

## 자외선 B에 의해 유도되는 DNA 상해에 대한 참갈파래 메탄올 추출물의 보호 효과

정슬아 · 정유현 · \*박종군\*

원광대학교 생물학과 박사과정, \*원광대학교 생명과학부 교수

### Protective Effects of *Ulva lactuca* Methanol Extracts against the Ultraviolet B-induced DNA Damage

Seula Jeong, Yuheon Chung and \*Jong Kun Park\*

Doctor's Course, Major in Dept. of Biological Science, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea

\*Professor, Major in Dept. of Biological Science, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea

#### Abstract

In this study, we investigated the protective effects of *Ulva lactuca* methanol extracts against ultraviolet B (UVB)-induced DNA damage in HaCaT cells. First, the contents of general and antioxidative nutrient contents of *Ulva lactuca* were measured. The moisture, carbohydrate, crude protein, crude fat and ash were 14.01%, 44.80%, 23.19%, 3.10% and 14.90%, respectively. Magnesium that acts as DNA repair enzyme cofactor was the most abundant mineral followed by Ca, P and Fe. The total phenolic and anthocyanoside contents of *Ulva lactuca* were 2.69 mg/g and 0.13 mg/g, respectively. Cells treated with *Ulva lactuca* methanol extracts for 24 hours post UVB exposure increased cell viability in a concentration-dependent manner compared to the non-treated control. Also, *Ulva lactuca* methanol extracts decreased the levels of UVB-induced DNA damage such as cyclobutane pyrimidine dimer and DNA damage response (DDR) proteins such as p-p53 and p21. These results suggest that *Ulva lactuca* methanol extracts comprising physiological active substances such as Mg, polyphenols and anthocyanosides promote DNA repair by regulating genes related with DDR.

Key words: *Ulva lactuca*, ultraviolet B, DNA damage

#### 서 론

인간의 세포 내 DNA 상해의 원인은 크게 내부적 요인과 외부적 요인으로 나뉜다. 내부적 요인은 세포의 대사과정에서 자연발생적으로 생긴 활성산소종(ROS) 등으로 인한 DNA 상해를 말한다. 외부적 요인은 자외선, 화학물질, 유전 독성물질 등 환경적 요인으로 발생하는 DNA 상해를 말한다. 우리가 일상생활에서 흔히 접하는 햇빛 속 자외선 B는 DNA 상해를 유발하는 환경적 요인 중 하나이다(Mullenders LHF 2018). 자외선 B에 과도하게 노출되면 세포 내 활성산소가 증가하게 되고, 8-옥소구아닌(8-OHdG)과 같은 산화된 염기를 만든다(de Jager 등 2017). 또한 DNA에 티민 이량체(cyclobutane pyrimidine dimer, CPD)와 6-4 광생성물질

(Pyrimidine(6-4) pyrimidine photoproducts, 6-4PP)과 같은 상보적이지 않은 피리미딘계 염기끼리의 결합을 만들어 DNA 상해를 유발한다(Mullenders LHF 2018). DNA 상해는 DNA 상해 회복 기작을 통해 회복되기도 하지만, 상해의 정도가 강할 경우 회복되지 못하고 돌연변이를 생성하여 피부암, 아토피 피부염, 대사성 질환 등을 일으키게 된다(Shimizu 등 2014; Basu AK 2018). 의학의 지속적인 발전으로 상기 다양한 질환을 치료하는 화학 요법이 많이 개발되었지만, 부작용과 독성의 문제는 아직 해결되지 못한 채 남아있다. 이에 인체에 무해하면서도 질병을 효과적으로 치료할 수 있는 새로운 소재를 천연물로부터 탐색하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

해양에 서식하는 생물은 육상생물에 비해 고염, 고압 등

\* Corresponding author: Jong Kun Park, Professor, Major in Dept. of Biological Science, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea. Tel: +82-63-850-6200, Fax: +82-63-843-2781, E-mail: jkpark@wku.ac.kr

의 특수한 환경에 서식하기 때문에 이에 적응하기 위해 다양한 활성 성분을 함유하고 있다. 특히, 해조류는 육상식물에 비해 다량의 마그네슘, 칼슘, 요오드, 철, 미네랄 및 비타민을 함유하는 것으로 보고되고 있다(Fan 등 2014). 해조류는 비소화성 다당류가 다량 함유되어 있어 식용으로서 큰 각광을 받지 못하였으나, 최근 항염증, 항암 및 면역 조절 작용 등 다양한 생리활성 등이 보고되면서 식품, 의약품 및 화장품의 소재로서 대두되고 있다(Fernando 등 2016; Alves 등 2018).

