

The Regulation of Early Senescence-related SM22 Protein in Human Dermal Fibroblasts by *Hovenia dulcis* Thunberg Fractions

Bo Ram Sim*

Beauty care Technology, Dongnam Health University, Cheoncheon-ro 74-gil 50, Jangan-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do 16328, Korea

Received November 4, 2019 / Revised June 26, 2020 / Accepted July 9, 2020

Several studies have proved *Hovenia dulcis* extracts to be an effective antidote for alcoholism, and they are frequently used in the clinical treatment of alcoholic liver disease. The purpose of this study was to investigate the anti-oxidant and anti-senescent activities of 80% methanol fractions of *H. dulcis* Thunberg in human dermal fibroblast (HDF) cells. The ethanol ethyl acetate fraction showed the highest inhibition of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging ($RC_{50}=3.6\pm 0.8 \mu\text{g/ml}$) as well as the highest total phenol content (417.2). Antiholistic liver disease. Extracts from e & Tech., Sungkyunkwan University, progressed in the HDF cells, SM22 expression ($p<0.001$) and β -galactosidase staining intensity increased ($p<0.001$). An increase in SM22 expression is associated with slower aging which suggests that its expression is high in early aging. HDF treatment using the ethyl acetate fraction significantly increased production of EGF ($p<0.01$) and PDGF-BB ($p<0.01$) while SHH expression was reduced ($p<0.05$). These results suggest that an 80% ethyl acetate fraction of *H. dulcis* can suppress early aging and demonstrate the potential application of the fraction as a natural anti-senescence agent.

Key words : Anti-senescence, DPPH, β -galactosidase, *Hovenia dulcis*, Sm22

서 론

세포는 분열을 통하여 성장하고 일정 시간이 지나면 노화를 통해 세포의 사멸과정을 거치게 된다. 하지만, 노화의 메커니즘은 계획적으로 진행되면 문제가 되지 않으나, 외부 환경에 의해 발생하는 노화는 세포 또는 인체에 큰 영향을 미치게 된다. 이에 세포 노화는 산화 관련성이 깊다는 연구가 발표되면서, 항산화 성분을 통해 노화를 극복하고자 하는 연구가 다양하게 진행되었다. 산화는 산소를 이용하여 에너지 대사를 하는 과정에서 활성산소($^1\text{O}_2$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ 등)가 인체에 병리학 적 문제를 야기시키면서 발생한다[11]. *tert*-butylhydroxyanisole (BHA), *tert*-butylhydroquinone (BHQ) 및 *tert*-butylhydroxytoluene (BHT)와 같은 합성 항산화제를 통해 활성산소의 문제를 감소시키고자 하였으나 안전성의 문제로 사용이 제한되어 이를 대체할 수 있는 항산화제 개발에 대한 연구가 활성화되었다[7]. 이에 동양권에서는 천연식물을 이용한 폴리페놀 화합물을 통해 항산화 뿐 아니라 항염증, 항종양, 항균활성 및 항당뇨 등 다양한 생리활성을 보고하였다[21].

노화의 많은 바이오 마커 중 베타-갈락토시다제(SA- β -Gal)

활성 및 피브로넥틴, 오스테오 넥틴, sm22 (smooth muscle 22, transgelin) 및 Apo J의 과발현은 노화를 측정하는 바이오마커 중 하나이다[18]. Sm22는 평활근 세포에서 높은 수준으로 발현 되는 단백질로 액틴 결합 단백질이다. 아미노산 154-161이 액틴 결합 부위로 알려졌으며, COOH 말단 절단 및 일부 결실이 점돌연변이를 형성하여 SM22 변형을 만들어 낸다[8]. 많은 보고에서 sm22은 4개의 양으로 하전된 아미노산을 포함하는 예측 된 액틴 결합 부위를 통해 액틴에 결합 할 수 있음을 발견했다. 또한, 최근 논문에서 sm22를 노화의 마커로 이용하는 연구들이 보고되고 있다[2].

헛개나무(*Hovenia dulcis* Thunberg)는 알콜 중독 치료제를 하는 해독제로 사용되었다[13]. 최근 몇 년 동안 헛개나무 종자의 알코올분해능이 보고되면서 헛개나무 추출물이 상용화 되었고, 헛개나무의 페놀성 성분은 바닐린산, 페룰산, 카테킨 및 벤조산 등이 보고되었다[20]. 또한, 헛개나무 추출물 및 분획물은 항산화, 항균, 항 당뇨병 효과, 알코올분해능 및 숙취해소능에 따른 효과가 보고된 바 있다[19]. 본 연구에서는 헛개나무 종자추출물 및 분획물로부터 세포 노화억제 효과를 분석하고, 세포 노화에 영향을 주는 sm22의 발현을 조절하는 기작을 확인하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-31-249-6578, Fax : +82-31-249-6570

E-mail : bback363@naver.com

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.

재료 및 방법

실험재료

헛개나무 종자는 경상북도 영천시에 위치한 두손에약초에서 구입하여 본 연구의 시료로 사용하였다. 건조된 헛개나무 종자 1,205 g을 분쇄하여 48시간 80% 에탄올 1 l에 추출하였다.

