

## A Possible Protective Role of *Ginkgo biloba* Outer Seed Coat Methanol Extracts on DNA Damage Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HaCaT Human Skin Keratinocytes

Jae Young Sim<sup>1</sup> and Jong-Hwan Lee<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology and Bioengineering, College of Engineering, Dong-eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>2</sup>Biomedical Engineering and Biotechnology Major, Division of Applied Bioengineering, College of Engineering, Dong-eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>3</sup>Department of Smart-Biohealth, College of Engineering, Dong-eui University, Busan 614-714, Korea

Received August 5, 2019 / Revised October 7, 2019 / Accepted October 8, 2019

The present study was carried out to evaluate extracts of *Ginkgo biloba*'s outer seed coat, their anti-oxidative effects, and their ability to protect against DNA damage due to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) treatments in cultured human keratinocyte (HaCaT) cells. The bioassays applied for determining the antioxidant effects of a *G. biloba* outer seed coat water extract (GOSWE) and a *G. biloba* outer seed coat methanol extract (GOSME) included the DPPH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radical scavenging assays. Our results revealed that GOSME had higher activity than GOSWE against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radical scavenging activity in *in vitro* and *in vivo* bioassays. Treatment with GOSME significantly increased the viability of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated HaCaT cells. GOSME's ability to protect against DNA damage was observed via the analysis of plasmids *in vitro* and genomic DNA in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated HaCaT cells. According to our data, GOSME is able to protect HaCaT cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and apoptosis by blocking cellular damage related to oxidative stress. In conclusion, our study indicated GOSME might serve as a novel agent for the treatment and prevention of skin disorders caused by oxidative stress.

**Key words** : DNA damage, GOSME, GOSWE, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ROS

### 서 론

사람의 피부는 몸을 외부환경으로부터 보호해 주는 장벽 역할을 하는 중요한 기관이다. 인간은 평생 동안 많은 내외부 자극에 노출되며 활성 산소가 발생한다. 활성산소의 발생을 보면 백혈구에 의한 세균제거, 격렬한 운동, 과도한 스트레스, 물질대사, 흡연, 자외선등에 의하여 발생한다. 자외선(ultra-violet radiation, UV) 같은 경우 파장에 따라 A, B 및 C의 3개 영역으로 나눌 수 있으며 자외선 B(UVB 방사선(radiation), 파장: 280-320 nm)는 피부세포의 지질, 단백질 및 DNA에 심각한 손상을 유발하여, 피부암, 면역시스템 억제, 세포사멸 또는 돌연변이 유발에 의한 심각한 질병을 발생시킬 수 있어 피부에 유해작용을 일으킨다[1, 4]. 위에서 언급한 환경적 요인에 의해 생성된 활성산소는 피부세포의 지질(lipids), 단백질(proteins) 및 DNA와 같은 세포 성분들에 산화적 손상(oxidative damage)을 일으켜 결과적으로 피부노화를 촉진시키

며 또한 피부암을 유발하기도 한다[3, 10]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 활성산소종의 하나로 세포 성장과 소멸 그리고 노화 등에 영향을 미치는 중요한 요소 중 하나다. 더욱이, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 불안정한 특성때문에 주위 물질과 매우 강하게 반응한다. 따라서, UV와 같은 환경적 요인의 지속적 피부 노출은 피부세포에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 같은 활성산소의 과도한 생성으로 이어져 피부세포의 산화적 스트레스에 의해 DNA와 단백질 구조가 파괴되어 피부노화를 가속화한다[8, 10, 12]. ROS로 인한 세포 손상으로부터 피부를 보호하기 위한 수많은 항산화물들이 제시되었는데 예를 들면 (-)epigallocatechin-3-gallate 및 resveratrol 등이 UVB로 인한 피부 손상을 저해하는 것으로 알려져 있다[8, 10, 20, 24]. 하지만, 천연 추출물을 이용하여 자외선에 의한 피부세포 DNA 손상 방지에 대항하는 소재나 제품 개발은 미약한 실정이다. 은행나무(*Ginkgo biloba*)는 행자목이라고도 하며 겉씨 식물에 속하는 낙엽 활엽수로 한국, 중국 및 일본 등지에 고루 분포한다. 9 내지 10월경에 열리는 황색의 은행 종자는 크게 바깥쪽 육질층(외종피, sarcotesta 혹은 *G. biloba* outer seedcoater)과 딱딱한 중간 껍질(후벽내종피, sclerotesta), 그리고 그 안쪽의 얇은 껍질(내종피, endotesta)로 이루어져 있다. 은행에는 간놀, 펙틴, 히스티딘, 전분, 단백질 등이 많이 함유되어 있어 폐기능을 향상시키고 기침을 멎게 하며[13], 레시틴을 함유하고 있어 신경세포막을 보호해 뇌 건강에 도움을 준다[11, 12, 17]. 또한 ginkgolide는 나쁜 콜레스테롤과 여러 독소를 제거하는 효과가 있다[5]. 무기질 P, Ca와 비타민 A, 비타민 C 및

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2280, Fax : +82-51-890-2632

E-mail : [jonghwanlee@deu.ac.kr](mailto:jonghwanlee@deu.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.