갈파래과(*Ulvaceae*)는 청태과라고도 하며, 녹조류 중 한국 전 연안에서 흔하게 관찰되는 대표적인 해조류이다. 참갈파래(*Ulva lactuca*)는 갈파래과의 기준종으로 해양의 표면부 및 조간부에서 서식한다. 자외선 및 염수에 직접적으로 접촉 받는 열악한 환경에 서식하므로 이에 대응하기 위해 플라보노이드, 탄닌 및 페놀 등 다양한 항산화 물질을 생산한다. 또한 다당체 등의 보습 성분, 사포닌 및 비타민 등을 함유하고 있다고 보고되고 있다(Abirami & Kowsalya 2011; Leelavathi & Prasad 2015; Abhishek 등 2018). 참갈파래에 다양한 생리활성 물질이 있음에도 불구하고, 국내에서 참갈파래는 식용하지 않고 가축의 사료와 바이오 에너지원으로 이용하고 있다(Abd EI Baky & EI Baroty 2016). 최근 참갈파래는 부영양화로 인해 대량 증식하는 녹조현상이 관찰되고 있어 해안의 미관을 해치고 악취를 발생시키는 유해종으로 분류되고 있어(Dominguez & Loret 2019), 이를 활용한 연구가 필요한 실정이다. 현재 국내에서는 참갈파래 에탄올 추출물의 항암 효능과 면역 활성 효능이 보고된 바 있으며, 참갈파래 추출물의 항산화 효능 및 항균 효능이 보고되었다(Jang 등 2006; Nam 등 2006). 국외에서는 참갈파래의 식품학적 및 생리활성 성분 분석에 관한 연구가 대부분이며, 참갈파래 메탄올 추출물의 항산화 효능과 참갈파래 다당류의 항염증, 항암 효능이 보고된 바 있다(Abd-Ellatef 등 2017; Ghareeb 등 2019).

본 연구에서는 국내 자생 참갈파래 메탄올 추출물의 DNA 상해에 대한 저해 효과를 규명하고자 하였다. 이를 위해 참갈파래의 일반성분과 기능성분을 분석하였으며, 자외선 B를 조사한 HaCaT 세포에 참갈파래 메탄올 추출물을 처리하여 세포활성도 분석, CPD 수준 변화 분석, DNA 상해 회복 관련 단백질 분석 등을 통해 DNA 상해 반응에 미치는 영향을 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 추출물의 제조

본 실험에 사용된 참갈파래는 2019년 4월 부산 칠암항에

서 채집하였다. 2번의 세척과정을 통해 불순물을 제거한 뒤 응달건조 후 추출에 사용하였다. 추출물의 제조는 갈파래 2 kg에 70% 메탄올 수용액 2 L를 넣고 전기추출기(KSNP B1130-240 L, Kyungseo, Korea)를 이용하여 40°C에서 3시간 30분 동안 2반복 추출하였다. 이후 추출물을 농축하고 용매를 제거하여 468.4 mg의 시료를 얻었다. 이를 phosphate-buffered saline(PBS)에 5 mL에 녹여 93.68 mg/mL의 농도로 실험에 사용하였으며, -20°C에 보관하였다.

### 2. 일반성분 분석

참갈파래의 일반성분은 식품공전법(Ministry of Food and Drug Safety 2018)에 따라 분석하였다. 수분 함량은 105°C 상압가열건조법으로 분석하였고, 회분은 550°C 직접회화법으로 분석하였다. 조단백질은 마이크로-킬달(Micro-Kjeldahl) 분해법으로 분석하였고, 조지방은 Soxhlet 추출법으로 분석하였다. 총 탄수화물은 시료 100 g 중에서 수분, 조단백질, 조지방 및 회분의 양을 차감하여 얻은 양으로 표시하고, 일반성분 시험 결과는 백분율로 표시하였다.

### 3. 무기성분 분석

건조 참갈파래 1.5 g을 microwave digestion에 넣고 질산(HNO<sub>3</sub>)을 처리하여 분해하고, 부피플라스크에 옮겨 증류수를 가해 최종 부피가 50 mL가 되도록 정용하여 시험용액으로 사용하였다. 이후 유도결합플라즈마(ICP, inductively coupled plasma spectrometer, iCAP-7400, ThermoFisher Scientific Inc, USA)로 Ca, P, Fe, Mg의 함량을 분석하였다. 각 무기질의 검출 파장은 Ca 317.9 nm, P 213.6 nm, Fe 259.9 nm, Mg 285.2 nm에서 측정하였다.

### 4. 총 폴리페놀 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을 이용하여 분석하였다. 건조 참갈파래 0.2 g을 부피플라스크에 취한 뒤 증류수를 소량 가하여 30분 동안 초음파 추출하였다. 위의 용액을 증류수로 50 mL 정용한 후 시험용액으로 사용하였다. 각각의 시험관에 증류수 7.5 mL와 표준용액 혹은 시험용액을 1 mL씩 취한 뒤 Folin-Denis 시약 0.5 mL를 가한 후 35% 탄산나트륨(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 1 mL를 넣어 암실에서 30분 방치하였다. 이후 UV-Vis spectrophotometer(Agilent 8453, Agilent Technologies, USA)를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 tannic acid(Sigma Aldrich, MA, USA)를 사용하였다. Tannic acid 10 mg을 증류수 50 mL로 정용하여 일정한 농도별로 조제하고, 시료와 같은 방법으로 실험하여 검량선 작성 및 정량분석에 사용하였다.

