

인간 진피섬유아세포에서 *Bifidobacterium bifidum* 배양액 및 추출액의 자외선B에 대한 보호 효능

권기영 · 박귀근

가천대학교 식품생명공학과

Protective Effects of *Bifidobacterium bifidum* Culture Supernatants and Intracellular Cell-Free Extracts on Human Dermal Fibroblasts against UV-B Irradiation

Gi Yeong Gwon and Gwi Gun Park

Department of Food and Bioengineering, Gachon University

ABSTRACT The present study investigated the protective effects of *Bifidobacterium bifidum* culture supernatants (BbSC) and intracellular cell-free extracts (BbICFE) on human dermal fibroblasts (HDFs) against ultraviolet-B (UV-B) irradiation. HDFs were treated with UV-B, UV-B+BbCS, and UV-B+BbICFE. Treatment of UV-B-irradiated HDFs with BbCS and BbICFE significantly increased cell viability compared to UV-B-irradiated HDFs. BbCS treatment reduced senescence in HDFs by approximately 40.0%. Moreover, sub-G1 phase was significantly reduced in BbCS- and BbICFE-treated HDFs (3.3% and 4.5%, respectively). The effect of UV-B on oxidative damage of HDFs was measured by dichlorofluorescein diacetate. Fluorescence intensity significantly increased in UV-B-irradiated HDFs. Inhibition of cellular reactive oxygen species in HDFs treated with 0.01% BbCS was the highest at 34.1%. Levels of p21 and p53 protein expression induced by UV-B irradiation were reduced by treatment with BbCS and BbICFE (47.0% and 35.6%, respectively). These results show that BbCS and BbICFE reduce UV-B-induced cellular senescence and apoptosis in HDFs. Thus, BbCS and BbICFE can be used as potential agents for protection of UV-B-induced skin cell damage.

Key words: *Bifidobacterium bifidum*, culture supernatants, intracellular cell free extracts, human dermal fibroblasts

서 론

현대사회의 생활 수준이 점점 향상되고 의학기술이 발전됨에 따라 최근에 인간의 평균수명도 증가하면서 사람들의 관심이 웰빙(well-being)으로 건강하게 오래 살며 아름답게 삶을 지내는 것으로 집중되고 있다. 이러한 현대사회의 관심에 부응하여 화장품 분야 및 기능성 식품의 시장규모가 확대되었고, 특히 천연물질을 활용한 연구 분야가 급속히 진행되고 있다(1). 그중 장내세균에서 자신을 보호하는 항산화 메커니즘이 보고(2-4)됨에 따라 장내세균의 항산화 효과에 대한 연구가 최근에 시작되고 있다. 또한, 국내외 연구진들에 의하여 사람의 피부장벽을 강화하는 효능, 보습 효과, 미백 등이 우수하다는 연구 결과가 보고되었다(5,6).

피부는 크게 표피, 진피, 피하조직으로 구성되어 있으며, 그중 진피는 human dermal fibroblasts(HDFs)로부터 생성

되는 엘라스틴과 콜라겐으로 구성된 세포외기질로 주름을 생성하고 피부의 탄력 조절에 관여한다(7). 피부는 외부를 덮고 있는 기관으로 여러 환경적인 요인에 대해 신체를 보호하고 유지하는 물리적 장벽으로써의 기능을 가지며, 다양한 환경적인 요인은 면역계의 활성화를 일으킨다. 나이가 들어감에 따라 노화는 피부의 구조적인 변화와 생리적 기능 감소로 인해 발생하는 내인성 노화(intrinsic aging)와 외부자극으로 화학적 요인에 따른 외인성 노화(extrinsic aging)로 분류되며, 주로 자외선(UV, ultraviolet)에 의해 영향을 받는다(8,9).

자외선은 태양광 스펙트럼에서 파장대가 200~400 nm 영역으로 가시광선보다 짧은 한 부분이다. 파장의 길이에 따라 자외선은 3가지로 분류되는데 장파장의 UV-A(320~400 nm)와 중파장의 UV-B(280~320 nm), 마지막으로 단파장의 UV-C(200~280 nm)로 나누어진다(10,11). 그중에서도 UV-B는 특히 광노화, 염증성 피부질환 그리고 암을 유발하는 가장 중요한 요소로 작용한다(12). UV-B는 피부의 가장 바깥쪽인 표피층과 진피층상부에 주로 작용하여 chemokine과 cytokine의 분비를 통한 염증반응을 일으키고(13-15) UV-B에 노출받은 피부는 세포 내 활성산소종

(reactive oxygen species, ROS)의 농도가 증가한다(16,17).

활성산소종은 일반적으로 안정한 상태의 산소보다 불안정하고 활성이 크며 높은 에너지를 가지고 있는 산소를 말한다. 이러한 활성산소종의 대표적인 예로는 과산화수소(H_2O_2), 초과산화물(O_2^-), 히드록시라디칼(OH^-) 등이 있으며 활성산소종은 자외선과 밀접한 관계가 있다(18). 자외선은 광노화의 주요 원인으로서 자외선 차단제 사용이 피부의 활성산소종을 감소시킨다는 보고(19-21)와 자외선 조사량에 따른 활성산소종의 생성량이 증가한다는 보고(22,23)가 이를 뒷받침한다. 피부에서 UV-B 노출에 의해 지속해서 생성된 활성산소종은 효소·비효소적 항산화 분자에 의해 빠르게 제거되지만, 과도하게 생성된 활성산소종은 피부손상을 일으킨다. 활성산소종으로부터 생성된 자유라디칼은 세포의 구조를 산화시키고 기능 저하를 유발하며 궁극적으로 이는 세포에서 비정상적인 유전자 발현의 결과를 초래한다(24). 따라서 본 연구는 UV-B에 의한 HDFs 손상을 보호하는 새 원료로서 *Bifidobacterium bifidum*의 culture supernatants와 intracellular cell free extracts를 제안하며 UV-B에 의한 손상 억제 효능을 입증함으로써 유효 성분을 발굴하는 데 목적이 있다.

