인 저해효과를 나타내었고, 특히 25 µg/mL의 농도에서 자외선 조사군(Con)과 비교하여 각각 83.7%, 82.8%의 억제효과를 나타내었다. 열수 추출물의 경우는 효과가 약하였으나 SW만이 Con과 비교하여 약 45%의 저해효능을 나타내었다. 한편 Kim 등(35)은 UVB

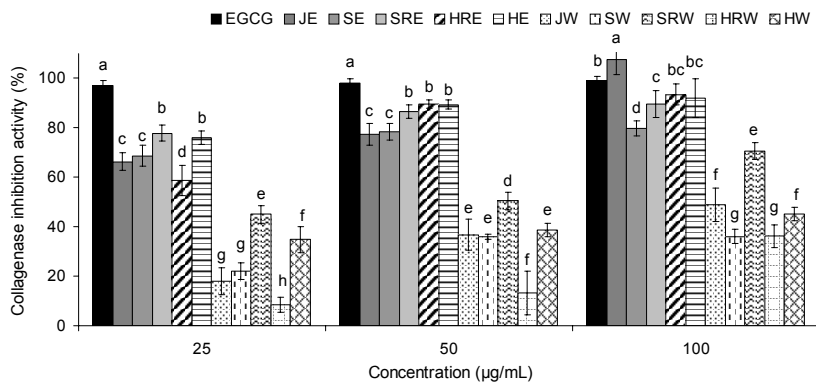


Fig. 2. Collagenase inhibition ability of colored rice extracts. JE, 70% ethanol extract of Josaengheugchal; SE, 70% ethanol extract of Sinneungheugchal; SRE, 70% ethanol extract of Shintoheug rice; HRE, 70% ethanol extract of Heugjinju rice; HE, 70% ethanol extract of Heugseol; JW, water extract of Josaengheugchal; SW, water extract of Sinneungheugchal; SRW, water extract of Shintoheug rice; HRW, water extract of Heugjinju rice; HW, water extract of Heugseol; EGCG, epigallocatechin gallate (positive control). Results are mean±SD of triplicate data. Means with different letters (a-h) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

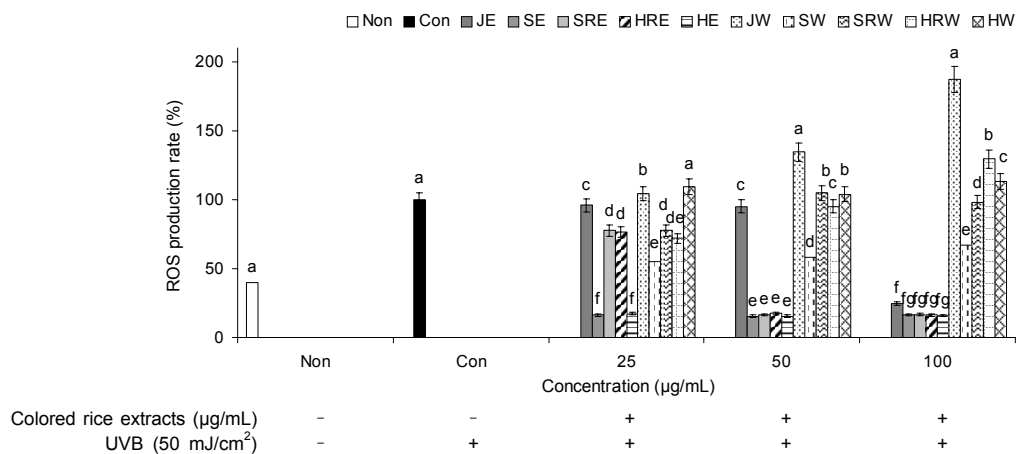


Fig. 3. Reactive oxygen species (ROS) inhibition ability of colored rice extracts. The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of colored rice extracts before treatment with UVB (50 mJ/cm²) for 30 min. Non was not treated any sample extracts and UVB. Con was treated only UVB on the cells. JE, 70% ethanol extract of Josaengheugchal; SE, 70% ethanol extract of Sinneungheugchal; SRE, 70% ethanol extract of Shintoheug rice; HRE, 70% ethanol extract of Heugjinju rice; HE, 70% ethanol extract of Heugseol; JW, water extract of Josaengheugchal; SW, water extract of Sinneungheugchal; SRW, water extract of Shintoheug rice; HRW, water extract of Heugjinju rice; HW, water extract of Heugseol. Results are mean±SD of triplicate data. Means with different letters (a-g) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

