

식용 해조류 톳(*Hizikia fusiformis*) 유래 항산화 활성분획물의 산화적 손상이 유도된 인간피부섬유아세포 보호 효과

Yong Ri Cui^{1,2} · 김현수¹ · 제준건¹ · Lei Wang¹ · 오재영¹ · Liu Jia² · 전유진^{1*}

¹제주대학교 해양의생명과학부, ²Qingdao KangMaiChen Biotechnology Co., Ltd.

Protective Effects of Antioxidant Active Fractions Derived from the Edible Seaweed *Hizikia fusiformis* in Oxidatively Stressed Human Dermal Fibroblasts

Yong Ri Cui^{1,2}, Hyun-Soo Kim¹, Jun-Geon Je¹, Lei Wang¹, Jae-Young Oh¹, Liu Jia² and You-Jin Jeon^{1*}

¹Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

²Qingdao KangMaiChen Biotechnology Co., Ltd. The Institute of Food Research, Shandong Province 266003, China

We investigated the protective effects of antioxidant fractions from a 70% ethanolic extract of *Hizikia fusiformis* in human dermal fibroblasts (HDFs). Powdered *H. fusiformis* was extracted with 70% ethanol and then partitioned into three fractions according to polarity using n-hexane (HFH), chloroform (HFC), and ethyl acetate (HFEA). Antioxidant activity was observed in HFEA at 0.66 mg/mL based on the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), and at 0.24 mg/mL based on alkyl radical scavenging. The protective effects of the HFEA antioxidant fraction against 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-damaged HDFs and the expression of Type I procollagen in HDFs were examined. HFEA caused the proliferation of HDFs with and without AAPH treatment and protected against AAPH damage to HDFs in a dose-dependent manner (50-200 µg/mL). This implies that the antioxidant properties of the fractions depended on their proliferative and protective effects. The HFEA antioxidant fraction had significant effects and caused the dose-dependent expression of Type I procollagen, an important anti-wrinkle protein, in HDFs. In conclusion, antioxidant substances in *H. fusiformis* were found in the ethyl acetate fraction, and the resulting HFEA may have cosmetic applications.

Key words: *Hizikia fusiformis*, Human dermal fibroblasts (HDF), Antioxidant, Cosmetic

서 론

예로부터 사면이 바다로 둘러싸인 제주도에서는 쉽게 해조류를 접할 수 있어 해조류는 도민들의 식탁에 자주 오르는 식재료 중 하나이다. 여러 해조류들 중 톳(*Hizikia Fusiformis*)은 다년생 해조류이며 갈조식물인 모자반과의 해조류로 제주도 연안 및 남해 등지에서 자생하고 있는 해조류 중 생산량이 가장 높고 우뚝가사리와 함께 제주도 어촌계의 소득원으로 주종을 이루고 있다(Lee and Kim, 2017). 톳은 제주도 어촌계의 주 생산품이기 때문에 제주도민들은 톳의 섭취가 손쉽게 이루어지고 있다. 그 중에 손질된 톳을 밥에 넣어 함께 먹는 톳밥은 제주도민

들의 특별한 음식문화로, 제주도민들의 밥상문화인 ‘톳밥’을 여러 TV 프로그램에서도 소개한 바 있다. 톳은 우리나라만이 아닌 중국 그리고 일본의 해안가에서도 관찰되는 대표적인 갈조류이다. 그렇기 때문에 톳은 지역적, 계절적 영향 없이 안정적인 공급과 표준화된 생산기술을 통해 연간 2만-4만 톤 정도 생산되며 식품, 건강식품, 의약품 및 화장품 등 분야에서 많은 연구가 되고 있는 유망한 해조류이다(Park and Jung, 2016). 독특한 맛과 함께 칼슘, 비타민 A 및 식이섬유소 함량이 풍부하여 당뇨병, 고혈압 예방, 대장암 및 변비 등에 효과가 좋으며 요오드의 함량이 많아 갑상선암 및 각기병 예방에 효과가 있다고 알려져 있다(Park et al., 2005).

*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3475 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: youjin@jeju.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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2019.0035>

Korean J Fish Aquat Sci 52(1), 35-42, February 2019

Received 21 January 2019; Revised 8 February 2019; Accepted 12 February 2019

저자 직위: Yong Ri Cui(연구소장), 김현수(박사), 제준건(석사과정), Lei Wang(박사), 오재영(박사), Liu Jia(연구원), 전유진(교수)

실제로 톳의 이전 연구에서 밝혀진 생리활성 연구 보고들로는 조골세포 증식효과(Jeon and Kim, 2011), 항산화효과(Park et al., 2005), 항염증효과(Song et al., 2011), 간 보호효과(Jung et al., 2001), 항고지혈증(Shan et al., 1999), 항콜레스테롤(Abdussalam, 1990)과 같은 여러 가지 연구가 밝혀졌지만 이미 더 많은 연구가 이루어진 미역, 다시마, 감태 등에 비해 연구가 미비한 실정이고, 활성물질 탐색이나 화장품 소재로서의 활용 연구는 다소 미비한 실정이다. 특히 최근 화장품 연구에서 가장 중요한 기능성분 중의 하나인 항주름 효과의 연구는 전무한 상황이기 때문에 활성물질 탐색과 항주름 효과의 연구가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 우리 실생활에 많은 비중을 차지하는 톳의 항산화 활성물질을 이용한 피부세포의 보호 활성을 검토하였으며, 이를 위하여 톳의 70% 에탄올 추출물과 이로부터 여러가지 용매 분획물을 제조하여 on-line HPLC를 통해 항산화 활성물질 확인과 활성물질을 포함하는 분획물의 피부세포 보호 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