재료 및 방법

*B. bifidum*의 배양액 및 추출물의 제조

본 연구에 사용된 장내세균 *B. bifidum*은 100 mL MRS에서 초기균수 10^4 CFU/mL로 접종하여 혐기적 조건에서 37°C, 16시간 정치배양을 하였다. 배양액은 4°C, 5,000×g, 15분간 원심분리 하여 상층액을 취하였으며 phosphate-buffered saline(PBS)으로 희석한 후 0.45 µm filter로 여과하여 culture supernatants로 사용하였다. 회수된 균체는 PBS로 2회 세척한 후 PBS로 현탁하여 초음파분쇄기(B01060001, Diagenode Inc., Denville, NJ, USA)로 파쇄하였다. 파쇄물은 4°C, 8,000×g, 15분간 원심분리 하여 cell debris를 제거하였으며 유효 성분이 함유된 상층액을 0.45 µm filter에 여과하여 intracellular cell free extracts로 사용하였다.

세포주 및 세포 생육 배지

본 실험의 세포주는 인간 피부 진피층에 대표적으로 존재하는 세포인 human dermal fibroblasts(HDFs, Lonza, Walkersville, MD, USA)를 사용하였다. HDFs는 계대배양하여 passage 5~7까지 사용하였다. HDFs 배양에 필요한 배지로 fetal bovine serum(FBS, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA)과 penicillin/streptomycin(Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 각각 10, 1% 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Invitrogen)을 사용하였으며 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 실험에 사용하였다.

세포 배양 및 UV-B 조사

UV-B 조사에 앞서 HDFs는 plate에 세포의 밀집도가 80%가 될 때까지 배양하였다. UV-B 조사하기 전 배양배지를 제거해주고 PBS를 이용하여 plate에 남아있는 배지성분을 제거한 후 serum free medium에 농도별 시료와 대조군 ascorbic acid를 각각 6시간 처리하였다. HDFs는 밀폐된 조사기기 UV-B Lamp(UV-1000, Boteck, Gunpo, Korea) 내에서 100 mJ/cm²로 조사하고 5% CO₂, 37°C에서 24시간 재배양하여 실험에 사용하였다.

세포생존율 측정

BbCS, BbICFE의 세포독성과 UV-B에 대한 보호 효능을 확인하기 위해 CCK-8(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 사용하였다. 96-well plate에 HDFs를 1×10^3 cells seeding 한 후 세포의 밀집도 80%까지 배양하였다. HDFs에 시료 처리 후 UV-B를 조사하여 5% CO₂, 37°C에서 24시간 재배양하고 PBS 100 µL로 2회 세척한 다음 CCK-8이 함유된 DMEM(1:9) 100 µL를 처리하여 5% CO₂, 37°C에서 2시간 반응하였다. 반응이 끝난 plate는 microplate reader(Sunrise, Tecan Schweiz AG, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 노화 측정

HDFs의 노화는 SA-β-gal 활성을 통해 확인하였다. 6-well plate에 HDFs를 4×10^5 cells seeding 한 후 세포의 밀집도 80%까지 배양하였다. HDFs에 시료 처리 후 UV-B를 조사하여 5% CO₂, 37°C에서 24시간 재배양하고 PBS 1 mL로 2회 세척한 다음 2% formaldehyde와 0.2% glutaraldehyde가 함유된 PBS 1 mL를 처리하여 5분간 상온에서 고정화하였다. 고정화한 HDFs는 PBS 1 mL로 2회 세척하고 SA-β-gal staining buffer[40 mM citric acid/phosphate(pH 6.0), 5 mM K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆, 160 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-d-galactopyranoside in dimethylformamide] 2 mL를 첨가하여 CO₂가 없는 37°C에서 HDFs를 16시간 염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

Western blot 분석

UV-B에 의한 세포 내 p21과 p53의 발현량을 측정하기 위해 6-well plate에 HDFs를 4×10^5 cells seeding 한 후 세포의 밀집도 80%까지 배양하였다. HDFs에 시료 처리 후 UV-B를 조사하여 5% CO₂, 37°C에서 24시간 재배양하고 수확 후 tris-EDTA buffer solution(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 250 µL로 4°C에서 1시간 용해하였다. 용해한 HDFs는 4°C, 12,000×g, 15분간 원심분리 하여 상층액을 취하였으며, Bradford(25)의 방법으로 동량의 단백질 1 mg/mL를 포함한 시료를 10% SDS-PAGE에 전기영동하였다. 단백질이 이동된 membrane은 1% bovine se-

rum albumin(BSA)이 함유된 tris-buffered saline(TBS)으로 상온에서 1시간 blocking 하고 TBS-T(tris-buffered saline, 0.1% Tween 20)를 이용하여 30분간 3회 세척하였다. 일차 항체 β -actin(Santa Cruz, Dallas, TX, USA), p21(Santa Cruz), p53(Santa Cruz)과 이차 항체(Santa Cruz)는 0.1% BSA가 함유된 TBS로 각각 상온에서 1시간 반응하였고 TBS-T를 이용하여 30분간 3회 세척하였다. Membrane은 western blot detection kit(Intron Biotechnology, Seongnam, Korea)을 이용하여 각 단백질을 검출한 다음 화상분석시스템(Amersham Imager 600, GE Healthcare Life Sciences, Ulster County, NY, USA)으로 현상하고 분석하였다.