### 5. 총 안토시아노사이드 함량 분석

건조 참갈파래 30 g을 에탄올(ethanol)과 1.5 mol/L 염산(HCl) 혼합액(17 : 3)을 넣어 녹인 후 200 mL 부피 플라스크에 정용하였다. 이 용액을 5 mL 취하여 에탄올과 염산 혼합액(17 : 3)을 넣어 50 mL로 정용한 다음 여과하여 처음 여액 20 mL는 버리고 다음 여액을 시험 용액으로 사용하였다. 에탄올과 1.5 mol/L 염산 혼합액(17 : 3)을 대조액으로 하여 UV-Vis spectrophotometer(Agilent 8453, Agilent technologies, USA)를 사용하여 540 nm 파장에서 측정하였다. 표준 물질은 안토시아닌의 함량이 알려진 vaccinium myrtillus extract(USP, USA)를 사용하였으며, 40 mg을 취하여 시험 용액과 같이 조작하여 표준용액으로 사용하였다.

### 6. 세포 배양

인간 피부 각질 세포주인 HaCaT 세포는 10% fetal bovine serum과 2 mM L-glutamine이 함유되어 있는 RPMI-1640 (Gibco, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기(Sanyo, Japan)에서 배양하였다.

### 7. UV 조사 및 시료처리

HaCaT 세포를 PBS로 세척한 후 자외선 B(Sankyo, Japan) 200 J/m<sup>2</sup>를 조사하였다. 자외선 B 선량은 UV radiometer (UVP, USA)를 사용하여 측정되었다. UVB 조사 후 세포는 정상배지 혹은 참갈파래 추출물이 농도별로 함유된 배지를 처리하여 배양하였다.

### 8. MTT assay

세포 활성도 실험은 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)(Sigma Aldrich, USA)를 이용하여 진행하였다. HaCaT 세포를 96 well plate(SPL, Korea)에 각 well 당 1×10<sup>5</sup>개의 세포를 분주하고, 24시간 동안 배양하였다. 24시간 뒤 PBS로 세척한 후 자외선 B를 조사하고, FBS가 첨가된 정상배지 혹은 참갈파래 추출물이 처리된 배지를 채우고 24시간동안 배양하였다. PBS로 세척한 후 0.5 mg/mL의 MTT 용액 100 μL를 넣고 4시간 동안 37°C 배양기에서 배양하였다. 4시간 후 MTT 용액을 완전히 제거하고, Dimethyl sulfoxide(DMSO)(Sigma Aldrich, USA) 50 μL를 처리하여 formazan을 완전히 용해하였다. 그 후 570 nm에서 흡광도(ELISA reader, ReTiSoft Inc, Canada)를 측정하여 그 효과를 정상 대조군에 대한 백분율로 산출하여 비교하였다.

### 9. Immunodot blot assay (IBD)

시료를 처리한 HaCaT 세포를 수거하여 nuclei lysis buffer

를 처리하고, 4°C에서 30분 반응하였다. 이후 PCI(Usb, USA)를 처리하여 상층액을 분리하였고, 상층액과 동량의 isopropanol (Daejung, Korea)을 처리하여 12시간 이상 반응한 후 DNA 분리를 진행하였다. 분리된 DNA에 absolute ethanol(Daejung, Korea) 1 mL를 처리하여 순수한 DNA를 수거한 후 D:W 50 μL에 녹여 실험을 진행하였다. 추출한 DNA는 slot blot (Hofer Inc, USA)을 이용하여 polyvinylidene fluoride membrane(PVDF)(Milipore, Germany)에 부착시킨 후 1:3,000의 비율로 희석시킨 CPD 항체(Cosmobio, USA)를 처리하여 4°C에서 12시간 반응시켰다. TBS-T 완충용액으로 15분간 2번 세척한 후 2차 mouse 항체를 사용하여 4°C에서 2시간 반응시키고, TBS-T 완충용액으로 15분간 2번 세척하였다. 암실에서 ECL plus(ELPIS, Korea)를 처리한 후 곧 바로 Hyper film(Fuji, Japan)에 현상하였다. 현상으로 얻은 이미지를 Image J 프로그램을 통해 자외선 B 조사 직후의 CPD 발현량에 대한 상대값을 결정하였다.

### 10. Western blot

Lowery 방법에 따라 protein prep buffer(Intron, Korea)를 세포에 처리하고, 4°C에서 1시간 반응시킨 후 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 단백질이 함유된 상층액만을 회수하였다. 단백질은 10% SDS-poly-acrylamide gel에서 분리시킨 후 Electrobolt system(BioRad, USA)을 사용하여 100V로 1시간 동안 0.45 μm PVDF에 옮겼다. 이후 TBS-T 완충용액으로 세척하고 5% skim milk를 처리하여 상온에서 30분 놓아두었다. 1 : 1,000의 비율로 희석한 p53(Cell signaling, USA), p-p53(Cell signaling, USA), p21(Cell signaling, USA), actin(Santacruz, USA) 항체를 각각 처리하여 4°C에서 12시간 반응시켰다. TBS-T 완충용액으로 15분간 2번 세척한 후 2차 항체를 사용하여 4°C에서 2시간 반응시키고, TBS-T 완충용액으로 15분간 2번 세척하였다. 암실에서 ECL plus(ELPIS, Korea)를 처리한 후 곧 바로 Hyper film(Fuji, Japan)에 현상하였다. 결과값은 현상으로 얻은 이미지를 Image J 프로그램을 통해 대조군에 대한 상대값으로 결정하였다.

