

유색미 에탄올 추출물의 산화방지 효과와 UVB에 유도된 인간유래 피부각질형성세포에서의 항노화 효과

최은영^{1,*} · 이진태¹

¹대구한의대학교 화장품약리학과

The effects of antioxidant and anti-aging treatment of UVB-irradiated human HaCaT keratinocytes with ethanol extracts of colored rice varieties

Eun-Young Choi^{1,*} and Jin-Tae Lee¹

¹Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongbuk

Abstract In this study, we investigated the antioxidant activities and anti-aging efficacy in terms of suppression of matrix metalloproteinases (MMPs) in UVB-irradiated HaCaT cells by adding the ethanol extracts of Josaengheogchal (JE) and Shintoheug rice (SRE). In the electron-donating ability and ABTS radical-scavenging assays, we observed that both JE and SRE had scavenging activities and in a collagenase inhibition assay, both extracts showed inhibition effects of over 73% at 1,000 µg/mL concentration. The expression of MMP-1 and -3, when the extracts were treated with UVB 50 mJ/cm², irradiated human HaCaT keratinocytes, was analyzed by western blotting and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that MMP-1 and -3 proteins and mRNAs were downregulated in a concentration-dependent manner in response to both extracts. Therefore, we expect that these compounds have a potential for the use as functional ingredients with anti-aging effects in the cosmetic and food industries.

Keywords: anti-aging, colored rice, human HaCaT keratinocytes, matrix metalloproteinases

서 론

피부 노화요인 가운데 외인성 노화(extrinsic aging)는 태양광선 등의 누적된 외부 스트레스에 의해 피부가 얇아지거나 주름이 증가되고 탄력이 감소되고 기미, 주근깨 및 검버섯 등이 증가하게 된다. 특히 UVB는 피부 섬유아세포와 표피상피세포의 DNA에 직접적인 손상을 주어 화상, 광노화, 피부암 등을 촉발하는 경로와 간접적으로는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성으로 인한 세포의 지방질막 손상과 세포 염증반응, 피부 구성단백질의 손상 등에 의한 광노화(photoaging)를 유발시킨다(Sun 등, 2015). 매우 낮은 강도의 UVB에 의한 피부세포의 산화 스트레스의 증가는 matrix metalloproteinase (MMP)의 발현을 가속화시켜 피부 콜라겐이 감소하게 된다(Jenkins, 2002; Oh 등, 2015). MMPs group은 collagenase, gelatinase, stromelysin, membrane-type MMP로 나눌 수 있으며, 약 20여 종류가 알려져 있다(Brinckerhoff 등, 2000). 이 중 collagenase group에는 MMP-1, -8, -13이 포함되며 주로 제 I형, II형, III형 콜라겐을 분해한다. Gelatinase group에는 MMP-2, -9가 포함되며 MMP-1에 의해 분

해된 콜라겐 조각들을 더 잘게 분해해 피부 노화에 주요한 역할을 한다. Stromelysin group에는 MMP-3, -10, -11이 포함되며, 주로 제 IV형 콜라겐을 분해한다(Kusukawa 등, 1996). 최근 노령인구의 증가로 노화를 지연시킬 수 있는 약물에 대한 관심이 크게 증가함에 따라 새로운 피부노화 억제제나 치료제 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 현대인들은 만성질환 및 성인병이 사회적인 문제로 대두됨에 따라 건강한 삶을 위한 웰빙(well-being) 및 기능성 식품에 대한 관심이 높아지면서 주식으로 기존의 백미에서 유색미로 대체하여 섭취하는 경향이 증가하고 있다(Ryu 등, 2005). 우리나라에서 유통되는 유색미는 흑미와 적미 등이 있으며(Nam 등, 2003), 품종에 따라 과피에는 다양한 자연 색소를 함유하고 있다(Kang 등, 2005). 흑미는 polyphenolics, 플라보노이드, 안토시아닌, 바이타민, 감마오리자놀 등의 기능성 성분들을 함유하고 있어 비교적 강한 산화방지 활성이 있고(Slavin 등, 1999), 적미는 탄닌계 색소 뿐 아니라 카테킨 및 카테콜 타닌 등 다양한 기능성 성분을 함유하고 있다고 보고되었으며(Choi와 Oh, 1996), 항암활성(Nam과 Kang, 1998)과 DNA 손상을 회복시켜주는(Tsuda 등, 1998) 효과에 대한 보고 등 다양한 연구들이 이루어지고 있다. 선행된 연구에서 이미 선별된 유색미 5종에 대한 생리활성에 대한 연구를 진행하였으며, 본 연구에서는 효과가 우수했던 조생흑찰과 신토흑미의 에탄올 추출물을 이용하여 사람 피부 표피세포에서의 MMP-1 (collagenase group)과 MMP-3 (stromelysin group), MMP-2와 9 (gelatinase group)의 단백질 발현 억제와 MMP-1과 MMP-3의 mRNA 발현에 대한 억제 활성을 알아보고자 하였다.

*Corresponding author: Eun-Young Choi, Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongbuk, 38578, Korea
Tel: +82-53-819-7745
E-mail: eychoi@dhu.ac.kr
Received July 12, 2018; revised September 15, 2018;
accepted November 16, 2018

재료 및 방법

시료의 추출

본 실험에 사용된 선별된 유색미는 조생흑찰(J)과 신도흑미(SR)의 2종으로 2015년 국립식량과학원(Miryang, Korea)에서 제공받아 에탄올을 이용하여 추출을 실시하였다. 시료 중량의 10배 양의 70% 에탄올에 침지하여 상온에서 24시간 방치하여 상층액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하였다. 각 추출물들은 여과지(Whatman No. 2, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 여과한 후 농축·냉동건조하여 냉장보관하면서 실험에 사용되었다.