세포주기 측정

HDFs의 apoptosis는 세포주기를 통해 확인하였다. 즉 6-well plate에 HDFs를 4×10^5 cells seeding 한 후 세포의 밀집도 80%까지 배양하였다. HDFs에 UV-B와 시료를 처리하여 5% CO₂, 37°C에서 24시간 재배양하고 수확 후 PBS 300 μ L에 풀어주었다. 여기에 에탄올 700 μ L를 첨가하고 4°C에서 3시간 보관하여 고정화하였다. 고정화한 HDFs는 PBS로 2회 세척한 후 propidium iodide staining solution(propidium iodide 50 μ g/mL, RNase 0.1 μ g/mL, 0.1% Triton X-100) 300 μ L를 가하여 37°C에서 1시간 염색하였다. 염색한 HDFs는 PBS로 2회 세척하고 Flow cytometry (FACSCalibur™, BD Biosciences, Sparks, MD, USA)를 사용하여 세포주기를 측정하였다.

세포 내 활성산소종 측정

UV-B에 의한 세포 내 활성산소종을 측정하기 위해 6-well plate에 HDFs를 4×10^5 cells seeding 한 후 세포의 밀집도 80%까지 배양하였다. HDFs에 UV-B와 시료를 처리하여 5% CO₂, 37°C에서 24시간 재배양하고 수확 후 20 μ M DCFH-DA(dichlorofluorescein diacetate, Sigma-Aldrich Co.)가 첨가된 DMEM에 다시 HDFs를 현탁하여 5% CO₂, 37°C, 45분간 반응하였다. 활성산소종은 Flow cytometry를 사용하여 측정하였다.

통계처리

결과는 SAS 9.3(Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 mean \pm SD로 나타내었고, 유의차는 Duncan의 다중범위 검정을 통하여 $P < 0.05$ 수준에서 확인하였다.

결과 및 고찰

시료 처리 및 UV-B 조사 후 세포생존율

HDFs에 BbCS를 각각 0.005, 0.01, 0.02% 농도를 처리하였으며 BbICFE는 각각 0.0025, 0.005, 0.01% 농도를 처

리하였다. CCK-8로 세포 독성을 확인한 결과 BbCS의 경우 0.01% 농도까지 97.8% 이상 세포생존율을 보였다. 하지만 0.02% 농도에서 세포생존율은 각각 87.9%로 세포 독성이 나타났다. BbICFE에서는 0.005% 농도까지 97.0% 이상 세포생존율을 보였다. 그러나 0.01% 농도에서는 세포생존율은 각각 81.7%로 세포 독성이 강하게 측정되었다($P < 0.05$) (Fig. 1). 또한, *Bifidobacterium longum*의 intracellular cell free extracts 연구에서 HDFs에 0.02% 이상 농도를 처리 시 세포 독성을 제시하였다(26). 따라서 본 연구에서는 BbCS의 경우 0.02% 미만으로 사용하였으며 BbICFE는 0.01% 미만으로 HDFs에 처리하였다.

UV-B가 HDFs에 미치는 영향을 확인하기 위해 UV-B 조사 조건을 확인하였다. UV-B 10 mJ/cm²에서 93.1% 세포생존율을 보였고 20 mJ/cm²에서는 89.9% 세포생존율을 확인하였다. 그리고 50 mJ/cm²에서 80.5%, 100 mJ/cm²에서는 67.3% 세포생존율을 보였다($P < 0.05$)(Fig. 2).

UV-B에 유도된 HDFs의 손상 연구에서 312 nm 파장의 UV-B 100 mJ/cm²를 조사한 결과 세포생존율은 73.3%로 보고되었다(26). 따라서 본 연구에 사용된 100 mJ/cm²의 UV-B 조사는 세포생존율이 67.3% 감소하여 적당한 세포 손상을 유도하였으며 시료를 투여 후 세포 영향을 연구하는데 적절한 강도로 판단하였다.

HDFs에 농도별 BbCS, BbICFE와 UV-B를 처리 후 세포생존율로 HDFs의 보호 효능을 확인하였다. UV-B만 조사된 HDFs 경우 세포생존율이 67.3%인 반면, BbCS, BbICFE

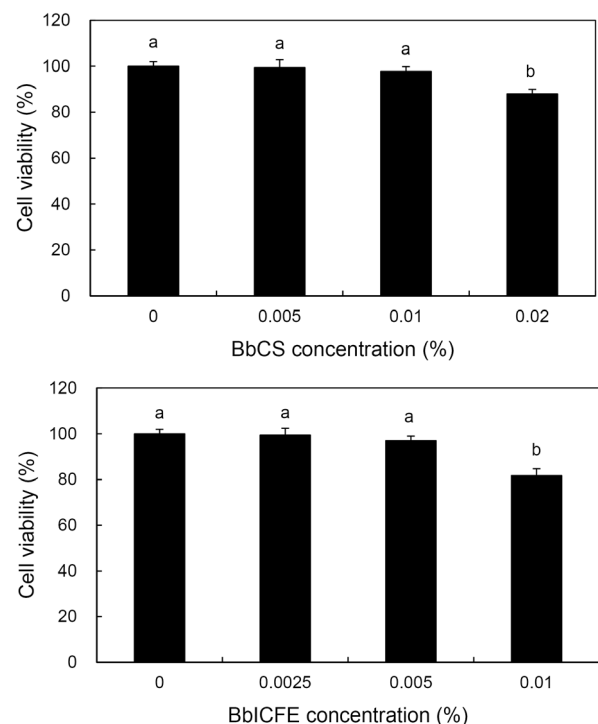


Fig. 1. Cytotoxicity assay by BbCS and BbICFE treatment in HDFs. Values with different letters above the bars are significantly different at $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

