

The Protective Effects of an Ethyl Acetate Fraction of *Raphiolepis indica* Against Oxidative Stress in HaCaT Keratinocytes

Eun Ju Yang¹, Hye-Ran Kim¹, Kyung-Soo Chang² and Jeong Hyun Chang^{1*}

¹Department of Clinical Laboratory Science, College of Medical Sciences, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Korea

²Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan, Busan 46252, Korea

Received February 28, 2020 / Revised July 8, 2020 / Accepted July 17, 2020

In a previous study, the total phenolic content in ethanol extracts of medicinal plants that naturally grow on Jeju Island were analyzed with the extracts of *Raphiolepis indica* leaf found to have the highest. The current study was carried out to evaluate the total flavonoid content, radical-scavenging activity, and the protective effect of *R. indica* extracts and solvent fractions on oxidative stress in HaCaT keratinocytes. More specifically, total flavonoid content and 2-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) radical-scavenging activity were measured to assess anti-oxidative activity, and protective effects against hydrogen peroxide (H₂O₂) were determined by 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide assay on the HaCaT cells. Of the various fractions analyzed, the ethyl acetate extract of *R. indica* showed the highest total flavonoid content (149.13 mg/g extracts) and the lowest remaining ABTS. In addition, the ethyl acetate fraction was significantly more resistant against H₂O₂ than the negative control. Our results therefore suggest that an ethyl acetate fraction of *R. indica* protects HaCaT cells against oxidative stress and could prove useful for developing functional cosmetic materials.

Key words : Anti-oxidants, ethyl acetate fraction, keratinocytes, oxidative stress, *Raphiolepis indica*

서 론

인체 피부는 가장 바깥쪽에 각질세포(keratinocytes)로 이루어져 있으며, 화학적 및 물리적 외부 자극으로부터 체내 기관과 세포를 보호하는 기능을 수행한다. 하지만 과도한 자극을 받게 되면 세포 내에 활성산소종이 과도하게 발생하고 축적되면서 산화적 스트레스를 유발하게 된다. 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 슈퍼옥사이드 라디칼(Superoxide radical, O₂⁻), 과산화수소(Hydrogen peroxide, H₂O₂), 하이드록실 라디칼(Hydroxyl radical, ·OH), 일중항 산소(singlet oxygen, ¹O₂) 등이 포함되는 물질이다. 이러한 활성산소종은 짝지어지지 않은 전자가 존재하므로 반응성이 매우 높아 세포막의 구성성분인 지질과 단백을 산화시키고 DNA를 손상시키는데 관여하여 세포 손상, 노화를 촉진시키고 다양한 질병을 유발하기도 한다[6, 9]. 특히, 피부세포 및 조직과 반응성이 큰 활성산소종은 ·OH과 ¹O₂등으로 알려져 있으며 이러한 물질들은 생체 구성성분 손상을 통해 피부 노화 및 염증을 가속화시킨다[28].

물론 활성산소종이 체내 농도가 낮을 때에는 세포 신호전달이나 항상성 유지에 반드시 필요한 산화환원의 매개체가 되는 유익한 작용을 하기도 하고 일부 과도하게 체내에서 발생하더라도 superoxide dismutase (SOD), catalase와 같은 항산화 효소 방어시스템이 있다[3]. 하지만 대기오염, 자외선, 흡연, 염증, 스트레스 등 다양한 요인들의 증가로 인해 활성산소종이 과다하게 생산되어 결국 체내에 지속적으로 활성산소종이 축적되면서 질병 증가가 발생되고 있다[13, 19, 24]. 과도하게 발생한 활성산소종의 제거를 통해 체내 손상 및 이로 인한 질병 발생을 예방할 수 있으므로 효과적인 외인성 항산화제의 필요성이 높아지고 있다. 항산화제로는 셀레늄, 라이코펜, 플라보노이드 등이 있는데 강력한 항산화능뿐만 아니라 항암, 항바이러스 작용 등을 한다고 알려져 있다[23]. 반면, 항산화제가 근육장애, 암 발생 촉진 등의 부작용을 발생한다는 보고도 있다[20].