실험시약 및 재료

본 실험에서 사용한 톳은 2015년 3월에 제주도 해안에서 채취한 톳(*H. fusiformis*)을 수세하고 동결 건조를 한 후에 톳을 분쇄하여 분말형태로 만들어 사용하였다. 추출 및 HPLC (high performance liquid chromatography) 분석을 위해 ethanol, acetonitrile (ACN), methanol, hexane, chloroform 및 ethyl acetate를 구입하여 사용하였고, 항산화 활성을 확인하기 위하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), α -(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron (4-POBN), 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), Ham's nutrient mixtures medium (F-12), penicillin/streptomycin 및 fetal bovine serum (FBS)는 Gibco BRL (Life Technologies, Burlington, ON, Canada)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 기타 시약은 분석용 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

추출 및 분획분리

톳 분말 300 g을 취하여 삼각 플라스크에 70% 에탄올 6 L를 함께 첨가하였고, 24 h 동안 상온에서 교반기를 이용하여 총 3 회 반복 추출하고 이후 필터 후 농축 과정을 거쳐 에탄올 추출물을 얻었다. 이 때 에탄올을 농축시킨 후 남은 추출물을 이용하여 수율을 측정하였고 극성도에 따라 헥산(n-hexane), 클로로포름(CHCl_3), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 순으로 분획하였다. 수

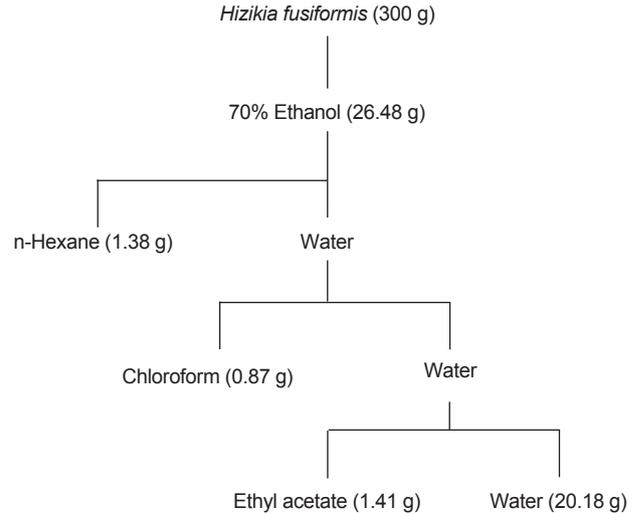


Fig. 1. Procedure of the 70% ethanol extract and its fractions of *Hizikia fusiformis*.

율을 측정하기 위해 추출물 1 mL을 건조된 수율 측정용 펜에 담아 건조 오븐에 24 h 동안 보관하여 전, 후 무게의 차이를 이용하여 측정하였다. 유기용매의 극성 별로 분리된 분획물들의 농축 후 무게는 헥산층은 1.38 g, 클로로포름층은 0.87 g, 에틸아세테이트층은 1.41 g을 획득하였고, 분획 후 남은 물층의 무게는 20.18 g을 획득하였다(Fig. 1).

DPPH, alkyl radical 소거능 측정

DPPH, alkyl radical 소거능을 측정하기 위하여 Heo et al. (2005)의 방법을 따라 전자스핀공명(Electron spin resonance, ESR)을 이용하였다. DPPH radical 소거능은 60 μM DPPH 60 μL 와 시료를 농도별로 60 μL 씩 혼합하여 2분간 반응 후 capillary tube에 옮겨 측정하였고, alkyl radical 소거능을 측정하기 위해 20 μL 증류수, 20 μL 시료, 20 μL AAPH (40mM), 20 μL POBN (40 mM)을 혼합하여 37°C water bath에서 30분간 반응 후 capillary tube에 옮겨 측정하였다.

HPLC 분석

톳의 활성물질을 탐색하기 위해 515 HPLC pump, in-line degasser AF, autosampler, photodiode array detector 및 pump control module II를 장착한 Waters사 HPLC를 이용하였다. Column은 sunfire C18 5 μm 4.6 \times 250 mm을 사용하여 각 활성성분을 확인하였다(Fig 2). 분석 조건으로는 기울기 용리 방법(gradient elution mde)로 하여 초기용매 ACN 5%에서 70분 동안 100%로 상승시켰으며 분리 조건 확립을 위해 모든 시료를 동일한 방법으로 분석하였다.