### 11. 통계처리

모든 측정값은 평균값±표준편차(mean±S.D.)로 표시하였으며, 각각의 실험은 최소 3회 이상 반복실험을 진행하여 측정되었다. 모든 통계는 GraphPad Prism을 이용하여 Student's *t*-test로 검증되었으며,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ 일 경우에 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 일반성분 함량

참갈파래의 일반성분을 분석한 결과(Table 1), 탄수화물 44.80±0.81%, 조단백질 23.19±0.68%, 회분 14.90±0.34%, 수분 14.01±0.30% 및 조지방 3.10±0.19% 순으로 나타났다. Abirami & Kowsalya(2011)는 참갈파래에 함유되어 있는 일반성분을 분석한 결과, 탄수화물 64.2%, 조단백질 12.9%, 회분 10.5% 및 조지방 1.2%였다고 보고하여 본 실험의 결과와 차이를 보였다(Abirami & Kowsalya 2011). 이는 참갈파래의 생육환경 및 성분분석 방법의 차이에 의한 결과로 사료되나, 함량의 순서는 유사한 결과를 보였다.

### 2. 무기성분 함량

참갈파래의 무기성분을 분석한 결과(Table 2) Mg(1,227.93±28.94 mg/100 g), Ca(341.53±10.64 mg/100 g), P(213.57±12.15 mg/100 g) 및 Fe(91.83±8.35 mg/100 g) 순으로 나타났다. Mg은 참갈파래의 무기질 함량 중 65.49%를 차지하는 것으로 나타났다. Abirami & Kowsalya(2011)는 참갈파래의 무기성분을 분석한 결과 Mg이 가장 많이 함유되어 있으며, Ca, P, Fe 순으로 함유되어 있다고 보고하여 본 실험과 유사한 결과를 보였다(Abirami & Kowsalya 2011). Mg은 세포 내 대부분의 대사과정에 연관되어 있으며, 유전체의 안정성을 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Hartwig A 2001). 특히, Mg은 자외선에 의한 절제 회복

(excision repair)에 관련된 효소인 AP endonuclease, DNA polymerase β, XPD 및 XPG 등의 보조인자로 작용하여 DNA 상해 반응에 도움을 줄 것으로 판단된다(Hartwig A 2001; Adhikari 등 2006). 따라서 참갈파래에 함유된 무기질은 Mg의 활용 측면에서 의의가 있을 것으로 사료된다.

### 3. 총 폴리페놀 및 안토시아노사이드 함량

참갈파래의 총 폴리페놀 함량과 총 안토시아노사이드 함량을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 총 폴리페놀 함량은 2.69±0.76 mg/g이었으며, 총 안토시아노사이드 함량은 0.13±0.97 mg/g이었다. Yu & Han(2018)은 해조류인 감태에 포함되어 있는 폴리페놀은 DPPH radical 소거능과 환원력을 가지는 등 항산화 활성이 뛰어난 것을 보고하였다(Yu & Han 2018). 또한 Lee 등(2014)과 Dutot 등(2008)은 세포에 안토시아닌, 플라보노이드 및 폴리페놀이 포함되어 있는 블루베리의 에탄올 추출물을 처리 시 산화적 스트레스의 감소와 세포 고사가 감소되는 것을 보아 산화적 스트레스에 저해 효과가 있음을 보고하였다(Dutot 등 2008; Lee 등 2014). 따라서 참갈파래에 함유된 폴리페놀과 안토시아노사이드는 항산화제로서 세포 내에서 nuclear factor erythroid-related factor(Nrf)-2의 활성을 유도하며, 이는 하위 유전자인 catalase (CAT), superoxide dismutase(SOD) 등과 같은 항산화 효소의 활성을 증가시켜 자외선 B에 의해 유발되는 ROS를 효과적으로 제거하여 DNA 상해회복에 도움을 줄 것으로 판단된다(Zhang & Tsao 2016).

Table 1. Proximate compositions of *Ulva lactuca*

(Unit: %)

	Moisture	Carbohydrates	Crude protein	Crude fat	Ash
<i>Ulva lactuca</i>	14.01±0.30 <sup>1)</sup>	44.80±0.81	23.19±0.68	3.10±0.19	14.90±0.34

<sup>1)</sup> Values are mean±S.D.

Table 2. Mineral contents of *Ulva lactuca*

Minerals	(mg/100 g)
Ca	341.53±10.64 <sup>1)</sup>
P	213.57±12.15
Fe	91.83±8.35
Mg	1,227.93±28.94

<sup>1)</sup> Values are mean±S.D.