화학적 합성물의 형태인 물질보다 부작용을 최소화하기 위해 많은 연구에서 천연물질이나 천연물질로부터 추출한 물질의 효과들을 검증하고 있다[16, 21]. 그 중 식물, 곰팡이, 콩류, 과일 등의 천연 약용식물에서 다양한 생물학적 활성을 가지는 식물성 화합물이 꾸준히 발견되고 있다[12]. 또한 활성산소 발생에 대해 억제효과를 가지는 항산화제의 대부분은 식물 기원의 화합물로 주로 페놀 화합물 구조를 가지는 것으로 확인되었다[2]. 한국의 경우에는 육지와 다른 환경적 요인들로 인해 제주에 특이적으로 7,800여종 이상의 식물이 자생하고 있으며, 이 식물들에 대한 다양한 생리활성 연구가 많이 진행되고

*Corresponding author

Tel : +82-53-819-1350, Fax : +82-53-819-1353

E-mail : jhchang@dhu.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.

있다[17]. 현재까지 일부 효능들이 확인되고 있지만 여전히 부족한 실정으로 본 연구에 앞서 제주 자생식물들로부터 추출물을 제조하여 생리활성을 탐색하였다. 그 중 항산화 효능이 있는 페놀 함량을 확인한 결과 다정큼나무 잎의 에탄올 추출물에서 높은 함량의 페놀이 확인하였다[11]. 다정큼나무(*Raphiolepis indica*)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 관목으로, 장미과는 딸기, 사과, 살구 등과 같은 다양한 과일 작물을 포함하여 3,000여개 이상의 많은 종을 포함한다[4]. 그 중 다정큼나무는 뿌리에서 추출한 물질의 항염증 효과가 보고된 바 있고[14, 15], 잎에서도 간세포 보호효과가 보고된 바 있다[11]. 하지만, 각질세포에 대한 항산화 효과 및 그 외 다양한 생리학적 효능 평가에 대한 연구는 여전히 미비한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 다정큼나무의 잎 추출물로 라디칼 소거능 및 총 플라보노이드 함량을 확인하고, 핵산, 디클로로메탄, 에틸 아세테이트, 부탄올, 물 분획물을 이용하여 항산화효과 및 각질세포에 대한 보호효과를 확인하여 천연 항산화제 개발에 필요한 기초자료를 제공하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

다정큼나무 잎 분획물 제조

제주에 자생하고 있는 다정큼나무 잎을 2006년 03월 채집하여 채집된 시료를 증류수로 수세한 후 물기를 제거하고 2주간 음건하였다. 이후, 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다. 다정큼나무 잎 추출물은 70% 에탄올을 이용하여 추출되었다. 이후, 다정큼나무 분획물 제조는 분획용 핵산, 디클로로메탄, 에틸 아세테이트, 부탄올 그리고 물을 사용하여 용매 극성에 따라 순차적 추출법을 이용하였다. 분말 건조된 시료에 에탄올로 2회 반복하여 추출하고 여과하여 얻어진 추출물을 감압 농축하고 동결 건조시켰다. 건조된 에탄올 추출물에 약 10배의 증류수와 동량의 핵산으로 분획하고 감압 농축 후 핵산 분획물을 얻고, 동일한 방법을 통해 디클로로메탄, 에틸 아세테이트, 부탄올 그리고 물 층의 분획물을 얻었다(Fig. 1). 추출물 및 분획물은 70% 에탄올을 이용하여 10 mg/ml 농도로

제조하여 사용되었다.

총 플라보노이드 함량 측정

다정큼나무 잎 추출물 및 분획물의 총 플라보노이드 함량을 측정하기 위해 0.1% 다정큼나무 잎 추출물 및 분획물 0.5 ml에 diethylene glycol (Junsei Cemicsals, Japan) 5 ml을 혼합하였다. 이후 1 N NaOH를 0.5 ml을 가하여 혼합 후 37°C의 항온수조에 1시간 동안 두었다. 이후 Tecan Infinite F50 (Tecan, switzerland)을 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 naringin (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하여 표준곡선을 작성하여 총 플라보노이드 함량을 환산하였다.

라디칼 소거능 측정

다정큼나무 잎 추출물 및 분획물의 라디칼 소거능은 2-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) assay를 이용하여 측정하였다[10]. 7 mM ABTS (Sigma-Aldrich, USA)와 2.45 mM Potassium persulfate (Sigma-Aldrich, USA)의 비율을 동량으로 혼합하여 냉장상태 암실에서 12시간 동안 반응시켜 라디칼을 생성시켰다. 실험 직전 혼합 용액을 750 nm 파장에서 0.7±0.002 흡광도가 되도록 희석하여 제조하였다. 이후 혼합용액을 190 µl씩 96 well plate (SPL, Korea)에 분주하고 최종 농도가 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/ml로 희석된 다정큼나무 잎 추출물 및 분획물 190 µl와 혼합하여 실온 암실에서 6분간 반응시켰다. 최종적으로 Tecan Infinite F50 (Tecan, switzerland)을 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 Quercetin (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다.