활성 피크 탐색을 위해 ABTS assay로 확인하였다. ABTS

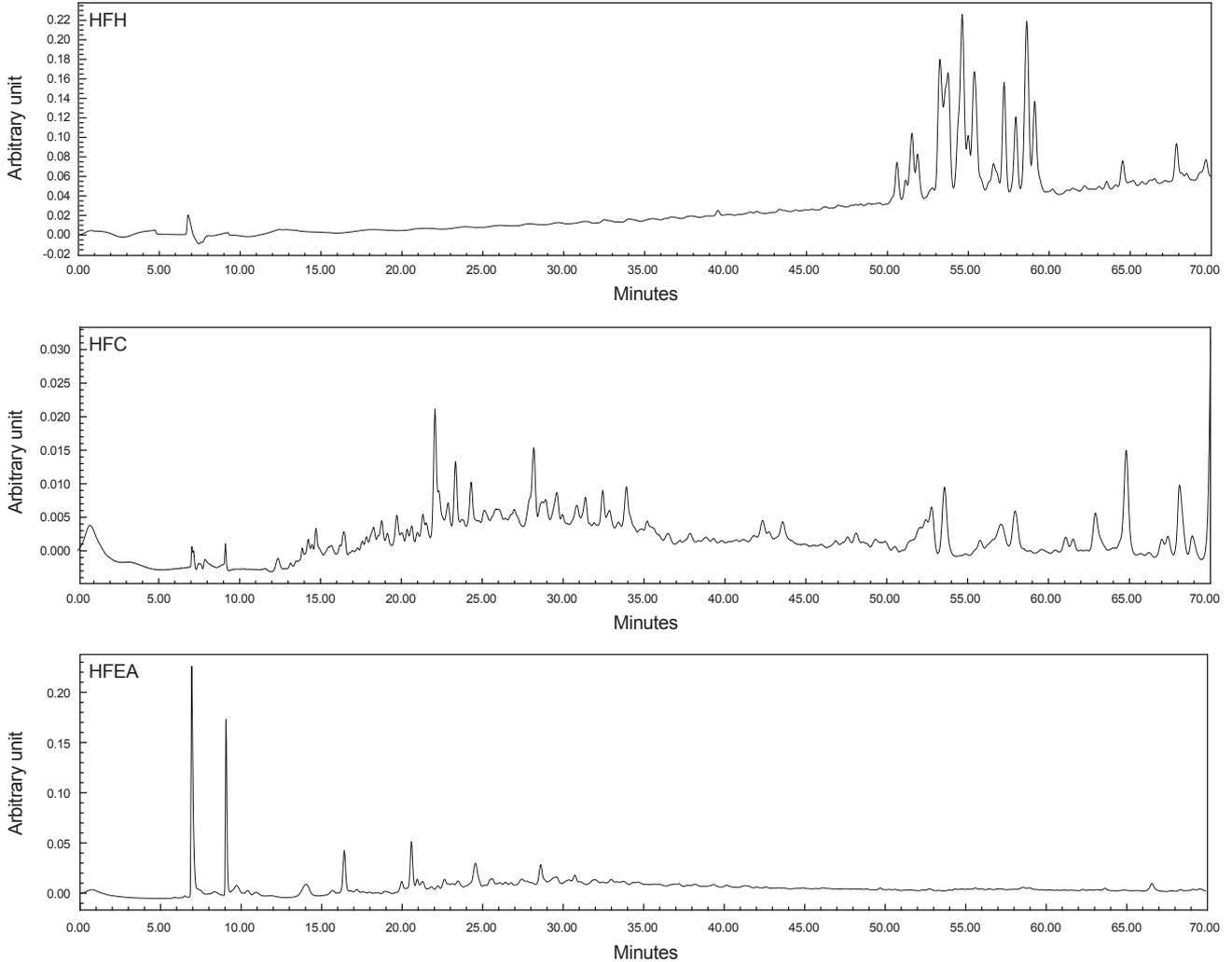


Fig. 2. HPLC chromatograms of the solvent fractions from 70% ethanol extract of *Hizikia fusiformis*. HFH, hexane fraction of *H. fusiformis*; HFC, chloroform fraction of *H. fusiformis*; HFEA, ethyl acetate fraction of *H. fusiformis*.

assay를 사용한 활성 물질의 탐색은 분리, 분석을 하는 동시에 효율적으로 유용성분 확인이 가능하다. 사용된 시약은 ABTS와 potassium persulfate를 사용하여 각각 완전히 녹인 후, ABTS 시약과 충분히 교반시켜 차광시켰다. 제조된 용액은 1 L 갈색병에 안정성을 위하여 12-14 h 동안 보관한 뒤 사용하였다.

세포 배양

HDF 세포는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. HDF 세포를 배양하기 위한 배지는 DMEM과 F-12를 3:1 비율로 혼합한 후 penicillin/streptomycin 100 µg/mL과 10%의 FBS를 첨가하였다. 세포 배양 주기는 5일 간격으로 진행하였으며 37°C, 5% CO₂ incubator (SANYO MCO-18AIC CO₂ Incubator, Moriguchi, Japan)에서 배양하였다.

HDF 세포에서 AAPH에 의한 산화적 손상에 대한 보호 효과 측정

각 시료에 대한 세포 독성을 평가하기 위해 MTT assay 방법을 이용하여 세포 수 각 well 당 5 × 10⁴으로 24 well plate에 진행하였다. 37°C 인큐베이터에서 24 h 배양하였으며 시료를 농도 별로 처리하였다. 이후 37°C 인큐베이터에서 1 h 배양하였으며 10 mM AAPH 10 µL를 처리하였다. 그 다음 37°C 인큐베이터에서 24 h 배양하였으며 2 mg/mL 농도의 MTT를 50 µL 처리하였다. 이후 37°C 인큐베이터에서 3 h 반응시키고, 37°C에서 3 h 배양한 후 형성된 불용성 결정을 DMSO로 완전히 녹여 빛을 차단시키고 12 h 보관 후에 ELISA reader를 사용하여 540 nm 흡광도에서 측정된 뒤 값을 구하였다. 대조구는 시료 처리 없이 산화적 스트레스만 유도시킨 실험군과 산화적 스트레

스를 유도시키지 않은 실험군으로 구분하였다.