추출물은 여과지(Advantech, circles 300 mm, Japan)에 여과 후 45°C에서 감압 농축 및 동결건조하였다. 건조 추출분말 (168.2 g)을 3차 증류수를 첨가하고 *n*-hexane과 섞은 후 분리하여 *n*-hexane층을 얻어 감압농축 및 동결건조 하였다(13.12 g). 이와 동일한 방법으로 순차적으로 ethyl acetate (66.6 g), *n*-butanol (63.25 g), 최종적으로 남은water (122.32 g)을 얻어 감압 농축 및 동결건조 후 실험에 이용하였다.

DPPH 라디칼 소거능

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)라디칼 소거능은 비단폴 추출물 및 분획물을 농도별로 ethanol (99.9%, pure grade, Duksan Pharmaceutical Co. Ltd., KyongKido, Korea)에 희석한 시료 100 μ l와 60 mM DPPH용액 100 μ l를 96 well plate에 분주하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 Wallac Victor2 plate reader를 이용하여 540 nm에서 항산화능을 측정하였다. DPPH라디칼 소거능은 측정농도의 50% 억제농도(IC₅₀) 값으로 계산하였다.

총 페놀함량 함량

총 페놀함량은 추출물 및 분획물 1 mg/ml 농도 100 μ l에 2 N Folin-Ciocalteu phenol reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 50 μ l를 넣은 다음 3분간 교반하였다. 이후 20% Na₂CO₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 300 μ l 첨가하여 37°C heat block에서 30분 동안 반응시켰다. 최종 시료에 1 ml의 증류수를 첨가하여 Wallac Victor2 plate reader의 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 정량분석은 gallic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 표준물질로 이용하여 산출하였다.

총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 비단폴 추출물 및 분획물 1 mg/ml 농도 100 μ l에 80% ethanol을 900 μ l 첨가한 뒤 30초간 교반하였다. 이 용액 500 μ l를 덜어 10% aluminum nitrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 μ l, 1 M potassium acetate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 100 μ l, 80% ethanol 4.3 ml씩 섞어 37°C heat block에서 40분간 반응시켰다. 흡광도의 변화는 Wallac Victor2 plate reader를 이용하여 415 nm에서 측정하였으며, 총 플라보노이드의 정량을 위하여 quercetin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 총 플라보노이드 함량을 산출하였다.

세포배양

HDF (ATCC; manassas, VA, USA) 세포주를 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), 1% P/S가 첨가된 DMEM (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) 배지에 2×10⁵ cells/ml 세포수로 100 mm c μ lture dish (SPL,

Pocheon, Korea)에 분주한 후 37°C CO₂ 배양기에서 배양하였다. 초기노화의 계대배양은 10계대배양 후(Early SS), 중기 노화의 계대배양은 25회 계대배양 후(Middle SS), 말기 계대배양은 40회 계대배양 후(Late SS)로 설정하였다. 또한, 단백질 분석을 위한 세포 노화는 각 계대배양 실험 후 H₂O₂를 500 μ M stock 농도로 5 μ l/3 ml씩 처리하였다.

Cyto-X 분석

HDF (ATCC; manassas, VA, USA) 세포주를 이용하여 세포의 독성테스트Cyto-X (LPS solution, Daejeon, Korea) 시약을 이용하였다. 세포를 96 well plate에 1.5×10⁴ 세포수로 12시간 배양한 뒤 헛개나무 추출물 및 분획물을 1, 10 및 100 μ g/ml로 처리하였다. 배양 24시간 후 각 well에 1/10 농도로 Cyto-X 시약을 첨가한 후 호일로 감싸 4시간 배양기에 처리하였다. Wallac Victor2 plate reader (Perkin Elmer Corp., Nerwalk, CT) 로 450 nm 흡광도에서 측정하여 수치화 하였다.

SA- β -gal 염색법

노화에 따라 증가하는 SA- β -gal (senescence-associated β -galactosidase) 활성을 보기 위하여 35 mm로 배양된 HDF 세포를 이용하여 cell μ Lar senescence assay kit (Cell biolabs, Inc., San Diego, CA)을 이용하여 세포를 일주일간 염색하였다. 광학현미경을 통하여 염색 결과를 확인하여 세포의 노화 여부를 검증하였고, Image J 프로그램을 이용하여 염색값을 수치화 하였다.

노화유도 방법

HDF 세포주를 이용하여 계대배양 횟수에 따라 세포의 노화도를 설정하였다. 중기 노화는 계대배양 25회 후, 말기노화는 계대배양 40회 후 H₂O₂를 500 μ M 처리하여 세포의 노화도를 측정하였다.

