

Vitexin에 의한 HDF 세포에서 UVB 유도 DRAM1-오토파지 단백질

변서정¹, 강상모^{2*}, 조영재³

¹건국대학교 생물공학과 학생, ²건국대학교 생물공학과 교수, ³건국대학교 생물공학과 학생

Regulation of UVB-induced DRAM1-Autophagy protein in HDF Cells by the Vitexin

Seo-Jung Byun¹, Sang-Mo Kang^{2*}, Young Jae Cho³

¹Student, Division of Biological Engineering, Konkuk University

²Professor, Division of Biological Engineering, Konkuk University

³Student, Division of Biological Engineering, Konkuk University

요약 본 연구는 메밀 추출물과 비텍신을 이용하여 UVB 손상 개선에 대한 효과를 알아보기 위해 Microarray 분석, 세포의 증식, 세포 상처 회복, 세포주기, 마이크로파지의 생성 양상, 단백질 분석 등을 실시하였다. Microarray 분석 결과는 DRAM1, Atg2a 및 Atg13 유전자에서 UVB에 의해 증가된 양상을 메밀 에탄올추출물과 비텍신에서 감소시켰다. 세포의 증식, 상처 회복, 주기 및 마이크로파지 양상에서는 메밀 에탄올추출물과 비텍신에서 정상 세포와 유사하게 개선되었으며, 단백질 분석에서 DRAM1, Beclin-1 및 LC3 I/II 모두 비텍신 처리군에서 감소하였고, p-mTOR 및 Survivin은 모두 증가되었다. UVB에 의한 손상에서 메밀 에탄올추출물과 비텍신은 DRAM1, Atg2a 및 Atg13을 같이 컨트롤 하고 세포 증식, 상처 회복 및 주기를 정상으로 회복하며 UVB에 의한 세포 노화 발생원인 중 하나인 오토파지를 조절하여 세포의 사멸억제 및 재생하므로 기능성 화장품 성분으로 활용가능할 것으로 사료 된다.

주제어 : 오토파지, DRAM1, 메밀추출물, UVB, 비텍신

Abstract This study was carried out to investigate the Fagopyrum esculentum (F. esculentum) extracts and vitexin are as the results of microarray, cell proliferation, cell wound recovery, cell cycle, microphage pattern and protein analysis for damage improvement caused by UVB-induced damage. Microarray results showed that UVB-induced increase in DRAM1, Atg2a and Atg13 genes was reduced in F. esculentum ethanol extract and vitexin. Cell proliferation, wound repair, cell cycle, and microphage patterns were improved in F. esculentum ethanol extract and vitexin, while buckwheat ethanol extract and vitexin decreased in both DRAM1, Beclin-1, and LC3 I/II in the vitexin treatment group and p-mTOR and survivin were all increased in protein analysis. It is thought that it can recover to normal and control autophagy, one of the causes of cell aging caused by UVB, to inhibit and regenerate cell death. F. esculentum ethanol extract and vitexin can be used as a functional cosmetic ingredient.

Key Words : Autophagy, DRAM1, Fagopyrum esculentum, UVB, Vitexin

1. 서론

UVB에 의해 발생하는 노화는 세포를 파괴하고 일부 조직을 사멸시켜 깊은 주름을 발생시키는 것에 영향을

준다[1]. 외부적인 환경에 의해 발생된 노화 메커니즘은 세포의 사멸단계에서 오토파지(autophagy) 또는 아포토시스(apoptosis)와 같은 세포의 사멸을 유도하

*Corresponding Author : Seo Jung Byun(betty-byun@hanmail.net)

는 신호를 통해 발생하며[2,3], 이와 관련된 신호체계 중 핵심단백질을 조절하고 노화를 극복하고자 하는 연구가 다양하게 진행되었다. 특히, 천연물을 이용한 친화적 소재를 통해 항산화, 항염, 항균 및 항노화 등 피부의 활성을 극복하고자 하는 다양한 연구들이 보고되었다[4-6].

세포에서 노화의 바이오 마커는 베타-갈락토시다제(SA- β -Gal)의 증가, 넵틴(nectin)의 구조변화, 세포사멸과 관련된 오토파지 또는 아포토시스, 염증 물질의 발생 등이 있으며, 피부에서는 검은 스팟의 생성 및 주름발생이 UVB에 의한 노화 과정에 대표적이다[7, 8]. 특히, 오토파지는 자가소화작용을 의미하는 자연분해 시스템 중 하나로 세포질 구성 성분이 자극에 의해 라이소좀과 융합하고 이를 분해하는 과정에서 발생된다. 오토파지는 크게 macroautophagy(거대자가포식), microautophagy(미세자가포식) 및 chaperone-mediated autophagy(샤페론매개자가포식)으로 구분되며, UVB에 의해 스트레스 조건하에 손상된 불필요한 부분을 분해함으로써 세포 내 환경을 유지하는 작용을 한다. 오토파지가 세포사멸을 유도하는 것을 오토파지 세포사멸(autophagic cell death)로 부르며, 자가소화포(autophagosome)가 caspase-8를 활성화시킴으로써 세포사멸을 촉진 시킨다.

스트레스 상황에서 p53이 핵으로 이동하여 $\beta 1$, $\beta 2$ 및 γ subunits of AMP-activated protein kinase (AMPK), sestrin 1, sestrin 2, phosphatase, tensin homologue (PTEN), damage-regulated autophagy modulator 1 (DRAM1) 등과 같은 유전자의 발현을 촉진하여 autophagy를 촉진시키고, 세포사멸을 조절한다. DRAM1은 DNA손상 모듈러 리소좀에 분포해 있다가 손상을 인지하여 오토파지 또는 아포토시스를 유발시킨다. DRAM1의 자극 인자는 UV 및 TLR-NF- κ B 등이 있으며, DRAM1에 의해 mTOR-ribosomal protein S6를 통해 오토파지를 조절하는 연구가 보고되었다[9].