높은 나이아신 등을 함유하고 있다[17]. 그 외에도 혈액순환촉진[21] 및 혈관확장작용[21], 항균작용[19] 등에 효과가 있다. 일반적으로 은행은 은행 잎이나 은행내종피가 약용 또는 식용되고 있다[18]. 하지만, 내종피를 감싸고 있고 육질층을 형성하며 냄새의 원인으로 버려지는 은행외종피(*G. biloba* outer seedcoat)에 대한 기능성은 알려진 것이 거의 없다. 본 연구는 은행외종피가 기능성 소재로써 활용가능한지를 알아보고자 외종피 추출물을 이용한 기능성 탐색을 시도하였다. 본 연구에서 탐색한 기능성은 은행외종피 추출물의 항산화 활성과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 공격으로부터 DNA의 손상을 보호할 수 있는지에 대한 연구를 진행하였고 이를 토대로 다양한 기능성 제품을 만드는 소재로의 활용가치에 대하여 고찰하였다.

## 재료 및 방법

### 은행외종피 추출물의 제조

은행은 부산시 연제구 토곡동에 위치한 부산광역시 영재교 육진흥원에 있는 은행나무로부터 가을철 노란색을 띠며 땅에 떨어진 은행열매를 회수하여 사용하였다. 은행외종피 물 추출물(*G. biloba* outer seedcoat water extract, GOSWE)의 제조는 먼저 외종피를 세척하고 내종피를 제거한 뒤 실온에서 건조하여 사용하였다. 1 kg의 외종피에 물 1 l를 첨가하고 100°C에서 2시간 동안 열수 추출을 한 후 이를 냉각시킨 뒤 와트만 여과지로 여과하여 여액을 수득하였다. 은행외종피 메탄올 추출물(*G. biloba* outer seedcoat methanol extract, GOSME)의 제조는 1 kg의 외종피에 메탄올 1L를 첨가하여 60°C에서 4시간 동안 추출을 하였다. 이후, GOSWE는 동결건조 과정을 거쳤고 GOSME는 회전 감압농축기로 감압 농축 후 중량을 측정하여 최종 mg/ml 농도로 DMSO에 녹여 사용하였고 시료를 처리할 때에는 희석하여 사용하였다.

### 세포배양

세포는 HaCaT 세포를 사용하였고 100 µg/ml 스트렙토마이신과 페니실린이 함유된 Dulbecco's modified eagle medium (Gibco Inc, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (Gibco Inc, USA)을 첨가된 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### DPPH 자유 라디칼 소거능 평가

추출물을 이용하여 안정한 자유 라디칼종인 DPPH에 대한 소거는 다음과 같이 진행되었다[7]. GOSWE와 GOSME (0, 25, 50, 100 µg/ml) 40 µl와 300 µM DPPH 용액 760 µl를 E-tube에 넣고 37°C에서 30분간 암소에서 반응 후 100 µl의 반응물을 마이크로플레이트에 분주 후 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 함량은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

### 과산화수소 소거능

과산화수소 라디칼 소거활성은 다음과 같이 진행하였다 [16]. 즉, 0.1 M 인산염 완충액(pH 5.0) 100 µl, GOSWE와 GOSME (0, 25, 50, 100 µg/ml) 40 µl, 1 mM 과산화수소 60 µl를 섞은 후 37°C에서 5분간 반응하였다. 5분 후 1.25 mM ABTS 400 µl와 400 µl peroxidase (1 unit/ml)를 혼합물에 넣고 37°C에서 10분간 반응한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비타민 C는 양성 대조군으로 사용되었다. 과산화수소 라디칼 함량은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유발된 손상 플라스미드 DNA의 회복실험

GOSME를 이용하여 과산화수소에 의해 손상된 플라스미드 DNA의 회복실험은 Ogasawara방법을 약간 변형하여 진행하였다[14]. 즉, 사용한 DNA로는 pcDNA 3.1 플라스미드를 사용하였다. DNA 손상 유도는 과산화수소의 hydroxyl radical 변환방법으로 다음과 같은 재료들을 사용하였다. 즉 Hydroxyl radical 생성은 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 µM FeCl<sub>3</sub>, 25 µM EDTA, 10 µM ascorbic acid, 0.5 µg 플라스미드 DNA를 사용하였고 반응 부피는 PBS (pH 7.4)로 최종 0.5 ml이 되게 맞추고 후 37°C에서 20분간 반응하였다. 혼합시 염화철은 EDTA와 먼저 섞었으며 ascorbic acid을 첨가하면서 반응을 시작하였다.