Western blotting 분석

HDF 세포주를 60 mm 세포배양 접시에 6×10⁵ 세포수로 12시간 배양한 뒤 10 μ g/ml 헛개나무 분획물을 24시간 처리하여 세포를 수집하였다. RIPA lysis buffer (GenDEPOT, USA)에 phosphatase inhibitor cocktail과 protease inhibitor cocktail을 1x로 섞어 얼음에 1시간 동안 lysis후 13,000 rpm에서 20분간 원심분리를 실시하였다. 상층액을 회수하여 Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, CA)를 이용하여 정량 후 10~25 μ g의 단백질을 SDS-PAGE gel method를 이용하여 전기영동 하였다. Gel transfer된 단백질을 PBS-T에 희석한 5% skim milk (LPS solution, Daejeon, Korea)에 1시간 동안 blocking한 뒤 1차 항체를 각각 1:1,000의 농도로 12시간 냉장실에 처리하였다. 3회 PBS-T로 세척한 뒤 2차 항체를 각각 1:5,000의 농도로 실온에서 처리 후 다시 3회 PBS-T로 세척하였다. Amersham

ECL Western blotting detection reagent (GE Healthcare)를 이용하여 X-ray film 발색으로 측정하였다. 항체는 anti-p56, anti-p21, anti-p16, anti-β-actin (Santa Cruze, Dallas, TX, USA) 및 anti-sm22 (Abcam, Cambridge, UK)를 이용하였다.

Cytokine 분석

HDF 세포주를 60 mm 세포배양 접시에 6×10⁵ 세포수로 12시간 배양한 뒤 10 µg/ml 헛개나무 추출물 및 분획물을 12 시간 처리하여 세포를 수집하였다. RayBio Human Cytokine Array (RayBiotech Inc, Norcross, GA, USA)를 이용하여 측정하였다. Kit에 첨부된 매뉴얼에 따라 실험을 진행하였으며, Amersham ECL Western blotting detection reagent (GE Healthcare)를 이용하여 X-ray film 발색으로 측정하고, image J 프로그램을 이용하여 발색을 수치화하였다.

Q-PCR 및 RT-PCR 분석

HDF 세포주를 60 mm 세포배양 접시에 6×10⁵ 세포수로 12시간 배양한 뒤 10 µg/ml 헛개나무 추출물 및 분획물을 12 시간 처리하여 세포를 수집하였다. Trizol reagent를 이용하여 세포들을 파쇄시키고 1차 total RNA를 추출한 후 추출물을 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Hilden, Germany)로 다시 순수 분리하였고, 이 때 DNA 오염을 제거하기 위해서 RNase-Free DNase를 처리과정을 포함토록 하였다. Total RNA 시료의 순도는 Nanodrop (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer, USA)을 이용하여 측정 후 흡광도(260 nm/280 nm 및 260 nm/230 nm)값이 1.85-2.05 범위에 속함을 확인한 뒤 RNA 주형 3 µg을 대상으로 oligo-d(T) primer (20 mers; Bioneer, Korea)와 random primer (random nonamers; TakaraBio Inc., Japan)이 포함된 역전사(reverse transcription) 반응을 실시하였고, 역전사 반응은 Qiagen OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Valencia, CA)을 이용하여 실시하였다. cDNA 주형으로부터 2 µl를 취하여 PCR 반응에 이용하였다. PCR 증폭은 QuantiTect™ SYBR® Green PCR master mix (Qiagen, Mississauga, ON, CA)을 이용하였으며, 각 확인할 타겟 primer (5' TCTGGCTGAAGAATGGCGTGATT-3'/5'-CACTGCTGCCATGCTTTGCCCTT-3')를 TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)를 이용하여 Q-PCR과 동일조건으로 PCR진행 후 각 생성물을 agarose gel에 전기영동하여 밴드를 확인하였다.

통계분석

모든 생리활성 실험은 3반복 실험을 통해 수치화 하였으며, 통계분석은 one-way ANOVA로 신뢰구간 p<0.05으로 검정을 실시하였다. 통계프로그램은 Graph Pad Prism 5 software (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 이용하였다.

결과 및 고찰

헛개나무 분획물의 항산화작용

헛개나무 분획물의 항산화 특성은 Table 1과 Table 2에 나타났다. 항산화 효과는 DPPH라디칼소거능은 분획물에서는 에틸아세테이트 분획물(2.2±0.1 µg/ml), 추출물(3.5±0.5 µg/ml), 부탄올 분획물(8.1±0.4 µg/ml), 헥산 분획물(33.5±2.1 µg/ml), 물 분획물(40.5±5.5 µg/ml) 순으로 항산화 효과를 보였다. 특히 에틸아세테이트 분획물은 BHA와 유사한 항산화 RC₅₀값을 갖는 것을 확인하였다. 이와 유사하게 에틸아세테이트가 총페놀 함량(417.2±5.3 mg GAE/ml, p<0.013) 및 총플라보노이드 함량(417.2±5.3 mg GAE/ml, p<0.006)은 높은 함량을 갖는 것을 알 수 있었고, 통계적으로 DPPH라디칼과 유의성이 있는 것을 확인하였다(Table 3).

페놀 성 화합물에 대한 관심은 주로 항산화 활성과 관련이

Table 1. DPPH radical scavenging activity of *Hovenia dulcis* Thunberg

Extract and fractions	RC ₅₀ (µg/ml)
M	3.5±0.5 ^{ab}
H	33.5±2.1 ^c
E	2.2±0.1 ^a
B	8.1±0.4 ^b
W	40.5±5.5 ^d
BHA	4±0.5 ^{ab}

M, 80% methanol extract; H, n-hexane fraction; E, ethyl acetate fraction; B, butanol fraction; W, water fraction; GAE, gallic acid equivalent; QE, quercetin equivalent; RC₅₀, 50% inhibit reaction concentration. For each data, values followed by the same letter (a - d) are not statistically different at p<0.05 as measured by the Duncan test ANOVA applies between fresh and dried samples. All determinations were performed in triplicate (n=3).