비텍신(vitexin)은 메밀의 대표물질로 대나무, 콩 등에서도 확인된다. 비텍신은 항산화제, 항염증제, 항암제, 항콜린제, 항균, 항바이러스 및 신경보호 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 위장관에서 흡수가 어렵고 흡수가 되지 않은 비텍신은 소변으로 배설된다[10]. 이러한 영향으로 비텍신 복용을 통한 효과를 보기 어렵

다. In vitro 실험에서 세포 처리에 대한 농도는 10~100 μ M농도에서 아포토시스와 관련된 Bcl-2의 증가, NR2B 함유 NMDA 수용체의 단백질 수치를 하향 조정, 세포질 내 Ca^{2+} 과부하 조절, 염증성 사이토카인 수준 억제 (TNF- α 및 IL-6), 항산화 조절 (Nrf2, HO-1, NQO-1 및 Grp78) 및 MMP 조절과 관련된 세포에 직접 처리하여 효과를 증명한 연구가 진행되었다.

메밀 (*Fagopyrum esculentum*)은 쌍자엽 식물로 종자는 삼각뿔 모양으로 검은 갈회색을 띤다. 오래전부터 식품 재료로 이용해 왔고 메밀국수, 메밀묵 및 메밀전 등의 음식으로 개발되었다. 메밀의 내과적 치료로는 홍역, 궤양성 위장염, 황달, 흉통, 산후출혈 및 악성 종기 치료용으로 이용되었다. 메밀에 포함된 페놀화합물은 루틴(rutin), 히페린(hyperin), 퀘세트린(quercitrin), 퀘세틴(quercetin), 비텍신(vitexin), 이소비텍신(isovitexin), 오리엔틴(orientin), 이소오리엔틴(isoorientin) 등 다양한 형태의 대표물질들이 보고되었다. 피부 관련 기능성 화장품 소재 중 천연물을 이용한 기능성 소재는 쇠뜨기, 민들레 뿌리, 우엉, 은행잎, 대두, 석류, 포도 씨 추출물이 있으며, 메밀 또한 퀘세틴, 퀘세트린 및 루틴을 기반으로 항균 및 항염증 작용을 개선시킬 수 있는 기능성 소재로 보고된 바 있다.

따라서 본 연구에서는 메밀의 대표물질 중 비텍신을 이용하여 세포 노화증 주름을 발생시킬 수 있는 기전인 UVB에 의해 발생 되는 오토파지를 억제하는 효과를 통해 화장품 기능성 소재로 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험재료

메밀은 강원도 봉평 전통시장의 특산물 판매지역에서 구입하여 본 연구의 시료로 사용하였다. 건조된 메밀은 1331 g을 분쇄하여 48시간 400 g씩 80% 에탄올 1 L, 80% 메탄올 1 L, 100% 물 1 L에서 각각 추출하였다. 추출물은 여과지(Advantech, circles 300 mm, Japan)에 여과 후 45°C에서 감압 농축 및 동결건조하였다. 건조 추출 분말 80% 에탄올 4.2 g, 80% 메탄올 1 L에 3.9 g, 100% 물 1 L에 3.1g을 회수하여 실험에 이용하였다. 80% 에탄올 조건은 추출물을 이용한 생리활성 실험에서 일반적으로 사용하는 농도로 설정하였다[11]. 메밀 표준물질 비텍신 (apigenin-6-C-glucoside,

Merck Millipore, USA)은 구매하여 실험에 이용하였다.

2.2 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 20회 계대배양 후 2×10^5 cells/mL 세포수로 100 mm culture dish (SPL, Pocheon, Korea)에 분주한 후 37°C CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2.3 Cyto-X 분석

HDF (ATCC; manassas, VA, USA) 세포주를 이용하여 세포성장률 테스트 Cyto-X (LPS solution, Daejeon, Korea) 시약을 이용하였다[12]. 세포를 96 well plate에 1.5×10^4 세포수로 12시간 배양한 뒤 메틸 추출물 10 µg/mL로 처리하였으며, 비텍신은 20 µM로 처리하였다. 또한, UVB에 의한 손상 억제 확인을 위해 세포를 12시간 배양한 뒤 각 메틸 추출물 10 µg/mL로 처리하였으며, 비텍신 20 µM로 처리 후 UVB 램프 (Heber Scientific lamp, 254-312 nm, Heber Scientific Company Ltd., Chennai, India)로 312nm 35mJ/cm²에 400 mJ/cm²단위로 노출하였고, 대조군은 형광등이 내제된 37°C, 5% CO₂ 배양기 조건 하에 배양하였다. 배양 24시간 뒤 총 볼륨의 1/10 농도로 Cyto-X 시약을 각 well에 첨가한 후 호일로 감싸 4시간 배양기에 배양하였다. 배양 후 Wallac Victor2 plate reader (Perkin Elmer Corp., Nerwalk, CT) 로 450 nm 흡광도에서 측정하여 측정값 %로 수치화하였다.

2.4 상처 회복법(Wound healing)

상처 회복률의 확인을 위해 HDF 세포를 24well 세포배양 접시에 4×10^5 세포수로 12시간 배양한 뒤 100 µL 텡으로 상처를 내고 각 메틸 추출물 10 µg/mL로 처리하였으며, 비텍신 20 µM로 처리 후 UVB 램프 312nm 35mJ/cm²에 시간 단위로 노출하였고, 1시간 뒤 LC3-GFP DNA (addgene, Cambridge, MA, USA)를 lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 주입하고 12시간 뒤 confocal 현미경 (LSM710, CarlZeiss, Oberkochen, Germany)을 이

용하여 녹색 스팟을 확인하였다[13].