### HaCaT 세포 생존능 분석

본 실험은 Kang의 방법을 변형하여 사용하였다[9]. 세포 생존은 96 Aqueous One Solution 세포증식검정(MTS) (Promega, Fitchburg, WI, USA)방법으로 의해 세포독성을 결정하였다. 먼저 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 세포 생존을 알아보기 위해 HaCaT 세포 (5×10<sup>5</sup>)를 96-웰 플레이트에 넣고 다양한 농도(0, 0.05, 0.1, 1 mM)의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 1 mM FeSO<sub>4</sub>를 각 웰에 첨가 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 또한, 과산화수소에 대하여 GOSME의 세포 생존에 대한 영향을 알아보기 위해 HaCaT 세포(5×10<sup>5</sup>)를 96-웰 플레이트에 넣고 0, 25, 50, 75, 100 µg/ml의 GOSME를 각 웰에 넣은 후 37°C에서 30 분간 배양하였다. 이후, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 1 mM FeSO<sub>4</sub>를 각 웰에 첨가 하였고 37°C에서 24 시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 5% MTS를 96-웰 플레이트에 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후, 490 nm의 파장에서 마이크로 플레이트 판독기(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 판독하였다.

### Phase-contrast microscopy

은행외종피 추출물의 과산화수소에 대한 보호효과를 보기 위해 HaCaT 인체 keratinocytes의 형태적 변화를 관찰하기 위해 inverted light microscope (IX2-SLP Olympus, JP)를 사용하였다.

**세포 계층 DNA 손상실험**

본 실험은 Cho의 방법을 변형하여 사용하였다[2]. HaCaT 세포( $2 \times 10^6$ )는 6-well plate에서 24시간 37°C에서 배양하였다. 100 µg/ml GOSME를 30분간 세포에 처리 후 1 mM FeSO<sub>4</sub>와 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣고 1시간 더 반응하였다. 1시간 뒤 세포를 회수 하여 1,200 rpm에서 3분간 원심분리 한 후 상등액을 제거 하였다. 계층 DNA분리를 위해서는 DNAzol(Molecular Research Center (Cincinnati, OH, USA))을 이용하였다. 0.5 ml DNAzol을 펠렛에 넣고 피펫팅으로 세포를 용해하였다. 세포 용해 후 원심분리 하였으며 상등액에 5 µl RNase A 를 넣고 60 분간 55°C에서 반응하였다. 이후 DNA 침전을 위해 상등액에 동일 부피의 에탄올을 첨가하였다. 침전물을 에탄올로 세척하고 8 mM NaOH로 용해 후 5 µl DNA loading buffer (50% glycerol (v/v), 40 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue)와 혼합 후 2% 아가로스젤에 전기영동을 하였고 EtBr 염색방법으로 염색하였다.

**통계처리**

실험결과 유의성 검증을 위한 통계 처리는 SPSS version 12.0로 분석한 후 t-검정을 실시하여 분산과 평균의 동일성 여부를 검정하였으며, 분석결과는 일원분산분석(one way ANOVA)에 의한 Duncan 검정을 실시하여  $p < 0.05$  수준에서 유의한 것으로 간주하였다. 각 실험에서 얻어진 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다.

**결과 및 고찰**

**은행외종피 추출물의 DPPH 자유 라디칼 소거능 효과**

은행외종피 추출물의 항산화 활성을 분석하기 위하여 DPPH 유리 라디칼의 제거 효과를 조사하였다. Fig. 1에 따르면 GOSWE와 GOSME의 DPPH 자유 라디칼 소거능은 추출 용매로 물을 사용하는 경우보다 메탄올을 사용하는 경우 약간 우

수한 것으로 확인되었다(Fig. 1A, Fig. 1B). 하지만, GOSME를 25 µg/ml, 50 µg/ml 및 100 µg/ml 사용하는 경우도 DPPH 자유 라디칼 소거능이 있는 것으로 나타났다(Fig. 1B). 자유 라디칼은 주로 활성산소종(ROS)이나 활성질소종(RNS)들이다. DPPH는 안정한 질소기반 자유 라디칼로 수소나 전자전달 과정을 통해 환원된다[6]. 은행외종피 추출물은 질소 라디칼에 속하는 DPPH의 환원하는 능력은 비교적 약한 것으로 사료된다. GOSWE는 특히 질소종 라디칼인 DPPH의 환원력은 없었고 GOSME의 경우 대조군인 비타민C 보다는 효과가 약하지만 DPPH의 환원을 할 수 있는 능력을 가지고 있는 것을 확인하였다(Fig. 1A, Fig. 1B). 식물 유래의 phytochemical에는 다양한 약리 효능을 가진 성분들이 많아 혼재 되어 있는데 기능성을 나타내는 성분을 효율적으로 추출하는 방안에는 여러 방법이 있을 수 있다. 그중 용매에 따라서 추출 성분의 변화가 생길 수 있고 이로 인해 기능성이 달리 나타날 수 있다. 그 외 추출물은 새로운 분획 용매를 순차적으로 적용하여 분획화하거나 농축 또는 동결건조 등의 방법을 추가적으로 사용하여 시료의 기능성을 극대화 할 수 있을 것으로 사료된다.