Table 3. Total phenolics and anthocyanosides contents of *Ulva lactuca*

(mg/g)

	Total phenolics	Total anthocyanosides
<i>Ulva lactuca</i>	2.69±0.76 <sup>1)</sup>	0.13±0.97

<sup>1)</sup> Values are mean±S.D.

#### 4. 세포활성도 측정

세포활성도는 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 방법으로 분석하였다. HaCaT 세포에 참갈파래 메탄올 추출물을 24시간 동안 처리하였을 때 시료를 처리하지 않은 정상 대조군 대비 500 µg/mL 농도까지는 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 1A). HaCaT 세포에 자외선 B 200 J/m<sup>2</sup>를 조사한 후 세포독성이 나타나지 않는 참갈파래 메탄올 추출물 농도를 24시간 동안 처리하여 유전독성에 대한 효과를 검증하였다. 자외선 B 조사에 의해 정상 대조군 대비 약 50% 감소된 세포 활성도는 참갈파래 메탄올 추출물 처리 시 농도 의존적으로 증가하였으며, 500 µg/mL 농도에서 추출물을 처리하지 않은 군에 비해 약 30% 높은 세포 생존율을 나타냈다(Fig. 1B).

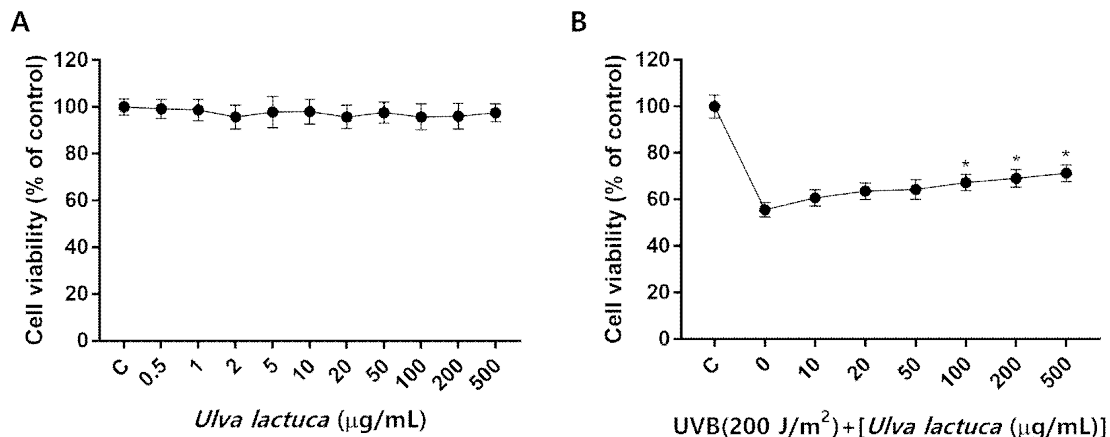
#### 5. IBD

참갈파래 메탄올 추출물의 DNA 상해에 대한 저해 효과를 확인하기 위해 CPD 수준 변화를 IBD로 분석하였다. 자외선 B 조사로 HaCaT 세포의 DNA에 형성된 CPD의 수준은 참갈파래 메탄올 추출물을 12시간 처리 시 농도 의존적으로 감소하였으며, 500 µg/mL의 농도에서 추출물을 처리하지 않은 군에 비해 약 40% 낮은 CPD 수준을 나타냈다(Fig. 2). 본 연구팀의 이전 연구에 따르면 HaCaT 세포에 자외선 B를 200 J/m<sup>2</sup> 조사 후 인삼 사포닌 Rg2 50 µM를 12시간 처리 시 CPD의 수준이 대조군 대비 약 60% 감소하였다(Ha 등 2010). 참갈파래에는 상기 분석된 기능성분 외에도 사포닌을 함유하고 있다고 보고되고 있어(Abirami & Kowsalya 2011; Elmegeed 등 2014; Leelavathi & Prasad

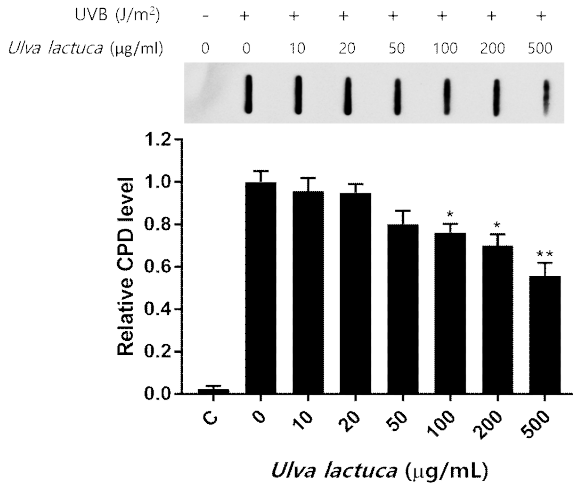
2015; Abhishek 등 2018), Rg2와 유사한 CPD 감소율을 나타내는 것으로 판단된다. Chung 등(2018), Jeong 등(2007)의 연구에 따르면 Rg2는 글루코코르티코이드 수용체 (glucocorticoid receptor, GR)에 결합하여 글루코코르티코이드 반응 부위(glucocorticoid response element)를 가진 p53을 이룬 시간에 활성화시키고, 이는 Gadd45a와 p21 같은 하위 유전자를 활성화하여 DNA 상해 회복을 촉진시키는 것으로 나타났다(Jeong 등 2007; Chung 등 2018). 따라서, 참갈파래에 함유된 사포닌도 이와 유사한 경로를 통해 DNA 상해 회복에 영향을 미칠 것으로 판단된다.