전자공여능 측정

전자공여능은 Blois(1958)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 각 시료용액 100 μ L에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich Co.) 50 μ L 넣어 잘 혼합한 후 암소에서 30분간 반응시킨 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH를 이용한 산화방지 활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

ABTS 라디칼 제거능 측정

ABTS 라디칼 제거활성의 측정은 Park 등(2016)의 방법에 의해 측정하였다. 즉 7.4 mM ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), (Sigma-Aldrich Co.) 0.5 mL와 2.6 mM 과황산포타슘($K_2S_2O_8$) 88 μ L를 섞은 용액 1 mL와 에탄올 88 mL를 혼합한 ABTS용액 1 mL를 1:1로 섞은 후 12시간 동안 라디칼을 형성시킨 용액을 99% 에탄올에 약 1:13의 비율로 섞어서 734 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.706 ± 0.001 이 되도록 조절한 ABTS 용액을 사용하였다. 시료용액 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 저해활성 측정은 Cannell 등(1988)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 즉 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM $CaCl_2$ 를 첨가하여, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.)를 녹인 기질액 0.25 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/mL, Sigma-Aldrich Co.) 0.15 mL를 첨가하여 실온에서 20분간 정지한 후 6% 시트르산 0.5 mL을 넣어 반응을 정지시킨 후 아세트산에틸 1.5 mL을 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 억제활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

세포의 배양

Human 유래 keratinocyte cell line인 HaCaT cells는 German Cancer Research Center (DKFZ, Germany)로부터 공급받았으며, 10% FBS와 페니실린/스트렙토마이신(Sigma-Aldrich Co.) 100 unit/mL이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL Co., Grand Island, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 incubator (MCO-18AIC, SANYO Co., Sakata, Japan)에서 배양하였으며, 2-3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다.

MTT assay

세포 생존율 측정은 Mosmann(1983)의 방법에 따라 측정하였다. HaCaT cell을 96well plate에 1×10^6 cells/well이 되게 0.18 mL 분주하고, 시료를 농도별로 조제하여 0.02 mL 첨가한 후 UV-B (LP471 UVB probe, Delta OHM, Padova, Italy)를 이용하여 cell plate와의 거리가 25 cm가 되도록 설치하여 50 mJ/cm²를 조사하고 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Co.) 용액 0.02 mL를 첨가하여 4시간 배양한 후 상층액을 제거하고, 형성된 포마잔에 각 well당 0.1 mL의 DMSO 용액과 0.1 mL의 에탄올을 가하여 실온에서 차광하여 30분간 반응시킨 뒤 ELISA reader (PowerWave XS, Biotek, Winooski, VT, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

웨스턴 블롯을 통한 단백질의 발현 측정

MMP-1과 -3의 발현을 보기 위하여 HaCaT cell을 96 well culture plate에 1×10^6 cells/mL로 cell seeding 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화시켰다. 배지를 제거한 후 시료를 농도별로 처리하고 30분간 반응시킨 후 UV-B (50 mJ/cm²)를 조사하고 24시간 동안 배양 후에 상층액을 제거하고 PBS로 2번 세척하였다. Cell을 harvest하여 radio-immuno-precipitation assay (RIPA) lysis buffer 200 μ L에 cell을 용출시켜 단백질을 수확·원심분리하여 얻은 상층액은 Bradford assay로 정량하고 SDS-PAGE에서 전기영동하여 분리하였다. Gel을 3시간 동안 polyvinylidenedifluoride (PVDF) membrane (Sigma-Aldrich Co.)에 옮긴 다음 4°C에서 4시간 동안 5% 탈지우유(skim milk)로 blocking 하였다. Primary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)를 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 overnight 하고 나서 TBST로 30분간 교반하여 세척하는 과정을 3회 반복하였다. 각각의 HRP-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 희석하여 상온에서 1시간 동안 처리하고 다시 TBST로 10분간 교반하여 세척하는 과정을 3회 반복한 뒤 ECL 용액을 가한 후 Western imaging system (EZ-Capture MG, ATTO, Amherst, NY, USA) 기기를 이용하여 밴드를 확인 및 정량하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

HaCaT cell은 100 mm dish에 3×10^5 cells/mL이 되게 분주하고 37°C에서 5% CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양 후 무혈청 배지 처리하여 다시 24시간 배양하였다. UV-B (50 mJ/cm²)를 조사하고 나서 무혈청 배지 9 mL과 시료를 농도별로 1 mL을 첨가하여 24시간 배양한 뒤 세포의 배양액을 harvest하여 human ELISA MMPs kit (Sigma Chemical Co.)을 사용하여 MMPs의 발현을 확인하였다.

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

RNA는 high pure RNA isolation kit (Roche, Basel, Switzerland)를 이용하였으며 제조회사의 방법에 준하여 total RNA를 추출하였으며 1 μ g/ μ L의 농도로 정량하고 추출된 total RNA는 transcriptor first Stand cDNA synthesis kit (Roche, Basel, Swiss)를 이용하여 역전사를 진행시켜 cDNA를 합성시켰다. 유전자 발현은 fast start essential DNA green master kit (Roche)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 이 분석에서 내부 대조구는 베타액틴(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)을 사용하였고 primer (Santa Cruz Bio-

technology, Inc.)의 순서는 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'), 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 변성(denaturation)시킨 후 40 cycle을 증폭시켰다. 95°C에서 60초간 변성, 60°C에서 60초간 아닐링(annealing), 72°C에서 65초간 extension시켰다. MMP-3은 94°C에서 60초간 40 cycle을 증폭시킨 후 60°C에서 60초간, 72°C에서 60초간 실행시켰다. RT-PCR 증폭으로 생산된 DNA는 0.5 μ g/mL의 ethidium bromide가 포함된 1% metaphor agarose gel에 전기이동하여 cooled CCD camera system EZ-Capture II와 CA analyzer software (version 3.00, EZ-Capture MG ATTO, Amherst, NY, USA)를 이용하여 mRNA의 발현 정도를 확인하였다.