HDF 세포에서 세포증식 효과 측정

각 시료에 대한 세포증식 효과를 평가하기 위해 MTT assay 방법을 이용하여 세포 수 각 well 당 5×10^4 으로 24 well plate에 진행하였다. 세포 독성이 없었던 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 이용하여 세포에 처리하였으며, 세포 독성평가 과는 달리 48 h 샘플을 세포에 처리하여 각 샘플들의 세포 증식 정도를 측정하였다.

콜라겐 생성을 측정

콜라겐 생성을 보기 위해 Wang et al. (2018)의 방법으로 HDF 세포를 배양시켜 시료 처리하여 48 h 이후에 각 well의 배지를 모아서 콜라겐의 반사되는 양을 확인하여 콜라겐 생성을 측정하였다.

통계분석

실험결과와 통계처리는 시료에 대한 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. SPSS 프로그램(SPSS Inc. Ver. 12.0)을 사용하여 One-way ANOVA-test를 실시하여 조사 항목들 간의 유의성 검증은 Turkey's multiple range test로 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 수준에서 실시하여 표시하였다.

결과 및 고찰

투스 추출물과 추출물 유래 용매 별 분획물들의 추출 수율 및 라디칼 소거 활성

투스 추출물과 추출물 유래 용매 별 분획물들의 수율은 Table 1에 나타내었다. 수율은 추출에 사용한 건조 톳 파우더(300 g)을 기준으로 계산하였으며, 톳의 70% 에탄올 추출물의 수율은 8.83%로 확인되었고, 추출물 유래 분획물들의 경우 hexane 분획물(HFH) 0.46%, chloroform 분획물(HFC) 0.29%와 EtOAc 분획물(HFEA) 0.47%로 확인되었다(Table. 1). 갈조류들 중에 우수한 생리활성과 다양한 플라보노이드를 포함하는 감태의 경

우 70% EtOH 추출물의 수율은 20% 정도로 확인되어 우리의 톳 추출물보다 높은 수율을 나타냈다(Lee et al., 2014). 하지만 우리의 갈조류 톳 추출물의 수율은 이전에 Cho et al. (2010)이 보고한 4종의 녹조류 에탄올 추출물 3.5-14.8% 보다 높거나 유사한 수율을 나타냈고, Cho et al. (2012)이 보고한 3종의 홍조류 에탄올 추출물 1.4-1.8% 보다 월등히 높은 수율을 확인하였다. 톳의 분획물들 중에서는 HFEA가 가장 높은 수율이 확인되었다. 여러 갈조류의 EtOAc 분획물로부터 여러 종류의 phlorotannin들이 보고 되어왔으며, 우수한 생리활성들이 확인되었다(Choi et al., 2007, Zou et al., 2008, Kim et al., 2011, Lee et al., 2014).

투스 추출물과 분획물들의 DPPH와 alkyl 라디칼 소거활성을 확인하였다(Table 1). DPPH 라디칼 소거 활성법은 화학적으로 유도되는 비교적 안정한 radical로서 시료의 free radical 소거 능력이나 수소 공여능력을 평가하는 방법으로, 항산화 물질들에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연소재로부터 항산화 능력을 쉽게 알아보기 위한 방법으로 알려졌다(Kim et al., 2018). 톳 추출물과 HFEA의 DPPH 라디칼 소거활성 IC_{50} 값은 각각 3.07 ± 0.01 , 0.66 ± 0.06 mg/mL로 HFEA가 추출물과 다른 분획물들에 비해 월등히 우수한 DPPH 라디칼 소거활성이 확인되었다(Table 1). 활성산소 중에서 alkyl 라디칼은 수소탈취에 의해 생기며, 분자재구성을 통해 diene 형태로 바뀌고 이것이 다시 산소와 결합하여 peroxy radical이 형성되어 산화를 일으킨다. 톳 추출물과 HFEA의 alkyl 라디칼 소거활성 IC_{50} 값은 각각 0.12 ± 0.01 , 0.24 ± 0.02 mg/mL로 추출물과 HFEA의 유사한 alkyl 라디칼 소거활성이 확인되어 추출물과 HFEA 모두 우수한 alkyl 라디칼 소거활성이 확인되었지만, HFH와 HFC는 DPPH 라디칼과 마찬가지로 alkyl 라디칼 소거활성 또한 좋지 않은 결과를 얻었다(Table 1). 따라서, HFEA의 우수한 항산화 활성을 확인하였고, 이전 연구들에서 HFH와 HFC 내 fucosterol (Hwang E et al., 2014)이나 fucoxanthin (Yan X et al., 1999)과 같은 천연 화합물의 연구 보고는 있었지만, HFEA의 경우 관련된 연구논문이 전무한 상황이기 때문에 가장 우수한 항산화 활성을 보였던 HFEA를 이용해 다음 실험에 임하였다.

투스 추출물 유래 용매 별 분획물들의 HPLC 크로마토그램 분석

Fig. 1에 나타낸 것과 마찬가지로 추출물의 용매 별 분획을 통해 HFH, HFC와 HFEA의 총 3개의 분획물을 얻었고, HPLC를 통해 각 분획물들의 크로마토그램 패턴을 분석하였다(Fig. 2). 분석한 결과, HFH는 다른 분획물들에 비해 비극성 화합물을 다수 포함하는 것을 확인할 수 있었으며, HFC는 각 피크들의 AU 값으로 보아 전체적으로 함유하는 화합물들의 각 함량들이 적은 것을 확인할 수 있었다. 그에 반해 HFEA에 경우 retention time 10 min 내외의 비교적 짧은 시간대에 피크들이 검출되어

Table 1. Yields and antioxidant properties of extract and solvent fractions from *Hizikia fusiformis*.