2.5 Microarray 분석법

마이크로어레이 분석을 위해 각 메틸 추출물 10 µg/mL로 처리하였으며, 비텍신 20 µM로 처리 후 UVB 램프 312 nm 35 mJ/cm²에 400 mJ/cm²단위로 노출하였고 24시간 뒤 세포를 수집하여 마이크로어레이 분석을 의뢰하였다. 마이크로어레이 분석은 마크로젠 코리아에 요청하여 분석하였다[7].

2.6 오토파지 확인

오토파지 확인을 위해 HDF 세포를 confocal용 세포배양 접시에 2×10^5 세포수로 12시간 배양한 뒤 각 메틸 추출물 10 µg/mL로 처리하였으며, 비텍신 20 µM로 처리 후 UVB 램프 312 nm 35 mJ/cm²에 400 mJ/cm²단위로 노출하였고, 1시간 뒤 LC3-GFP DNA (addgene, Cambridge, MA, USA)를 lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 주입한 후 12시간 뒤 confocal 현미경 (LSM710, CarlZeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 녹색 스팟을 확인하였다[14].

2.7 Western blotting 분석

HDF 세포주를 60 mm 세포배양 접시에 6×10^5 세포수로 12시간 배양한 뒤 각 메틸 추출물 10 µg/mL로 처리하였으며, 비텍신 20 µM로 처리 후 UVB 램프로 312 nm 35 mJ/cm²에 400 mJ/cm²단위로 노출하였고, 24시간 처리하여 세포를 수집하였다.

HEK293T 세포에 c-Flag pcDNA3.1 (addgene, Cambridge, MA, USA)를 이용하여 FLAG-DRAM1 plasmid를 cloning을 통해 제작한 뒤 lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 주입하고, 12시간 배양 후 각 메틸 추출물 10 µg/mL로 처리하였으며, 비텍신 20 µM로 처리하고 24시간 추가 배양하였다.

Phosphatase inhibitor cocktail과 protease inhibitor cocktail을 1x로 포함된 RIPA lysis buffer (GenDEPOT, USA)를 첨가 후 얼음에 1시간 동안 lysis후 13,000 rpm에서 20분간 원심분리를 실시하였다. 단백질 상층액을 회수하여 Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, CA)를 이용하여 정량한 뒤 10~25 µg의 단백질을 이용하여 SDS-PAGE gel method로 전

기영동 하였다. Gel transfer시킨 뒤 5% skim milk (LPS solution, Daejeon, Korea)에 1시간 동안 blocking하였다. 1차 항체를 각각 1:1,000으로 제조하여 냉장실에 하룻밤 배양하였다. 3회 PBS-T로 각 10분간 세척 한 뒤 2차 항체를 1:5,000의 농도로 처리한 후 실온에서 1시간 동안 blocking 한뒤 다시 3회 PBS-T로 세척 하였다. Amersham ECL Western blotting detection reagent (GE Healthcare)를 이용하여 발색을 측정하였다. 항체는 anti-LC3, anti-Bcl2, anti-β-actin (Santa Cruze, Dallas, TX, USA) 및 anti-DRAM1, anti-Beclin1, anti-VPS34 (Abcam, Cambridge, UK)를 이용하였다[14- 16].

2.8 통계분석

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

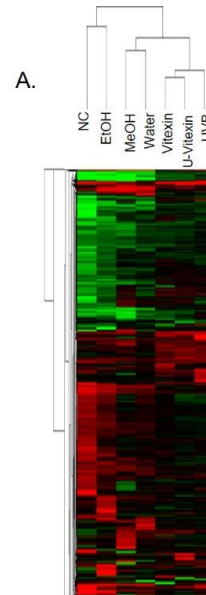
3. 결과 및 고찰

3.1 메밀 추출물 및 비텍신의 오토파지 신호 조절

메밀 추출물 및 vitexin을 이용한 마이크로어레이 분석을 진행한 결과 figure 1A 및 1B에 나타났다. 마이크로어레이 결과 중 *DRAM1*이 UVB (2.8 fold change - up)에 의해 증가 되었다가 비텍신에 의해 감소 되는 것이 확인되었다(0.4 fold change - down). 메밀 대표물질 비텍신이 UVB 손상에 의해 증가 되는 오토파고솜 전 단계에서 오토파지를 조절할 수 있는 *DRAM1*을 억제하여 오토파지를 조절할 수 있음을 알 수 있었다.

오토파지는 세포사멸(자가포식)을 유도하는 신호로 세포사멸에 대한 기전은 상황에 따라 다르게 발생한다. 세포 발생단계에서의 오토파지는 태아의 각 기관을 구성하는 부분을 나누기 위해 발생하는 것으로 기관의 형성과 관계있는 반면, 분화를 완료한 정상 세포에서는 외부의 강한 자극으로 인해 손상된 세포기관을 제거하여 더 큰 악영향을 방지하기 위해 발생 되기도 한다. 세포사멸 과정에서 관련 유전자인 Atg (Autophagy-related genes)에 조절된다[17, 18]. 자가포식 시작단

계에서 Atg1/Unc-51kinase에 의해 복합체를 형성하여 오토파지의 신호를 시작하는데 이 바로 전 단계에서 *DRAM1*에 의해 오토파지 조절인자인 mTOR의 인산화 작용이 억제되면서 Atg1/Unc-51 kinase (ULK1) 복합체 형성을 개시한다[2].



B.

Description	GeneSymbol	NCBI accession no.	UVB intensity ratio	Vitexin intensity ratio	UVB vitexin intensity ratio
Autophagy related 2A	<i>Atg2a</i>	NM_194348	2.251011688	0.396025209	0.83663787
Autophagy related 13	<i>Atg13</i>	NM_051811	2.038303811	0.2464438	1.023207076
DNA-damage regulated autophagy modulator1	<i>DRAM1</i>	NM_027878	2.808659745	0.2166138	0.248230573

Fig. 1. Target gene identification by microarray analysis.