통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS 25.0 (IBM SPSS Inc., NY, USA)를 이용하여 평균과 표준편차로 나타내었고, 각 처리군 간의 유의성에 대한 검증은 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 이용하여 유의성을 확인한 후, Duncan's multiple range tests ($p < 0.05$)로 다중비교를 실시하여 분석하였다.

결과 및 고찰

전자공여능 활성 결과

DPPH는 매우 안정한 자유라디칼로서 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. 만일 시료가 항산화 활성을 가지고 있다면 DPPH가 갖고 있는 지질산화에 관여하는 자유라디칼의 비공유결합을 소거하여 DPPH의 환원성을 높일 것이고, DPPH가 환원이 많이 될수록 보라색을 잃게 되어 UV 측정 시 그 수치도 낮아진다(Ancerewicz 등, 1998; Heo 등, 2006). 선별된 유색미 2종에 대한 전자공여능 활성결과를 Fig. 1(A)에 나타내었다. JE와 SRE 모두 500 μ g/mL 농도에서 88.5%와 88.9% 이상의 높은 DPPH 라디칼 제거능을 보였다. Lee 등(2007)은 고아미 2호벼, 큰눈벼 및 흑광벼의 70% 에탄올추출물이 5 mg/mL의 농도에서 22.6, 26.3 및 32.5%의 활성을 가진다고 보고하였고, Woo 등(2008)은 수원511호 및 일품쌀의 70% 에탄올 추출물에 대한 DPPH 라디칼 제거활성은 1 mg/mL의 농도에서 각각 14.16%와 10.92%, 5 mg/mL의 농도에서 각각 42.00%와 30.10%의 활성을 보고하였으며, Song 등(2005)은 유색보리 40계통의 평균값이 69.82 \pm 10.21%의 전자공여능을 나타내었다고 보고한 것과 비교하였을 때, 선별된 유색미 2종인 JE와 SRE의 자유 라디칼 제거활성이 매우 우수함을 확인할 수 있었다.

ABTS 라디칼 제거 활성 결과

ABTS 라디칼을 이용한 산화방지력의 측정은 과황산포타슘과의 반응에 의해 생성된 ABTS 자유 라디칼이 추출물 내의 산화방지력 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 측정방법이다(Kim 등, 2009). JE와 SRE에 대한 ABTS 라디칼 제거활성 결과는 Fig.1(B)에 나타내었다. JE와 SRE 모두 100 μ g/mL 이상의 농도에서 93.5%와 95.7% 이상의 ABTS 라디칼 제거능을 나타내었는데, 이는 양성 대조군인 BHT보다도 높은 제거능이었다. Seo 등(2013)은 건강홍미, 적진주벼,

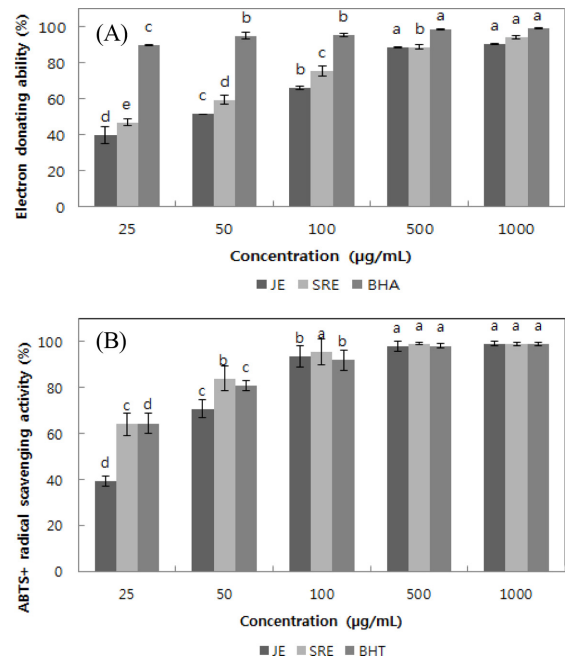


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity (A) and ABTS radical scavenging activity (B) of colored rice extracts. JE: 70% Ethanol extract of Josaengheugchal, SRE: 70% Ethanol extract of Shintoheug Rice, BHA: Butylated Hydroxy Anisole (Positive control), BHT: Butylated Hydroxy Toluene (Positive control), Results are means \pm SD of triplicate data. Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