#### 6. Western blot

DNA 상해 회복 관련 단백질의 발현 수준에 대한 참갈파래 메탄올 추출물의 효능을 확인하기 위해, p53, p-p53, 그리고 p21의 단백질 수준을 western blot으로 검증하였다. p53은 DNA 상해 회복 기작과 관련된 유전자의 발현을 조절하는 전사인자로 유전체 안정성을 유지하는 중요한 역할을 한다(Helton & Chen 2007; Williams & Schumacher 2016). 자외선 B에 의해 유발된 DNA 상해는 DNA 상해를 인식하는 단백질인 ATM과 ATR을 활성화시킨다(Blackford & Jackson 2017). 활성화된 ATM은 p53을 인산화 시킨다. 인산화 된 p53은 G1기에서 S기로의 세포주기 진행을 억제시키는 Cdk의 저해제인 p21을 증가시켜 상해 받은 세포의 증식을 억제하고, 회복과정을 거칠 수 있게 한다(Herzinger 등 1995; Meng 등 1999; Chen 등 2015; Karimian 등 2016). HaCaT 세포에 자외선 B 200 J/m<sup>2</sup>를 조사한 후 참갈파래 메탄올 추출물을 농도별로 6시간 처리한 결과, p53 단백질의



**Fig. 1.** Effects of various concentrations of *Ulva lactuca* methanol extracts on viability of UVB-exposed HaCaT cells. Cells exposed to 200 J/m<sup>2</sup> UVB (B) or not (A) were post-incubated in growth medium or medium containing various concentrations of *Ulva lactuca* methanol extracts for 24 h and processed for MTT assay. Data represent the mean values of at least three independent experiments±S.D. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 versus non-treated (0 group) UVB-exposed group.



**Fig. 2.** Effects of various concentrations of *Ulva lactuca* methanol extracts on the level of CPD. Cells exposed to 200 J/m<sup>2</sup> UVB were post-incubated in growth medium or medium containing various concentrations of *Ulva lactuca* for 12 h. The level of CPD was determined by IBD. Data represent the mean values of at least three independent experiments±S.D. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 versus non-treated (0 group) UVB-exposed group.

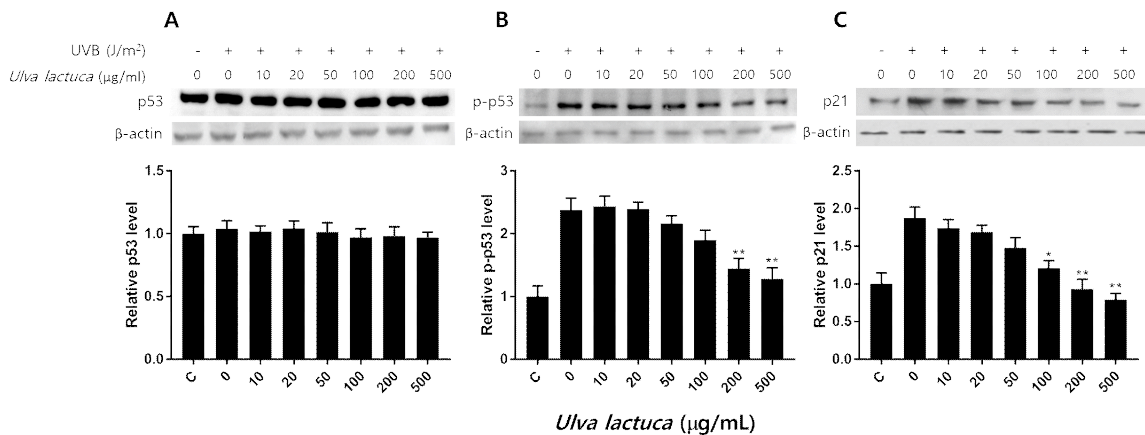
발현 수준은 추출물을 처리하지 않은 군에 비해 큰 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3A). 그러나 p-p53과 p21의 단백질 발현 수준은 참갈파래 메탄올 추출물 농도 의존적으로 감소하였으며, 500 µg/mL의 농도에서 추출물을 처리하지 않은 군

에 비해 약 45%, 57% 낮은 발현 수준을 나타냈다(Fig. 3B, 3C).

