



# UVB로 손상된 피부 섬유아세포에서 쌍별귀뚜라미 메탄올 추출물의 보호효과

정택영<sup>1</sup> · 유명남<sup>1</sup> · 허희진<sup>1</sup> · 양진우<sup>2</sup> · 정현상<sup>1</sup> · 이준수<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>충북대학교 식품생명공학과, <sup>2</sup>국립식량과학원 밀연구팀

## Protective Effect of *Gryllus Bimaculatus* Methanol Extract on UVB-induced Photoaging in Human Skin Fibroblasts

Taekyoung Jeong<sup>1</sup>, Myeongnam Yu<sup>1</sup>, Huijin Heo<sup>1</sup>, Jinwoo Yang<sup>2</sup>, Heonsang Jeong<sup>1</sup>, Junsoo Lee<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University

<sup>2</sup>Wheat research team, National Institute of Crop Science

### Abstract

We evaluated the protective effects of cricket methanol extract (CME) on ultra-violet B (UVB)-induced photoaging in human skin fibroblasts. The fibroblast cells were treated with 10, 50, and 100 µg/mL of CME for 24 h, and then exposed to UVB (30 mJ/cm<sup>2</sup>). CME showed a dose-dependent cytoprotective effect without any observable cytotoxicity. CME reduced UVB-induced production of reactive oxygen species (ROS) by 34.4, 34.9, 40.6% at concentrations of 10, 50, 100 µg/mL respectively. CME inhibited the release of matrix metalloproteinase (MMP) 1 and 3. Furthermore, CME also reduced UVB-induced collagen degradation in the fibroblast cells. Taken together, our data suggests that CME has a significant protective effect on UVB-induced photoaging of the skin. This benefit occurs through multiple mechanisms. The results also suggest a potential role for CME as an ingredient in anti-photoaging cosmetic products in the future.

Key Words : *Gryllus bimaculatus*, fibroblast, photoaging, collagen

## 1. 서 론

인간의 피부는 신체 내부 기관과 환경 사이의 보호 장벽 기능을 하지만 미세먼지, 중금속, 각종 산화물질 및 자외선 등의 지속적인 노출에 의해 피부 노화가 일어난다(Rittie & Fisher 2002; Ding & Wang 2003). 피부 노화는 나이가 들면서 발생하는 내인성 노화와 흡연, 온도, 습도, 자외선 등 환경요소의 원인으로 나타나는 외인성 노화로 나뉘며, 외인적 피부 노화의 주요원인은 자외선 조사의 노출이다(El-Domyati et al. 2002; Bernhard et al. 2007). 자외선은 UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) 그리고 UVC (200-280 nm)로 파장에 따라 구분되고, 대부분의 UVC는 오존층에 의해 차단되고 UVA와 UVB는 지구 표면으로 침투하여 피부 노화를 촉진시킨다고 알려져 있다(Afaq & Mukhtar 2006). UVB는 일중항 산소, 수산화 라디칼 및 과산화수소를 비롯한 피부 섬유아세포에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 유발하고, 과도하게 증가된 ROS는 피부세포에서 염증반응을 일으키고 피부 조직 손상을 유발하며 세포막과 세포 내 구조를 손상시켜 피부주름과 같은 노화를 가

속화 시킨다고 알려져 있다(Kammeyer & Luiten 2015; Poon et al. 2015). 이러한 비정상적인 활성산소종의 증가로 체내 항산화 방어체계가 손상되고 산화적 스트레스를 일으켜 단백질의 기능이 변화되고 관련된 신호전달경로를 조절하여 피부 섬유아세포에서 matrix metalloproteinases(MMPs)의 발현 및 분비를 유도한다(Afaq et al. 2005). MMPs는 아연 의존성 단백분해효소(endopeptidase)로서 결합조직에서 세포 외 기질의 분해에 주요한 역할을 한다고 알려져 있다(Rabe et al. 2006). 그 중 MMP-1은 피부에서 구조 단백질인 제1형 섬유 콜라겐의 분해를 시작하는 효소로서 피부 주름을 생성하고 피부의 탄력을 감소시켜 피부 노화를 일으키고 MMP-3는 pro-MMP-1을 활성화시킨다고 알려져 있다(Rittie & Fisher 2002; Pillai et al. 2005). 따라서 피부 노화에 도움을 주는 항산화 물질이나 콜라겐 합성을 증가시키거나 콜라겐 분해효소의 작용을 억제시키는 소재를 찾는 것이 중요하다.