**은행외종피 추출물의 과산화수소 소거 효과**

은행외종피 추출물중 GOSME는 질소종 자유라디칼이 해당하는 DPPH 라디칼을 환원할 수 있는 능력을 가지고 있는 것으로 확인하였다. 다음으로 활성산소종이며 자외선에 의해서 생성 되어 피부에 많은 영향을 미치는 과산화수소에 대한 GOSWE와 GOSME의 제거에 대한 실험을 진행하였다. Fig. 2A에 나타낸 바와 같이 GOSWE는 함량을 점차적으로 증가하더라도 과산화수소 라디칼 소거에 크게 차이 나지 않음을 확인할 수 있다. 반면, GOSME는 50 µg/ml과 100 µg/ml을 사용하는 경우, 즉 함량이 증가될수록 과산화수소 라디칼 소거가 향상되는 것을 확인하였다(Fig. 2B). 항산화능에 있어 GOSWE보다 GOSME가 뛰어난 것을 확인 하였기 때문에 이후의 실험에서는 GOSME위주로 실험을 진행하였다. 상기 실험 결과를

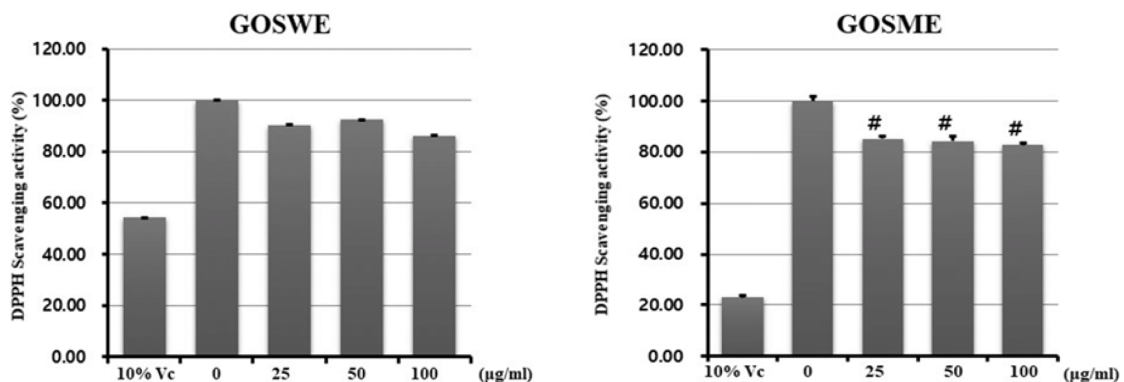


Fig. 1. Effect of *Ginko biloba* outer seedcoat methanol extract (GOSME) on DPPH scavenging activity. Values are expressed as the mean±SD. Positive control is Vc (Vitamin C). #  $p < 0.05$  indicate significant difference between the sample without extract and extracts-treated samples.

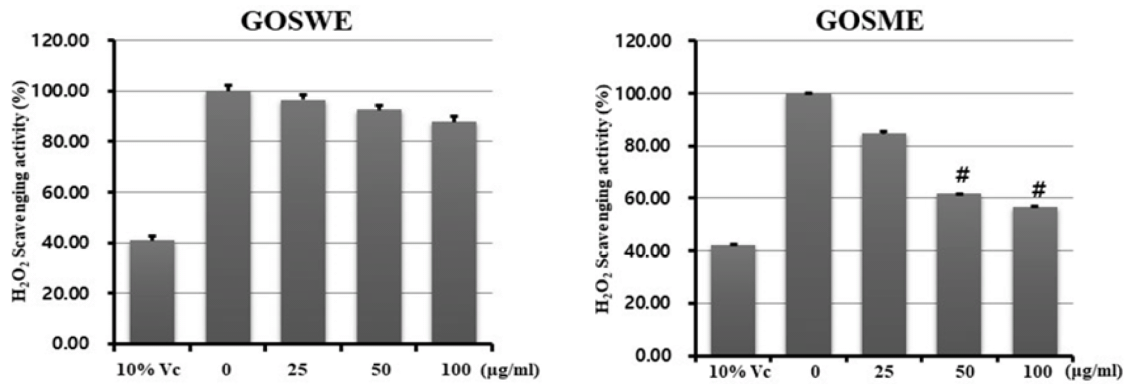


Fig. 2. Effect of *G. biloba* outer seedcoat water extract (GOSWE) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging activity. Values are expressed as the mean ± SD. Positive control is Vc (Vitamin C). # *p*<0.05 indicate significant difference between the sample without extract and extracts-treated samples.

통해 GOSME의 경우 DPPH 라디칼 소거보다는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 라디칼 소거가 우수하여 자외선에 노출되어 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거를 위한 소재로 활용 할 있을 것으로 사료된다. 이렇듯 상기의 소재는 선택적 항산화력을 가지는 것으로 판단되며 은행외종피 추출물은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유발되는 각종 피부노화 억제제를 위한 소재로 활용 될 수 있는 근거로 작용할 수 있다고 사료된다.