	Yield (dry weight, %)	DPPH (IC_{50} , mg/mL)	Alkyl (IC_{50} , mg/mL)
Extract	8.83	3.07 ± 0.01	0.66 ± 0.06
HFH	0.46	1>	1>
HFC	0.29	1>	1>
HFEA	0.47	0.12 ± 0.01	0.24 ± 0.02

HFH, hexane fraction of *H. fusiformis*; HFC, chloroform fraction of *H. fusiformis*; HFEA, ethyl acetate fraction of *H. fusiformis*; DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

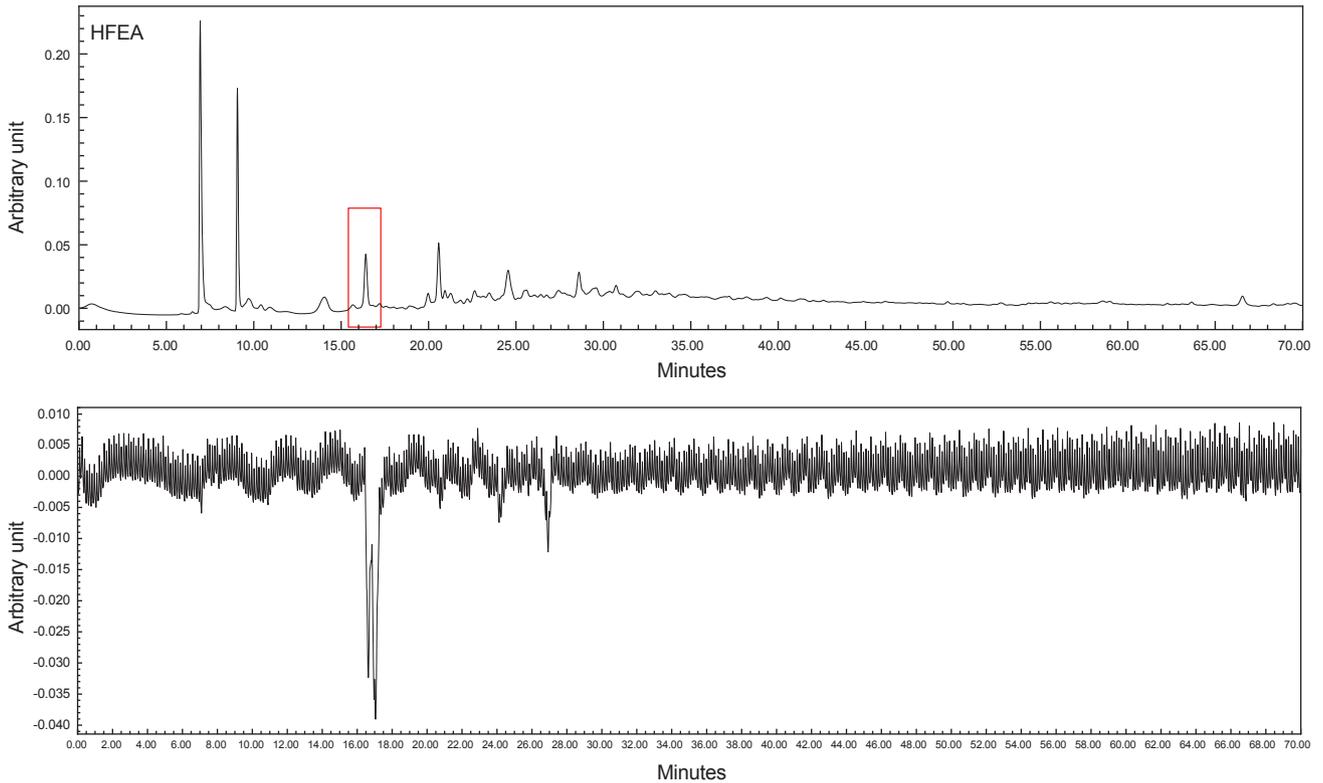


Fig. 3. ABTS on-line HPLC chromatogram of the ethyl acetate fraction from the ethanol extract of *Hizikia fusiformis*. ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

극성 화합물들을 포함하며, 각 피크들의 AU 값을 통해 각 피크들의 함량이 높은 주피크 4가지를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과를 통해 우리의 분획물들이 용매 극성 별로 적절하게 분획이 된 것을 확인할 수 있었고, HFEA 내에서 확인된 4가지의 피크들에 대해서 추가 분석을 통한 항산화 활성 물질 분석이 가능할 것이다.