를 조사한 HaCaT cell에서의 머위 추출물의 ROS 생성억제 효과를 실험한 결과 Con과 비교하여 500 µg/mL의 농도에서 45% 이상의 소거효능을 나타내었다고 한 보고와 비교하였을 때, 우리의 결과가 활성산소종 발현억제 효능이 매우 뛰어남을 확인할 수 있었다.

세포 생존율

Yellow tetrazolium salt MTT는 담황색 기질로서 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 reductase에 의해 환원되어 formazan을 생성하는데 죽어있는 세포에서는 형성되지 않고 살아있는 세포의 수가 많을수록 formazan의 생성도 많아지고 세포의 성장을 측정할 수 있다(36).

선별된 유색미 5종에 대한 사람각질세포인 HaCaT 세포에서의 생존율을 확인하기 위하여 MTT assay를 실시하였으며, 그 결과는 Fig. 4A에 나타내었다. HaCaT 세포에 대하여 25 µg/mL의 농도에서 JE, SE, SRE, HRE, HE, 그리고

HRW가 95~100%의 세포 생존율을 나타내었고 100 µg/mL의 농도에서는 JE, HRE, HE, HRW가 모두 80% 이상의 생존율을 보였다. 그 결과를 바탕으로 선별된 유색미 5종 가운데 에탄올 추출물에 대하여 UVB를 조사(50 mJ/cm²)한 후의 세포 생존율을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 4B에서 나타낸 바와 같이 HE가 전 농도에서 92% 이상의 세포 생존율을 보였다. 따라서 단백질 발현 및 mRNA 발현에 관한 실험을 진행하기 위하여 유색미 5종 가운데 HE를 선별하였으며, UVB를 HaCaT cell에 50 mJ/cm²의 자극을 주는 조건으로 진행하였다.

Pro-collagen type I 생성 및 MMPs 발현억제

진피의 90%를 차지하고 있는 콜라겐은 collagen type I, II, III, IV, V가 있으며, 세포 내에서 pro-collagen이라는 전구물질로 합성된 후 세포 외로 분비되어 collagen 섬유로 중합된다. 이 중 주요 구조 단백질은 collagen type I 이

