

## Effect of *Cnidium japonicum* Miq. Crude Extracts on UVB-induced Photoaging Damage in Human Keratinocytes

Eun Seong Lee<sup>1</sup>, Jung Hwan Oh<sup>2</sup>, Chang-Suk Kong<sup>2,3</sup> and Youngwan Seo<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Ocean Science and Technology School, Korea Maritime & Ocean University, Busan 49112, Korea

<sup>2</sup>Marine Biotechnology Center for Pharmaceuticals and Foods, College of Medical and Life Sciences, Silla University, Busan 46958, Korea

<sup>3</sup>Department of Food and Nutrition, Silla University, Busan 46958, Korea

<sup>4</sup>Division of Convergence on Marine Science, Korea Maritime & Ocean University, Busan 49112, Korea

Received March 2, 2023 /Revised April 6, 2023 /Accepted May 9, 2023

*Cnidium japonicum* (*C. japonicum*) is a type of halophyte that inhabits soil of a high salinity, and according to previous studies, it is known to have antitumor effects. However, the skin's protective effect, particularly against UVB irradiation, has not been revealed. In this study, *C. japonicum* crude extract was studied to determine its effect on damage to human keratinocytes (HaCaT) induced by UVB irradiation, and ROS assays were performed, the results of which showed that *C. japonicum* crude extract affects UVB-induced photoaging damage in human keratinocytes. To examine inhibitory effects against the expressions of MMPs, RT-PCR and Western blot assay were performed by treating the crude extract at concentrations of 10, 50, and 100 µg/ml by irradiating UVB at 15 mJ/cm<sup>2</sup>. As a result, it was confirmed that the mRNA and protein expression levels of MMP-1, MMP-3, and MMP-9 decreased in the group treated with *C. japonicum* crude extract, which also effectively regulated the antioxidant defense mechanism pathway by activating JNK, ERK, and p38. In conclusion, the current study suggested the possibility that *C. japonicum* could be used as a raw material for anti-photoaging cosmeceuticals in the future.

**Key words :** *Cnidium japonicum*, human keratinocytes, MMPs, photoaging damage, UVB

### 서론

염생식물은 염분함량이 높은 토지에서 자라는 식물로서 해안의 사구 또는 갯벌 등의 환경에서 염에 내성을 가지고 자생하는 식물이다. 육상식물과는 다르게 대부분의 염생식물들은 흡수된 염분을 배출하거나 세포의 삼투압을 유지하는 적응방식을 공유하여 염분에 대한 저항력을 가지고 있는 식물로 알려져 있다[17, 28]. 염생식물의 높은 염분함량은 식물조직에 높은 산화스트레스를 유도한다. 산화스트레스는 조직내 기체 교환 감소를 초래하여 잎 조직에 이산화탄소 공급을 줄이고, 결국에는 광합성 전자 전달을 감소시키기 때문에 superoxide 음이온, 과산화수소 및 hydroxyl radical과 같은 다양한 활성 산소종의 생성을 유도한다고 알려져 있다[1]. 따라서 염생식물들은

높은 염분함량 유래 산화스트레스에 저항하기 위해 효소 체계발달 등에 의한 독특한 항산화 기작을 발전시켜 왔으므로 특이한 항산화 물질 또한 가질 가능성이 높을 것으로 여겨져 왔다[5]. 이를 뒷받침하는 연구로 염생식물인 *Hordeum marinum*과 같은 속이지만 일반 식물인 *H. vulgare*의 항산화능 비교 결과 염생식물인 *H. marinum*의 항산화능이 높았으며, 염생식물인 *Cakile maritima*와 일반식물의 항산화능 비교결과 일반식물에 비해 *C. maritima*의 항산화능이 높게 나왔다[3, 8, 15]. 본 연구에 사용된 갯사상자 역시 전라남도 보성군 해안가에서 채집한 염생식물이며 갯사상자의 열매인 사상자의 성분에 관한 연구를 살펴보면 ethanol 추출물로부터 불활성 휘발성분으로서 sesquiterpene acetate인 torilin이 주요 화합물로 분리되었고[6], benzene 추출물에서 torilolide, oxytorilolide가 분리되었다. 그 밖에 많은 sesquiterpenoid 화합물, essential oils과 hemiterpenoid 화합물 등의 성분이 보고되었다[13, 30]. 사상자에 함유된 주요 성분으로 많은 연구가 진행되고 있는 것은 guaiane type sesquiterpene 화합물인 torilin으로 그 활성에 관한 연구 보고로는 진통 소염작용[6], anti-angiogenic activity, hepatoprotective activity 및 testosterone 5 $\alpha$ -reductase inhibitory activity 등이 보고되었다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-410-4328, Fax : +82-51-404-4750

E-mail : ywseo@kmou.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.