Table 2. Total phenolic and flavonoid contents of *Hovenia dulcis* Thunberg

Extract and fractions	TPC (mg GAE/ml)	TFC (mg QE/ml)
M	413.2±15.5 ^a	155.3±11.1 ^b
H	115.1±11.2 ^c	20.1±1.1 ^c
E	485.1±21.1 ^a	255.1±21.3 ^a
B	251.4±12.1 ^b	108.2±10.2 ^{bc}
W	95.5±10.1 ^d	15.1±1.8 ^c

TPC, total phenolic contents; TFC, total flavonoid contents; M, 80% methanol extract; H, n-hexane fraction; E, ethyl acetate fraction; B, butanol fraction; W, water fraction; GAE, gallic acid equivalent; QE, quercetin equivalent. For each data, values followed by the same letter (a - c) are not statistically different at p<0.05 as measured by the Duncan test ANOVA applies between fresh and dried samples. All determinations were performed in triplicate (n=3).

Table 3. Correlation with DPPH radical scaving total phenolic and flavonoid contents of *Hovenia dulcis* Thunberg

	DPPH	TPC	TFC
DPPH			
TPC	0.013		
TFC	0.006	0.028	

DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging ability; TPC, total phenolic contents; TFC, total flavonoid contents. For each data, values followed by the correlation factor are not statistically different at $p < 0.05$ as measured by ANOVA applies between fresh and dried samples.

있고, 생체 내에서 중요한 생물학적 활성을 나타내며 인체의 항산화 방어 능력을 초과하는 과도한 산소 라디칼 형성과 관련된 질병을 퇴치하는 데 도움이 될 수 있다[23]. 식물 성분의 소거 작용은 폴리 페놀계 화합물과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다[6]. 유리 라디칼 소거 작용을 나타내는 식물의 성분은 다양하며, 헛개나무도 이러한 항산화 작용이 보고된 바 있다[19]. 성분은 여전히 불분명하지만, 헛개나무의 항산화 활성은 폴리 페놀의 존재에 의해 야기될 가능성이 있다. 얻어진 결과에 기초하여, 헛개나무 추출물 및 분획물은 항산화 활성을 갖는 건강 증진제로서 잠재적인 역할을 수행할 수 있을 뿐만 아니라 천연 항산화제를 제공할 수 있다고 할 수 있다.

인간 섬유아세포의 복제 노화는 널리 연구되어 왔으며 노화 연구를 위한 유효한 모델로 여겨진다[15]. 산화된 단백질의 축적은 노화를 유도하고, 정상적인 세포 기능을 방해하여 노화의존성 변화의 원인이 된다. 다양한 마커가 노화 과정에서 확인되었으며, 이는 일부 자유라디칼의 관여에 따라 산화적으로 손상된 세포 성분의 축적이 보고되었다[22]. 이러한 산화적 손

상이 노화 과정에 기여하는 여러 요인 중 하나라는 증거들이 확인되고 있으며, 이는 헛개나무의 항산화 활성이 노화억제에 영향을 줄 것으로 보인다.

헛개나무 분획물의 정상세포 세포독성

본 연구에서는 HDF 정상세포주를 이용하여 헛개나무 분획물의 세포독성을 확인하였다. 세포독성은 미토콘드리아에서 배출되는 mitochondrial dehydrogenase와 반응하는 (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay에서 발생하는 tetrazolium salt를 DMSO (dimethyl sulfoxide)로 용해시키는 과정에서 발생하는 오차를 줄일 수 있는 시약인 Cyto-X로 대체하여 사용하였다.

헛개나무 분획물의 세포독성은 HDF 세포주에서 추출물 및 분획물에서 모두 세포독성이 없음을 확인하였다(data not shown). 천연물 유래 비극성 물질들은 다양한 항암활성을 갖지만, 정상세포에 독성을 주지 않는 것으로 보고되고 있다[12]. 본 연구결과에서도 헛개나무 에틸아세테이트 분획물에서 정상세포의 세포독성이 없는 것은 난용성인 알칼로이드, 페놀 및 플라보노이드의 영향일 것으로 사료된다.

HDF 세포의 노화시 sm22발현 및 SA-β-Gal 염색

세포 노화는 세포 배양 실험에서 HSP90 억제제, Bcl-2 패밀 리 억제제, FOXO4 억제 펩티드 및 퀘르세틴의 조합을 포함하여, 여러 부류의 세놀리틱스가 현재까지 확인되었다[9]. 증가된 리소좀의 pH를 통해 베타-갈락토시다아제의 검출은 노화 세포의 가장 특징적인 마커 중 하나이다. SA-β-Gal 활성의 세포 측정에는 DNA 삽입 Hoechst 염료를 사용하여 총 세포 수의 결정과 조합하여 효과적인 약물을 선별할 수 있는 가능성을