세포 배양 및 독성 측정

본 실험에 사용된 세포는 사람각질세포인 HaCaT 세포로 기본 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium (Hyclone, USA)을 사용하였고, 기본 배지에 0.1 mM non-essential amino acids (GIBCO, USA), 10% fetal bovine serum (GIBCO, USA) penicillin-streptomycin (GIBCO, USA)을 첨가하여 배

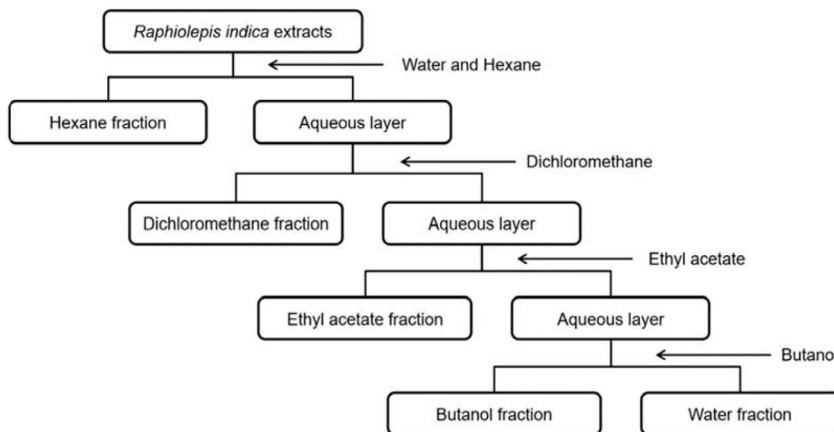


Fig. 1. Preparation of fractions from *Raphiolepis indica*. Fraction of *Raphiolepis indica* were extracted according to the solvent polarity of hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and water.

양하였다. 세포 배양은 5% CO₂, 37°C 온도의 조건으로 배양되었다. 배양된 세포에 대한 다정크나무 잎 분획물의 세포독성 정도를 확인하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 변형하여 측정하였다 [7]. 우선 96 well plate에 1×10⁴ cells/ml의 세포부유액을 100 µl씩 분주 후 5% CO₂, 37°C 온도의 조건으로 24시간 배양되었다. 이후 다정크나무 잎 분획물의 최종농도가 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml이 되도록 제조하여 각 well에 100 µl씩 분주하여 5% CO₂, 37°C 온도의 조건으로 48시간 배양하였다. MTT (Sigma-Aldrich, USA) 시약을 5 mg/ml 농도로 제조하여 20 µl씩 분주하였고 이후 5% CO₂, 37°C 온도의 조건으로 2시간 동안 반응시켰다. 최종적으로 배지 제거 후 dimethyl sulfoxide (DMSO) 200 µl를 분주하고 Tecan Infinite F50 (Tecan, switzerland)을 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

각질세포 보호 효과

HaCaT 세포의 산화적 스트레스에 대한 다정크나무 잎 분획물의 세포 보호 효과를 확인하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay로 세포 생존율을 확인하였다[7]. 96 well plate에 1X10⁴ cells/ml의 세포 부유액을 100 µl씩 분주 후 5% CO₂, 37°C 온도의 조건으로 24시간 배양하고, 이후 다정크나무 잎 분획물의 최종농도가 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml이 되도록 제조하여 100 µl씩 분주하여 5% CO₂, 37°C 온도의 조건으로 48시간 배양하였다. 48시간 이후, 100 mM 과산화수소를 20 µl씩 분주하고 4시간 동안 HaCaT 세포에 산화적 스트레스 자극을 주었다. 이후, 5 mg/ml MTT (Sigma-Aldrich, USA) 시약 20 µl를 분주하고 5% CO₂, 37°C 온도의 조건으로 2시간 동안 반응시켰다. 최종적으로 배지 제거 후 dimethyl sulfoxide (DMSO) 200 µl를 분주하고 Tecan Infinite F50 (Tecan, switzerland)을 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

본 연구의 실험 결과는 3회 반복하여 평균±표준편차로 나타냈다. 각 실험군의 유의성은 SPSS software (USA)를 이용하여 확인되었다.