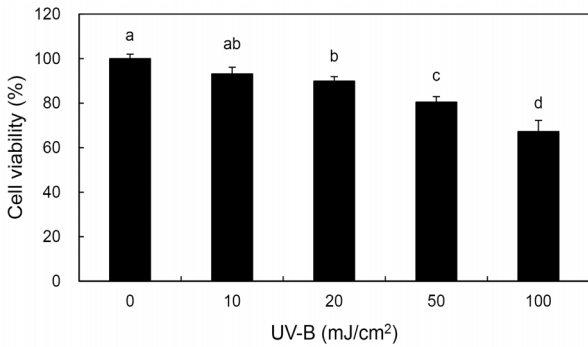


Fig. 2. Effect of UV-B irradiation on viability of HDFs. Values with different letters above the bars are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

처리 시 모두 농도 의존적으로 세포생존율이 증가하였다 ($P<0.05$). 0.01% BbCS 처리한 HDFs에서 생존율이 82.7%로 가장 높았다. 0.01% BbCS에서 ascorbic acid 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 HDFs의 생존율 85.0%와 비교하여 가장 유사한 세포 보호능이 관찰되었다. 반면에 0.005% BbICFE의 세포 생존율은 78.2%이며 0.01% BbCS 처리한 HDFs보다 다소 낮은 수치를 보였다(Fig. 3). 또한, *B. longum*의 intracellular cell free extracts 연구에서 HDFs에 0.02% 농도를 처리 시 생존율이 10.9% 증가(26)를 보였으며 본 실험에

서 0.01% BbCS 처리 시 생존율이 15.4% 증가하였다.

세포 노화 측정

정상 세포는 배양 시 제한된 수의 세포 분열을 한 후에 비가역적인 증식억제 상태에 이르게 되며 이러한 상태를 세포 노화라고 한다(27). 세포 노화는 *in vivo*에서 세포가 재생 능력을 잃고 더 이상의 세포 분열을 안 하는 것을 말하며 DNA 손상을 주는 경우 나타난다(28). 노화된 세포는 pH 6.0에서 lysosome의 β -galactosidase의 발현량이 증가하여 β -galactoside 결합을 분해한다. 또한, 정상 세포에 비해 morphology가 납작해지고 커지며 SA- β -gal의 활성이 뚜렷하게 증가한다. 그러므로 세포 노화의 생물학적 표지자로서 SA- β -gal 활성이 이용된다(29).

따라서 SA- β -gal 활성을 통해 농도별 BbCS, BbICFE를 처리하여 UV-B에 의해 유도된 HDFs의 노화에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 그 결과 UV-B가 조사되지 않은 HDFs 경우 노화율이 3.3%인 반면, UV-B만 조사된 HDFs는 52.7%로 증가하였다. 하지만 0.005% BbICFE와 0.01% BbCS 처리한 HDFs의 노화율은 각각 23.8%, 12.7%로 0.01% BbCS 처리한 경우 노화율이 40.0% 감소하였다. BbCS는 농도 의존적으로 노화율이 현저히 감소하였다($P<0.05$). 또한, ascorbic acid 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리한 HDFs의 노화율

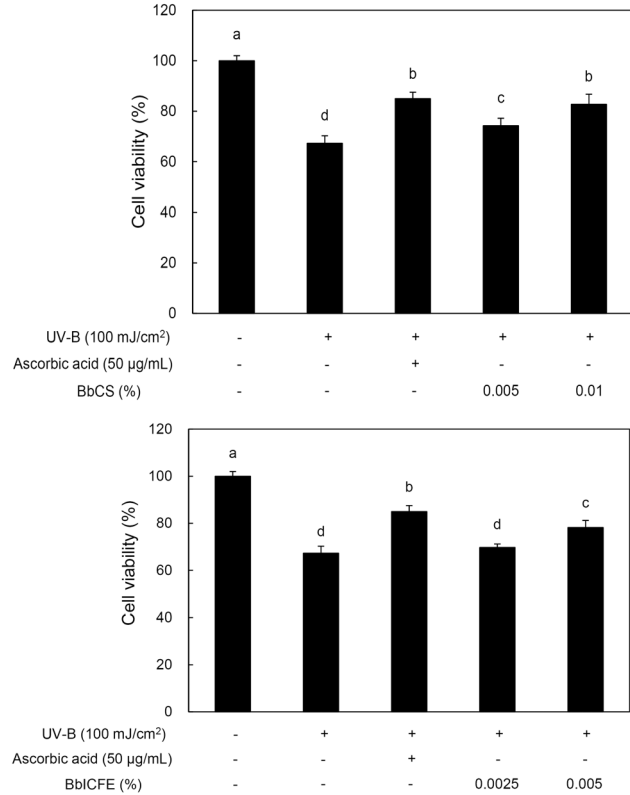


Fig. 3. Effect of cell viability by BbCS and BbICFE in UV-B irradiated HDFs. Values with different letters above the bars are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