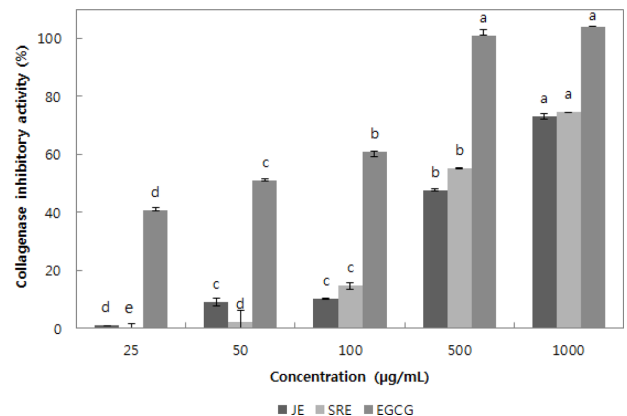


Fig. 2. Collagenase inhibitory ability of colored rice extracts. JE: 70% Ethanol extract of Josaengheugchal, SRE: 70% Ethanol extract of Shintoheug Rice, EGCG: Epigallocatechin gallate (Positive control), Results are means \pm SD of triplicate data. Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

남평벼의 에탄올 추출물의 경우 대한 0.2 mg/mL의 농도에서 약 63.2, 52.2%, 그리고 32.1%라고 보고하였으며, Park 등(2016)은 남부 평야지에서 생산된 유색미 18종에 대한 항산화 활성을 연구한 결과에서 흑진주가 14.70 \pm 0.62 μ g/mL의 IC₅₀값을 나타내었고, 신토흑미와 신평흑찰이 각각 16.79 \pm 1.56 및 17.01 \pm 2.72 μ g/mL의 순으로 산화방지 활성이 높았다고 보고하였다. 이러한 기존의 연구 결과와 비교하였을 때 JE와 SRE가 우수한 산화방지 활성을 나타내었음을 확인할 수 있었다.

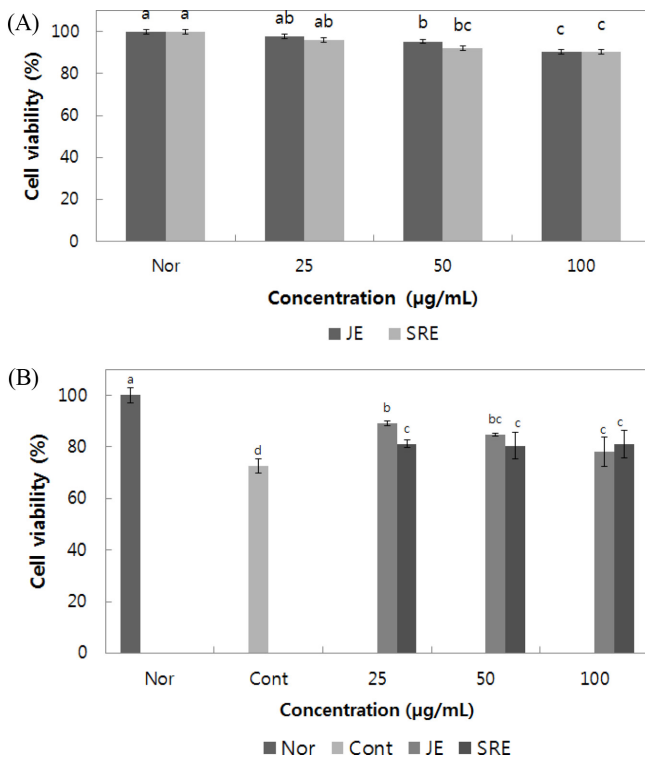


Fig. 3. Cell viability assay on Human HaCaT cells of colored rice extracts. (A) The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of Colored rice extracts (B) and treatment with UVB (50 mJ/cm²). Nor: not treated any extract and UVB, Cont: only treated UVB, JE: 70% Ethanol extract of Josaengheugchal, SRE: 70% Ethanol extract of Shintoheug Rice, Results are means±SD of triplicate data. Means with different letters (a-d) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

Collagenase 억제 활성 결과

콜라겐은 피부에서 탄력과 결합에 중요한 역할을 하고 있는데 트립신과 같은 단백질 분해효소의 작용을 받지 않고 collagenase에 의해 분해된다(Fanger 등, 1997). 따라서 collagenase는 세포외기질 단백질을 분해하는 효소로 피부의 주름생성을 촉진시키는 요인이 된다. 이러한 collagenase 억제능 실험결과는 Fig. 2와 같다. JE와 SRE 모두 1,000 µg/mL의 농도에서 각각 73.2, 74.4% 이상의 효소 억제능을 나타내었다. Lee 등(2018)의 연구보고에 따르면, 딸기의 80% 에탄올 추출물이 collagenase를 저해하는 IC₅₀ value가 3.08±0.22 mg/mL이라고 보고하였고, Min 등(2004)이 보고한 단삼의 에탄올추출물에 대한 분획물 가운데 chloroform fraction 1%의 농도에서 88.2±2.1%의 억제활성을 나타낸 결과와 비교했을 때, 우리의 결과가 비교적 높은 collagenase 저해 효능을 나타내고 있음을 확인할 수 있었으며, 아직까지 일반미나 잡곡, 유색미의 collagenase 억제 활성에 대한 연구결과는 미흡한 실정이다.