결과 및 고찰

총 플라보노이드 함량

다정크나무 잎 추출물 및 분획물의 항산화 효과를 확인하기 위해 플라보노이드 함량을 측정하였다. 플라보노이드는 식물의 이차대사산물의 일종으로 두 개의 페닐 고리 구조를 가지고 있는 물질이다[25]. 이 플라보노이드는 세포에서 NF-κB의 활성을 조절하여 항산화, 항염증, 항알러지 효과를 보이는 다양한 생물학적 활성을 가지고 있다[1, 27]. 본 연구에서도 다정

크나무의 항산화 효과를 확인하기 위해 대표적인 항산화 물질인 플라보노이드를 함유하고 있는지 확인하였다. 또한 각각의 용매로 인해 추출된 추출물의 플라보노이드 함량을 각각 확인하여 비교하였다. 다정크나무 잎 추출물의 총 플라보노이드 함량은 75.70 mg/g extract로 확인하였고, 다정크나무 hexan, dichloromethane, 에틸 아세테이트, 부탄올, 물 분획물의 플라보노이드 함량은 각각 37.80, 49.86, 149.13, 110.36, 38.93 mg/g extract로 확인하였다(Table 1). 다정크나무 분획물 중 에틸 아세테이트 분획물에서 가장 높은 총 플라보노이드 함량이 관찰되었다. 이는 다정크나무의 에틸 아세테이트 분획물의 항산화 효과가 다른 분획물에 비해 높을 것으로 기대할 수 있고, 플라보노이드가 포함되는 페놀계 화합물 분석을 통해 항산화 효과와 상관관계에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

라디칼 소거능

Table 1에서 다정크나무의 에틸 아세테이트 분획물에서 플라보노이드가 가장 높은 농도로 관찰되었기 때문에 항산화 효과와의 상관관계를 확인하고자 ABTS를 이용한 라디칼 소거능을 관찰하였다. ABTS는 청록색의 시약으로 항산화물질과 반응하여 양이온 라디칼이 소거되면서 무색으로 변하게 된다[5]. 다정크나무 잎 추출물 및 각 분획물과 ABTS를 반응시켜 라디칼 잔여량을 확인한 결과는 다음과 같이 확인되었다. 다정크나무 추출물은 0.1 mg/ml 농도에서는 라디칼 소거능을 확인할 수 없었고 0.2, 0.4, 0.8 mg/ml 농도에서 89.93, 66.13, 46.06% 라디칼 잔여능을 확인하였다(Fig. 2). hexan 분획물은 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/ml 농도에서 라디칼 소거능을 확인할 수 없었고, dichloromethane 분획물은 0.4, 0.8 mg/ml 농도에서 96.93, 78.18%의 라디칼 잔여능을 확인하였다. 반면, 에틸 아세테이트 분획물은 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/ml 농도에서 각각 91.33, 73.16, 33.97, 20.57%의 라디칼 잔여능을 확인하며 모든 농도에서 유의적으로 가장 높은 라디칼 소거능을 확인하였다. 부탄올 분획물은 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/ml 농도에서 각각 94.00, 86.67, 45.68, 37.33 %의 라디칼 잔여능을 확인하며 라디칼 소거능을 가지고 있음을 확인하였다. 또한 물 분획물은 0.8 mg/ml에서 91.22%의 라디칼 잔여능을 확인하였다. 양성 대조군을 사용된 Quercetin은 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/ml에서 7.85,

Table 1. Total flavonoids content of extract and fractions from *Raphiolepis indica*

Materials	Total flavonoids content (mg/g extract)
Crude extract	75.70±4.91
Hexane fraction	37.80±3.00
Dichloromethane fraction	49.86±1.40
Ethyl acetate fraction	149.13±4.56
Butanol fraction	110.36±5.47
Water fraction	38.93±3.91

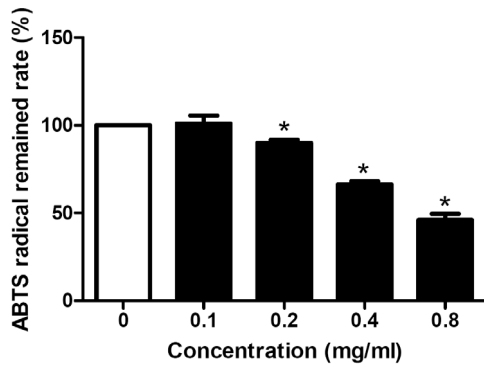


Fig. 2. ABTS radical remained rate of extract from *Raphiolepis indica*. Radical scavenging activity of extract from *Raphiolepis indica* was measured by ABTS assay. Significant difference from control is indicated ($p < 0.05$).