(A) Genes differentially expressed in response to UVB (400 mJ/cm²) and vitexin (20 μM) treatment in HDF cells are shown in the heat map. (B) Gene expression profiles were analysed in HDF cells with UVB (400 mJ/cm²) and vitexin (20 μM). Red color is overexpression, blue color is down expression.

마이크로어레이 분석법은 다양한 유전자를 mRNA 기반으로 분석하는 방법으로 이 연구의 결과를 통해 오토파지를 유발하는 *DRAM1*이 비텍신 처리 시 억제되었고, UVB 손상을 통해 증가 된 *DRAM1*을 억제하는 것을 확인했다. 또한, 포스파티딜이노시톨 3-인산 (phosphatidylinositol 3-phosphate, PI(3)P) 비의

존적인 *Atg2a* 및 *Atg13*를 통한 오토파고솜을 조절하는 것을 알 수 있었다. PI(3)P 비의존적인 관점에서 분해를 위한 리소솜으로 운반하는 작용을 하는 것은 환경 스트레스에 대한 영향이 가장 크며, 인터페론과 같은 사이토카인과 관련이 없는 특징을 갖는다.

3.2 메밀 추출물 및 비텍신의 세포 증식

메밀 추출물 및 비텍신을 이용한 세포증식률은 figure 2A에 나타났다. 에탄올추출물(EtOH, $p < 0.01$) 및 비텍신 ($p < 0.001$) 처리군에서 세포의 세포 증식이 유의성 있게 증가한 것을 확인했다. 또한, UVB를 처리한 처리군에서 비텍신 처리시 UVB 손상을 회복하는 것을 figure 2A에 나타났다. UVB 처리군을 비교하면 정상 세포에서의 성장률과 동일하고 에탄올추출물 및 비텍신 처리군에서 세포의 세포 증식이 유의성 있게 증가하였다.

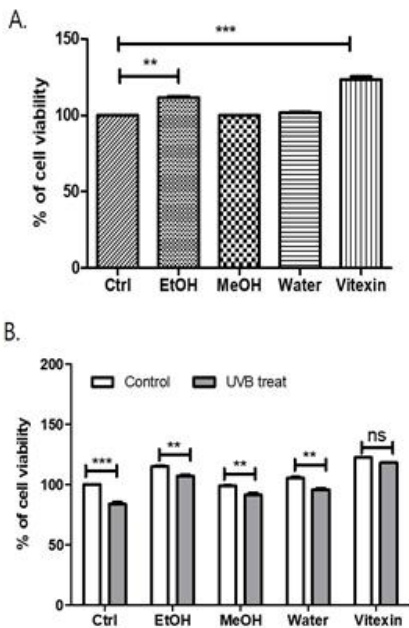


Fig. 2. Cell viability and UVB induced anti-proliferation change by *Fagopyrum esculentum* extract and vitexin.

(A) Cell viability of HDF cells with *F. esculentum* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and vitexin (20 μM). (B) UVB-induced cell viability change detected with UVB (400 mJ/cm^2), *F. esculentum* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and vitexin (20 μM).

비텍신을 이용한 생리활성은 NRF2를 조절하여 항산

화 활성을 유지[19], phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) - protein kinase B (AKT)를 조절하여 세포 성장을 증가[20], AMPK를 억제하여 비만을 완화[21], NF- κ B를 조절하여 염증 완화 및 세포 성장을 조절하는 것으로 알려졌다[22]. 특히 PI3K-AKT는 신호전달경로에서 다양한 성장인자 및 조절인자에 의해 활성화되어 세포 성장, 생존, 세포 증식, 이동 및 세포주기를 조절한다[23, 24]. PI3K에서 인지된 신호는 AKT를 통해 세포질 쪽으로 이동하는 구조적 변화를 일으키며[25], 천연물을 통한 AKT 신호의 변화는 양파추출물, 은행추출물 및 소철 등에서 확인된 바 있다[26-28].

세포에 자극된 UVB는 세포의 성장을 억제하고 염증을 유발하며, 손상을 입혀 구조변화를 야기한다[1, 7]. 특히 피부세포는 직사광선을 그대로 받아 UV에 대한 손상에 직접적인 영향을 받는다. 세포에 발생한 손상을 줄이기 위해 세포는 오토파지와 아포토시스 같은 세포 사멸을 유도하여 MMP와 같은 물질을 통해 주름을 발생시킨다[29-33]. 본 연구에서는 이 같은 영향 중 오토파지를 조절하는 영향을 보이는 비텍신을 통해 새로운 오토파지 조절인자를 마이크로어레이 기반으로 추가 탐색 하였다.

3.3 메밀 추출물 및 비텍신의 상처회복 및 세포주기 회복

메밀 추출물 및 비텍신을 이용한 상처 회복률을 figure 3A에 나타났다. 에탄올추출물 및 비텍신 처리군에서 동일시간 배양 시 상처가 회복되는 것을 확인하였으며, UVB 처리 시 상처 회복이 느려진 것을 알 수 있었다. 반면, UVB처리 후에도 에탄올추출물 및 비텍신 처리군은 정상 세포에서 처리된 회복속도와 매우 유사하였다. UVB 처리군의 세포주기에서도 subG1을 포함하는 G1 arrest에서도 메탄올 추출물 및 물 추출물에서는 UVB 단독 처리군과 비교시 차이를 보이지 않은 반면, 에탄올추출물 및 비텍신에서는 G1이 감소 되는 것을 확인했다.