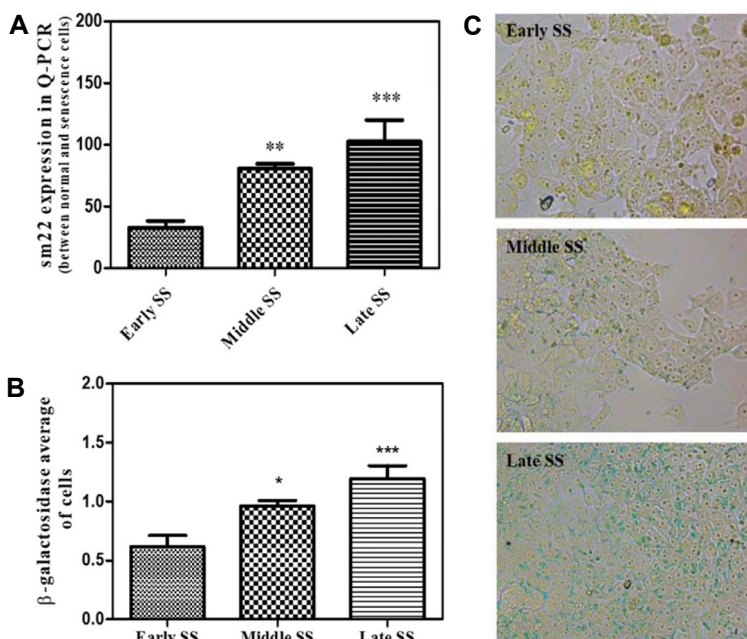


Fig. 1. Cell passage-induced premature senescence as measured by the sm22 expression and β-galactosidase staining in HDF cells. (A) HDF cells were early SS (passaged 10 times), middle SS (passaged 25 times) and late SS (passaged 40 times). The senescence-associated gene expression was assessed by qPCR. SS, senescence. (B) SA-β-Gal activity was measured one week later. (C) Senescence staining was detection by SA-β-Gal assay.

제공한다. 고품량 형광 이미지 획득 및 분석 플랫폼을 사용하면 SA-β-Gal, 세포 형태 및 세포 수에 영향을 미치는 약물 라이브러리의 빠른 스크리닝을 할 수 있다[10].

세포독성이 보이지 않은 HDF 세포주를 이용하여 세포 노화를 확인하여 Fig. 1에 나타냈다. Cyto-X와 같은 세포독성 측정법과 동일하게 세포 노화 측정은 세포고정이 되지 않은 세포를 이용하는 방법으로 이는 sm22의 Q-PCR 발현은 유의적인 차이를 보였다(Fig. 1A, $p < 0.001$). 특히 세포의 노화가 발생하는 초기노화부터 중기까지 sm22의 발현이 증가되었고, 더불어 노화마커인 SA-β-Gal 활성 또한 증가되는 것을 알 수 있었다(Fig. 1B, $p < 0.001$).

세포의 노화에 따른 sm22의 발현 차이

평활근 알파-액틴은 세포 골격의 중요한 구성 요소이다. 이는 세포 운동 성과 세포 내 이입에 관여하며, 알파-액틴의 새로운 전사 표적은 성장 조절, 노화, 자기 재생 및 종양 억제에 관한 다양한 연구가 진행되어 있다[4]. 구조 단백질로서 알파-액틴은 주로 발현 수준 및 단백질 조직에 의해 세포 활성화에 영향을 치는데 여기서 sm22의 결합역할이 세포의 노화에서 큰 영향을 미친다. 노화에 의한 세포 골격의 구조의 변화는

세포 운동성을 억제하고, 이에 따른 성장 단백질의 억제를 유도한다[16].

HDF 세포주를 이용하여 sm22의 발현을 Western blot으로 확인하였다(Fig. 2). 세포 노화 마커중 sm22의 증가를 확인하였고, H₂O₂처리시 초기노화에서는 증가된 양상이 눈에 띄는 반면 노화의 진행에 따라서 발현되어 이는 sm22의 증가가 점차 차이를 보이지 않는 것을 알 수 있었다. 반면, 노화단계의 sm22의 RNA 레벨은 유사하게 H₂O₂처리시 증가됨을 알 수 있었다. 반면, 본 연구에서는 p53과 p21의 발현이 sm22만큼 높게 증가하지 않았는데, 이는 sm22는 초기 노화에 작용하는 기작으로 보이며, 세포 노화의 증가와 관련 깊은 p53 및 p21은 노화의 과정이 더 진행되면 발생할 것으로 생각된다.

내인성 노화의 주요 원인인 ROS는 O₂보다 높은 반응성을 갖는 활성산소 등이 존재한다. 이러한 ROS는 정상적인 세포 내 활성화에 의해 지속적으로 생성되지만 세포내 항산화 작용에 의해 대체적으로 제거된다[5]. 산화 스트레스에 의한 DNA 손상은 세포복구 또는 세포사멸을 결정하는 전사 인자 인 p53을 활성화시키고, 노화 촉진 유전자 p21을 발현시킨다[14]. 세포주기 억제의 조절자이인 p53과 p21은 세포주기를 조절하여 정상적인 작용을 하지 못하고, G1 주기에 머무르게 되는데