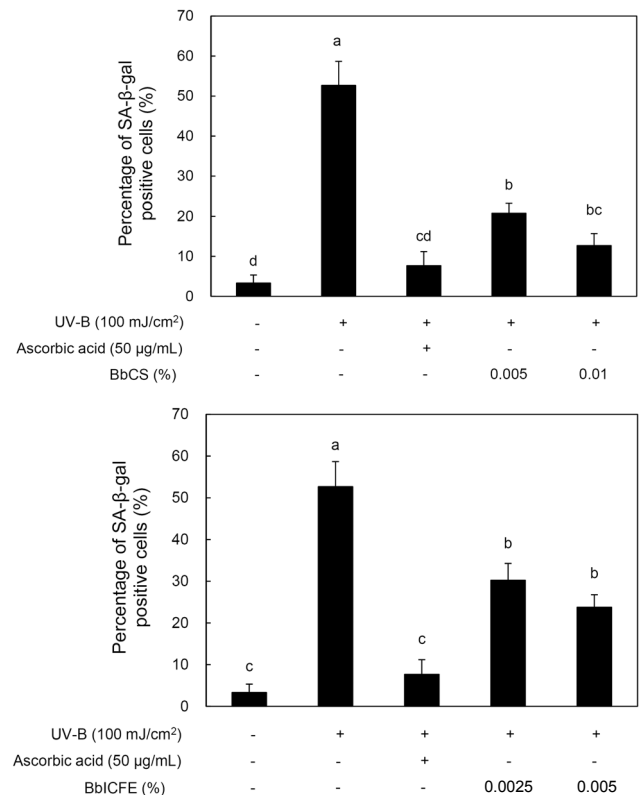


Fig. 4. Effect of BbCS and BbICFE on SA- β -gal activity in UV-B irradiated HDFs. Values with different letters above the bars are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

7.7%와 비교하여 0.01% BbCS를 처리한 HDFs 경우 노화 억제율이 가장 근접하였다(Fig. 4). 또한, *B. longum*의 intracellular cell free extracts 연구에서 HDFs에 0.02% 농도를 처리 시 노화율이 22.9% 감소(26)한 것과 비교하여 0.01% BbCS 처리 시 노화율이 40.0% 감소로 더 높았다.

세포 내 p53과 p21의 단백질 발현량 변화

UV-B에 지속해서 노출될 경우 UV-B가 피부에 흡수되어 활성산소종을 발생시키고, 이는 산화적 스트레스로 DNA를 손상, 단백질 산화 등을 유발시킨다. 세포의 DNA가 손상되면 p53이 급격히 발현하며 그 결과 p53의 하위 유전자인 p21의 발현이 유도된다(30).

HDFs에 BbCS, BbICFE 처리하여 UV-B에 노출할 경우 HDFs 내 p21과 p53 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 먼저 p21에서 UV-B만 조사한 HDFs의 발현율 100%와 비교하여 0.01% BbCS 처리한 HDFs의 발현율은 29.2%로 가장 낮은 발현율을 확인하였다. 반면에 0.0025% BbICFE는 75.3%로 p21 발현율 감소 효과가 가장 낮았다. 또한, p53에서 UV-B만 조사한 HDFs의 발현율 100%와 비교하여 0.01% BbCS 처리한 HDFs의 발현율은 53.0%로 가장 낮은 수치를 확인하였으며 0.0025% BbICFE는 81.4%로 p53 발현율이 가장 높았다. p21의 발현은 p53에 의하여 제어되는 양상과 다소 차이를 보였으며 대부분 시료별 농도가 증가함에 따라 p21과 p53은 현저히 감소함을 확인

하였다($P<0.05$)(Fig. 5). UV-B 조사에 의해 발현된 p21과 p53의 증가가 항산화 효과로 인하여 점차 감소하는 연구 결과(31,32)와 비교하여 BbCS와 BbICFE에서 항산화 효능이 있다고 판단된다.

세포주기 측정

세포주기는 세포가 복제되는 과정으로 DNA 복제가 일어나는 S기, 세포질 분리가 일어나는 M기, S기와 M기 사이에 존재하는 G2기, M기와 S기 사이에 존재하는 G1기로 구분된다. 이러한 과정으로 진행되는 세포주기는 하나의기가 완성되어야 다음의 기로 진행되는 특징을 갖고 있으며 이를 체크포인트(checkpoint)라고 한다(33). Sub-G1기는 정상적인 세포주기에서 거의 나타나지 않는 구간으로 Sub-G1기에서 세포주기 억제는 세포의 성장이 정지되며, 이는 apoptosis가 유발되는 것을 의미한다.

Propidium iodide는 이중 나선 DNA나 RNA의 염기 사이에 들어가 결합하는 형광 물질이다. 염기 서열에 특이적이지 않으며, 약 4.5 염기당 한 분자의 빈도로 결합한다. Propidium iodide는 Flow cytometry로 세포 내 DNA를 정량적으로 분석하는 실험에 이용된다. DNA 복제가 완료된 G2/M기의 세포당 DNA 양이 G0/G1기 세포에 비해 두 배가량 많기 때문에, 세포 내 DNA를 propidium iodide staining 하고 flow cytometry를 하여 세포주기를 분석할 수 있다(34).