**은행외종피 추출물의 DNA 손상 보호 효과**

은행외종피 추출물중 GOSME는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 우수한 소거능이 있는 것이 확인 되었다. 따라서, 과산화수소에 의해 유발되는 DNA 단편화 억제 작용이 있는 확인하기위해 먼저 플라즈미드 DNA를 가지고 DNA 단편화 억제 실험을 실시하였다. Fig. 3에 따르면, 각 레인은 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 함께 24시간 동안 배양한 대조 pcDNA 3.1 플라즈미드 DNA를 함유하고 있다. 무처리 군을 보면 pcDNA 3.1 플라즈미드 DNA는 supercoiled (SC) DNA가 있는 것이 확인되며 이것과 비교하여, GOSME를 0.05 mg/ml 및 0.1 mg/ml 처리한 군에서 동일한 pcDNA 3.1 플라즈미드 DNA를 확인할 수 있다. 또한, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 DNA가 분절되어 open circular (OC) DNA로 전환되어 손상되는 것(GOSME 0 mg/ml 처리군)을 확인할 수 있고, GOSME를 처리한 군에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 DNA 분절이 억제되어 OC DNA 형태를 유지 할 수 있었으므로 보아 GOSME는 DNA 손상을 방지할 수 있는 소재로 활용 될 수 있음을 확인할 수 있었다.

**은행외종피 추출물의 HaCaT 세포 사멸과 계층 DNA 분해 억제**

GOSME는 과산화수소 활성 억제와 플라즈미드 DNA 단편화에 대한 보호력을 가지고 있는 것을 나타냈다. 다음으로 피부세포에서도 GOSME가 과산화 수송에 의한 피부세포의 손상을 억제 할 수 있는지 확인하였다. 사용한 피부 세포는 HaCaT 세포이며 과산화수소에 대한 HaCaT 세포의 세포독성 실험을 위해서 MTS assay를 수행하였으며 이때 사용할 과산

화수소의 농도도 결정하였다. 과산화수소가 HaCaT 세포 생존에 미치는 영향을 보면 대조군에 비해 50, 100 µM과 1 mM로 농도가 높아짐에 따라 세포 사멸이 증가한다는 것을 알 수 있었다. 특히, 1 mM 과산화수소농도에서 절반에 해당하는 세포가 사멸하는 것을 알 수가 있었다(Fig. 4A). 따라서 1, mM 농도의 과산화수소를 GOSME가 세포보호능을 나타내는지에 대한 최고 농도로 설정하여 다음 실험을 진행하였다. 미리 GOSME를 처리한 실험군에 1 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 HaCaT 세포의 사멸에 대하여 GOSME가 HaCaT 세포를 과산화수소의 공격으로부터 보호함으로써 세포의 생존력이 증가하는지 확인하였다. 과산화수소 스트레스

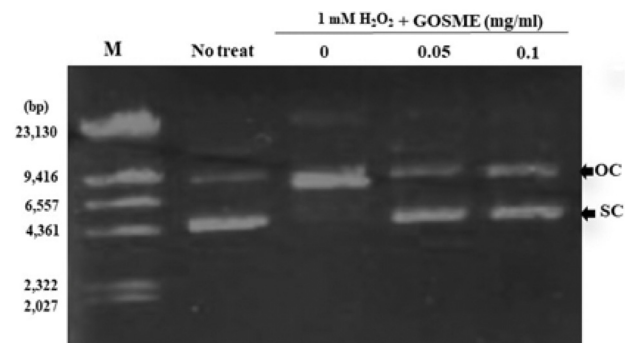


Fig. 3. Protective effect of GOSME on pcDNA 3.1 plasmid DNA damage under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. Each lane contains control pcDNA 3.1 plasmid DNA (500 ng) incubated with 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 hr. M is size marker. Lane M is IDNA/ HindIII fragments and No treat lane is control lane. Lane 0 is only H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated plasmid DNA. Lanes 0.05 and 0.1 were treated with concentration of the extract (50 and 100 µg/ml). The pcDNA 3.1 plasmid DNA was identified as supercoiled DNA in the no treat lane. In contrast, the supercoiled plasmid DNA had transformed to open circular DNA due to DNA segmentation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated sample. OC means open circular and SC means super coil.