최근 천연, 친환경, 유기농 등 인체에 유해하지 않고 자연 친화적인 소재를 테마로 한 친환경 녹색산업이 각광을 받고 있으며, 이에 천연 유기농 화장품 시장의 증가와 소재에 대

\*Corresponding author: Junsoo Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, 1 Chungdae-ro, Seowon-gu, Cheongju, Chungbuk, 28644, Korea Tel: +82-43-261-2566 Fax: +82-43-271-4412 E-mail: junsoo@chungbuk.ac.kr

한 관심이 증가하고 있다. 식용 곤충은 경제적이고 친환경적이며 영양학적 가치가 뛰어나 최근 식용곤충의 재배 증가와 식품원료로 인정된 트렌드를 반영한 식품소재의 다양화로 곤충소재에 대한 연구가 활발히 되고 있으며 또한 건강식품으로 발전 가능성 있는 식품원으로 보고되고 있다(Rumpold & Schluter 2013). 그 중 쌍별귀뚜라미(two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*)는 번식이 빠르며 오메가-3, 오메가-6 등 다가 불포화지방산과 단백질, 키틴, 키토산 등 많은 기능성 성분들이 함유되어 있다고 보고되어 있으며, 항염증, 면역 조절 및 간 보호에 대한 연구가 알려져 있다(Ahn et al. 2000; Seo et al. 2004; Im et al. 2018). 하지만 UVB에 의한 광노화에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 식용곤충으로 주로 소비되고 있는 귀뚜라미를 메탄올 추출물로 제조하여 인간 피부 섬유아세포에서 UVB 조사로 유도된 광노화에 미치는 영향을 연구하였다.

## II. 연구 내용 및 방법

### 1. 재료 및 시료의 추출

쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*)는 (주)뷰니크에서 제공받았으며 건조 후 분쇄기(JL-1000, Hibell, Hwaseong, Korea)를 사용하여 분말로 만들고 10 g을 취하여 메탄올 300 mL를 넣고 shaker를 사용하여 24시간 동안 실온에서 추출하였다. Filter paper (no. 2 filter paper, Advantech, Tokyo, Japan)를 이용하여 여과한 후 감압 농축하여 농축액을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 재용해하고 0.22  $\mu\text{m}$  멸균 필터로 여과하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

### 2. 세포배양 및 세포 독성 실험

인체 피부 섬유아세포주인 Hs68 세포는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS, 10%)과 streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), penicillin (100 unit/mL)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하여  $37^{\circ}\text{C}$ , 95% humid air, 5%  $\text{CO}_2$ 로 설정된 배양기(Thermo Scientific, Tewksbury, MA, USA)에서 배양하였다. 96-well plate에 Hs68 세포를  $1.0 \times 10^4$  cells/well의 농도로 분주하였다. 24시간 배양 후 FBS가 함유되지 않은 배지귀뚜라미 메탄올 추출물이 첨가된 배지로 교체하였다. 24시간 시료 처리 후 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, 5 mg/mL) 용액 20  $\mu\text{L}$ 를 각 well에 첨가 후 2시간 동안 배양하였다. 생존 세포에서 생성된 자색 formazan 결정을 DMSO로 가용화하여 microplate reader (Epoch, BioTek Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 시료 처리 시에는 DMSO가 배지 내에서 최종 농도가 0.1% (v/v) 미만인 되도록 희석하여 사용하였다.