## 요약 및 결론

본 연구에서는 참갈파래의 일반성분 및 기능성분을 분석하였으며, 자외선 B로 유도된 세포독성과 유전독성에 대한 참갈파래 메탄올 추출물의 보호효과를 검증하였다. 참갈파래의 일반성분은 탄수화물(44.80%), 단백질(23.19%), 회분(14.90%) 및 지방(3.10%) 순으로 함량이 높았으며, 무기성분은 Mg(1,227.93 mg/100 g), Ca(341.53 mg/100 g), P(213.57 mg/100 g) 및 Fe(91.83 mg/100 g) 순으로 함량이 높았다. 참갈파래의 총 폴리페놀과 총 안토시아노사이드 함량을 분석한 결과, 총 폴리페놀의 함량은 2.69 mg/g이었으며, 총 안토시아노사이드의 함량은 0.13 mg/g이었다. 이 외에도 참갈파래는 사포닌을 함유하고 있다고 보고되고 있다.

자외선 B는 HaCaT 세포의 세포활성도를 감소시키고, CPD의 생성을 유도했다(Fig. 1, 2). 자외선 B를 조사 후, 참갈파래 메탄올 추출물을 처리했을 때 500 µg/mL 농도에서 추출물을 처리하지 않은 군 대비 약 30% 높은 세포생존율과 약 40% 낮은 CPD 수준을 나타냈다(Fig. 1, 2). 또한 DNA 상해 회복 관련 단백질인 p-p53과 p21의 수준은 500 µg/mL 농도에서 추출물을 처리하지 않은 군 대비 약 45%, 57% 낮은 발현 수준을 나타냈다(Fig. 3B, 3C). 참갈파래 메탄올 추출물의 페놀, 안토시아노사이드는 및 사포닌 등의 생리활성 물질은 이른 시간에 p53을 활성화시키고, 이에 따라 하위 유



**Fig. 3.** Effects of various concentrations of *Ulva lactuca* methanol extracts on the levels of DNA damage response proteins. Cells exposed to 200 J/m<sup>2</sup> UVB were post-incubated in growth medium or medium containing various concentrations of *Ulva lactuca* for 6 h. The levels of p53, p-p53 and p21 were determined by western blot. B-actin was used as an internal control. Data represent the mean values of at least three independent experiments±S.D. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 versus non-treated (0 group) UVB-exposed group.

전자인 p21을 활성화시킴으로써 DNA 상해회복을 촉진시켜 CPD의 수준을 감소시키고, 세포 활성도를 증가시키는 것으로 판단된다.

현재 식물 유래 사포닌에 대한 연구는 활발하나, 상대적으로 해양 동·식물 유래 사포닌 연구가 부족한 실정이다. 본 연구 결과를 토대로 하여 향후 연구에서는 참갈파래 추출물에 함유되어 있는 사포닌 등의 단일 성분을 분리하고, 이들이 GR을 통한 p53 경로의 활성화로 DNA 상해회복을 촉진시키는지 분석하고자 한다.

### 감사의 글

이 논문은 2019년 해양수산부 재원으로 해양수산과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구입니다(갈파래 유래 사포닌 분석 및 DNA 상해반응 조절 소재 개발).