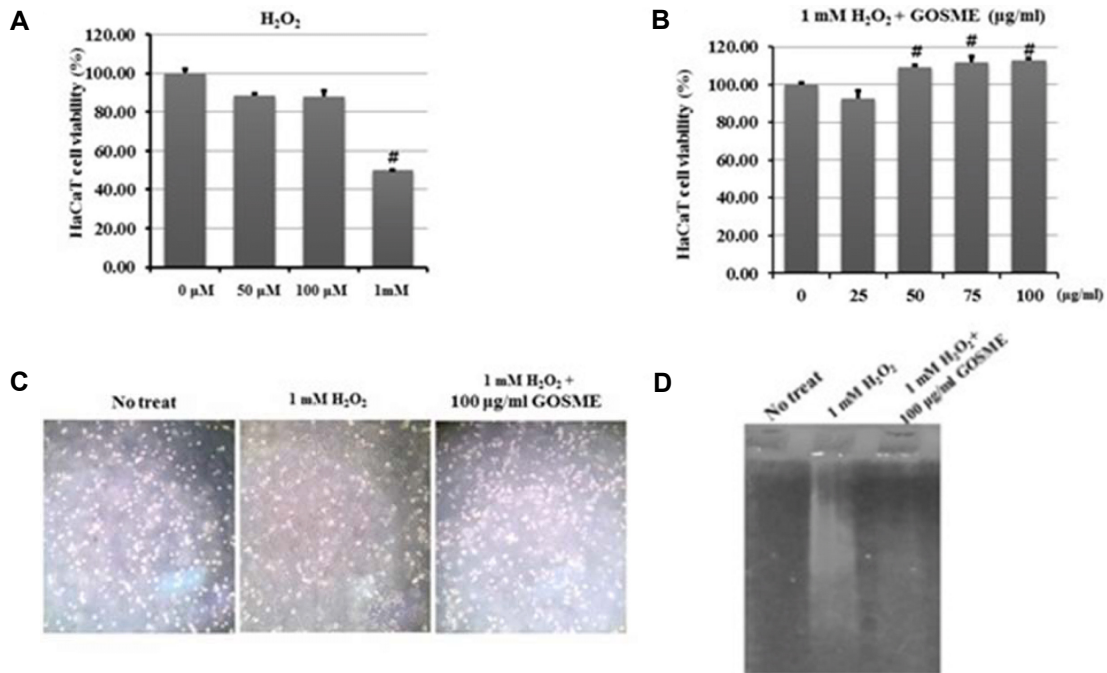


Fig. 4. Protective effect of GOSME on HaCaT cell viability and on genomic DNA fragmentation in HaCaT cell under  $H_2O_2$  stress. HaCaT cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were either left untreated or treated with indicated concentrations (A) and 1,000  $\mu M$  (B) of  $H_2O_2$  for 24 hr. After then 100  $\mu l$  of MTS solution (0.5 mg/ml) was treated to each well, a plate was incubated for 4 hr at  $37^\circ C$ . HaCaT cells without GOSME or with GOSME were exposed to  $H_2O_2$  at a concentration of 1 mM for 24 hr and the cells were observed under a phase contrast microscope (C). Genomic DNA was isolated from 1 mM  $H_2O_2$ -treated HaCaT cell with or without GOSME for 24 hr (D). The observation was measured with a microplate reader at 490nm using a microplate reader. Values are expressed as the mean $\pm$ SD. #  $p < 0.05$  indicate significant difference between the sample without extract and extracts-treated samples.

하에서 HaCaT 세포의 보호 효과에 대한 실험결과를 나타낸 것으로 과산화수소 처리하고 24시간 후 세포 상태를 확인한 결과 무처리 군과 1 mM  $H_2O_2$  + 100  $\mu g/ml$ 의 GOSME 처리 군에서 동등한 정도의 세포가 관찰되었다(Fig. 4B, Fig. 4C). 반면, 1 mM  $H_2O_2$ 만 처리한 군에서는 적은 수의 세포가 관찰되는 것을 확인하였다(Fig. 4B, Fig. 4C). 또한, 25, 50, 100  $\mu g/ml$  농도의 GOSME는 과산화수소의 공격에 의한 세포사멸을 막고 결과적으로 세포생존력을 향상시키는 결과를 나타내었기에 GOSME는 자체에 의해 세포사멸이 유발되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4B, Fig. 4C). 상기의 실험결과는 GOSME는 과산화수소에 대한 우수한 항산화 활성을 가지고 있어 산화적 스트레스에서 세포 손상을 차단하여 세포사멸로부터 HaCaT 세포의 보호가 가능하다는 것을 의미한다. Fig. 3에서 GOSME는 과산화수소 스트레스하에서 플라스미드 DNA의 절단을 억제하고 HaCaT 세포 사멸도 저해할 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서, GOSME가 HaCaT 세포의 게놈 DNA도 과산화수소의 공격으로부터 절단을 방지할 수 있는 확인하였다. Fig. 4D에 나타난 바와 같이 GOSME를 무처리하고 1 mM  $H_2O_2$ 만 처리한 군의 게놈 DNA는 아가로즈겔 상에서 분해되어 smear DNA 형태로 나타나는 것을 확인하였다. 하지만,