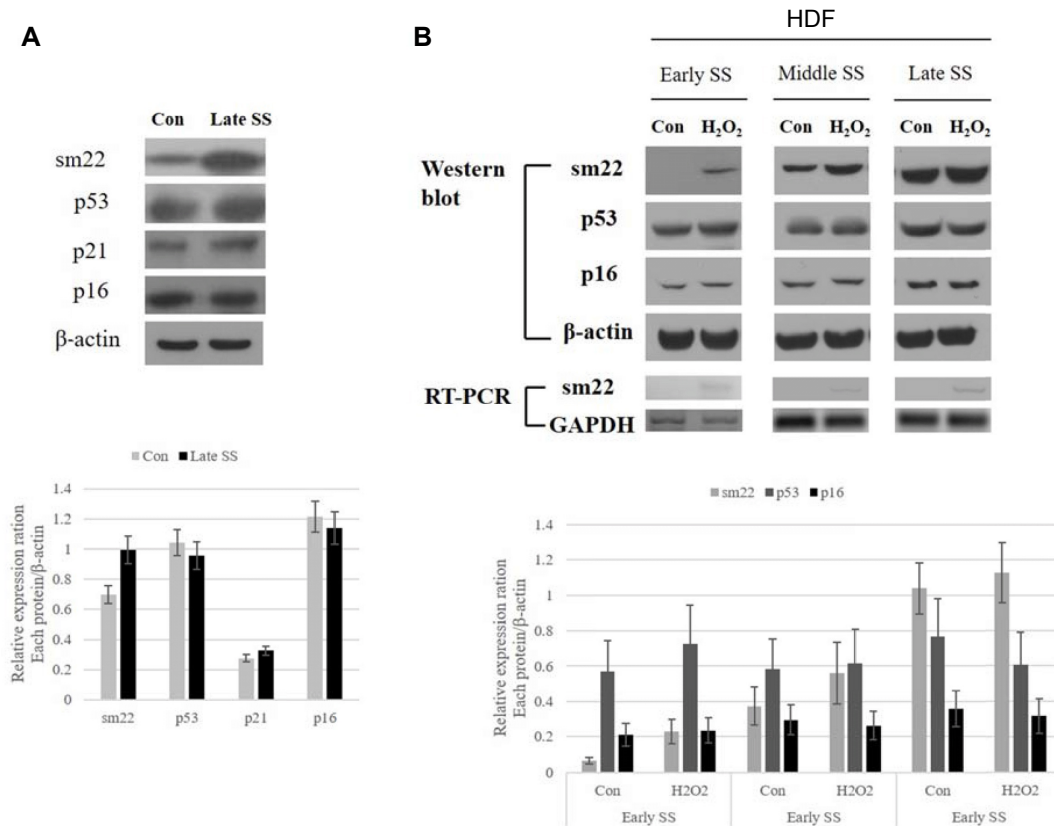


Fig. 2. Protein expression levels of senescence biomarkers. (A) Protein expression levels of senescence biomarkers were examined by Western blotting. (B) H₂O₂-induced cell senescence marker levels were detected at different stages by Western blotting and RT-PCR. Early SS (passaged 10 times), middle SS (passaged 25 times) and late SS (passaged 40 times). H₂O₂ dose were 500 μM stock treated 5 μl per 3 ml.