### 3. UVB 조사

Hs68 세포를  $1.0 \times 10^4$  cells/well의 농도로 96-well plate에 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 각 well에 FBS가 첨가되지 않은 배지에 시료를 희석한 후 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 그 다음 배지를 제거 후 phosphate buffered saline (PBS)으로 1회 세척한 뒤 UVB lamp (GL20SE, Sankyo Denki, Japan)를 사용하여 UVB (30  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )를 조사하였고, UV light meter (UV-340A, Lutron, Taipei, Taiwan)를 이용하여 자외선 강도를 모니터링 하였다. UVB 조사는 세포가 부착된 96-well plate에 PBS를 얇게 도포한 후 수행하였다. 조사 후 FBS가 없는 배지로 시료를 희석하여 24시간 동안 세포에 처리하였다. 대조군은 동일한 조건으로 UVB 조사 없이 진행하였다.

### 4. 활성산소종(ROS) 생성 측정

Hs68 세포에 귀뚜라미 메탄올 추출물을 농도별(10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 전처리하였다. 24시간 후 PBS로 세척한 후 세포를 UVB (30  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )로 조사하였다. UVB 조사 후 세포에 시료를 30분간 처리 후 25  $\mu\text{M}$ 의 dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)로 염색하였다. 세포 내에서 ROS가 나타내는 형광 강도를 485 nm의 여기 파장 및 530 nm의 방출 파장에서 fluorescent spectrophotometer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 이용하여 2시간 동안 측정하였다.

### 5. MMP-1, MMP-3 및 수용성 콜라겐 생성 측정

MMP-1, MMP-3의 생성량은 human MMP-1 ELISA kit 및 human MMP-3 ELISA kit (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA)을 이용하여 측정하였다. UVB 조사 후 수용성 콜라겐 생성량 측정은 Sircol™ soluble collagen assay kit (Biocolor, Carrickfergus, UK)을 사용하였다.

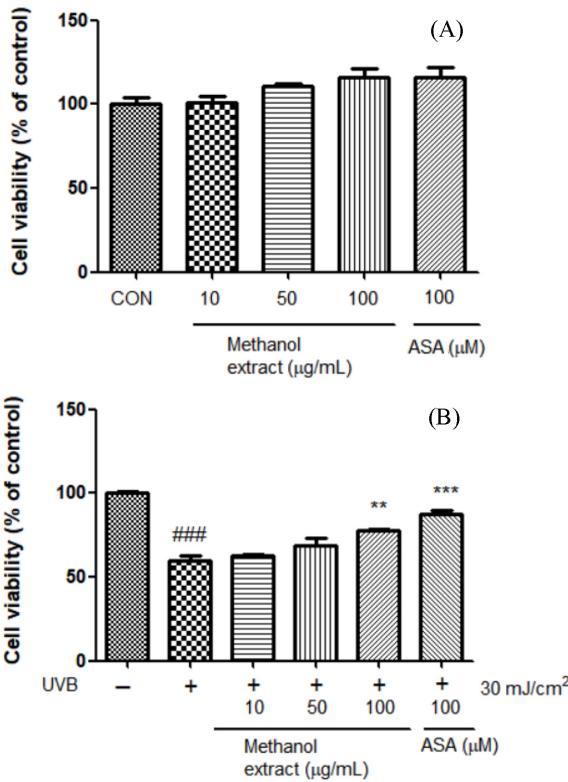
### 6. 통계처리

GraphPad Prism 5 (Graphpad Software, SanDiego, CA, USA) 소프트웨어를 이용하여 통계분석을 실시하였다. 데이터 간의 유의차는 One-way ANOVA의 Turkey-Kramer method를 통해  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 귀뚜라미 메탄올 추출물의 세포 독성 및 피부세포 보호효과

귀뚜라미의 세포 독성 및 보호효과를 확인하기 위해 메탄올 추출물을 제조하여 Hs68 세포주를 통해 세포 생존율을 측정하였다. UVB 비조사군에 추출물을 10, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리한 결과 모든 농도에서 세포독성은 나타나지 않았다(Figure 1A). UVB로 인한 세포손상은 ROS 신호 분자 및 염증성 사이토카인 경로를 활성화 시키고, DNA 손상을