1 mM  $H_2O_2$ 와 GOSME가 함께 처리된 군에서는 이러한 smear DNA가 거의 나타나지 않았는데 이것은 GOSME가 과산화수소에 의한 DNA 파괴 효과에 대하여 보호 할 수 있다는 것을 의미하였다. 자외선 영역 중 자외선 B, UVB 방사선(파장: 280-320 nm)는 피부암, 면역 시스템 억제 및 광노화 등의 피부에 대한 유해 작용을 일으키는 주요 환경 요인 중 하나이다[22, 23]. 특히, 산화적 스트레스와 관련되어 세포 손상을 유발할 수 있고[15], DNA 손상을 통해 결과적으로 피부노화를 촉진하게 된다[4]. 피부는 여름철에 태양에 노출되는 빈도가 높아진다. 태양광에 포함된 자외선은 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 발생을 유발할 수 있는 이는 DNA에 산화적 손상(oxidative damage)을 일으켜, 결과적으로 피부노화를 촉진시키고 암질환의 피부 병변을 유발하게 된다. 본 연구에서 사용된 은행외종피 추출물은 이러한 자외선에 의한 피부 DNA 손상을 예방할 수 있는 천연 소재로 활용 할 수 있을 것으로 사료된다. 특히, 화장품 소재, 피부 의약품 소재, 자외선 차단제와 같은 피부 외용제로 사용될 수 있음에 따라, 피부노화를 방지하는 효과를 높일 수 있다. 즉, 상기 은행외종피 추출물은  $H_2O_2$  소거 효과 및 DNA 손상에 대한 보호를 통해 우수한 피부노화 예방 및 개선, 피부주름개선, 피부염증개선

효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 2017년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 기본연구지원사업의 지원을 지원받아 수행되었으며 (Grant #: 2017R1D1A1B03028537) 또한, 2019년도 동의대학교 교내연구비(201902220001)도 일부 지원되었습니다.

### References

- Bernard, J. J., Gallo, R. L. and Krutmann, J. 2019. Photoimmunology: how ultraviolet radiation affects the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* doi: 10.1038/s41577-019-0185-9.
- Cho, E. S., Lee, K. W. and Lee, H. J. 2008. Cocoa procyanidins protect PC12 cells from hydrogen-peroxide-induced apoptosis by inhibiting activation of p38 MAPK and JNK. *Mutat. Res.* **640**, 123-130.
- De Silva, M. B. and Tencomnao, T. J. 2018. The protective effect of some Thai plants and their bioactive compounds in UV light-induced skin carcinogenesis. *Photochem. Photobiol. B.* **185**, 80-89.
- Dubey, D., Srivastav, A. K., Singh, J., Chopra, D., Qureshi, S., Kushwaha, H. N., Singh, N. and Ray, R. S. 2019. Photoexcited triclosan induced DNA damage and oxidative stress via p38 MAP kinase signaling involving type I radicals under sunlight/UVB exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **174**, 270-282.
- Feng, Z., Yang, X., Zhang, L., Ansari, I. A., Khan, M. S., Han, S. and Feng, Y. 2018. Ginkgolide B ameliorates oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial dysfunction via modulating Lectin-like ox-LDL-receptor-1 and NADPH oxidase 4 expression and inflammatory cascades. *Phytother. Res.* **32**, 2417-2427.
- Foti, M. C. 2015. Use and Abuse of the DPPH (·) Radical. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 8765-8776.
- Hus, B., Coupar, I. M. and Ng, K. 2006. Antioxidant activity of hot water extract from the fruit of the Doum palm. *Hyphaena thebaica. Food Chem.* **98**, 317-328.
- Jian, L., Xin, L., Yufang, M. and Yifan, H. 2015. Protective effect of calycosin-7-O-β-D-glucopyranoside against oxidative stress of BRL-3A cells induced by thioacetamide. *Pharmacogn. Mag.* **11**, 524-532.
- Kang, K. A., Lee, K. H., Chae, S. W., Zhang, R., Jung, M. S., Lee, Y. K., Kim, S. Y., Kim, H. S., Joo, H. G., Park, J. W., Ham, Y. M., Lee, L. H. and Hyun, J. W. 2005. Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. *FEBS Lett.* **579**, 6295-6304.
- Li, L., Yao, Y., Jiang, Z., Zhao, J., Cao, J. and Ma, H. 2019. Dehydroepiandrosterone prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced BRL-3A cell oxidative damage through activation of PI3K/Akt pathways rather than MAPK pathways. *Oxid. Med. Cell Longev.* **28**, 2019:2985956. doi: 10.1155/2019/2985956.
- Lindner, M., Gosewisch, A., Eilles, E., Branner, C., Krämer, A., Oos, R., Wolf, E., Ziegler, S., Bartenstein, P., Brandt, T., Dieterich, M. and Zwergal, A. 2019. *Ginkgo biloba* extract EGb 761 improves vestibular compensation and modulates cerebral vestibular networks in the rat. *Front Neurol.* **10**, 147. doi: 10.3389/fneur.2019.00147.
- Li, R. G., Li, T. T., Hao, L., Xu, X. and Na, J. 2009. Hydrogen peroxide reduces lead-induced oxidative stress to mouse brain and liver. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **82**, 419-422.
- Liu, K. X., Wu, W. K., He, W. and Liu, C. L. 2007. *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) attenuates lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats: roles of oxidative stress and nitric oxide. *World J. Gastroenterol.* **13**, 299-305.
- Ogasawara, Y., Imase, M., Oda, H., Wakabayashi, H. and Ishii, K. 2014. Lactoferrin directly scavenges hydroxyl radicals and undergoes oxidative self-degradation: a possible role in protection against oxidative DNA damage. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 1003-1013.
- Oliveira, M. M., Ratti, B. A., Daré, R. G., Silva, S. O., Truiti, MDCT., Ueda-Nakamura, T., Auzély-Velty, R. and Nakamura, C. V. 2019. Dihydrocaffeic acid prevents UVB-induced oxidative stress leading to the inhibition of apoptosis and MMP-1 expression via p38 signaling pathway. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2019**, 2419096. doi: 10.1155/2019/2419096.
- Pick, E. and Keisari, Y. 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* **38**, 161-170.
- Ren, C., Ji, Y. Q., Liu, H., Wang, Z., Wang, J. H., Zhang, C. Y., Guan, L. N. and Yin, P. Y. 2019. Effects of *Ginkgo biloba* extract EGb761 on neural differentiation of stem cells offer new hope for neurological disease treatment. *Neural. Regen. Res.* **14**, 1152-1157.
- Ren, X. J., Yang, Z. B., Ding, X. and Yang, C. W. 2018. Effects of *Ginkgo biloba* leaves (*Ginkgo biloba*) and *Ginkgo biloba* extract on nutrient and energy utilization of broilers. *Poult Sci.* **97**, 1342-1351.
- Sati, P., Dhyani, P., Bhatt, I. D. and Pandey, A. 2018. *Ginkgo biloba* flavonoid glycosides in antimicrobial perspective with reference to extraction method. *J. Tradit. Complement. Med.* **9**, 15-23.
- Shi, M., Nie, Y., Zheng, X. Q., Lu, J. L., Liang, Y. R. and Ye, J. 2016. Ultraviolet B (UVB) Photosensitivities of tea catechins and the relevant chemical conversions. *H. Molecules* **21**, pii: E1345.
- Tian, J., Liu, Y. and Chen, K. 2017. *Ginkgo biloba* Extract in Vascular Protection: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **15**, 532-548.
- Yang, Y., Wu, R., Sargsyan, D., Yin, R., Kuo, H. C., Yang, I., Wang, L., Cheng, D., Wang, C., Li, S., Hudlikar, R., Lu, Y. and Kong, A. N. 2019. UVB drives different stages of epigenome alterations during progression of skin cancer. *Cancer Lett.* **449**, 20-30.
- Zheng, H., Zhang, M., Luo, H. and Li, H. 2019. Isoorientin