최근 친환경적 소비추세에 따라 화장품에 들어가는 성분도 동식물 유래의 천연물이 그 효과를 기반으로 다양한 형태로 화장품에 배합되어 사용되고 있다. 특히 식물성 원료에서 해양원료에 이르기까지, 환경 친화적인 천연 소재를 이용한 화장품 개발 및 천연화장품의 수요가 늘어나고 있다[33]. 피부에 영향을 주는 요인으로는 연령 증가에 따른 노화뿐만 아니라 환경적 요인인 자외선의 영향을 많이 받는다. 자외선은 파장범위 200-400 nm인 빛으로 UVA, UVB, UVC로 크게 구분하는데, 이 중 UVC는 100-280 nm의 짧은 파장으로 오존층에 흡수되어 지표면으로 도달할 수 없고 UVA와 UVB만이 지표면에 도달하여 피부에 영향을 미치게 된다[14, 25]. UVA는 320-400 nm의 파장을 가지며 피부의 진피, 피하지방층까지 도달하여 피부 홍반과 색소침착을 유발하고, 280-320 nm의 파장인 UVB는 단시간 내에 표피와 진피의 모세혈관까지 침투하여 피부 단백질 합성을 억제하고 피부 홍반, 일광화상을 입히며 멜라닌 색소를 만들어 색소침착을 유발한다[9, 23, 27].

자외선으로부터 발생하는 광노화 및 광손상은 인체에 유해 활성 산소종의 생성을 증가시키며, 활성산소의 발생은 세포 내 구조적 손상을 유도하고 세포자멸 등의 세포 기능을 조절하는 신호전달에 관여하는 MAPKs를 활성화하여 세포 증식, 분화, 사멸 등에 관여하는 유전자의 전사를 조절하게 된다[22, 32]. 이는 세포 증식, 사멸을 조절하는 p38 kinase와 JNK (c-Jun N-terminal kinase), 세포의 증식과 분화에 관여하는 ERK (Extracellular signal regulated kinase)가 인산화되면 신호 단백질 AP-1 (Activator protein-1)의 전사를 유도한다[7, 10, 16]. 그 결과 피부의 구성 성분인 collagen이나 elastin이 감소하는 원인이 되는 MMP (Matrix metalloproteinase)의 발현을 촉진하고, collagen의 합성과 변형을 줄여 피부 탄력의 감소와 주름을 일으켜 피부의 노화, 손상을 유발한다[12, 26]. 세포외기질을 손상시키는 인자인 MMPs는 약 26종으로 분류되며 그 중 노화에 관련된 인자인 MMP-1, MMP-3 및 MMP-9만이 UV에 의하여 증가한다[11]. MMP-1은 collagenase로 세포외기질 단백질과 collagen을 분해하고 MMP-3는 기저막의 콜라겐 유형 II, III, IV, IX, X 및 proteoglycan, elastin 등을 분해한다. MMP-9 또한 세포외기질 단백질이나 콜라겐을 분해한다고 알려져 있다[12, 29].

갯사상자(*Cnidium japonicum*)는 산형화목 산형과의 해안 사구에서 자라는 두해살이풀에 속하며, 뿌리는 1개가 깊게 들어가며 굵고 사상자에 비해서 잎이 두껍다. 줄기는 위로 자라지 않고 지면에 붙어 방사상으로 뻗으면서 자라나며 식물 전체에 독특한 향기가 있다. 한국에서는 주로 동해안의 해안 사구와 남부지역의 남해안과 서해안의 해안 사구에 분포한다. 갯사상자의 유사종인 사상자의 약리효과로는 간세포 보호작용, 항암작용 등의 다양한 생