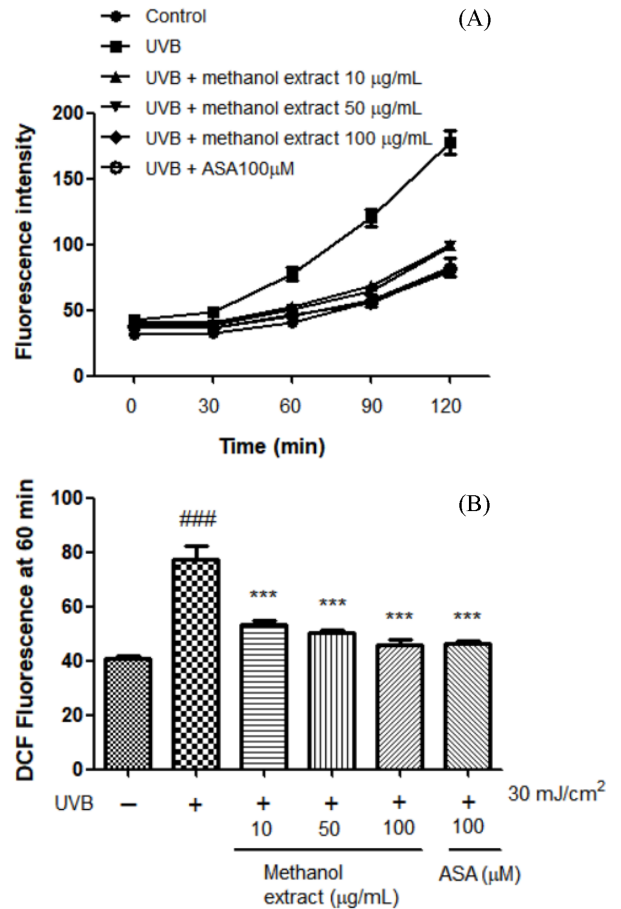
<Figure 1> Effects of *Gryllus bimaculatus* methanol extract on (A) cell viability and (B) protective effect against UVB-induced cell death.

Each value was expressed as the mean±standard error (n=3). Statistical significance was analyzed using the Turkey-Kramer method. ###p<0.001 versus non-irradiated control. \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 versus UVB irradiation only. ASA means ascorbic acid (positive control).

유발하여 세포 사멸을 유도하고 피부 노화를 촉진한다고 알려져 있다(Cadet et al. 2015). UVB(30 mJ/cm<sup>2</sup>)를 Hs68 세포에 조사하였을 때 세포 생존율이 약 55% 수준으로 감소하였으며 귀뚜라미 메탄올 추출물을 처리하자 UVB군에 비해 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하였다<Figure 1B>. 이 결과를 통해 UVB로 유도된 광노화에 대해 귀뚜라미 메탄올 추출물이 세포 보호효과가 있는 것으로 판단되었다.

2. ROS 생성에 대한 귀뚜라미 메탄올 추출물의 억제효과

ROS는 일중항 산소, 수산화 라디칼 및 과산화수소 등의 활성산소로, 생명체의 항상성 유지기작을 통해 조절된다. 하지만 외인성 노화의 주된 요인인 UVB의 노출로 인해 산화적 스트레스와 피부노화가 유도된 피부는 ROS가 과도하게 증가하여 피부주름, 피부암 및 광노화와 같은 피부손상을 유발한다(Scharffetter-Kochanek et al. 1993). UVB 조사군에서 대조군보다 ROS의 생성이 유의적으로 증가하였으나 귀뚜라미 메탄올 추출물 10, 50, 100 μg/mL 농도에서 각각 34.4, 34.9, 40.6% ROS 생성량이 감소하였고 특히 귀뚜라미 메탄올 추출물 100 μg/mL 농도에서 양성대조군과 비슷한 수