### References

- Abd EI Baky HH, EI Baroty GS. 2016. Potential of macroalgae *Ulva lactuca* as a source feedstock for biodiesel production. *Recent Pat Food Nutr Agric* 8:199-204
- Abd-Ellatef GF, Ahmed OM, Abdel-Reheim E, Abdel-Hamid AZ. 2017. *Ulva lactuca* polysaccharides prevent Wistar rat breast carcinogenesis through the augmentation of apoptosis, enhancement of antioxidant defense system, and suppression of inflammation. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 9:67-83
- Abhishek D, Jyoti P, Savan D, Suumitra C. 2018. Pharmacognostic standardization of *Chaetomorpha antennina* and *Ulva lactuca*, green seaweeds from Gujarat coast. *J Pharmacogn Phytochem* 7:3863-3870
- Abirami RG, Kowsalya S. 2011. Nutrient and nutraceutical potentials of seaweed biomass *Ulva lactuca* and *Kappaphycus alvarezii*. *J Agric Sci Technol* 5:109-115
- Adhikari S, Toretsky JA, Yuan L, Roy R. 2006. Magnesium, essential for base excision repair enzymes, inhibits substrate binding of N-methylpurine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 281:29525-29532
- Alves C, Silva J, Pinteus S, Gaspar H, Alpoim MC, Botana LM, Pedrosa R. 2018. From marine origin to therapeutics: The antitumor potential of marine algae-derived compounds. *Front Pharmacol* 9:777
- Basu AK. 2018. DNA damage, mutagenesis and cancer. *Int J Mol Sci* 19:970
- Blackford AN, Jackson SP. 2017. ATM, ATR, and DNA-PK: The trinity at the heart of the DNA damage response. *Mol Cell* 66:801-817
- Chen A, Huang X, Xue Z, Cao D, Haung K, Chen J, Pan Y, Gao Y. 2015. The role of p21 in apoptosis, proliferation, cell cycle arrest, and antioxidant activity in UVB-irradiated human HaCaT keratinocytes. *Med Sci Monit Basic Res* 21:86-95
- Chung YH, Jeong SA, Choi HS, Ro S, Lee JS, Park JK. 2018. Protective effects of ginsenoside Rg2 and astaxanthin mixture against UVB-induced DNA damage. *Anim Cells Syst* 22:400-406
- de Jager TL, Cockrell AE, Du Plessis SS. 2017. Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species. In Ahmad S (Ed.), *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment*. vol. 996. pp.15-23. Springer
- Dominguez H, Loret EP. 2019. *Ulva lactuca*, a source of troubles and potential riches. *Mar Drugs* 17:357
- Dutot M, Rambaux L, Warnet JM, Rat P. 2008. Oxidative stress modulation using polyphenol-rich blueberries: Application on a human retinal cell model. *J Fr Ophthalmol* 31:957-980
- Elmegeed DFA, Ghareeb DA, Elsayed M, El-Saadani M. 2014. Phytochemical constituents and bioscreening activities of green algae (*Ulva lactuca*). *Int J Agric Pol Res* 2:373-378
- Fan X, Bai L, Zhu L, Yang L, Zhang X. 2014. Marine algae-derived bioactive peptides for human nutrition and health. *J Agric Food Chem* 62:9211-9222
- Fernando IPS, Nah JW, Jeon YJ. 2016. Potential anti-inflammatory natural products from marine algae. *Environ Toxicol Pharmacol* 48:22-30
- Ghareeb DA, Abd-Elgwad A, EI-Guindy N, Yacout G, Zaatout HH. 2019. *Ulva lactuca* methanolic extract improves oxidative stress-related male infertility induced in experimental animals. *Arch Physiol Biochem* 31:1-9
- Ha SE, Shin DH, Kim HD, Shim SM, Kim HS, Kim BH, Lee JS, Park JK. 2010. Effects of ginsenoside Rg2 on the ultraviolet B-induced DNA damage responses in HaCaT cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 382:89-101
- Hartwig A. 2001. Role of magnesium in genomic stability. *Mutat Res, Fundam Mol Mech Mutagen* 475:113-121
- Helton ES, Chen X. 2007. p53 modulation of DNA damage

- response. *J Cell Biochem* 100:883-896
- Herzinger T, Funk JO, Hillmer K, Eick D, Wolf DA, Kind P. 1995. Ultraviolet B irradiation-induced G2 cell cycle arrest in human keratinocytes by inhibitory phosphorylation of the cdc2 cell cycle kinase. *Oncogene* 11: 2151-2156
- Jang MK, Kim NY, Lee DG, LEE JH, Ha JM, Ha BJ, Kim MH, Bae SJ, Jang JS, LEE SH. 2006. Effects of *Ulva lactuca* extracts on cytotoxicity of cancer cell lines and immune stimulation. *J Life Sci* 16:1169-1173
- Jeong SJ, Han SH, Kim DY, Lee JC, Kim HS, Kim BH, Lee JS, Hwang EH, Park JK. 2007. Effects of mRg2, a mixture of ginsenosides containing 60% Rg2, on the ultraviolet B-induced DNA repair synthesis and apoptosis in NIH3T3 cells. *Int J Toxicol* 26:151-158
- Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. 2016. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair(Amst)* 42: 63-71
- Lee SH, Ha SE, Cho HK, Par JK. 2014. Inhibitory effects of ethanol extracts of some Korean plants on ultraviolet B-induced DNA damage. *Korean J Food Nutr* 27:845-850
- Leelavathi MS, Prasad MP. 2015. Comparative analysis of phytochemical compounds of marine algae isolated from gulf of mannar. *World J Pharm Pharm Sci* 4:640-654
- Meng X, Dong Y, Sun Z. 1999. Mechanism of p53 downstream effectors p21 and Gadd45 in DNA damage surveillance. *Sci China Ser C: Life Sci* 42:427-434
- Ministry of Food and Drug Safety. 2018. Korean Food Code. Ministry of Food and Drug safety
- Mullenders LHF. 2018. Solar UV damage to cellular DNA: From mechanisms to biological effects. *Photochem Photobiol Sci* 17:1842-1852
- Nam CS, Kang KS, Ha JM, Lee SH, Lee JH, Lee DG, Jang JS, Kang HY, Ha BJ. 2006. The correlativity of *Ulva lactuca* fractions, LPS, enzymatic activity and the evaluation of water fraction. *J Life Sci* 16:984-988
- Shimizu I, Yoshida Y, Suda M, Minamino T. 2014. DNA damage response and metabolic disease. *Cell Metab* 20:967-977
- Williams AB, Schumacher B. 2016. p53 in the DNA damage repair process. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6:a026070
- Yu MY, Han YS. 2018. Antioxidant activities and quality characteristics for cracker added with *Ecklonia cava*. *Korean J Food Nutr* 31:821-827
- Zhang H, Tsao R. 2016. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci* 8:33-42

---

Received 07 May, 2020  
 Revised 20 May, 2020  
 Accepted 02 June, 2020