7.40, 7.37, 7.24%의 라디칼 잔여능을 확인하며 농도가 증가할 수록 라디칼을 소거하는 경향을 보였다(Table 2). 대부분 플라보노이드를 포함하여 총 폴리페놀의 함량이 라디칼 소거능과 관계가 있는 것으로 알려져 있지만, 모든 추출물에서 관찰되는 항산화성분과 라디칼 소거능의 상관관계가 항상 양의 상관관계로 나타나는 것은 아니라는 연구들도 있다[9, 22]. 이는 플라보노이드와 같은 폴리페놀 화합물을 추출하는 물질의 종류에 따라 라디칼 소거능의 차이가 있으며 특정 성분과의 종합적인 작용에 의해 조절이 된다고 예상된다.

세포 독성 효과

라디칼 소거능이 확인된 분획물이 세포에서 직접적으로 항산화효과를 나타내는지 확인하고자 하였고 각 분획물의 진정

한 항산화효과를 확인하기 위해서는 세포독성을 보이지 않는 농도를 우선적으로 확인하는 과정이 필요하다. 이를 확인하기 위해 다정킴나무 분획물 중 라디칼 소거능을 보인 에틸 아세테이트와 부탄올 분획물을 사람의 각질세포주인 HaCaT 세포에 농도별로 처리하였고 세포독성이 있는지 확인하고자 MTT assay를 실시하였다. 다정킴나무 분획물 중 에틸 아세테이트, 부탄올 분획물은 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml 농도에서 각각 대조군 대비 100% 이상의 세포 생존율을 나타내며 세포 독성을 나타내지 않았다(Table 3). 하지만, 0.4 mg/ml 농도에서는 에틸 아세테이트 분획물 처리군은 86.19%, 부탄올 분획물 처리군에서는 91.77%의 세포 생존율이 관찰되어 세포독성이 있음을 확인하였다(Table 3). 따라서, 이후 HaCaT 세포에 처리하는 다정킴나무 추출물의 농도는 세포독성을 나타내지 않는 0.2 mg/ml 이하의 농도로 선정하여 실험하고자 하였다.

세포 보호 효과

세포에 산화적 스트레스를 일으키는 것에는 다양한 외적 요소들이 있는데 이러한 외적 요소들로부터 체내 손상을 막아주는 첫 번째 방어막으로 피부가 있다. 특히, 피부의 가장 바깥쪽을 구성하는 각질세포는 자외선에 꾸준히 노출되면 다양한 활성산소종이 발생하지만 이에 대항하여 SOD, catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소들을 생성하여 피부 손상을 막는다[18]. 하지만 이러한 방어시스템에도 지속적인 외부 자극에 노출되면 과잉의 활성산소종이 발생하여 결국 산화적 스트레스를 유발하고 이로 인해 DNA 손상, 세포막 변성 및 세포 죽음을 유발하여 피부 노화 및 질병을 유발한다[26]. 그래서 본 연구에서는 사람 각질세포인 HaCaT 세포를 이용하

Table 2. ABTS radical remained rate of fractions from *Raphiolepis indica*

Materials	Concentration (mg/ml)			
	0.1	0.2	0.4	0.8
Hexane fraction	100±0.01	100±0.01	100±0.01	100±0.01
Dichloromethane fraction	100±0.01	100±0.01	96.93±2.35	78.18±1.79*
Ethyl acetate fraction	91.33±4.16*	73.16±1.19*	33.97±5.87*	20.57±4.01*
Butanol fraction	94.00±3.46	86.67±3.06*	45.68±5.25*	37.33±3.06*
Water fraction	100±0.01	100±0.01	100±0.01	91.22±5.55*
Quercetin	7.85±0.09*	7.40±0.36*	7.37±0.01*	7.24±0.04*

Radical scavenging activity of fractions from *Raphiolepis indica* were measured by ABTS assay. Significant difference from control is indicated ($p < 0.05$).