비텍신의 상처회복 및 세포주기의 조절은 AKT의 조절이라고 생각되며, 이와 유사하게 UVB를 조사 후 ERK/AKT 또는 PI3K/AKT를 증가시키는 물질을 통해 손상을 극복하였다[34, 35]. UVB 처리시 세포내 손상이 발생되며 오토파지의 증가를 보이는데 세포의 사멸을 극복하는 방안으로 오토파지를 억제하는 매커니즘이 보고되었고, HDF 세포에서 천연물을 포함한 포도

프로텍틴의 사용이 UVB에 의한 손상을 오토파지 생성을 억제하여 세포보호 효과를 보고한 바 있다[36]. 특히, 비텍신의 상처회복 및 세포주기가 AKT에 의한 조절 및 오토파지에 관련된 내용인지 추가 실험이 필요했으며, 마이크로어레이에서 오토파지 인자들이 조절된 것은 UVB 보호 효과에서 오토파지 관련 인자가 영향을 미치는 것으로 보인다.

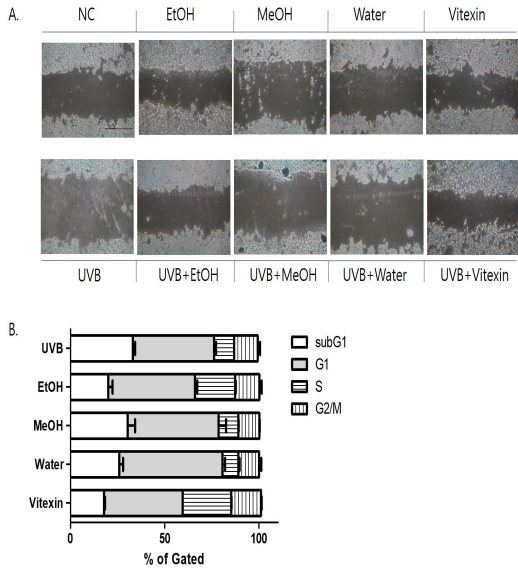


Fig. 3. Proliferative activity of Fagopyrum esculentum extract and vitexin in HDF cells in wound healing model and cell cycle.

(A) Growth in wound healing were measured using visual picture with UVB (400 mJ/cm²), F. esculentum (10 μg/mL) and vitexin (20 μM). (B) Cell Cycle FACS analysis were UVB, F. esculentum and vitexin.

3.4 메밀 에탄올추출물 및 비텍신의 오토파지 감소

메밀 추출물 및 비텍신을 이용한 오토파지를 LC3를 형성하는 녹색 형광 시그널(GFP)을 figure 4A 및 4B에서 나타냈다. UVB 처리 시 오토파지 스팟(puncta)이 현저하게 증가 되는 반면(p<0.001), 에탄올추출물 및 비텍신 처리 시 LC3 스팟이 감소 된 것을 확인할 수 있었다(p<0.001). UVB를 처리 시 일부 세포에서 오토파지 현상이 심하게 일어나면서 사멸하는 세포를 일부 확인하였으며, 사멸한 세포를 이용하여 형광현미경을 통해 확인했을 때 오토파지가 심하게 나타나는 것을 확인했다(data not shown).

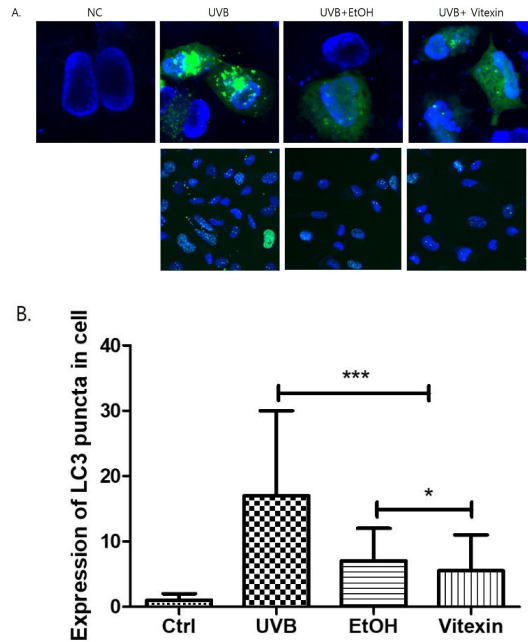


Fig. 4. GFP-LC3 fluorescent signal (green) expressed Fagopyrum esculentum extract and vitexin in HDF cells.

(A) UVB-induced autophagic cells displayed punctate cytoplasmic LC3 distribution, in contrast to diffuse nuclear and cytoplasmic localization. Fluorescently tagged protein co-localized with staining obtained with anti-LC3 (B) UVB-induced GFP-LC3 puncta change detected with UVB (400 mJ/cm²), F. esculentum (10 μg/mL) and vitexin (20 μM).

오토파지와 관련 있는 ATG 유전자들이 오토파고솜을 만들어 오토파지 식세포작용을 시작한다. 이때 오토파고솜 막으로 ATG 단백질들이 모이면서 막의 신장(elongation)이 일어난다[2]. ATG 유전자들에 의해 오토파고솜이 만들어지면 LC3를 제외한 나머지 ATG 유전자들은 오토파고솜에서 분리되기 때문에 LC3는 오토파고솜의 마커로 사용된다. LC3-GFP는 LC3에 녹색 형광을 띄는 단백질을 같이 발현하도록 하여 형광현미경으로 관찰할 수 있는 시스템으로 오토파지를 확인하는 진단시스템으로 많이 이용된다[32]. 오토파지는 다양한 질병에서 주요한 타겟이 된다. 오토파지는 외부의 침입 또는 손상이 발생한 세포로부터 다른 세포를 보호하기 위한 시스템으로 제거하고자 하는 물질을 오토파고솜으로 둘러싸 리포솜과 결합하여 물질을 제거한다. 외부환경에 의한 손상이 세포에 치명적인 영향을 주지 않으면, 오토파지는 형성되지 않으며 DRAM1에서 손상을 인지하고 오토파지의 작용을 개시할 수 있다[37].