세포 생존율 측정 결과

Yellow tetrazolium salt MTT는 담황색 기질로서 살아있는 세포의 미토콘드리아 내의 환원효소에 의해 환원되어 포마잔(formazan)을 생성하는데 죽어있는 세포에서는 형성되지 않고 살아있는 세포의 수가 많을수록 포마잔의 생성도 많아지고 세포의 성장을 측정할 수 있다(Gross와 Lapiere, 1962). JE와 SRE에 대한 사람각질

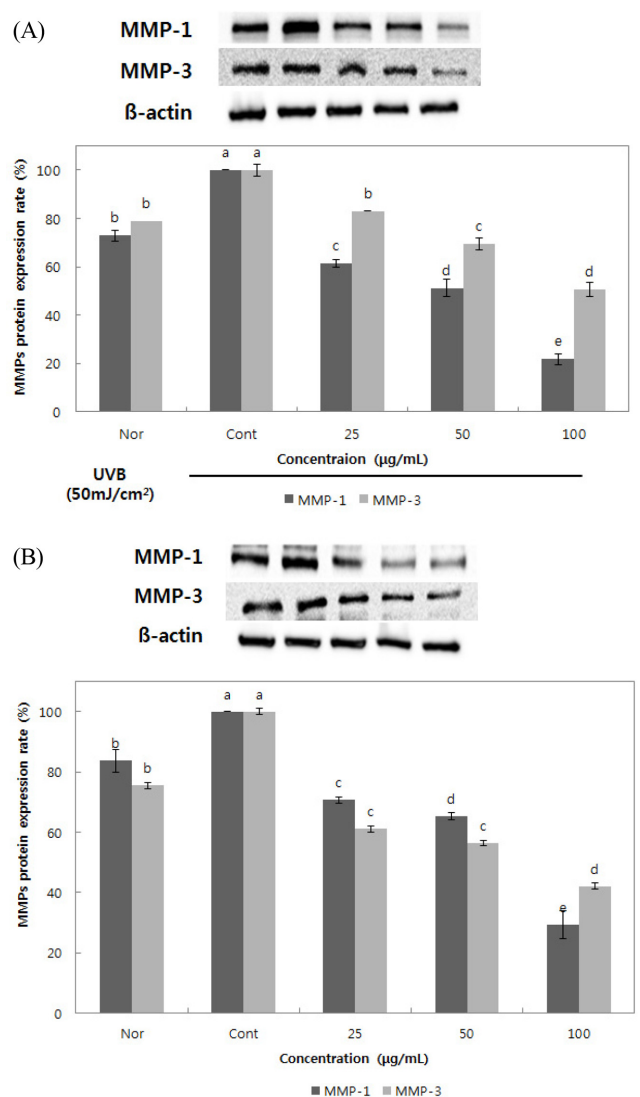


Fig. 4. Expression levels of MMP-1 and -3 on UVB-stimulated HaCaT cells from colored rice extracts. The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of extracts before treatment with UVB (50 mJ/cm²) for 24 h. The results were analyzed by western blot. Nor: not treated any extract and UVB, Cont: only treated UVB, (A) JE: 70% Ethanol extract of Josaengheugchal, (B) SRE: 70% Ethanol extract of Shintoheug Rice. Bands are representative of three or four experiments. The percentage indicates the MMP-1 and -3 ratios relative to the β-actin. Means with different letters (a-e) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

세포인 HaCaT 세포에서의 생존율을 확인하기 위하여 MTT assay를 실시하였으며, 그 결과는 Fig. 3(A)에 나타내었다. HaCaT 세포에 대하여 100 µg/mL 이하의 농도에서 모두 90% 이상의 세포 생존율을 나타내었다. 또한 UV-B (50 mJ/cm²)를 조사한 후 JE와 SRE를 처리시켰을 때의 HaCaT 세포의 생존율을 확인한 결과는 Fig. 3(B)에 나타내었다. UVB만 조사한 세포(Cont)의 생존율이 약 72.6%였으며, UVB 조사 후 JE를 처리한 경우는 25-100 µg/mL의 농도에서 89.0-78.2%, SRE를 처리한 경우는 81.2-81.1%의 생존율을 나타내어 UVB 자극으로 인한 세포 손상을 회복시켜주는 효과를 확인할 수 있었다.

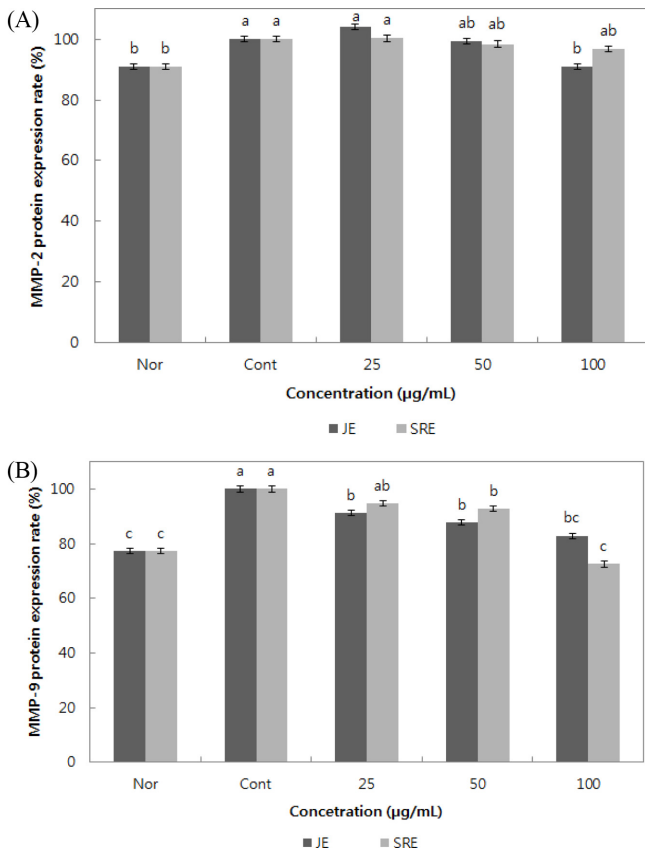


Fig. 5. Expression levels of MMP-2 and -9 on UVB-stimulated HaCaT cells from colored rice extracts. The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of extracts before treatment with UVB (50 mJ/cm²) for 24 h and subjected to ELISA assay using antibodies to MMP -2 and -9. Nor: not treated any extract and UVB, Cont: only treated UVB, JE: 70% Ethanol extract of Josaengheughchal, SRE: 70% Ethanol extract of Shintoheug Rice. Bands are representative of three or four experiments. The percentage indicated the MMP-1, -2, and -9 ratios relative to the β-actin. Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