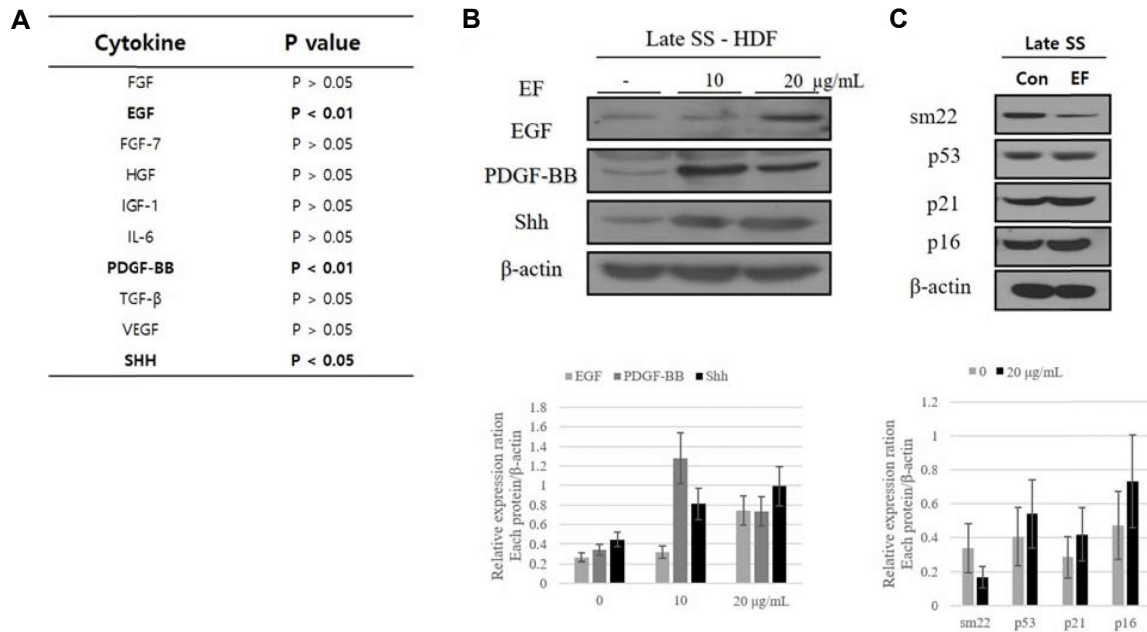


Fig. 3. Cells treated with the *Hovenia dulcis* Thunberg ethyl acetate fraction demonstrated changes in cytokine expression, senescence marker expression, and wound healing capacity. (A) Changes in cytokine production were measured using cytokine kits. All values were expressed as a percentage (n=3) of controls and were compared by ANOVA. (B) The protein expression levels of EGF, PDGF-BB, and SHH were determined by Western blotting. (C) Protein expression levels of senescence biomarkers in HDFs following treatment with the *Hovenia dulcis* Thunberg ethyl acetate fraction. EF, *Hovenia dulcis* Thunberg ethyl acetate fraction.

이때 역턴과 가교 결합을 하는 sm22를 누적시킨다. Sm22의 노화에 따른 축적은 UVB에 의해 섬유아세포에서도 확인된 바 있으며, 방사선유도에 의한 종양세포에서도 보고된 바 있다[2, 18].

헛개나무 분획물의 sm22 억제 및 사이토카인 조절

HDF는 피부 진피의 90%를 차지하는 콜라겐 생성에 중요한 역할을 한다. 콜라겐은 진피 밀도, 탄성, 조직의 결합력, 세포의 접착, 세포 증식 및 분화에 관여하며, 섬유아세포인 HDF 세포는 이때 사이토카인을 외부에 분비하여 주변 세포에 기능적 영향을 준다[1].

HDF 세포주를 이용하여 헛개나무 에틸아세테이트 분획물을 처리한 결과 EGF (p<0.01), PDGF-BB (p<0.01), SHH (p<0.05)의 사이토카인이 유의적으로 증가한 것을 확인하였고 (Fig. 3A), 150 µg의 다소 많은 단백질로 분석한 결과 EGF, PDGF-BB, Shh의 단백질 분석이 헛개나무 에틸아세테이트 분획물 처리시 증가됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 세포 노화가 진행된 중기 노화유도된 HDF세포에서 헛개나무 에틸아세테이트 분획물 처리시 sm22의 발현이 더 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 3C). 본 연구에서는 헛개나무 에틸아세테이트 처리가 세포의 성장을 유도하는 사이토카인의 변화 및 노화유도 초기 sm22의 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 헛개나무 분획물의 사이토카인 변화는 아토피성 유도된 HaCaT 세포

의 TNF-α/IFN-γ의 조절, 염증성 사이토카인의 조절 이외에는 현재 보고된 바 없으며[3, 17], 이 같은 결과는 일부 세포의 세포증식에 영향을 줄 수 있을 것으로 보여진다.

따라서 헛개나무의 생리활성 물질은 향후 분리 및 정제 연구가 필요할 것으로 생각되며, 본 연구는 향후 헛개나무를 이용한 세포 노화 억제 기초 자료로 제시하고자 한다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Abdul Khodir, W., Abdul Razak, A., Ng, M., Guarino, V. and Susanti, D. 2018. Encapsulation and characterization of gentamicin sulfate in the collagen added electrospun nanofibers for skin regeneration. *J. Funct. Biomat.* **9**, 36.
2. Chen, S., Qin, S., Wang, M. and Zhang, S. 2015. Expression and significance of NELIN and SM22a in varicose vein tissue. *Exp. Ther. Med.* **9**, 845-849.
3. Choi, R. Y., Woo, M. J., Ham, J. R. and Lee, M. K. 2017. Anti-steatotic and anti-inflammatory effects of *Hovenia dulcis* Thunb. extracts in chronic alcohol-fed rats. *Biomed. Pharmacother.* **90**, 393-401.