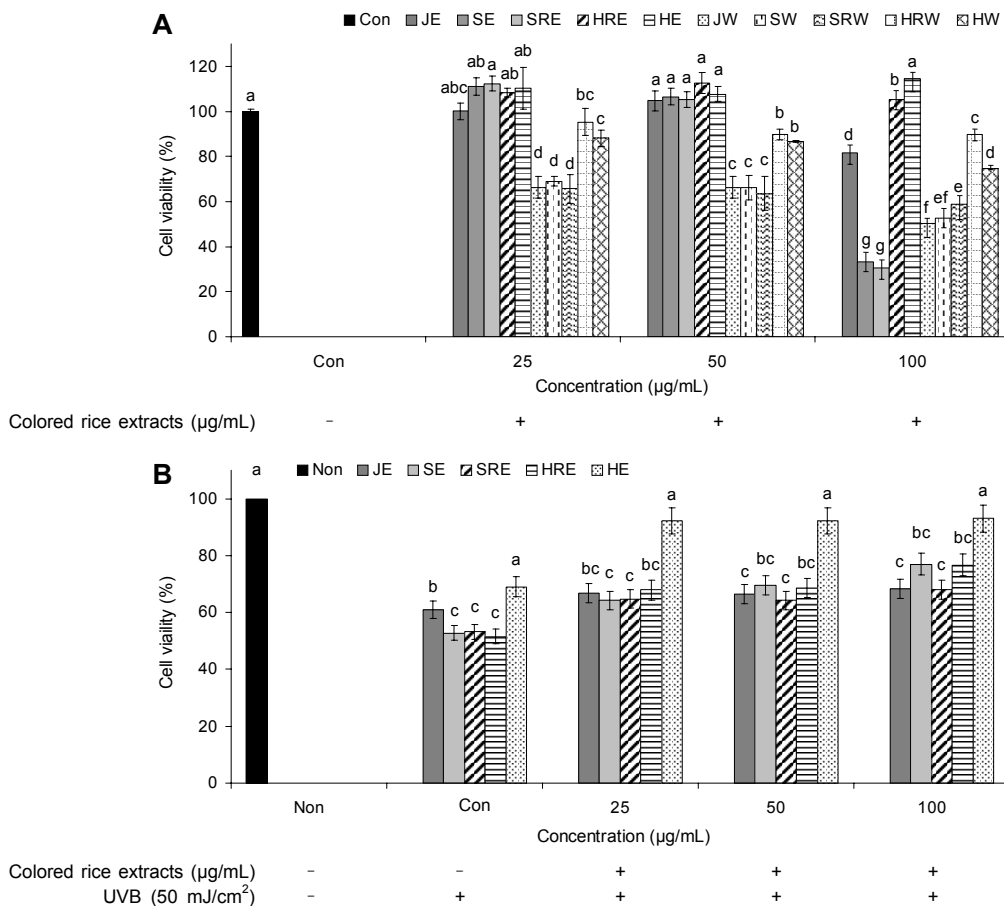


Fig. 4. Cell viability assay of colored rice extracts on Human HaCaT cells. (A) The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of colored rice extracts. (B) The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of colored rice extracts before treatment with UVB (50 mJ/cm²) for 24 h. Non was not treated any sample extracts and UVB. Con was only treated UVB on the cells. JE, 70% ethanol extract of Josaengheugchal; SE, 70% ethanol extract of Sinneungheugchal; SRE, 70% ethanol extract of Shintoheug rice; HRE, 70% ethanol extract of Heugjinju rice; HE, 70% ethanol extract of Heugseol; JW, water extract of Josaengheugchal; SW, water extract of Sinneungheugchal; SRW, water extract of Shintoheug rice; HRW, water extract of Heugjinju rice; HW, water extract of Heugseol. Results are mean±SD of triplicate data. Means with different letters (a-g) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at *P*<0.05.

대부분이다(37). 세포외기질을 분해하는 단백질 분해효소인 MMP group에는 약 20여 종이 있으며, collagenase group(MMP-1, -8, -13), gelatinase group(MMP- 2, -9), stromelysin group(MMP-3, -10, -11)이 있다(38). 그중 MMP-1은 주로 type I, III형을 분해하는 collagenase이고 MMP-3은 collagen type IV를 특이적으로 분해하고 pro-MMP-1을 활성화시키며(17), MMP-8과 -13은 관절의 연골분해를 가속화시켜 관절조직의 파괴를 가속화시킨다. 우리는 MMP-1, -3, -8, -13의 발현억제와 pro-collagen type I의 생성을 확인하였고, 결과는 Fig. 5와 같다. UVB 자극을 준 세포에 HE를 농도별로 처치하였을 때 pro-collagen type I은 100 µg/mL의 농도에서 발현이 증가하였고, MMP-1과 -13은 농도 의존적으로 발현이 억제되었으나, MMP-3과 -8의 발현에는 크게 영향을 주지 않은 것을 확인할 수 있었다. 특히 MMP-1의 발현이 자외선을 조사하지 않은 대조군(Non)보다도 억제되었으며, 이는 Lee 등(39)이 보고한 한방 발효주 주박 추출물의 MMP-1 발현

억제 실험 결과에서 자외선을 조사한 HaCaT cell에서의 MMP-1 발현이 50과 100 µg/mL의 농도에서 Non보다도 억제된 것과 유사한 결과임을 확인할 수 있었다. 반면에 MMP-3의 발현억제 결과에서는 HE의 농도가 증가할수록 오히려 발현이 증가하였으며, 이는 HE가 UVB의 조사로 인한 MMP-3의 발현억제에 대한 효능이 없음을 알 수 있었다.