MMP-1과 MMP-3의 단백질 발현 억제 결과

진피의 90%를 차지하고 있는 콜라겐은 collagen type I, II, III, IV 그리고 V가 있으며, 세포 내에서 pro-collagen이라는 전구물질로 합성된 후 세포 외로 분비되어 콜라겐 섬유로 중합된다(Fisher 등, 1997). 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(Brinckerhoff 등, 2000). 그 중 MMP-1은 주로 type I, III형을 분해하는 collagenase이고, MMP-3은 collagen type IV를 특이적으로 분해하고 pro-MMP-1을 활성화시킨다(Fisher 등, 1996). MMP-1과 -3의 단백질 발현을 억제하는지 확인하기 위해 Western blot을 실시하였고, 그 결과는 Fig. 4와 같이 나타났다. JE와 SRE 모두 UVB를 조사한 HaCaT cell에서의 MMP-1과 MMP-3의 발현을 농도의존적으로 억제시켰으며, 특히 MMP-1은 100 µg/mL의 농도에서 78.3% (JE)와 70.8% (SRE)의 우수한 억제효과를 보였다. 그러나 MMPs의 발현이 UVB를 조사하지 않은 정상세포군 (Nor)보다도 억제되었는데, 이는 Lee 등(2014)의 보고에서 한방 발효주 주박 추출물의 자외선 조사에 따른 HaCaT cell에서의

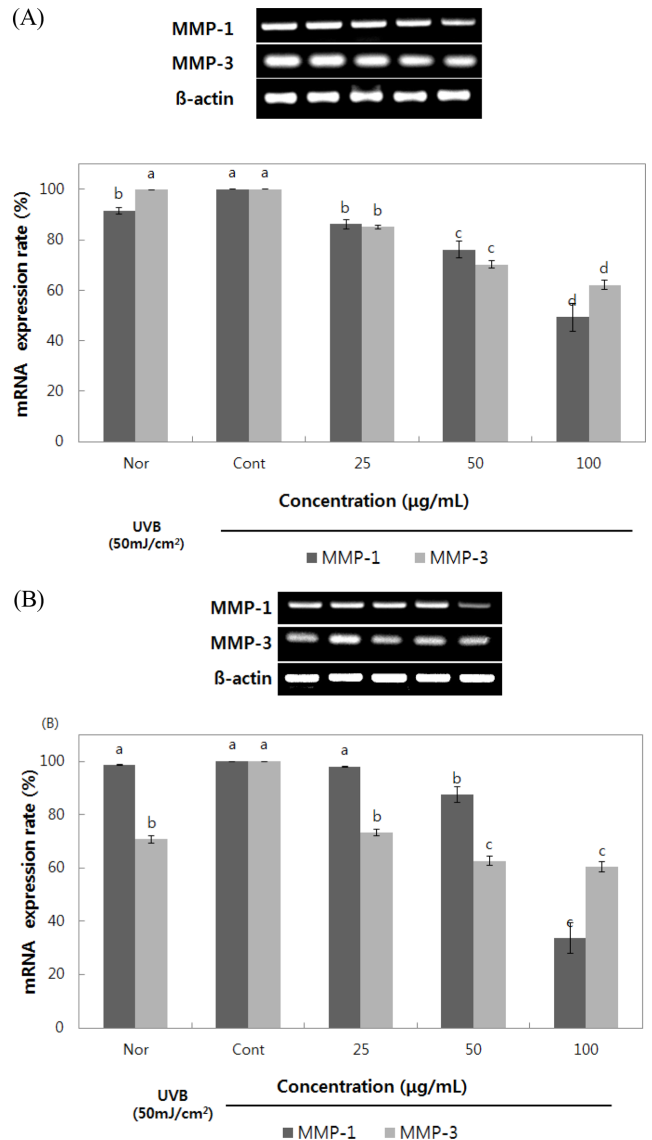


Fig. 6. MMPs mRNA expression on UVB-stimulated HaCaT cells from Colored rice extracts. The cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of extracts before treatment with UVB (50 mJ/cm²) for 4 h and subjected to RT-PCR using the MMP-1 and -3. Nor: not treated any extract and UVB, Cont: only treated UVB, (A) JE: 70% Ethanol extract of Josaengheughchal, (B) SRE: 70% Ethanol extract of Shintoheug Rice. Bands are representative of three or four experiments. The percentage indicated the MMP-1 and -3 ratios relative to the β-actin. Means with different letters (a-d) above the bars are significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

MMP-1 발현억제 결과에서, 우리의 결과와 마찬가지로, 50과 100 µg/mL의 농도에서 정상세포군(Nor)보다도 발현이 억제된 결과를 제시한 것과 비슷한 결과임을 확인할 수 있었다.