리활성을 나타내는 것으로 연구되어 있다[31]. 그러나 갯사상자에 대한 광노화 보호 효과에 관한 연구는 아직 미미한 실정이다. 이에 본 연구에서는 갯사상자 조추출물이 산화스트레스에 미치는 영향과 UVB 유래 광손상에 미치는 효과와 그 작용기전에 관한 연구를 수행하여 화장품 소재로의 개발 가능성을 탐색하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구에 사용된 갯사상자(*Cnidium japonicum* Miq.)는 전라남도 보성군에서 채집하였다. 자연 건조한 시료를 Methylene chloride (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)로 24시간 동안 2회 침지하여서 비극성도가 높은 물질들을 우선 추출하였고 그 이후 Methanol를 이용하여 동일한 방법으로 극성도가 높은 물질들을 2회 추출하였다. 이후에는 각각의 추출물을 여과하여 농축한 뒤 합해 조추출물로 이용하였다.

### 세포배양

Human keratinocyte HaCaT세포는 10% fetal bovine serum (FBS)과 100 unit/ml penicillin-streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, WELGENE, Korea)을 배양액으로 하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 배양하였다.

### 세포생존율 측정

시료에 대한 세포의 생존율을 측정하기 위해서 배양된 HaCaT cell을 5×10<sup>3</sup> cells/well이 되도록 96 well plate에 분주하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건에서 24시간 배양하였다. 그 후 갯사상자 조추출물을 농도별로 처리하였으며, 대조군으로는 phosphate buffered saline (PBS, BYLABS, Korea)를 처리하여 24시간 동안 동일조건으로 배양하였다. 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide (MTT, fc. 1 mg/ml) 용액을 넣어 4시간 동안 동일한 조건에서 배양하여 MTT formazan crystal 형성을 유도한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 처리하여 녹인 후 ELISA reader (Bio-Tek instruments, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### UVB 조사조건 확립

HaCaT 세포를 24 well plate에 분주한 후 24시간 동안 배양한 다음, PBS로 2회 씻어내고 다시 PBS 500 μl를 첨가하여 각각 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100 mJ/cm<sup>2</sup> 의 UVB (280 nm UVB light source, Bio-Sun lamp, France)를 조사하였다. 이때 positive control에는 UVB를 조사하지 않았다. UVB 조사 후 serum-free DMEM 배지로 교환하여 동일한 배양 조건에서 24시간 동안 배양하여 실험을 진행하였다. 배양

후 MTT formazan crystal 형성을 유도하기 위해 MTT (1 mg/ml) 용액을 넣어 4시간 동안 동일한 조건에서 배양한 뒤 DMSO를 처리하여 녹인 후 ELISA reader (Bio-Tek instruments, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Intracellular Reactive oxygen species (ROS) 측정

세포 내 free radical 생성은 DCFH-DA assay로 측정하였다. DCFH-DA (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, sigma)는 세포 내 활성산소와 반응해 형광물질을 만드는데 이 시약을 처리해 발생하는 형광을 측정함으로써 세포 내 활성산소의 농도를 측정할 수 있다. HaCaT 세포를 Black 96 well plate에 분주한 후 24시간 배양한 뒤 20  $\mu$ M DCFH-DA를 20분간 처리 후 시료를 농도별로 가하여 1시간 동안 배양한 뒤 PBS로 세척하였고, 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하였다. 30분 간격으로 0-120분 동안 excitation 485 nm과 emission 530 nm에서 형광도를 측정하였으며, 시료와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 ROS 소거능을 평가하였다.

#### Proliferation assay

HaCaT 세포를 12 well plate에 배양한 후 24시간 뒤에 UVB 15 mJ/cm<sup>2</sup>을 조사하고 갯사상자 추출물을 10, 50, 100  $\mu$ g/ml 조사한 뒤 24시간 뒤에 MTT (1 mg/ml) 용액을 넣어 4시간 동안 동일한 조건에서 배양한 뒤 DMSO를 처리하여 녹인 후 ELISA reader (Bio-Tek instruments, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성은 UVB를 조사하지 않은 대조군과 UVB를 동일조건으로 조사한 뒤 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 평가하였다.