MAPK의 발현 및 인산화 저해효과

MMP-1은 산화적 스트레스로 인해 콜라겐을 분해하는데 관여하는 주요한 효소이고, 이것은 MAPK-ERK/p38/JNK activation과 매개되어 있다(40). MAPK pathways는 자외선 조사를 포함하는 세포 외 자극들에 대응하여 활성화되고(41), MAPK signaling은 MMP 분비를 포함한 다양한 세포 과정에서 중요한 조절 역할을 수행하여(42) 조기 피부 노화와 노화된 피부의 특징인 피부 주름을 야기한다고 알려져 있다. Fig. 6에서 나타낸 바와 같이 HE가 ERK와 p38의 인산화를 농도 의존적으로 억제하고 있음을 확인하였다.

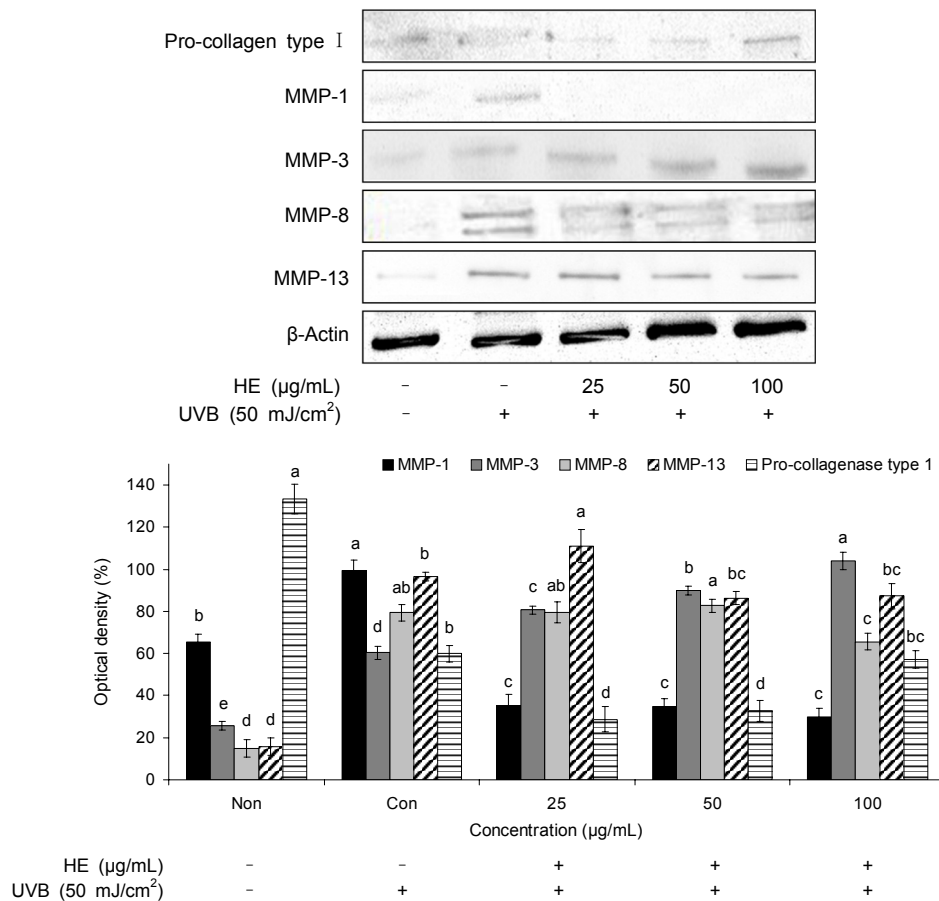


Fig. 5. Expression levels on pro-collagen type I and MMPs of HE on UVB-irradiated Human HaCaT cells. The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of HE before treatment with UVB (50 mJ/cm²) for 24 h and subjected to western blot analysis using phospho-specific antibodies to MMP-1, -3, -8, -13, and pro-collagen type I. Bands are representative of three or four experiments. Non was not treated any sample extract and UVB. Con was only treated UVB on the cells. HE: 70% ethanol extract of Heugseol. Means with different letters (a-e) above bars of the same item are significantly different by Duncan's multiple range test at *P*<0.05.