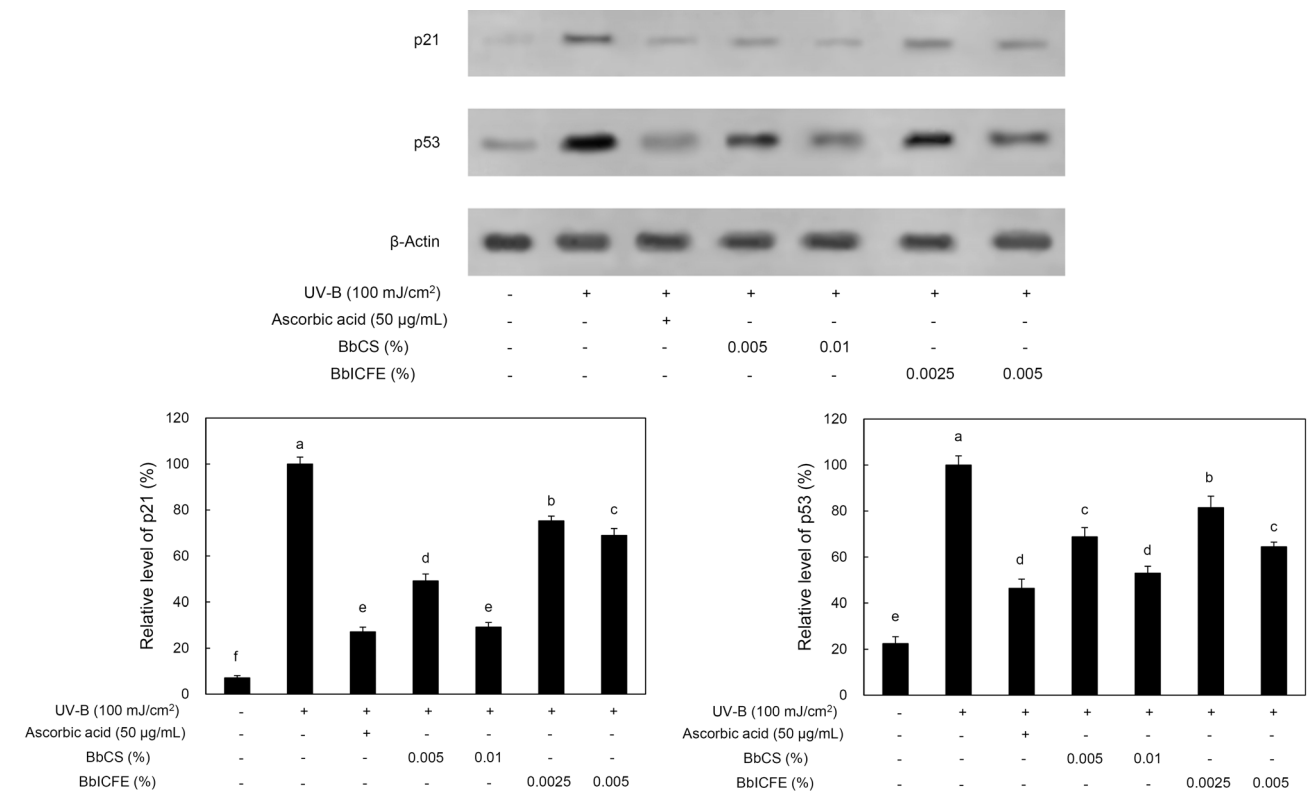


Fig. 5. Expression of p21 and p53 in UV-B irradiated HDFs. Values with different letters above the bars are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 1. The effect of BbCS and BbICFE on cell cycle in UV-B exposed HDFs

Groups		Percentage of cells (%)			
		Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
Normal control		1.24±0.35 ^d	64.5±1.35 ^a	8.96±0.67 ^a	25.3±1.06 ^b
UV-B 100 mJ/cm ²	UV-B control	15.2±0.37 ^a	52.1±1.47 ^b	6.30±0.78 ^b	26.4±0.86 ^b
	Ascorbic acid	3.16±0.36 ^c	54.8±2.20 ^b	7.64±0.66 ^{ab}	34.4±0.98 ^a
	0.01% BbCS	3.34±0.25 ^c	55.4±2.12 ^b	8.76±0.55 ^a	32.5±0.93 ^a
	0.005% BbICFE	4.48±0.43 ^b	65.1±1.17 ^a	4.12±0.47 ^c	26.3±1.10 ^b

Values are mean±SD.

Different letters (a-c) within the same column indicate significant differences at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

따라서 HDFs가 BbCS와 BbICFE 처리 후 UV-B에 노출 될 경우 세포주기의 변화를 확인하고자 propidium iodide staining을 하였다. UV-B만 조사한 HDFs에서 Sub-G1기는 15.2%로 관측되었으며 UV-B 조사하지 않은 HDFs에서는 1.24%로 관측되었다. Ascorbic acid 50 µg/mL를 처리한 HDFs에서는 3.16%로 처리하지 않은 그룹보다 12.0% 낮은 Sub-G1 주기 수치가 나타났다. 0.01% BbCS 처리한 HDFs는 3.34%로 시료 중 가장 낮은 Sub-G1 주기를 보였으며 0.005% BbICFE 처리한 HDFs의 Sub-G1 주기가 4.48%로 관측되었다($P<0.05$)(Table 1). *B. longum*의 intracellular cell free extracts 연구에서 HDFs의 세포주기 결과, Sub-G1기가 감소함을 보고(26)하였으며 장내세균이 UV-B에 의한 apoptosis를 줄여주는 데 영향이 있다고 생각된다. 또한, 모든 시료에서 propidium iodide staining 결과로 정상 세포주기에서는 거의 발견되지 않은 Sub-G1기 세포 수가 감소하였으므로 apoptosis를 억제하여 세포주기를 정상화하는 데 영향을 미치는 것으로 판단된다.