#### RT-PCR

HaCaT 세포를 동일한 조건에서 배양한 후 QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN Sciences, USA)를 이용해 total RNA를 추출하여 정량하였다. 분리된 RNA는 역전사반응을 실시하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 MMP-1, MMP-3 및 MMP-9 primer를 첨가하였으며, control로  $\beta$ -actin을 사용하였다. T 100 Thermal Cycle (Bio-Rad, CA, USA)를 이용해 95°C 용에서 2분간 denaturation한 뒤 95°C 용에서 30초간 denaturation, 60°C 초에서 45초간 annealing, 75°C에서 extension 과정을 30 cycle 반복함으로써 증폭시킨 뒤 4°C에서 종결하였다. 합성한 cDNA는 TAE buffer (BYLABS, Korea)를 전해질로 사용한 1.5% agarose gel을 이용해 5분간 전기영동 후 Ethidium bro-amide (EtBr, AMRESCO, USA)용액에 넣고 20분간 염색 후 UV (Davinch-Chemi TM imager, CAS-400SM, USA)를 이용해 mRNA 발현을 확인하였다.

#### Western blot assay

HaCaT 세포를 6 well plate에 분주하고 24시간 동안 동일한 조건에서 배양한 뒤 PBS로 2회 세척 후 UVB를 조사한 후에 serum free DMEM 배지를 넣고 Sample을 농도별로 처리하여 동일한 조건에서 24시간 동안 배양한다. RIPA Buffer (Sigma-Aldrich Co., USA)로 균질화한 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 상등액을 얻었다. 이후 BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였으며, 동일 양의 단백질(6  $\mu$ g)은 SDS-PAGE법을 통해 전기영동 후 분리하여 Nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences, Germany)에 transfer한 후 5% skim milk에서 1시간 동안 blocking 하였다. TBS-T buffer (BYLABS, Korea)로 10분간 3회 세척하고 1차 항체는 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. TBS-T buffer로 10분간 3회 세척한 후 2차 항체를 처리하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 다시 TBS-T buffer로 10분간 3회 세척한 다음 detection solution (ECL solution)에 반응시킨 후 이미지 분석장치(Davinch-Chemi TM imager, CAS-400SM, Korea)를 이용하여 protein 발현 정도를 측정하였다.

#### 통계처리

실험결과는 평균  $\pm$  표준편차(Mean  $\pm$  Standard deviation, n=3)로 표기하였고, statistical analysis system v9.1 (SAS Institute Inc., USA)를 이용하여 실험결과의 유의성을 검토하였다. 집단 간의 유의성을 알아보기 위하여 일원 배치 분산분석(One way Analysis Of Variance: ANOVA)을 실시하였고, 사후검증은 Duncan's multiple range test를 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## 결 과

#### 갯사상자 추출물의 세포 생존율

갯사상자 조추출물이 HaCaT 세포 생존에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 확인하였다(Fig. 1). HaCaT 세포에 조추출물을 농도 10, 50, 100  $\mu$ g/ml로 24시간 처리한 결과 갯사상자 조추출물은 농도 10, 50, 100  $\mu$ g/ml에서 각각 94.7%, 88.8%, 89.5%의 생존율을 나타내었다. 이 결과를 바탕으로 10, 50, 100  $\mu$ g/ml의 농도를 처리농도로 선정하여 실험을 진행하였다.

#### UVB 조사조건 확립

UV는 태양으로부터 지구에 도달하는 전자기 스펙트럼의 일부로 가시광선보다 파장이 짧아 육안으로는 보이지 않는다. 이러한 파장은 UVA, UVB, UVC로 분류되는데 그 중 UVB는 290-320 nm로 파장이 짧아 표피층에 침투했을 때 홍반 손상을 일으킬 수 있다[13, 18]. UVB를 선량별

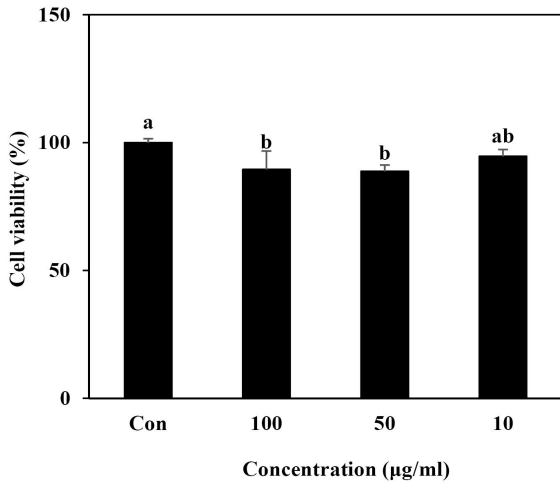


Fig. 1. Cytotoxic effects of *C. japonicum* crude extract on HaCaT cells by using the MTT analysis. The cells were treated with 10, 50, 100 µg/ml of *C. japonicum* crude extract for 24 hr. <sup>a-b</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