Table 3. Cell viability of ethyl acetate and butanol fraction from *Raphiolepis indica*

Materials	Concentration (mg/ml)				
	0	0.05	0.1	0.2	0.4
Ethyl acetate fraction	100±0.00	100.88±1.71	101.24±1.62	100.71±2.39	86.19±3.17*
Butanol fraction	100±0.00	101.24±2.26	102.74±2.27	101.33±1.92	91.77±3.62*

Cell viability of ethyl acetate and butanol fraction from *Raphiolepis indica* was measured by MTT assay. Significant difference from control is indicated ($p < 0.05$).

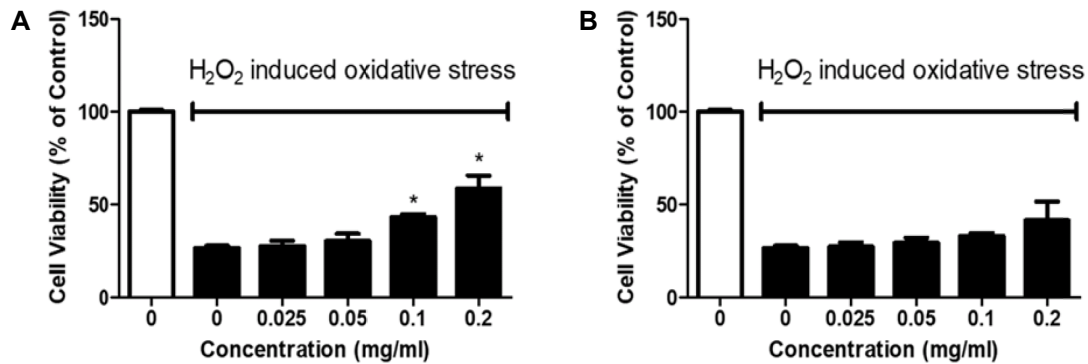


Fig. 3. Cell protection ability of ethyl acetate and butanol fraction from *Raphiolepis indica*. (A) Ethyl acetate fraction, (B) Butanol fraction. Cell protection ability of ethyl acetate and butanol fraction from *Raphiolepis indica* was measured by MTT assay. Significant difference from control is indicated ($p < 0.05$).

여 과산화수소(H₂O₂)를 처리한 다음 산화적 스트레스에 대한 다정크나무 분획물의 항산화 효과를 확인하고자 하였다. H₂O₂는 외인적 요인에 의해 체내에 생성되고 세포막을 통과하여 금속이완과 반응하여 또 다른 활성산소종을 생성시켜 세포 손상을 증가시킨다[8]. 일단, 다정크나무의 에틸 아세테이트, 부탄올 분획물을 이용하여 H₂O₂로 유도된 HaCaT 세포의 산화적 손상에 대한 세포보호효과가 있는지 확인하기 위해 세포생존율을 관찰하였다. 그 결과, 에틸 아세테이트 분획물 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml에서 30.97, 43.36, 59.17%의 세포 생존율을 나타내며 물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 세포생존율이 증가한 것을 확인하였다(Fig. 3A). 또한 부탄올 분획물 0.05, 0.1, 0.2 mg/ml에서도 30.09, 33.63, 42.48%의 세포 생존율이 관찰되었지만 에틸 아세테이트에 의해 세포생존율이 더 높게 관찰되었다(Fig. 3B). 이는 다정크나무의 추출물 중에서 에틸 아세테이트 분획의 추출물이 과산화수소로 발생한 HaCaT 세포의 세포 손상에 대한 보호효과가 가장 높다는 것을 나타낸다.