하지만, UVB 처리 시 증가 되는 손상을 비텍신이 보호한 것으로 보이며, 오토파지의 생성이 현저하게 감소된 것을 확인했다. UVB에 의한 DRAM1의 증가가 단백질 수준에서 조절될 수 있는지 확인할 필요성이 있다.

3.5 DRAM1을 통한 오토파지 단백질 변화 및 메틸 에탄올추출물과 비텍신의 오토파지 감소 관련 단백질 분석

HEK293T 세포에서 DRAM1 plasmid를 이용하여 DRAM1단백질을 세포내 증가시킨 후 오토파지 관련 단백질을 분석한 결과 DRAM1이 증가 되면 Beclin-1 및 LC3 I/II 가 증가 되는 것을 확인하였고, 오토파지를 억제하는 p-mTOR는 감소하고, 아포토시스를 조절하는 수 있는 Bcl-2도 감소하였다. 또한, 세포 생존에 영향을 주는 p-AKT 및 Survivin도 감소를 figure 5 A 및 5B에 나타냈다.

메틸 추출물 및 비텍신을 이용한 실험에서도 타겟 단백질은 DRAM1이 마이크로어레이 결과와 유사하게 비텍신에서 감소 되었으며, Beclin-1 및 LC3 I/II 모두 비텍신 처리군에서 감소하였다. p-mTOR 및 Survivin 은 에탄올 추출물 및 비텍신에서 모두 증가 되었으며, Bcl2는 에탄올추출물에서만 증가 되는 것을 알 수 있었다. Bcl2의 증가는 비텍신 이외의 물질이 조절하는 것으로 판단된다.

비텍신에 대한 오토파지 연구는 Beclin1을 억제하는 것으로 보고된 바 있으며, 억제된 Beclin1을 통해 Bcl-2 결합을 억제하여 오토파지 및 아포토시스를 억제하는 것으로 알려졌다[38]. Beclin1/Bcl-2 결합은 마우스를 이용한 동물실험에서 오토파지를 일으키는 안전하고 효과적인 생체조절을 할 수 있는 메커니즘이지만[39], 본 연구에서 비텍신이 조절하는 오토파지는

Beclin1/ Atg14/ VPS34/ VPS15 에 의한 것으로 보이며 오히려 Bcl-2의 발현은 Beclin1과 반대로 작용한 것을 알 수 있다.

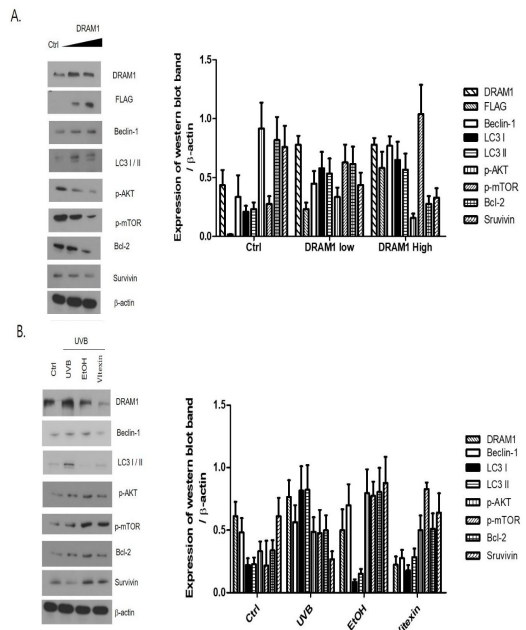


Fig. 5. Protein expression levels of LC3 marker and signal changing.

(A) Associations among the target pathway-associated genes and corresponding protein levels were analysed following treatment with DRAM1 plasmid expression. (B) Associations corresponding protein levels were analysed following treatment in HDF cells with UVB (400 mJ/cm²), F. esculentum ethanol extract (10 μg/mL) and vitexin (20 μM).

4. 결론

메틸을 이용한 에탄올, 메탄올, 물 추출물 및 메틸 대표물질 비텍신을 이용하여, UVB에 의한 손상 개선에 대한 마이크로어레이, 세포 증식, 세포 상처 회복, 세포 주기, 마이크로파지 양상 및 단백질 분석한 결과는 다음과 같다. 마이크로어레이 결과는 DRAM1, Atg2a 및 Atg13 유전자에서 UVB에 의해 증가 된 양상을 메틸 에탄올추출물 및 비텍신에서 감소시켰다. 세포 증식, 세포 상처 회복, 세포주기 및 마이크로파지 양상에서 메틸 에탄올추출물 및 비텍신에서 개선되었으며, 메틸 에탄올추출물 및 비텍신은 단백질 분석에서 DRAM1, Beclin-1 및 LC3 I/II 모두 비텍신 처리군에서 감소하였고, p-mTOR 및 Survivin은 모두 증가 되었다.

기존 비텍신 연구논문에서는 Beclin1억제를 통한 오토파지의 감소를 다루고 있으나, UVB에 의한 손상에서 메틸의 대표물질인 비텍신은 DRAM1, Atg2a 및 Atg13을 같이 컨트롤 하는 것, 세포 증식, 세포 상처 회

복 및 세포주기를 정상으로 회복하는 것, UVB에 의한 세포 노화 발생원인 중 하나인 오토파지를 조절하여 세포의 사멸억제 및 재생한다는 점에서 기능성 화장품 성분으로 활용할 수 있는 것으로 사료된다.