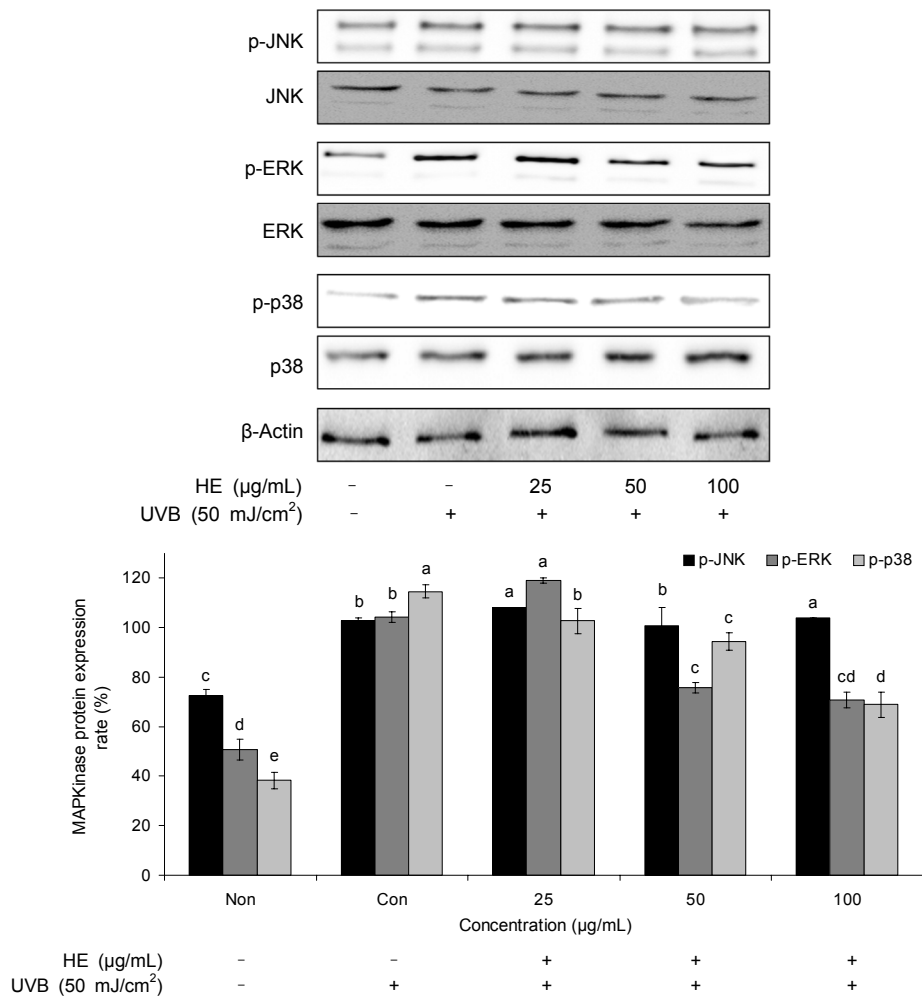


Fig. 6. Suppression effects of MAPK phosphorylations of HE on UVB-irradiated Human HaCaT cells. The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of HE before treatment with UVB (50 mJ/cm²) for 24 h and the suppression of phosphorylations of ERK, JNK, and p38 were assayed by western blot. Non was not treated any sample extract and UVB. Con was only treated UVB on the cells. HE: 70% ethanol extract of Heugseol. Bands are representative of three or four experiments. Means with different letters (a-e) above bars of the same item are significantly different by Duncan's multiple range test at *P*<0.05.