위의 결과들을 종합하면 다정크나무 분획물 중 에틸 아세테이트 분획물에서 가장 높은 총 플라보노이드 함량 및 라디칼 소거능을 확인하였고 이로 인해 산화적 스트레스로부터 HaCaT 세포를 보호하는 효과를 나타냈음을 보여준다. 추가적인 연구를 통해 에틸 아세테이트 분획물의 화합물 분석 및 세포 보호 관련 기전 규명을 위한 연구가 필요할 것으로 보인다. 본 연구 결과는 다정크나무 에틸 아세테이트 분획물의 항산화 소재로서 개발 가능성을 제시하며, 앞으로 항산화기능을 포함한 천연 항산화제 및 기능성 물질을 개발하는데 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Cazarolli, L. H., Zanatta, L., Alberton, E. H., Figueiredo, M. S., Folador, P., Damazio, R. G., Pizzolatti, M. G. and Silva, F. R. 2008. Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini Rev. Med. Chem.* **8**, 1429-1440.
- Choi, M. H., Ryu, E. M., Oh, D. S. and Shin, H. J. 2012. Improvement of acne condition in skin care using *Camellia japonica* L. extracts. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **10**, 661-672.
- Debnath, T., Park, S. R., Kim, D. H., Jo, J. E. and Lim, B. O. 2013. Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of *Inonotus obliquus* and germinated brown rice extracts. *Molecules* **2013**, 9293-9304.
- Fan, L., Zhang, M. Y., Liu, Q. Z., Li, L. T., Song, Y., Wang, L. F., Zhang, S. L. and Wu, J. 2013. Transferability of newly developed pear SSR markers to other Rosaceae species. *Plant Mol. Biol. Report* **31**, 1271-1282.
- Fellegrini, N., Ke, R., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol.* **299**, 379-389.
- Fernando, C. D. and Soysa, P. 2014. Total phenolic, flavonoid contents, in-vitro antioxidant activities and hepatoprotective effect of aqueous leaf extract of *Atalantia ceylanica*. *BMC Complement Altern. Med.* **2014**, 395.
- Jo, H. J., Shin, Y. S., Park, G. N. and Chang, K. S. 2013. Inhibition of hepatitis C virus (HCV) genotype 2a RNA replication by extracts of medicinal herbs with anti-cholesterol effects. *J. Med. Plant. Res.* **7**, 1089-1099.
- Kammeyer, A. and Luiten, R. M. 2015. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res. Rev.* **21**, 16-29.
- Kim, E. J., Choi, J. Y., Yu, M., Kim, M. Y., Lee, S. and Lee, B. H. 2012. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **44**, 337-342.
- Kim, H. J., Lee, K. J., Ma, K. H., Cho, Y. H., Lee, S., Lee, D. J. and Chung, J. W. 2015. Effect of tomato leaf extracts on anti-inflammatory and antioxidant activities. *Kor. J. Int.*