ELISA assay를 통한 MMPs 발현 억제 결과

Gelatinase group에는 MMP-2와 -9이 포함되며 MMP-2는 MMP-9과 MMP-13을 활성화시킨다. MMP-9는 gelatinase와 collagenase type IV인 UVB 유도 MMP이며 피부에서 MMP-1을 포함한 collagenase에 의해 절단한 후에 콜라겐 섬유의 최종 분해를 하는 중요한 역할을 담당하고 있다. 더욱이, MMP-9의 gelatinase

activity가 N terminal nonhelical telopeptide에서 collagen type I, II 그리고 V를 절단하는데, 이는 MMP-9가 이전에 생각했던 것보다 collagenous ECM의 remodeling에 있어서 훨씬 광범위한 역할을 수행한다고 보고 있다(Okada 등, 1995). 우리는 MMP-2와 -9의 발현억제를 human ELISA MMPs Kit을 통해 확인하였고 결과는 Fig. 5에 나타내었다. UVB 자극을 준 세포에 JE와 SRE를 각각 농도별로 처리하였을 때 MMP-9의 100 µg/mL의 농도에서 각각 17.2%와 27.5%의 억제효과를 보였으나 MMP-2의 단백질 발현에는 크게 영향을 주지 않은 것을 확인할 수 있었다.

RT-PCR에 의한 MMPs의 mRNA 발현억제 효과

MMP-1과 -3의 단백질 발현 억제실험의 결과를 토대로 우리는 JE와 SRE가 MMP-1과 -3의 mRNA 발현에 미치는 영향을 관찰하고자 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. 그 결과 JE (Fig. 6(A))는 MMP-1, -3의 mRNA의 발현을 농도의존적으로 감소시켰으며 특히 JE 100 µg/mL의 농도를 처리한 경우에 mRNA 발현이 매우 유의하게 감소(약 50.7%와 37.9%)되었음을 확인하였다. SRE를 처리한 MMP-1과 -3의 mRNA의 발현은 Fig. 6(B)에 나타내었다. SRE는 MMP-1의 mRNA 발현억제가 미미하다가 100 µg/mL의 농도에서 매우 효과적으로 억제(약 66.4%)하였음을 확인할 수 있었고, MMP-3 mRNA 발현은 농도의존적으로 발현이 억제되었고 100 µg/mL의 농도에서 약 39.7%가 억제되었음을 알 수 있었다. 또한 MMP-1 mRNA의 경우, 정상세포군(Nor)보다 JE와 SRE를 처리한 세포군에서의 발현이 보다 더 감소한 결과를 보였으며 MMP-3 mRNA의 발현에서도 Nor 보다 JE를 처리한 세포군에서 보다 낮은 결과를 보였다. 이는 JE와 SRE의 농도가 높아질수록 뚜렷한 결과를 보인 결과이므로 우리는 JE와 SRE가 세포자극의 요인으로 작용할 수도 있다는 고려 하에 MTT 결과를 고찰하였고(Fig. 3). 유색미 시료를 농도의존적으로 처리한 세포가 UVB를 조사하지 않은 경우(Fig. 3(A)) 뿐 아니라 조사하였을 경우(Fig. 3(B))에서 모두 높은 세포생존율을 보인 것으로 보아 유색미 자체가 세포에 자극요인이 되지 않는 것으로 사료된다. 그리고 이와 같이 정상세포군(Nor)보다 샘플 처리를 한 후에 MMP-1의 mRNA 발현이 보다 더 감소한 결과는 Han 등(2013)의 진갈과피 추출물의 MMP-1 발현조절 효과를 발표한 보고에서도 확인할 수 있었다. 다만 정상세포군이 UVB를 처리한 Cont과 비슷한 MMPs mRNA 발현을 보인 것은 정상세포군 자체가 이미 스트레스를 받은 상태였던 것으로 보인다. 그러나 유색미의 처리를 통해 MMPs mRNA의 발현을 억제한 것은 유의한 결과로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 선별된 유색미 2품종에 대한 자외선 조사에 따른 노화 억제 메커니즘을 확인하고자 산화방지 활성을 분석하였으며, JE와 SRE 모두 500 µg/mL 농도에서 88.5%와 88.9% 이상의 높은 DPPH 라디칼 억제능을 보였으며, ABTS 억제활성 실험에서는 100 µg/mL 이상의 농도에서 93.5%와 95.7% 이상의 ABTS 라디칼 억제능을 나타내었다. collagenase 억제 활성 실험 결과, JE와 SRE 모두 1,000 µg/mL의 농도에서 각각 73.2%, 74.4% 이상의 효소 억제능을 나타내었다. 또한 MMPs의 단백질과 mRNA의 발현억제를 확인한 결과, MMP-1과 -3의 단백질 발현은 농도의존적으로 억제되었음을 확인할 수 있었고, 특히 MMP-1은 JE와 SRE의 50 µg/mL의 농도에서 각각 약 29.8%와 33.2%의 억제효과를 나타내었고, 100 µg/mL의 농도에서는 각각 78.3%와 70.8%의 우수한 억제효과를 나타내었다. 또한 MMP-1과 -3의

mRNA의 발현은 농도의존적으로 감소시켰으며 특히 JE 100 µg/mL의 농도를 처리한 경우에 mRNA 발현이 매우 유의하게 감소(약 50.7%와 37.9%)되었음을 확인하였다. SRE는 MMP-3 mRNA의 발현이 농도의존적으로 억제되었고 100 µg/mL의 농도에서 약 39.7%가 억제되었으며, MMP-1 mRNA의 발현은 100 µg/mL의 농도에서 약 66.4%가 억제되었음을 알 수 있었다. 본 연구에서 선별된 유색미 2종인 조생흑찰과 신토흑미의 에탄올 추출물이 산화방지 및 항노화 효능을 확인함에 따라 기능성 식품·화장품 분야에서 주름개선 및 항노화 소재로서의 가능성을 확인하였다.