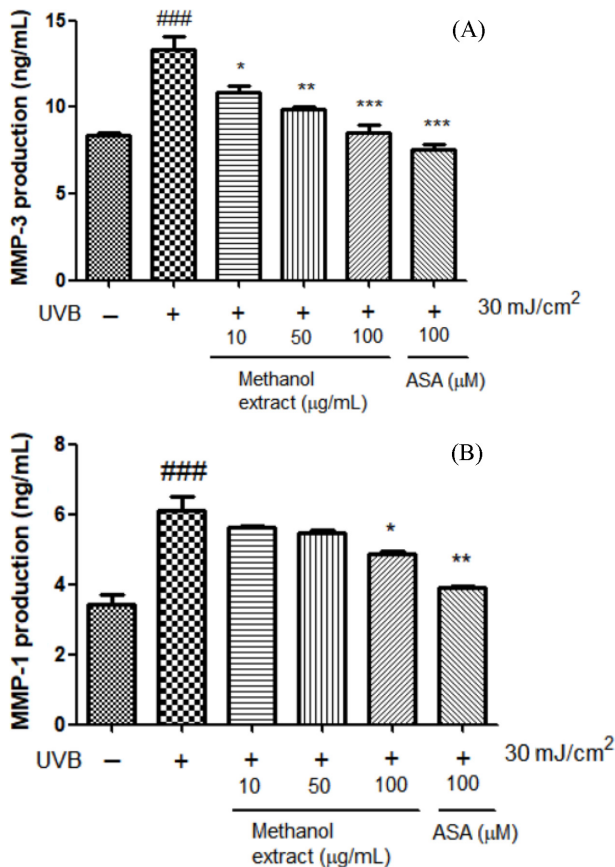
<Figure 2> Effects of *Gryllus bimaculatus* methanol extract on ROS production. (A) ROS production after UVB irradiation for 2 h after UVB irradiation and (B) at 60 min after UVB irradiation.

Each value was expressed as the mean±standard error (n=3). Statistical significance was analyzed using the Turkey-Kramer method. ###p<0.001 versus non-irradiated control. \*\*\*p<0.001 versus UVB irradiation only. ASA means ascorbic acid (positive control).

준을 나타냈다<Figure 2>. Im et al. (2019)은 벼메뚜기 (*Oxya chinensis sinuosa*) 추출물의 경구 투여가 UVB로 손상된 피부세포에서 ROS 생성을 감소시키고 MMP-1으로 인한 콜라겐 분해를 억제시켜 광노화 억제활성을 나타낸다고 보고한 바 있다. 이와 같이 본 연구의 귀뚜라미 메탄올 추출물이 UVB 조사에 의해 유도되는 ROS를 제거하여 산화적 스트레스로부터 피부세포를 보호할 것으로 생각된다.

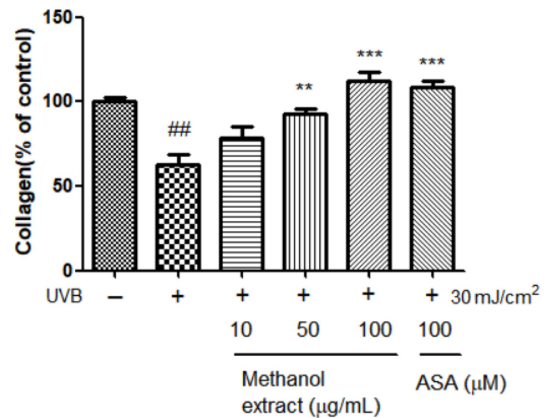
3. MMP-1, MMP-3 및 수용성 콜라겐 생성에 대한 귀뚜라미 메탄올 추출물의 효과

UVB는 결합조직에서 세포외기질(extracellular matrix)의 분해에 주요한 역할을 하여 피부노화를 일으킨다고 알려져 있는 matrix metalloproteinases (MMPs) 발현을 유도하여 피부노화를 촉진시킨다(Fisher et al. 1998). MMPs 중 MMP-1은 광노화로 인한 세포외기질 분해에 중요한 역할을



<Figure 3> Effects of *Gryllus bimaculatus* methanol extract on (A) MMP-3 and (B) MMP-1 protein production. Each value was expressed as the mean±standard error (n=3). Statistical significance was analyzed using the Turkey-Kramer method. ###p<0.001 versus non-irradiated control. \*p<0.05 and \*\*p<0.01, \*\*\*P<0.001 versus UVB irradiation only. ASA means ascorbic acid (positive control).