RT-PCR에 의한 MMPs의 mRNA 발현억제 효과

선별된 유색미 중 활성산소종을 유의하게 억제시킨 HE에 대한 MMPs의 mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 HaCaT 세포에 HE를 다양한 농도로 처치한 후 UVB로 자극한 다음 24시간 배양하여 총 RNA를 추출하였고 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. 그 결과(Fig. 7) MMP-1, -3의 mRNA의 발현은 농도 의존적으로 감소시켰으며, MMP-9의 경우 HE를 100 µg/mL의 농도로 처치한 경우에 발현을 감소시켰음을 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 선별된 유색미 5품종에 대한 자외선 조사에 따른 노화 억제 기전을 확인하고자 항산화 활성과 활성산소종(ROS) assay를 분석하였으며, 주름형성을 유발하는 효소인 MMPs와 그 upstream인 MAPK pathway(ERK, JNK 및

p38)에서의 인산화 발현을 얼마나 저해하는지를 분석하였다. 유색미 5품종 가운데 전자공여능과 ABTS 소거활성 결과, 신토흑미 에탄올 추출물(SRE)과 흑설 에탄올 추출물(HE), SRE와 흑설 열수 추출물(HW)이 각각 뛰어난 소거활성을 보였으며, collagenase 저해 활성 결과 HE가 전 농도에서 고르게 높은 저해효과를 나타내었다. 또한, ROS assay에서 SE와 HE가 전 농도에서 매우 효과적인 ROS 생성억제를 나타냄에 따라 우리는 선별된 유색미 가운데 HE를 이용하여 MMPs와 MAPK의 발현억제 pathway를 확인하였다. 그 결과 pro-collagen type I은 100 µg/mL의 농도에서 발현이 증가하였고, MMP-1과 -13은 농도 의존적으로 발현이 억제되었으며, ERK와 p38의 인산화 또한 농도 의존적으로 억제하고 있음을 확인하였다. 이러한 결과에 따라 MMPs의 mRNA 발현을 확인하기 위한 RT-PCR을 실시하였으며, MMP-1과 3의 mRNA의 발현은 농도 의존적으로 감소하였고 MMP-9는 HE를 100 µg/mL의 농도로 처치한

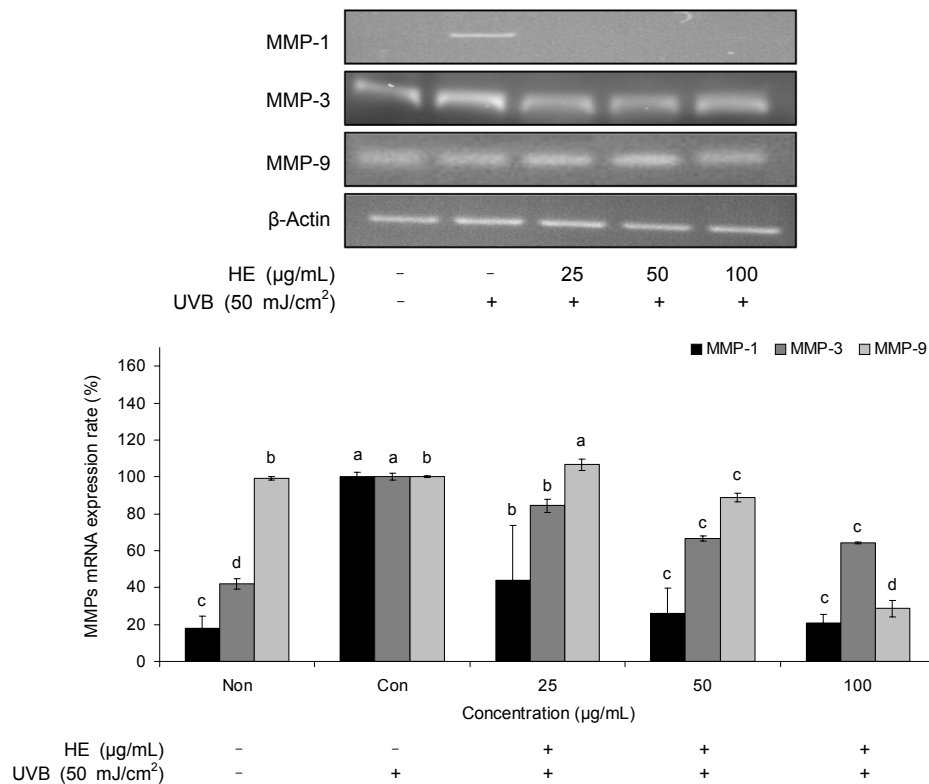


Fig. 7. Suppression effects MMPs mRNA expression of HE on UVB-irradiated Human HaCaT cells. The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of HE before treatment with UVB (50 mJ/cm²) for 24 h and subjected to RT-PCR using the MMP-1, -3, and -9. Bands are representative of three or four experiments. Non was not treated any sample extract and UVB. Con was only treated UVB on the cells. HE: 70% ethanol extract of Heugseol. Means with different letters (a-d) above bars of the same item are significantly different by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.