REFERENCES

- [1] C. Ji et al. (2012). *Perifosine sensitizes UVB-induced apoptosis in skin cells: new implication of skin cancer prevention? Cell Signaling*, 24(9), 1781-1789.
DOI : 10.1016/j.cellsig.2012.05.003
- [2] D. Denton & S. Kumar. (2019). *Autophagy-dependent cell death. Cell death and Differentiation*, 26(4), 605-616.
DOI : 10.1038/s41418-018-0252-y
- [3] H. She, Y. He, Y. Zhao & Z. Mao. (2018). *Release the autophagy brake on inflammation: The MAPK14/p38alpha-ULK1 pedal. Autophagy*, 14(6), 1097-1098.
DOI : 10.1080/15548627.2018.1446626
- [4] K. Jo, G. Y. Bae, K. Cho, S. S. Park, H. J. Suh & K. B. Hong. (2020). *An Anthocyanin-Enriched Extract from Vaccinium uliginosum Improves Signs of Skin Aging in UVB-Induced Photodamage. Antioxidants (Basel)*, 9(9), 844.
DOI : 10.3390/antiox9090844
- [5] E. H. Jeong, H. Yang, J. E. Kim & K. W. Lee. (2020). *Safflower Seed Oil and Its Active Compound Acacetin Inhibit UVB-Induced Skin Photoaging. JMB Journal of Microbiolog and Biotechnology*, 30(10), 1567-1573.
DOI : 10.4014/jmb.2003.03064
- [6] J. Zhong & L. Li. (2016). *Skin-Derived Precursors against UVB-Induced Apoptosis via Bcl-2 and Nrf2 Upregulation. BioMed Research International*, 2016(6894743).
DOI : 10.1155/2016/6894743
- [7] J. Y. Wang, P. H. Lu, W. W. Lin, Y. H. Wei, L. Y. Chiu, S. R. Chern, C. Hung & N. L. Wu. (2020). *Galectin-3 regulates UVB-induced inflammation in skin. Journal of Dermatological Science*, 98(2), 119-127.
DOI : 10.1016/j.jdermsci.2020.03.007
- [8] M. Boichuck, J. Zorea, M. Elkabets, M. Wolfson & V. E. Fraifeld. (2019). *c-Met as a new marker of cellular senescence. Aging (Albany NY)*, 11(9), 2889-2897.
DOI : 10.18632/aging.101961
- [9] T. Lu, Z. Zhu, J. Wu, H. She, R. Han, H. Xu & Z. H. Qin. (2019). *DRAM1 regulates autophagy and cell proliferation via inhibition of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mTOR-ribosomal protein S6 pathway. Cellular Communications and Signalling*, 17(1), 1-15.
DOI : 10.1186/s12964-019-0341-7
- [10] S. W. Bark & H. S. Kim. (2020). Effects of Mung Bean (*Phaseolus aureus* L.) Supplementation on BUN and Hepatic Functional Enzyme Activities in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Journal of Environmental Science International*, 29(4), 351-359.
- [11] C. S. Lee & I. H. Han. (2019). *Physiological Activities of Water and 80% Ethanol Extracts of Various Coffee Bean Residues. Korean Journal of Food and Cookery Science*, 35(6), 591-600.
- [12] B. R. Sim, Y. S. Nam & J. B. Lee. (2019). *Regulation of Wnt/ β -catenin Signal Transduction in HT-29 Colon Cancer Cells by a Rhododendron brachycarpum Fraction. Journal of Life Science*, 29(8), 871-878.
DOI : 10.5352/JLS.2019.29.8.871
- [13] T. Storm et al. (2020). A Semiautomated, Phenotypic, In Vitro Scratch Assay for Assessing Retinal Pigment Epithelial Cell Wound Healing. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 36(4), 257-266.
DOI : 10.1089/jop.2019.0116
- [14] E. Shvets & Z. Elazar. (2008). Autophagy-independent incorporation of GFP-LC3 into protein aggregates is dependent on its interaction with p62/SQSTM1. *Autophagy*, 4(8), 1054-1056.
- [15] C. Chen et al. (2018). *DRAM1 regulates the migration and invasion of hepatoblastoma cells via autophagy-EMT pathway. Oncology Letters*, 16(2), 2427-2433.
DOI : 10.3892/ol.2018.8937
- [16] Meijer. AH & van der Vaart. M. (2014). *DRAM1 promotes the targeting of mycobacteria to selective autophagy. Autophagy*, 10(12), 2389-2391.
DOI : 10.4161/15548627.2014.984280
- [17] Xu. T. Denton. D & Kumar. S. (2019). *Hedgehog and Wingless signaling are not essential for autophagy-dependent cell death.. Biochemical Pharmacology*, 162(3-13).
DOI : 10.1016/j.bcp.2018.10.027
- [18] B. Zhou, J. Liu, R. Kang, D. J. Klionsky, G. Kroemer & D. Tang. (2020). *Ferroptosis is a type of autophagy-dependent cell death. Seminars in*