한다고 보고되어져 있으며, MMP-3는 stromelysin 1이라고도 하며 type IV collagen을 특이적으로 분해하고 pro-MMP-1을 활성화시킨다고 알려져 있다(Oh et al. 2006; Lee et al. 2012). Jung et al. (2014)은 Hs68 세포에 UVB를 조사하였을 때 MMP-1과 MMP-3의 생성이 증가되었고 이로 인해 콜라겐 함량도 같이 감소했다고 보고하였다. 따라서 콜라겐을 분해하는 protease인 MMP-1은 주름 생성과 같은 피부노화와 직접적으로 관련이 있기 때문에 MMP-1 활성을 억제할 수 있는 소재를 찾는 것이 중요하다. UVB 조사군은 MMP-3와 MMP-1의 생성을 유의적으로 증가시켰으나, 귀뚜라미 메탄올 추출물 처리군은 농도 의존적으로 MMP-3와 MMP-1의 생성을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 100 μg/mL 농도에서 MMPs 생성 억제 효과가 유의적으로 나타났다 <Figure 3>. 수용성 콜라겐 생성을 측정된 결과 수용성 콜라겐의 함량이 UVB 조사에 의해 유의적으로 감소하였으나, 귀뚜라미 메탄올 추출물 처리군에서는 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다<Figure 4>. 따라서 본 연구에서 귀뚜라미의



<Figure 4> Effects of *Gryllus bimaculatus* methanol extract on UVB-induced collagen production. Each value was expressed as the mean±standard error (n=3). Statistical significance was analyzed using the Turkey-Kramer method. ##p<0.01 versus non-irradiated control. \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 versus UVB irradiation only. ASA means ascorbic acid (positive control).

메탄올 추출물이 MMP-1 및 MMP-3를 감소시키고 콜라겐 생성을 증가시켜 피부 광노화를 효과적으로 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

#### IV. 요약 및 결론

본 연구는 인체 피부 섬유아세포에서 쌍별귀뚜라미 메탄올 추출물의 UVB에 대한 광노화 억제 효능을 평가하였다. 세포독성과 세포 보호효과는 MTT를 이용하여 측정하였으며 ROS 생성 정도는 fluorescent spectrophotometer로 측정하였고, MMPs와 수용성콜라겐의 생성량은 assay kit를 이용하여 측정하였다. 인체 피부 섬유아세포에서 귀뚜라미 메탄올 추출물 100 μg/mL의 농도까지 독성은 나타나지 않았으며, UVB조사로 인한 감소된 세포 생존율을 귀뚜라미 메탄올 추출물이 농도 의존적으로 증가시켰다. 쌍별귀뚜라미 메탄올추출물은 10, 50, 100 μg/mL 농도에서 UVB로 인한 ROS 생성량을 각각 31.4, 34.9, 40.6% 감소시켜 인체 피부 섬유아세포에서 UVB 조사로 인한 손상으로부터 보호할 수 있음을 확인하였다. 또한 인체 피부 섬유아세포에서 UVB 조사로 인해 유도되는 MMP-1, MMP-3의 생성을 유의적으로 억제하여 세포 내 콜라겐 수준을 유의적으로 증가시켰다. 결론적으로 본 연구를 통해 쌍별귀뚜라미 추출물은 UVB로 인한 피부노화를 효과적으로 개선할 수 있는 항노화 기능성 화장품 소재로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

#### 감사의 글

이 논문은 충북대학교 국립대학육성사업(2019)지원을 받아 작성되었습니다.