- Agric.* **27**, 529-535.
11. Kim, H. R., Park, G. N., Jung, B. K., Yoon, W. J., Jung, Y. H. and Chang, K. S. 2016. Antioxidative effects of *Rhaphiolepis india* and *Quercus salicina* from Jeju. *J. Kor. Oil Chemists' Soc.* **33**, 41-50.
 12. Lampe, J. W. 1999. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 475S-490S.
 13. Lee, Y. J., Kim, D. B., Lee, J. S., Cho, J. H., Kim, B. K., Choi, H. S., Lee, B. Y. and Lee, O. H. 2013. Antioxidant activity and anti-adipogenic effects of wild herbs mainly cultivated in Korea. *Molecules* **18**, 12937-12950.
 14. Lin, C. H., Chang, H. S., Lio, H. R., Chen, I. S. and Tsai, I. L. 2013. Triterpenoids from the roots of *Rhaphiolepis indica* var. *tashiroi* and their anti-inflammatory activity. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 8890-8898.
 15. Lin, C. H., Chang, H. S., Lio, H. R., Ou, T. H., Chen, I. S. and Tsai, I. L. 2010. Anti-inflammatory biphenyls and dibenzofurans from *Rhaphiolepis indica*. *J. Nat. Prod.* **73**, 1628-1631.
 16. Manayi, A., Khanavi, M., Saiednia, S., Azizi, E., Mahmoodpour, M. R., Vafi, F., Malmir, M., Siavashi, F. and Hadjiakhoondi, A. 2013. Biological activity and microscopic characterization of *Lythrum salicaria* L. *Daru* **21**, 61.
 17. Moon, J. Y., Yim, E. Y., Song, G., Lee, N. and Hyun, C. G. 2010. Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju Island plants. *EurAsia J. BioSci.* **4**, 41-53.
 18. Park, S. N. 1997. Skin aging and antioxidant. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **23**, 75-132.
 19. Rakhunde, P. B., Saher, S. and Ali, S. A. 2014. Neuroprotective effect of *Feronia limonia* on ischemia reperfusion induced brain injury in rats. *Indian J. Pharmacol.* **46**, 617-621.
 20. Salehi, B., Martorell, M., Arbiser, J. L., Sureda, A., Martins, N., Maurya, P. K., Sharifi-Rad, M., Kumar, P. and Sharifi-Rad, J. 2018. Antioxidants: positive or negative actors? *Biomolecules* **8**, 124.
 21. Seo, E. J., Kuete, V., Kadioglu, O., Krusche, B., Schroder, S., Greten, H. J., Arend, J., Lee, I. S. and Efferth, T. 2013. Antiangiogenic activity and pharmacogenomics of medicinal plants from traditional Korean medicine. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **2013**, 131306.
 22. Shon, H. K., Lee, Y. S., Park, Y. H., Kim, M. J. and Lee, K. A. 2008. Physico-chemical properties of gugija (*Lycii fructus*) extracts. *Kor. J. Food Cookery Sci.* **24**, 905-911.
 23. Tinggi, U. 2008. Selenium: its role as antioxidant in human health. 2008. *Environ. Health Prev. Med.* **13**, 102-108.
 24. Tobwal, S., Fan, W., Hines, C. J., Folk, W. R. and Ercal, N. 2012. Antioxidant potential of *Sutherlandia frutescens* and its protective effects against oxidative stress in various cell cultures. *BMC Complement Altern. Med.* **2012**, 271.
 25. Verwerdis, F., Trantas, E., Douglas, C., Vollmer, G., Kretzschmar, G. and Panopoulos, N. 2007. *Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health.* *Biotechnol. J.* **2**, 1214-1234.
 26. Xuan, S. H., Kim, G. Y., Yu, J. Y., Kim, J. W., Yang, Y. R., Jeon, Y. H., Jeong, Y. J., Kim, A. R. and Park, S. N. 2016. Antioxidant and cellular protective effects against oxidative stress of *Calendula officinalis* flowers extracts in human skin cells. *Appl. Chem. Eng.* **27**, 620-626.
 27. Yamamoto, Y. and Gaynor, R. B. 2001. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Investig.* **107**, 135-142.
 28. Yang, H. G., Kim, H. J., Kim, H. S. and Park, S. N. 2013. Ethosome formulation for enhanced transdermal delivery of artemisia princeps Pampanini extracts. *Appl. Chem. Eng.* **24**, 190-195.

초록 : HaCaT 피부 각질세포의 산화적 스트레스에 대한 다정큼나무 에틸 아세테이트 분획물의 세포 보호 효과

양은주¹ · 김혜란¹ · 장경수² · 장정현^{1*}

(¹대구한의대학교 임상병리학과, ²부산가톨릭대학교 임상병리학과)

제주에서 자생하는 식물인 다정큼나무는 장미과에 속하는 관목으로 다정큼나무 잎 에탄올 추출물에서 높은 총 페놀 함량이 확인되었다. 이를 바탕으로 본 연구에서는 다정큼나무 추출물에서 hexan, dichloroform, 에틸 아세테이트, 부탄올, 물을 이용하여 분획물을 제조하고, 5가지 분획물의 항산화효과를 확인해보고자 하였다. 특히, 외부 환경요인 및 자외선 등을 통해 산화적 스트레스가 많이 발생하는 피부각질세포에서의 항산화효과 및 세포보호효과를 확인하고자 사람 각질세포인 HaCaT세포를 이용하였다. 항산화능은 총 플라보노이드 함량 및 2-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) 라디칼 소거능을 통해 관찰하였고 HaCaT 세포보호효과는 세포에 과산화수소(H₂O₂)와 추출물을 처리한 다음 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 통해 확인하였다. 다정큼나무 잎 추출물 및 5가지 분획물 중 에틸 아세테이트 분획물에서 가장 높은 총 플라보노이드 함량 및 가장 낮은 라디칼 잔여량이 관찰되었고 H₂O₂에 의한 HaCaT 세포의 산화적 스트레스를 가장 많이 차단하여 높은 생존율을 보였다. 이를 토대로 다정큼나무 잎 에틸 아세테이트 분획물은 높은 항산화효과를 가지고 있어 사람 각질세포의 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 효과를 가지고 있음이 확인되었다. 따라서, 본 연구 결과는 다정큼나무 잎 에틸 아세테이트 분획물을 이용하여 산화적 스트레스로 인한 피부 손상을 억제하는 기능성 물질 소재로 활용할 수 있을 것으로 제시한다.