뚝 추출물 내 항산화 활성 분획물을 분석하기 위해 HFEA의 4가지 주피크들을 on-line HPLC를 통하여 ABTS 라디칼 소거활성을 분석하였다. On-line HPLC는 crude한 샘플에서 활성피크를 탐색하는데 아주 효과적인 방법으로 이전의 여러 논문에서 사용되었고, on-line HPLC를 이용한 ABTS 라디칼 소거활성 측정은 HPLC의 postcolumn에 의해 분리된 후 680-730 nm에서 흡광도의 감소에 기초하여 ABTS 활성 정도를 측정한다(Lee et al., 2013, Kim et al., 2014, Kim et al., 2016). On-line HPLC를 통해 HFEA 내 피크들의 ABTS 라디칼 소거활성을 측정한 결과 retention time 16.5 min에 검출되는 피크가 아주 강력한 ABTS 라디칼 소거활성이 있음을 확인하였다(Fig. 3). 이러한 결과는 HFEA 내 주피크였던 4개의 피크들 중 retention time 16.5 min의 피크가 아주 우수한 ABTS 라디칼 활성이 확인되어 뚝에 항산화 활성 분획물에서 항산화 활성을 갖는 주피크의 분석이 가능하였고, 앞에 DPPH, alkyl 라디칼 소거활성

평가 결과에서 확인된 HFEA의 우수한 항산화 활성에 대한 검증이 가능하였다.

HFEA의 섬유아세포 (HDF)를 이용한 항주름 활성

진피층의 섬유아세포는 진피층의 섬유상 단백질인 collagen과 elastin의 발현을 담당하고 있는데, 나이가 증가함에 따라 진피층에 존재하는 섬유아세포의 작용과 그 수가 감소하여 collagen과 elastin 등의 구조 단백질의 합성이 감소되고, 피부 세포 내 수분이 손실되면 각질층의 구조가 변화된다(Jeon and Yi, 2014). 따라서, 우리는 항산화 활성이 우수하였던 HFEA가 피부 관련세포, 주름과 연관된 HDF세포에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 농도에 따른 생존률, AAPH 산화 보호효과, 세포증식률을 확인하였다. 이를 위하여 샘플들의 농도는 50 µg/mL, 100 µg/mL과 200 µg/mL의 농도로 처리하였다. 각 농도의 분획물들을 처리하여 세포 독성을 확인한 결과, 모든 분획물들의 각 농도에서 90% 이상의 세포 생존률을 확인하여 독성이 거의 나타나지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 4A).

활성산소가 체내에 들어가면 조직의 세포막을 비롯한 지질 성분을 공격함으로써 강력한 세포독성으로 작용하는 과산화 지질을 생성하여 조직 및 세포막을 파괴한다. 그렇기 때문에 최근 산화유도 물질을 이용해 유도된 세포노화에 대한 조절 작용을 보

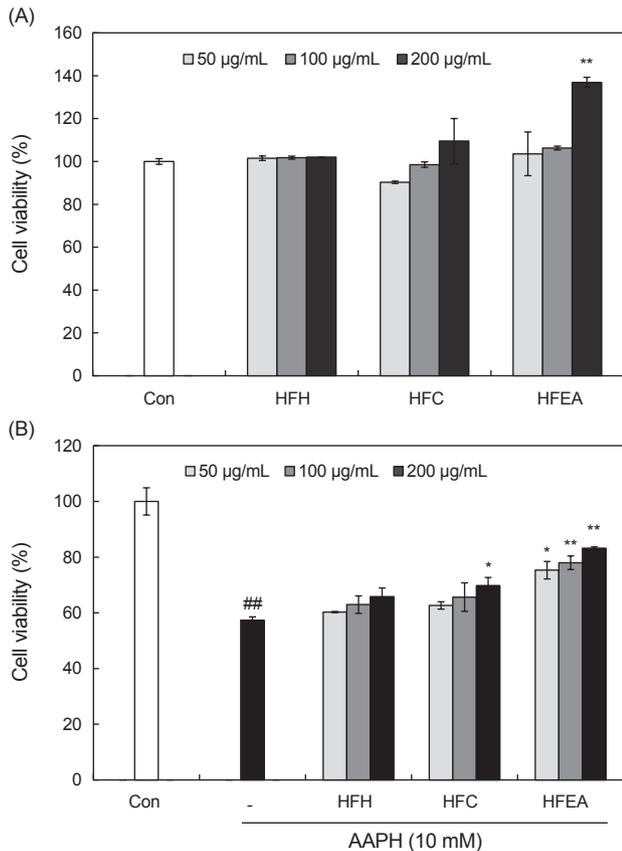


Fig. 4. Protective effects of the different solvent fractions against AAPH-induced HDF cell damage: (A) The cytotoxicity of the solvent fractions on HDF cell; and (B) protective effects of the solvent fractions against AAPH-induced HDF cell damage. Cell viability was measured by MTT assay. The data are expressed as the means±SE (n = 3). *P<0.05, **P<0.01 as compared to AAPH-exposed group and ##P<0.01 as compare to control group. AAPH, 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride; HDF, human dermal fibroblast; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; HFH, hexane fraction of *H. fusiformis*; HFC, chloroform fraction of *H. fusiformis*; HFEA, ethyl acetate fraction of *H. fusiformis*.