저자정보

- 정택영(충북대학교 식품생명공학과, 석사과정, 0000-0002-3950-6143)  
 유명남(충북대학교 식품생명공학과, 석사과정, 0000-0001-7727-2440)  
 허희진(충북대학교 식품생명공학과, 박사과정, 0000-0003-1117-4068)  
 양진우(농촌진흥청 국립식량과학원 밀연구팀, 전문연구원, 0000-0002-7991-2218)  
 정현상(충북대학교 식품생명축산학부, 교수, 0000-0003-0349-4483)  
 이준수(충북대학교 식품생명축산학부, 교수, 0000-0001-5557-4229)

Conflict of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. 2005. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res.*, 571:153-173  
 Afaq F, Mukhtar H. 2006. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp Dermatol.*, 15:678-684  
 Ahn MY, Ryu KS, Park BY, Kim DW, Kim I, Kim SH. 2000. Effect of cricket on the chicken and its egg. *Korean J Poult Sci.*, 27:197-202  
 Bernhard D, Moser C, Backovic A, Wick G. 2007. Cigarette smoke-an aging accelerator? *Exp Gerontol.*, 42:160-165  
 Cadet J, Douki T, Ravanat JL. 2015. Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *J Photochem.*, 91(1):140-155  
 Ding BX, Wang CB. 2003. Inhibitory effect of polypeptides from *Chlamys farreri* on UVB-induced apoptosis and DNA damage in normal human dermal fibroblasts in vitro. *Acta Pharmacol Sin.*, 24:1006-1010  
 El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, et al. 2002. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol.*, 11: 398-405  
 Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, Lin P, McPhillips F, Wang Z, et al. 1998. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *J Clin Invest.*, 101:1432-1440  
 Im AR, Park IW, Ji KY, Lee JY, Kim KM, Na MK, et al.

2019. Protective effects of *Oxya chinensis sinuosa* Mishchenko against ultraviolet B-induced photodamage in hairless mice. *BMC Complement Altern Med.*, 19:286-294  
 Im AR, Yang WK, Park YC. Kim SH, Chae S. 2018. Hepatoprotective effects of insect extracts in an animal model of nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrients.*, 10:735-753  
 Jung HY, Shin JC, Park SM, Kim NR, Kwak WJ, Choi BH. 2014. *Pinus densiflora* extract protects human skin fibroblasts against UVB-induced photoaging by inhibiting the expression of MMPs and increasing type I procollagen expression. *Toxicol Rep.*, 1:658-666  
 Kammeyer A, Luiten RM. 2015. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev.*, 21:16-29  
 Lee YR, Noh EM, Han JH, Kim JM, Hwang JK, Hwang BM, et al. 2012. Brazilin inhibits UVB-induced MMP-1/3 expressions and secretions by suppressing the NF-κB pathway in human dermal fibroblasts. *Eur J Pharmacol.*, 674:80-86  
 Oh JH, Kim A, Park JM, Kim SH, Chung AS. 2006. Ultraviolet B-induced matrix metalloproteinase-1 and -3 secretions are mediated via PTEN/Akt pathway in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol.*, 209:775-785  
 Pillai S, Oresajo C, Hayward J. 2005. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation-a review. *Int J Cosmetic Sci.*, 27:17-34  
 Poon F, Kang S, Chien AL. 2015. Mechanisms and treatments of photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.*, 31:65-74  
 Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJS, Morison WL, Sauder DN. 2006. Photoaging mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol.*, 55:1-19  
 Rittie L, Fisher GJ. 2002. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev.*, 1(4):705-720  
 Rumpold BA, Schluter OK. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Mol Nutr Food Res.*, 57:802-823  
 Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Briviba K, Sies H. 1993. Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.*, 331:1-3  
 Seo DH, Hwang SY, Han J, Koh SK, Kim I, Ryu KS, et al. 2004. Immune-enhancing activity screening on extracts from two crickets, *Gryllus bimaculatus* and *Teleogryllus emma*. *Entomol Res.*, 34:207-211