- Cancer Biology*, 66, 89-100.
DOI : 10.1016/j.semcancer.2019.03.002
- [19] Y. Lu, T. Yu, J. Liu & L. Gu. (2018). *Vitexin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by controlling the Nrf2 pathway*. *PLoS One*, 13(4), e0196405.
DOI : 10.1371/journal.pone.0196405
- [20] M. Hu, F. Li & W. Wang. (2018). *Vitexin protects dopaminergic neurons in MPTP-induced Parkinson's disease through PI3K/Akt signaling pathway*. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 565-573.
DOI : 10.2147/DDDT.S156920
- [21] S. Inamdar, A. Joshi, S. Malik, R. Boppana & S. Ghaskadbi. (2019). *Vitexin alleviates non-alcoholic fatty liver disease by activating AMPK in high fat diet fed mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 519(1), 106-112.
DOI : 10.1016/j.bbrc.2019.08.139
- [22] K. Ganesan, K. M. Ramkumar & B. Xu. (2020). *Vitexin restores pancreatic beta-cell function and insulin signaling through Nrf2 and NF-kappaB signaling pathways*. *European Journal of Pharmacology*, 888, 173606.
DOI : 10.1016/j.ejphar.2020.173606
- [23] F. Mangili et al. (2020). *Beta-arrestin 2 is required for dopamine receptor type 2 inhibitory effects on AKT phosphorylation and cell proliferation in pituitary tumors*. *Neuroendocrinology*.
DOI : 10.1159/000509219
- [24] L. Xi et al. (2020). *SIRT1 promotes pulmonary artery endothelial cell proliferation by targeting the Akt signaling pathway*. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(6), 179.
DOI : 10.3892/etm.2020.9309
- [24] J. Yang, P. Cron, V. M. Good, V. Thompson, B. A. Hemmings, & D. Barford. (2002). *Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP*. *Nature Structural and Molecular Biology*, 9(12), 940-944.
DOI : 10.1038/nsb870
- [26] A. Z. El-Hashim, M. A. Khajah, K. Y. Orabi, S. Balakrishnan, H. G. Sary & A. A. Abdelali. (2020). *Onion Bulb Extract Downregulates EGFR/ERK1/2/AKT Signaling Pathway and Synergizes With Steroids to Inhibit Allergic Inflammation*. *Frontiers in Pharmacology*, 11.
DOI : 10.3389/fphar.2020.551683
- [27] X. J. Chen et al. (2019). *Ginkgo biloba extract-761 protects myocardium by regulating Akt/Nrf2 signal pathway*. *Drug Design, Development and Therapy*, 13, 647-655.
DOI : 10.2147/DDDT.S191537
- [28] X. L. Cui et al. (2019). *Extract of Cycas revoluta Thunb. enhances the inhibitory effect of 5-fluorouracil on gastric cancer cells through the AKT-mTOR pathway*. *World Journal of Gastroenterology*, 25(15), 1854-1864.
DOI : 10.3748/wjg.v25.i15.1854
- [29] A. S. Gary & P. J. Rochette. (2020). *Apoptosis, the only cell death pathway that can be measured in human diploid dermal fibroblasts following lethal UVB irradiation*. *Scientific Reports*, 10(1), 18946.
DOI : 10.1038/s41598-020-75873-1
- [30] Godar. DE. Miller. SA & Thomas. DP. (1994). *Immediate and delayed apoptotic cell death mechanisms: UVA versus UVB and UVC radiation*. *Cell Death and Differentiation*, 1(1), 59-66. DOI :
- [31] Yoshizumi. M. Nakamura. T. Kato. M. Ishioka. T. Kozawa. K. Wakamatsu. K & Kimura. H. (2008). *Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes*. *HaCaT. Cell Biology International*, 32(11), 1405-1411.
DOI : 10.1016/j.cellbi.2008.08.011
- [32] D. Hao et al. (2019). *Sanshool improves UVB-induced skin photodamage by targeting JAK2/STAT3-dependent autophagy*. *Cell Death and Disease*, 10(1), 1-13.
DOI : 10.1038/s41419-018-1261-y
- [33] J. K. Kim et al. (2012). *5,7-Dimethoxyflavone, an activator of PPARalpha/gamma, inhibits UVB-induced MMP expression in human skin fibroblast cells*. *Experimental Dermatology*, 21(3), 211-216.
DOI : 10.1111/j.1600-0625.2011.01435.x
- [34] J. Kang et al. (2008). *Extracellular matrix secreted by senescent fibroblasts induced by UVB promotes cell proliferation in HaCaT cells through PI3K/AKT and ERK signaling pathways*. *International Journal of Molecular Medicine*, 21(6), 777-784.
- [35] M. Ming et al. (2010). *UVB-induced ERK/AKT-dependent PTEN suppression promotes survival of epidermal keratinocytes*. *Oncogene*, 29(4), 492-502.
DOI : 10.1038/onc.2009.357
- [36] H. Zheng, M. Zhang, H. Luo & H. Li. (2019). *Isoorientin alleviates UVB-induced skin injury by regulating mitochondrial ROS and cellular*

autophagy. Biochemical and Biophysical Research Communications, 514(4), 1133-1139.
DOI : 10.1016/j.bbrc.2019.04.195

- [37] Z. Quan et al. (2020). *PLCε maintains the functionality of AR signaling in prostate cancer via an autophagy-dependent mechanism. Cell Death and Disease, 11(8), 716.*
DOI : 10.1038/s41419-020-02917-9
- [38] M. Bhardwaj et al. (2018). *Vitexin induces apoptosis by suppressing autophagy in multi-drug resistant colorectal cancer cells. Oncotarget, 9(3), 3278-3291.*
DOI : 10.18632/oncotarget.22890
- [39] L. Zhang, Q. Feng, Z. Wang, P. Liu & S. Cui. (2019). *Progesterone receptor antagonist provides palliative effects for uterine leiomyoma through a Bcl-2/Beclin1-dependent mechanism. Bioscience Reports, 39(7).*
DOI : 10.1042/BSR20190094

변 서 정(Seo-Jung Byun)

[정회원]



- 2003년 8월 : 숙명여자대학교 피부 미용학과(가정학사)
- 2017년 2월 : 건국대학교 생물공학과(이학석사)
- 2019년 2월 : 건국대학교 생물공학과 박사수료

- 2019년 2월 ~ 현재 : 피엘코스메틱 교육강사
- 관심분야 : 화장품, 미용
- E-Mail : betty-byun@hanmail.net

강 상 모(Sang-Mo Kang)

[정회원]



- 1975년 2월 : 건국대학교 미생물공학과 졸업
- 1987년 3월 : 오오사카대학 석사
- 1990년 3월 : 오오사카대학 박사
- 1990년 9월 : 건국대학교 생물공학과 교수 ~ 현재

- 관심분야 : 생물공학과
- E-mail : kangsm@konkuk.ac.kr

조 영 재(Young Jae Cho)

[정회원]



- 2016년 2월 : 건국대학교 생물공학과 학사
- 2018년 2월 : 건국대학교 생물공학과 석사
- 2021년 2월 : 건국대학교 생물공학과 박사

- 2020년 3월 ~ 현재 : 경동대학교 강사
- 관심분야 : 화장품
- E-Mail : skinhaircosme@naver.com