alleviates UVB-induced skin injury by regulating mitochondrial ROS and cellular autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **514**, 1133-1139.

24. Zhou, F., Huang, X., Pan, Y., Cao, D., Liu, C., Liu, Y. and

Chen, A. 2018. Resveratrol protects HaCaT cells from ultra violet B-induced photoaging via upregulation of HSP27 and modulation of mitochondrial caspase-dependent apoptotic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **499**, 662-668.

---

## 초록 : HaCaT 인간 피부 케라티노사이트에서 과산화수소 유발 DNA 손상에 대한 은행외종피 추출물의 보호효과

심재영<sup>1</sup> · 이종환<sup>1,2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>동의대학교 생명공학과, <sup>2</sup>동의대학교 바이오응용공학부 의생명공학 전공, <sup>3</sup>동의대학교 바이오헬스학과)

본 연구는 은행외종피 추출물의 항산화 및 DNA 손상 보호용 조성물에 관한 것으로 HaCaT 세포에서 은행외종피 물과 메탄올 추출물의 과산화수소의 공격에 대한 항산화 효과 및 DNA 손상보호에 대한 것이다. 이를 위해 은행외종피 물 추출물(GOSWE)와 은행외종피 메탄올 추출물(GOSME)의 항산화력을 위해서는 DPPH와 과산화수소 소거능을 실시하였다. GOSWE와 GOSME는 DPPH 소거능에서 다소 차이를 보였다. 더욱이, GOSME는 과산화수소 소거능에서 GOSWE보다 탁월한 효과를 발휘하였다. 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리된 HaCaT 세포의 세포생존실험에서 GOSME는 세포생존력을 향상시켰다. GOSME는 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 플라스미드 DNA 단편화 저해능과 HaCaT세포에서 게놈 DNA 단편화 억제능이 있는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 GOSME는 활성산소제거를 통한 산화적 스트레스관련 세포손상 억제를 통한 세포사멸억제 및 과산화수소 유발 DNA 손상을 억제 할 수 있다는 것을 제시하였다. 결론적으로 GOSME는 산화적스트레스에 의한 피부질환에 대한 치료 및 방어제로 이용 될 수 있는 신소재로 평가 할 수 있다.