고하는 많은 연구가 보고되었다(Jeon and Yi, 2014). 본 연구에서는 산화 유도물질인 AAPH를 처리하여 MTT assay를 통해 AAPH에 의한 산화 세포 독성을 확인하였다. 결과, HFEA를 제외한 분획물에서는 활성이 미비 하였지만, HFEA는 모든 농도에서 유의적으로 AAPH에 대한 산화 보호효과가 확인되었다 (Fig. 4B). HFEA가 HDF 세포에서 무독하고, 산화작용에 대한 보호효과 결과를 바탕으로 HDF 세포의 증식활성을 측정하였다. 모든 분획물들을 농도 별로 2일 동안 HDF 세포에 처리하여 MTT assay를 통해 세포 증식률을 확인한 결과, 산화 보호효과와 비슷하게 HFEA를 제외한 분획물들에서는 활성이 미비하였

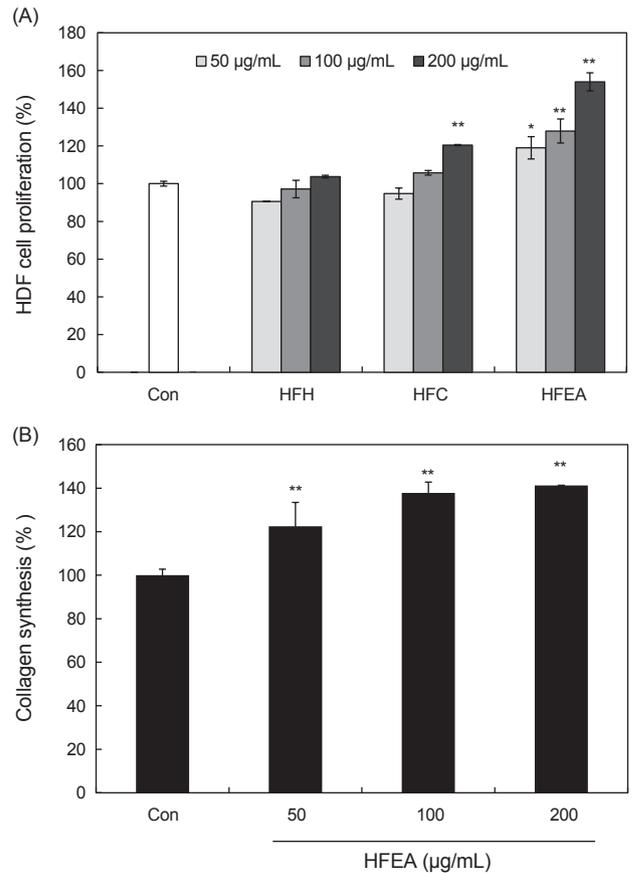


Fig. 5. (A) Proliferation effect of the solvent fractions on HDF cells. Cell viability was measured by MTT assay. (B) Effects of HFEA on collagen synthesis in HDF cells. Medium of the cell were collected and analyzed for collagen ELISA. The data are expressed as the means means±SE (n=3). *P<0.05, **P<0.01 as compared to control group. HDF, human dermal fibroblast; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; HFH, hexane fraction of *H. fusiformis*; HFC, chloroform fraction of *H. fusiformis*; HFEA, ethyl acetate fraction of *H. fusiformis*.

지만, HFEA는 모든 농도에서 유의적으로 세포증식이 일어났음을 확인할 수 있었고, 특히 200 µg/mL의 농도에서는 세포가 컨트롤 그룹에 비해 50% 정도 더 증식한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5A). 이러한 결과들은 HFEA가 collagen과 elastin의 발현을 담당하고 있는 섬유아세포에서 산화물질에 대한 산화 보호 효과를 확인하였고, 노화에 의해 줄어들 수 있는 섬유아세포의 증식에 도움을 줌으로써 산화 보호효과와 더불어 우수한 세포 증식효과로 우리의 항산화 활성 프랙션인 HFEA가 뛰어난 섬유아세포 보호효과가 있음을 확인할 수 있었다.

Collagen은 신체 곳곳에 존재하는 대표적인 섬유상 단백질로서 14개의 type이 존재하며 이 중 피부에는 type I collagen이 주로 존재한다. 섬유아세포의 기능 이상은 collagen의 생성 저해

와 collagen 분해 효소인 MMP의 활성 증가로 이어지게 된다. 따라서 HFEA에 의한 procollagen type I의 생성 촉진을 알아보기 위하여 ELISA assay를 수행하였다 (Fig. 6). 결과, HFEA를 50 µg/mL, 100 µg/mL과 200 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 농도의존적으로 procollagen type I의 양이 늘어남을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 HFEA의 이전 결과들과 함께 고려하여 뚝의 항산화 분획물인 HFEA가 자연노화 또는 광노화 피부의 노화를 보호하며, 이로 인해 감소할 수 있는 procollagen type I 단백질의 양을 증가시킴으로 항산화 작용으로 인한 노화피부에 효과적임을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 뚝에서부터 분리한 활성 분획물이 섬유아세포 주 실험모델을 활용한 세포효능 실험을 통해 피부의 노화 개선에 효능이 있음을 *in vitro*에서 확인하였고, HPLC를 통해 항산화 활성 분획물의 항산화 활성 주피크를 분석할 수 있었다. 이러한 결과는 우리가 일상 생활에 많이 접하는 뚝이 피부 개선 데 나아가 피부 노화억제에 아주 효과적일 것으로 판단되며, 음식으로만이 아닌 기능성 화장품 시장에서 활용가치가 높다고 사료된다.

사 사

본 연구는 2018년도 교육부의 재원으로 한국연구재단-국립대학육성사업의 지원을 받아 수행된 연구임.

References

Abdussalam S. 1990. Drugs from seaweeds. *Med Hypotheses* 32, 33-35.

Cho ML, Kang IJ, Won MH, Lee HS and You SG. 2010. The antioxidant properties of ethanol extracts and their solvent partitioned fractions from various green seaweeds. *J Med Food* 13, 1232-1239. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.1124>.

Cho ML, Lee DJ and You SG. 2012. Radical scavenging activity of ethanol extracts and solvent partitioned fractions from various red seaweeds. *Ocean and Polar Res* 34, 445-451. <https://doi.org/10.4217/OPR.2012.34.4.445>.

Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, Kim SY, Kim CD, Lee JH and Yoon TJ. 2007. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res* 20, 120-127. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2007.00365.x>.

Heo SJ, Park PJ, Park EJ, Kim KS and Jeon YJ. 2005. Antioxidant activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Ecklonia cava* by electron spin resonance spectrometry and comet assay. *Eur Food Res Technol* 221, 41-47. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-1187-3>.

Hwang E, Park SY, Shin HS, Lee DG and Yi TH. 2014. Effect of oral administration of fucosterol from *Hizikia fusiformis* on DNCB-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Food Sci. Biotechnol* 23, 593-599. <https://doi.org/10.1007/>

s10068-014-0081-9.

Jeon MH and Kim M. 2011. Effect of *Hizikia fusiforme* fractions on proliferation and differentiation in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Life SCI* 21, 300-308. <https://doi.org/10.5352/JLS.2011.21.2.300>.

Jung BM, Ahn CB, Kang SJ, Park JH and Chung DH. 2001. Effects of *Hizikia fusiforme* extracts on lipid metabolism and liver antioxidative enzyme activities in triton-induced hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30, 1184-1189.

Jeon SH and Yi DH. 2014. Effects of alliin on cellular protection, Up-regulation of collagen and Down-regulation of MMP1 in human dermal fibroblasts. *Kor. J Aesthet Cosmetol* 12, 249-258.

Kim MJ, Kim JH, Lee S, Cho EJ and Kim HY. 2018. Determination of radical scavenging activity of *Aster Yomena* (Kitam.) Honda. *J Kor Academia-Industrial cooper Soc* 19, 402-407. <https://doi.org/10.5762/KAIS.2018.19.9.402>.

Kim HS, Zhang C, Lee JH, Ko JY, Kim EA, Kang N and Jeon YJ. 2014. Evaluation of the biological activities of marine bacteria collected from Jeju island, Korea, and isolation of active compounds from their secondary metabolites. *Korean J Fish Aquat Sci* 17, 215-222. <https://doi.org/10.5657/FAS.2014.0215>.

Kim HH, Kim HS, Ko JY, Kim CY, Lee JH and Jeon YJ. 2016. A single-step isolation of useful antioxidant compounds from *Ishige okamurae* by using centrifugal partition chromatography. *Korean J Fish Aquat Sci* 19, 1-7. <https://doi.org/10.1186/s41240-016-0023-y>.

Lee HY and Kim JD. 2017. The Effect of dietary *Hizikia Fusiforme* on the reduction of blood pressure and total cholesterol in Jeju women divers. *J Digit Converg* 15, 471-478. <https://doi.org/10.14400/JDC.2017.15.5.471>.

Lee JH, Ko JY, Oh JY, Kim CY, Lee HJ, Kim J and Jeon YJ. 2014. Preparative isolation and purification of phlorotannins from *Ecklonia cava* using centrifugal partition chromatography by one-step. *Food Chem* 158, 433-437. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.112>.

Lee JH, Ko JY, Samarakoon K, Oh JY, Heo SJ, Kim CY, Nah JW, Jang MK, Lee JS and Jeon YJ. 2013. Preparative isolation of sargachromanol E from *Sargassum siliquastrum* by centrifugal partition chromatography and its anti-inflammatory activity. 2013. *Food Chem Toxicol* 62, 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.010>.

Park HH and Jung WK. 2016. *Sargassum fusiforme* fucoidan: desalination, components, antioxidant, and NO inhibition in LPS-Stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Chitin Chitosan* 21, 75-81. <https://doi.org/10.17642/jcc.21.2.1>.

Park KE, Jang MS, Lim CW, Kim YK, Seo Y and Park HY. 2005. Antioxidant activity on ethanol extract from boiled-water of *Hizikia fusiformis*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48, 435-439.

- Shan BE, Yoshida Y, Kuroda E and Yamashira U. 1999. Immunomodulating activity of seaweed extract on Human lymphocytes in vitro. *Int J Immunopharmacol* 21, 59-70. <https://doi.org/10.11501/3160540>.
- Song HS, Eom SH, Kang YM, Choi JD and Kim YM. 2011. Enhancement of the antioxidant and anti-inflammatory activity of *Hizikia fusiforme* water extract by lactic acid bacteria fermentation. *Korean J Fish Aquat Sci* 44, 111-117. <https://doi.org/10.5657/kfas.2011.44.2.111>.
- Wang L, Lee WW, Oh JY, Cui YR, Ryu BM and Jeon YJ. 2018. Protective effect of sulfated polysaccharides from celluclast-assisted extract of *Hizikia fusiforme* against ultraviolet B-Induced skin damage by regulating NF- κ B, AP-1, and MAPKs signaling pathways in vitro in human dermal fibroblasts. *Mar. Drugs* 16, 239. <https://doi.org/10.3390/md16070239>.
- Yan X, Yoshihiro C, Masahiro S and Tadahiro N. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hizikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci Biotechnol. Biochem* 63, 605-607. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.605>.
- Zou Y, Qian ZJ, Li Y, Kim MM, Lee SH and Kim SK. 2008. Antioxidant effects of phlorotannins isolated from *ishige okamurae* in free radical mediated oxidative system. *J Agric Food Chem* 56, 7001-7009. <https://doi.org/10.1021/jf801133h>.