경우에 발현이 감소하였음을 확인하였다. 선별된 유색미 5종의 에탄올 추출물은 항산화 활성이 우수하였고, 특히 HE의 주름억제 활성 효능을 확인함에 따라 기능성 식품·화장품 분야에서 주름개선 및 항노화 소재로서의 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부에서 지원하는 2015년도 농생명 산업기술개발사업(과제번호: 15-162-004)의 연구수행으로 진행되었습니다.

REFERENCES

- Her YM, Lee SY, Lee SY. 2007. Preparation of functional nutrient enriched rices by coating method. *Food Eng Prog* 11: 185-197.
- Ryu SN, Park SZ, Kang SS. 2005. *Studies on exploration and expansive use of genetic variation of functional substances in rice*. Rural Development Administration, Jeonju, Korea.
- Nam SH, Chang SM, Kang MY. 2003. Varietal difference in antioxidative activity of ethanolic extracts from colored rice bran. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46: 16-22.
- Kang MY, Nam YJ, Nam SH. 2005. Screening of antioxidant-related functional components in brans of the pigmented rices. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 233-239.
- Choi HC, Oh SK. 1996. Diversity and function of pigments in colored rice. *Korean J Crop Sci* 41: 1-9.
- Ling WH, Wang LL, Ma J. 2002. Supplementation of the black rice outer layer fraction to rabbits decrease atherosclerotic plaque formation and increases antioxidant status. *J Nutr* 132: 20-26.
- Slavin JL, Martini MC, Jacobs Jr DR, Marquart L. 1999. Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *Am J Clin Nutr* 70: 459S-463S.
- Ryu SN, Han SJ, Park SZ, Kim HR. 2006. Antioxidant activity of blackish purple rice. *Korean J Crop Sci* 51: 173-178.
- Choi SW, Nam SH, Choi HC. 1996. Antioxidative activity of ethanolic extracts of rice brans. *Food Sci Biotechnol* 5: 305-309.
- Tsuda T, Horio F, Osawa T. 1998. Dietary cyanidine-3-O-β-D-glucoside increases *ex vivo* oxidation resistance of serum in rats. *Lipids* 33: 583-588.
- Nam SH, Kang MY. 1998. Comparison of inhibitory effect of rice bran-extracts of the colored rice cultivars on carcinogenesis. *Appl Biol Chem* 41: 78-83.
- Song SJ, Lee YS, Rhee CO. 2000. Volatile flavor components in cooked black rice. *Korean J Food Sci Technol* 32: 1015-1021.
- Chae S, Piao MJ, Kang KA, Zhang R, Kim KC, Youn UJ, Nam KW, Lee JH, Hyun JW. 2011. Inhibition of matrix metalloproteinase-1 induced by oxidative stress in human keratinocytes by mangiferin isolated from *Anemarrhena*