세포 내 활성산소종 측정

비극성 분자인 DCFH-DA는 HDFs 내로 들어가면서 DCFH로 분해되며, HDFs 내 활성산소종에 의해 DCF로 변화되어 녹색형광을 나타낸다. 따라서 HDFs 내의 활성산소종의 농도가 증가할수록 녹색형광을 나타낸다. 이러한 원리

에 의해 HDFs 내 활성산소종 억제능을 확인하였으며, FL1-parameter로 형광 정도를 측정하였다(35).

UV-B만 조사한 HDFs 내 활성산소종 생성능 100%와 비교하여 UV-B 처리하지 않은 HDFs의 활성산소종 생성능은 46.0%로 확인하였다. Ascorbic acid 50 µg/mL를 처리한 HDFs에서는 52.0%로 나타났으며, HDFs에 각각 0.01% BbCS, 0.005% BbICFE 처리 후 활성산소종 생성능은 65.9, 66.7%로 관찰되었다. 0.01% BbCS, 0.005% BbICFE 처리 시 세포 내 활성산소종 생성능에서 유의적 차이는 보이지 않았다($P<0.05$)(Fig. 6).

Lactobacillus plantarum, *Lactobacillus bulgaricus* DSMZ 20080, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*, *B. longum*의 culture supernatants와 intracellular cell free extracts의 연구에서 뛰어난 활성산소종 억제능을 보고하였다(36). 또한, *Lactobacillus* spp.의 culture supernatants에서도 우수한 항산화능(37)을 확인하였고 *L. plantarum*의 intracellular cell free extracts에서 항산화소제로 입증하였다(38). 이는 장내세균에서 ascorbic acid, α-tocopherol, uric acid, bilirubin, glutathione 등을 생성(39,40)하고 이는 활성산소종 제거능을 갖기 때문에 UV-B에 의한 손상 억제 효능을 지닌다고 생각된다.

따라서 *B. bifidum* 배양액과 추출액은 UV-B 조사로 증가한 활성산소종을 감소시켜 산화적 스트레스를 억제시켰음을 알 수 있었다. 이러한 효과로 활성산소종의 생성능을 억제시켜 p21과 p53의 발현율과 세포 노화를 및 apoptosis가 감소하였다. 이는 곧 세포생존율에 영향을 미쳤으며 UV-B에 대한 보호 효과를 입증하였다.

요 약

본 연구는 장내세균 *Bifidobacterium bifidum* 배양액과 추출액을 사용하여 자외선B를 조사한 인간 진피섬유아세포에서 세포생존율과 세포 노화 및 세포주기의 변화를 살펴봄으로써 자외선B에 의한 세포 보호 효능을 평가하였다. 우선 자외선B를 조사한 결과 광량에 비례하여 HDFs의 생존율이 감소하였으며 100 mJ/cm² 조사 시 67.3%로 떨어졌으나 *B. bifidum* 배양액과 추출액 처리 후 세포생존율을 증가시켜 자외선B에 대한 보호 효능이 있었다. 그리고 SA-β-gal

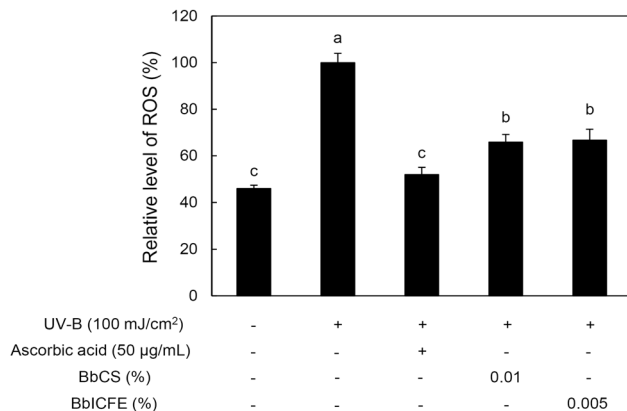


Fig. 6. Summary of treatment effect on cellular ROS level in UV-B irradiated HDFs. Values with different letters above the bars are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

activity 변화를 측정한 결과에서 세포 노화율을 감소시켰음을 확인하였다. 또한, propidium iodide staining을 통하여 세포주기상 Sub-G1기 세포 수가 감소하였으므로 apoptosis를 억제하였고 이는 세포주기를 정상화하는 데 긍정적인 영향을 미쳤다. *B. bifidum* 배양액과 추출액 처리한 결과 세포 내 활성산소종이 감소함에 따라 p53과 p21의 발현을 감소시켰으며, 따라서 이에 본 연구에서 *B. bifidum* 배양액과 추출액은 UV-B로 인한 손상을 보호하는 효과가 있음을 규명하였다.