References

- Ancerewicz JE, Migliavacca PA, Carrupt B, Testa F, Bree R, Zini JP, Tillerent S, Labidalle D, Guyot AM, Chauvent-Monges CA, Ridant AL. Structure property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radical Bio. Med.* 25: 113-120 (1998)
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200 (1958)
- Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin. Cancer Res.* 6: 4823-4830 (2000)
- Cannell RJP, Kellan SJ, Owsianks AM, Walker JM. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med.* 54: 10-14 (1988)
- Choi HC, Oh SK. Diversity and function of pigments in colored rice. *Korean J. Corp. Sci.* 41: 1-9 (1996)
- Fanger GR, Johnson NL, Johnson GL. MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with ac/Cdc42. *EMBO J.* 16: 4961-4972 (1997)
- Fisher GJ, Datta S, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Molecular basis of sun-induced premature ageing and retinoid antagonism. *Nature* 379: 335-339 (1996)
- Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.* 337: 1419-1428 (1997)
- Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54: 1197-1204 (1962)
- Han GS, Lee SR. Effects of *Citrus sunki* peel extract on matrix metalloproteinase-1 expression. *J. Life Sci.* 23: 1553-1556 (2013)
- Heo JC, Park JY, An SM, Lee JM, Yun CY, Shin HM, Kwon TK, Lee SH. Antioxidant and antitumor activities of crude extracts by *Gastrodia elata* Blume. *Korean J. Food Preserv.* 13: 3-7 (2006)
- Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech. Ageing Dev.* 123: 801-810 (2002)
- Kang MY, Nam YJ, Nam SH. Screening of antioxidation-related functional components in brans of the pigmented rices. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 48: 233-239 (2005)
- Kim YE, Yang, JW, Lee CH, Kwon EK. ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of *tricholoma matsutake* Sing. (Pine mushroom). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 555-560 (2009)
- Kusukawa J, Harada H, Shima I, Sasaguri Y, Kameyama T, Morimatsu M. The significance of epithelial growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol. Eur. J. Cancer* 32B: 217-221 (1996)
- Lee DS, Kim KH, and Yook HS. Cosmetic effects of the fractional extracts from strawberry (*Fragaria ananassa* var. 'Seolhyang') leaf. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 47: 271-278 (2018)
- Lee SM, Lee SJ, Kwon YY, Baek SH, Kim JS, Sohn HY, Shin WC. Skin whitening and anti-wrinkle effects of extract from Jubak of oriental herbal liquor. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43: 1695-1700 (2014)
- Lee YR, Woo KS, Kim KJ, Son JR, Jeong HS. Antioxidant activities of ethanol extracts from germinated specialty rough rice. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 765-770 (2007)
- Min EG, Kim YH, Kum SI, Han YH. Inhibition of growth and collagenase activity of the extract from *Salvia miltiorrhiza* against

- microorganisms causing periodontal diseases. *Kor. J. Microbiol.* 40: 111-114 (2004)
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63 (1983)
- Nam SH, Chang SM, Kang MY. Varietal difference in antioxidative activity of ethanolic extracts from colored rice bran. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 46: 16-22 (2003)
- Nam SH, Kang MY. Comparison of inhibitory effect of rice bran-extracts of the colored rice cultivars on carcinogenesis. *Appl. Biol. Chem.* 41: 78-83 (1998)
- Oh MC, Kim KC, Ko C, Ahn YS, Hyun JW. Peptides-derived from scales of *Branchiostegus japonicus* inhibit ultraviolet B-induced oxidative damage and photo-aging in skin cells. *J. Life Sci.* 25: 269-275 (2015)
- Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92 kDa gelatinase/type IV collagenase=gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab. Invest.* 72: 311-22 (1995)
- Park JY, Ham HM, Han SI, Oh SH, Song YC, Cho JH, Hur YJ, Lee YY, Lee BW, Choi YH. Comparison of antioxidant components and antioxidant activities of colored rice varieties cultivated in southern plain. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 45: 1214-1220 (2016)
- Park EJ, Kang MH. Application of the alkaline comet assay for detecting oxidative DNA damage in human biomonitoring. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 213-222 (2002)
- Ryu SN, Park SZ, Kang SS. Studies on exploration and expansive use of genetic variation of functional substances in rice. Report of Rural Development Administration. Suwon, Korea. pp.93-106 (2005)
- 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. Comparative analysis of physicochemicals and antioxidative properties in new red rice (*Oryza sativa* L. cv. Gunganghongmi). *J. Crop. Sci. Biotech.* 16: 63-68 (2013)
- Slavin JL, Martini MC, Jacobs Jr DR, Marquart L. Plausible mechanisms for the protectiveness of whole grains. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 459S-463S (1999)
- Song ES, Park SJ, Woo NRA, Won MH, Choi JS, Kim JG, Kang MH. Antioxidant capacity of colored barley extracts by varieties. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 1491-1497 (2005)
- Sun Z, Park SY, Hwang E, Zhang M, Jin F, Zhang B, Yi TH. Salvianolic acid B protects normal human dermal fibroblasts against ultraviolet B irradiation-induced photoaging through mitogen-activated protein kinase and activator protein-1 pathways. *Photochem. Photobiol.* 91: 879-886 (2015)
- Tsuda T, Horio F, Osawa T. Dietary cyanidine 3-O- β -D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats. *Lipids* 33: 583-588 (1998)
- Woo KS, Jeong EG, Suh SJ, Yang CI, Jeong HS, Kim KJ. Antioxidant components and antioxidant activities of 70% ethanol extracts on Suweon-511 and Ilpum rice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 1223-1230 (2008)