4. Chua, M. D., Hipolito, K. J., Singerr, O. B., Solway, J. and Guttman, J. A. 2018. SM22 is required for the maintenance of actin-rich structures generated during bacterial infections. *Exp. Cell Res.* **369**, 139-146.
5. Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A. and D'Arca, D. 2016. ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 3565127.
6. Dias, M. I., Sousa, M. J., Alves, R. C. and Ferreira, I. C. 2016. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Ind. Crops Prod.* **82**, 9-22.
7. Diaz, C. E., Oliveros, G., Muñoz-Acevedo, A. and Lozada, W. V. 2016. Kinetic study of the quenching of singlet oxygen by naringin isolated from peels of the fruit of bitter orange (*Citrus aurantium* L.). *Rev. Cubana Plant. Med.* **3**, 359-368.
8. Fu, Y., Liu, H. W., Forsythe, S. M., Kogut, P., McConville, J. F., Halayko, A. J., Camoretti-Mercado, B. and Solway, J. 2000. Mutagenesis analysis of human SM22: characterization of actin binding. *J. Appl. Physiol.* **89**, 1985-1990.
9. Fuhrmann-Stroissnigg, H., Niedernhofer, L. J. and Robbins, P. D. 2018. Hsp90 inhibitors as senolytic drugs to extend healthy aging. *Cell Cycle* **17**, 1048-1055.
10. Fuhrmann-Stroissnigg, H., Santiago, F. E., Grassi, D., Ling, Y., Niedernhofer, L. J. and Robbins, P. D. 2019. SA- β -galactosidase-based screening assay for the identification of senotherapeutic drugs. *J. Vis. Exp.* **148**, 1-7. (e58133).
11. Ighodaro, O. and Akinloye, O. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* **54**, 287-293.
12. Jiang, N., Fan, J., Xu, F., Peng, X., Mu, H., Wang, J. and Xiong, X. 2015. Ratiometric fluorescence imaging of cellular polarity: decrease in mitochondrial polarity in cancer cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 2510-2514.
13. Jiraungkoorskul, K. and Jiraungkoorskul, W. 2016. Alcohol de-addiction and anti-hangover properties of Korean raisin tree, Huk Gae, *Hovenia dulcis*. *Asian Agrilhist.* **20**, 265-273.
14. Kim, Y. Y., Jee, H. J., Um, J. H., Kim, Y. M., Bae, S. S. and Yun, J. 2017. Cooperation between p21 and Akt is required for p53-dependent cellular senescence. *Aging Cell* **16**, 1094-1103.
15. Kirkland, J. L. and Tchkonina, T. 2017. Cellular senescence: a translational perspective. *EBioMedicine* **21**, 21-28.
16. Kolesnichenko, M. and Vogt, P. K. 2011. Understanding PLZF: two transcriptional targets, REDD1 and smooth muscle α -actin, define new questions in growth control, senescence, self-renewal and tumor suppression. *Cell Cycle* **10**, 771-775.
17. Lim, S. J., Kim, M., Randy, A., Nam, E. J. and Nho, C. W. 2016. Effects of *Hovenia dulcis* Thunb. extract and methyl vanillate on atopic dermatitis-like skin lesions and TNF- α /IFN- γ -induced chemokines production in HaCaT cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **68**, 1465-1479.
18. Lumba, M., Willis, L., Santra, S., Rana, R., Schito, L., Rey, S., Wouters, B. and Nitz, M. 2017. A β -galactosidase probe for the detection of cellular senescence by mass cytometry. *Org. Biomol. Chem.* **15**, 6388-6392.
19. Maievas, H. A., López-Froilán, R., Morales, P., Pérez-Rodríguez, M. L., Ribani, R. H., Cámara, M. and Sánchez-Mata, M. C. 2015. Antioxidant phytochemicals of *Hovenia dulcis* Thunb. peduncles in different maturity stages. *J. Funct. Foods* **18**, 1117-1124.
20. Morales, P., Maievas, H. A., Dias, M. I., Calhella, R. C., Sánchez-Mata, M. C., Santos-Buelga, C., Barros, L. and Ferreira, I. C. 2017. *Hovenia dulcis* Thunb. pseudofruits as functional foods: Phytochemicals and bioactive properties in different maturity stages. *J. Funct. Foods* **29**, 37-45.
21. Oh, M. J., Ju, J. W., Lee, J. Y., Choi, Y. S., Lee, B. S., Kim, D. K. and Jung, M. Y. 2015. Antiphotooxidative activities of elm (*Ulmus davidiana* Planch) root bark extracts on methylene blue-sensitized photooxidation of lipids and isolation and identification of active compounds. *Food Sci. Biotechnol.* **24**, 883-890.
22. Sakai, T., Kurokawa, R., Hirano, S. I. and Imai, J. 2019. Hydrogen indirectly suppresses increases in hydrogen peroxide in cytoplasmic hydroxyl radical-induced cells and suppresses cellular senescence. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 456.
23. Van Hung, P. 2016. Phenolic compounds of cereals and their antioxidant capacity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 25-35.

초록 : 헛개나무 분획물에 의한 HDF세포의 초기 노화관련 sm22 단백질 조절

심보람*

(동남보건대학교 뷰티케어과)

본 연구에서는 *Hovenia dulcis* Thunberg (헛개나무)의 80% 메탄올 분획물의 항산화 및 세포 노화 억제활성을 규명하고자 하였다. 헛개나무 에틸아세테이트 분획물이 DPPH라이칼 소거능에서 가장 높은 활성 저해를 보였고 ($RC_{50} = 3.6 \pm 0.8 \mu\text{g/ml}$), 총 페놀($417.2 \pm 5.3 \text{ mg GAE/ml}$) 및 총플라보노이드($260.6 \pm 27.5 \text{ mg QE/ml}$) 측정에서도 가장 높은 활성을 보였다. HDF 세포에서 노화가 진행됨에 따라 sm22의 발현이 증가되었고($p < 0.001$), β -갈락토시다아제의 염색양이 증가($p < 0.001$)되는 것을 확인하였다. 반면, sm22의 증가는 세포 노화가 진행된 세포일수록 증가폭이 감소되는 것이 확인되었고, 초기노화에서 발현이 높은 것을 알 수 있었다. 헛개나무 에틸아세테이트 분획물을 처리시 HDF세포의 EGF ($p < 0.01$), PDGF-BB ($p < 0.01$), SHH ($p < 0.05$)의 사이토카인이 유의적으로 증가를 보이며, 노화 시 발생된 sm22의 수치를 감소시키는 것을 보였다. 이러한 결과는 헛개나무 에틸아세테이트 분획물이 초기 세포 노화의 작용을 조절할 수 있음을 보여준다.