- asphodeloides*. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 2321-2325.
14. 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.
 15. Matrisian LM. 1992. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14: 455-463.
 16. Chiang HM, Chen HC, Lin TJ, Shih IC, Wen KC. 2012. *Michelia alba* extract attenuates UVB-induced expression of matrix metalloproteinases via MAP kinase pathway in human dermal fibroblasts. *Food Chem Toxicol* 50: 4260-4269.
 17. 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.
 18. Mathews-Roth MM, Michel JL, Wise RJ. 1995. Amelioration of the metabolic defect in erythropoietic protoporphyria by expression of human ferrochelatase in cultured cells. *J Invest Dermatol* 104: 497-499.
 19. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. 2000. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell* 103: 481-490.
 20. Varani J, Warner RL, Gharraee-Kermani M, Phan SH, Kang S, Chung JH, Wang ZQ, Datta SC, Fisher GJ, Voorhees JJ. 2000. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J Invest Dermatol* 114: 480-486.
 21. Zurick KM, Qin C, Bernards MT. 2012. Adhesion of MC3T3-E1 cells bound to dentin phosphoprotein specifically bound to collagen type I. *J Biomed Mater Res A* 100: 2492-2498.
 22. Park JY, Ham H, Han SI, Oh SH, Song YC, Cho JH, Hur Y, Lee YY, Lee BW, Choi YH. 2016. Comparison of antioxidant components and antioxidant activities of colored rice varieties (*Oryza sativa* L.) cultivated in Southern plain. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 1214-1220.
 23. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
 24. Park EJ, Kang MH. 2002. Application of the alkaline comet assay for detecting oxidative DNA damage in human biomonitoring. *Korean J Nutr* 35: 213-222.
 25. Cannell RJP, Kellam SJ, Owsianka AM, Walker JM. 1988. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med* 54: 10-14.
 26. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
 27. Heo JC, Park JY, An SM, Lee JM, Yun CY, Shin HM, Kwon TK, Lee SH. 2006. Anti-oxidant and anti-tumor activities of crude extracts by *Gastrodia elata* Blume. *Korean J Food Preserv* 13: 83-87.
 28. Ancerewicz, J, Migliavacca E, Carrupt PA, Testa B, Brée F, Zini R, Tillement JP, Labidalle S, Guyot D, Chauvet-Monges AM, Crevat A, Ridant AL. 1998. Structure-property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radical Biol Med* 25: 113-120.
 29. Song ES, Park SJ, Woo NRA, Won MH, Choi JS, Kim JG, Kang MH. 2005. Antioxidant capacity of colored barley extracts by varieties. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1491-1497.
 30. Woo KS, Jeong EG, Suh SJ, Yang CI, Jeong HS, Kim KJ. 2008. Antioxidant components and antioxidant activities of 70% ethanol extracts on *Suweon-511* and *Ilpum* rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1223-1230.
 31. Lee YR, Woo KS, Kim KJ, Son JR, Jeong HS. 2007. Antioxidant activities of ethanol extracts from germinated specialty rough rice. *Food Sci Biotechnol* 16: 765-770.
 32. Seo WD, Kim JY, Son YC, Cho JH, Jang KC, Han SI, Ra JE, Oh SH, Kang HJ, Kim BJ, Baek NI, Jeong RH, Nam MH. 2013. Comparative analysis of physicochemicals and antioxidative properties in new red rice (*Oryza sativa* L. cv. Gunganghongmi). *J Crop Sci Biotechnol* 16: 63-68.
 33. Fanger GR, Johnson NL, Johnson GL. 1997. MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42. *EMBO J* 16: 4961-4972.
 34. Min EG, Kim YH, Kum SI, Han YH. 2004. Inhibition of growth and collagenase activity of the extract from *Salvia miltiorrhiza* against microorganisms causing periodontal diseases. *Korean J Microbiol* 40: 111-114.
 35. Kim JH, Na Y, Sim GS, Lee BC, Pyo HB. 2006. Antioxidative and anti-inflammatory effects of *Petasites japonicus*. *J Soc Cosmet Sci Korea* 32: 263-267.
 36. Gross J, Lapiere CM. 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 1014-1022.
 37. 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: 1419-1429.
 38. Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. 2000. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res* 6: 4823-4830.
 39. Lee SM, Lee SJ, Kwon YY, Baek SH, Kim JS, Sohn HY, Shin WC. 2014. Skin whitening and anti-wrinkle effects of extract from Jubak of oriental herbal liquor. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1695-1700.
 40. Hwang BM, Noh EM, Kim JS, Kim JM, You YO, Hwang JK, Kwon KB, Lee YR. 2013. Curcumin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase-1/3 expression by suppressing the MAPK-p38/JNK pathways in human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol* 22: 371-374.
 41. Wenk J, Brenneisen P, Wlaschek M, Poswig A, Briviba K, Oberley TD, Scharffetter-Kochanek K. 1999. Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloproteinase-1. *J Biol Chem* 274: 25869-25876.
 42. Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. 2002. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci* 973: 31-43.