REFERENCES

1. Cho WG. 2007. Comparison of drug delivery using hairless and pig skin. *J Korean Oil Chemists' Soc* 24: 410-415.
2. Ahotupa M, Saxelin M, Korpela R. 1996. Antioxidative properties of *Lactobacillus* GG. *Nutrition Today* 31: 51S.
3. Korpela R, Peuhkuri K, Lähteenmäki T, Sievi E, Saxelin M, Vapaatalo H. 1997. *Lactobacillus rhamnosus* GG shows antioxidative properties in vascular endothelial cell culture. *Milchwissenschaft* 52: 503-505.
4. Sanders JW, Leenhouts KJ, Haandrikman AJ, Venema G, Kok J. 1995. Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *J Bacteriol* 177: 5254-5260.
5. Di Marzio L, Cinque B, De Simone C, Cifone MG. 1999. Effect of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* on ceramide levels in human keratinocytes *in vitro* and stratum corneum *in vivo*. *J Invest Dermatol* 113: 98-106.
6. Prince T, McBain AJ, O'Neill CA. 2012. *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus*-induced cell death by competitive exclusion. *Appl Environ Microbiol* 78: 5119-5126.
7. Marks JG, Miller J. 2006. *Lookingbill and Marks' principles of dermatology*. 4th ed. Elsevier Health Sciences, Oxford, UK. p 8-9.
8. Baumann L. 2007. Skin ageing and its treatment. *J Pathol* 211: 241-251.
9. Chung JH. 2003. Photoaging in Asians. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 19: 109-121.
10. Afaq F, Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H. 2002. Botanical antioxidants for chemoprevention of photocarcinogenesis. *Front Biosci* 7: d784-d792.
11. Clydesdale GJ, Dandie GW, Muller HK. 2001. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol Cell Biol* 79: 547-568.
12. Katiyar SK, Matsui MS, Elmets CA, Mukhtar H. 1999. Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochem Photobiol* 69: 148-153.
13. 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: 1419-1428.
14. Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT. 2006. UVB-mediated induction of cytokines and growth factors in pterygium epithelial cells involves cell surface receptors and intracellular signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 2430-2437.
15. Shimauchi T, Sugita K, Nishio D, Isoda H, Abe S, Yamada Y, Hino R, Ogata M, Kabashima K, Tokura Y. 2008. Alterations of serum Th1 and Th2 chemokines by combination therapy of interferon-gamma and narrowband UVB in patients with mycosis fungoides. *J Dermatol Sci* 50: 217-225.
16. Yoshizumi M, Nakamura T, Kato M, Ishioka T, Kozawa K, Wakamatsu K, Kimura H. 2008. Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT. *Cell Biol Int* 32: 1405-1411.
17. Erden Inal M, Kahraman A, Köken T. 2001. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. *Clin Exp Dermatol* 26: 536-539.
18. Thiele J, Elsner P. 2001. *Oxidants and antioxidants in cutaneous biology*. Karger Publishers, Basel, Switzerland. p 1-17.
19. Jo HR, Lee HJ, Kang MH. 2011. Antioxidative status, DNA damage and lipid profiles in Korean young adults by glutathione s-transferase polymorphisms. *Korean J Nutr* 44: 16-28.
20. Lee EH, Lee JK, Hong JT, Jung KM, Kim YK, Lee SH, Chung SY, Lee YW. 2001. Protective effect of green tea extract, catechin on UVB-induced skin damage. *J Fd Hyg Safety* 16: 117-124.
21. Kim JS, Kim JB. 2011. The effects of extracts from mulberry (*Morus alba*) leaves and branches on UVB-induced skin damage. *J Kor Sor Cosm* 17: 993-999.
22. Bossi O, Gartsbein M, Leitges M, Kuroki T, Grossman S, Tennenbaum T. 2008. UV irradiation increases ROS production via PKC δ signaling in primary murine fibroblasts. *J Cell Biochem* 105: 194-207.
23. Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blaudschun R, Wenk J. 1997. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol Chem* 378: 1247-1257.
24. Miyachi Y. 1995. Photoaging from an oxidative standpoint. *J Dermatol Sci* 9: 79-86.
25. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
26. Yoon Y, Choi SJ, Park WJ, Eom SY, Lee SK, An IS. 2012. The protective effect of extracts of *Bifidobacterium longum* against ultraviolet B in human dermal fibroblasts. *Kor J Aesthet Cosmetol* 10: 887-891.
27. Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.
28. Park JS. 2004. Cellular senescence, apoptosis and carcinogenesis. *J Korean Geriatr Soc* 8: 1-7.
29. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9363-9367.
30. Pontén F, Berne B, Ren ZP, Nistér M, Pontén J. 1995. Ultraviolet light induces expression of p53 and p21 in human skin: effect of sunscreen and constitutive p21 expression in skin appendages. *J Invest Dermatol* 105: 402-406.
31. Macip S, Igarashi M, Fang L, Chen A, Pan ZQ, Lee SW, Aaronson SA. 2002. Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J* 21: 2180-2188.
32. El-Missiry MA. 2012. Antioxidant role of p53 and of its target TP53INP1. In *Antioxidant Enzyme*. Seillier M, Peugot S, Dusetti NJ, Carrier A, eds. Intech, Rijeka, Croatia. p 117-138.
33. Hartwell LH, Weinert TA. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634.

34. Riccardi C, Nicoletti I. 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature publishing* 238: 1458-1461.
35. Aranda A, Sequedo L, Tolosa L, Quintas G, Burello E, Castell JV, Gombau L. 2013. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicology in Vitro* 27: 954-963.
36. EL-Adawi HI, Khalil MA, EL-Sheekh MM, El-Deeb NM, Hussein MZ. 2012. Cytotoxicity assay and antioxidant activities of the lactic acid bacterial strains. *Afr J Microbiol Res* 6: 1700-1712.
37. Xing J, Wang G, Zhang Q, Liu X, Gu Z, Zhang H, Chen YQ, Chen W. 2015. Determining antioxidant activities of lactobacilli cell-free supernatants by cellular antioxidant assay: a comparison with traditional methods. *PLoS One* 10: e0119058.
38. Hong YF, Lee HY, Jung BJ, Jang S, Chung DK, Kim H. 2015. Lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* down-regulates UV-induced MMP-1 expression and up-regulates type I procollagen through the inhibition of reactive oxygen species generation. *Mol Immunol* 67: 248-255.
39. Fang FC. 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* 2: 820-832.
40. Donkó Á, Péterfi Z, Sum A, Leto T, Geiszt M. 2005. Dual oxidases. *Philos Trans R Soc B* 360: 2301-2308.