로 조사하여 각각 HaCaT 세포에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 확인하였다(Fig. 2). UVB의 범위를 10-100 mJ/cm<sup>2</sup>로 지정하여 HaCaT 세포에 조사한 뒤 24시간 후의 세포독성 측정 결과, UVB 조사량이 증가할수록 HaCaT 세포 생존율이 감소하는 것을 확인하였다. UVB를 조사하지 않은 대조군의 생존율을 기준으로 하여 비교한 결과, 24시간 배양 후 적용한 모든 선량 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100 mJ/cm<sup>2</sup>에서 각각 97.42%, 95.26%, 64.40%, 27.04%, 21.02%, 20.14%, 15.15%의 생존율로 점차 세포생존율이 감소하는 경향을 나타내었다. 이 결과에 따라 실험에 적

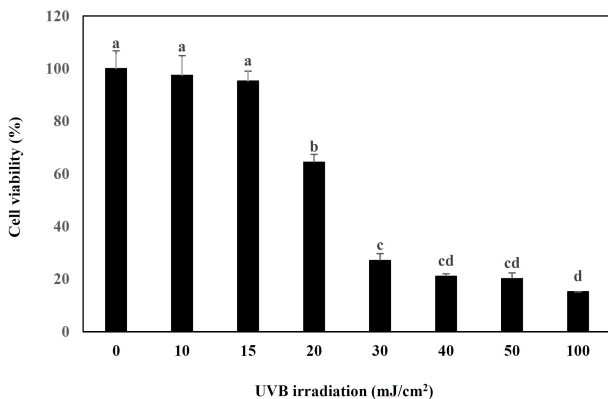


Fig. 2. HaCaT cells after 10-100 mJ/cm<sup>2</sup> UVB irradiation. Cells were tested for their viability after UVB irradiation. The cell viability was determined by MTT assay. <sup>a-d</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

용하는 24시간을 기준으로 UVB를 조사했을 때, 세포 생존율이 90% 이상인 조사량 15 mJ/cm<sup>2</sup>을 실험에 적용하여 향후 실험을 진행하였다.

**갯사상자 조추출물의 활성산소종 생성 억제 효과**

갯사상자 조추출물이 세포 내 활성산소종의 생성 억제 효과가 있는지 알아보기 위해 갯사상자 조추출물을 10, 50, 100 µg/ml의 농도로 HaCaT 세포에 처리한 후 세포 내 활성산소종을 측정하였다. 그 결과 측정시간 120분이 지남에 따라 갯사상자 조추출물을 처리하지 않은 대조군에 비해 세포 내 ROS 억제 효과를 나타냈고, 농도가 높아짐에 따라 억제 효과도 커짐을 확인하였다(Fig. 3). 따라서 조추출물이 세포를 ROS로부터 생성된 산화스트레스로부터 보호할 수 있음을 확인하였다.

**갯사상자 조추출물의 UVB로 손상된 세포보호효과**

갯사상자 추출물이 UVB로 인해 손상된 HaCaT 세포보호 효과가 있는지 알아보기 위해 HaCaT 세포에 UVB를 15 mJ/cm<sup>2</sup> 조사하고 갯사상자 추출물을 10, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리한 뒤 24시간 뒤에 세포 독성을 확인하였다. 그 결과 UVB 단독조사군에 비해 UVB 비조사군의 세포 생존율이 높게 나왔으며, 갯사상자 추출물을 처리하였을 때 UVB 비조사군보다 농도의존적으로 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

**갯사상자 조추출물이 피부노화에 미치는 영향**

갯사상자 추출물의 피부노화에 미치는 효과를 피부노화 생성 관련 인자 발현 검토를 통해 확인하였다. 세포외 기질 분해에 관여하는 인자인 MMPs는 약 26종으로 분류되어 있으며, 그 중 노화에 연관된 인자인 MMP-1과 MMP-3, MMP-9만이 UV에 의하여 증가하는 것으로 보고

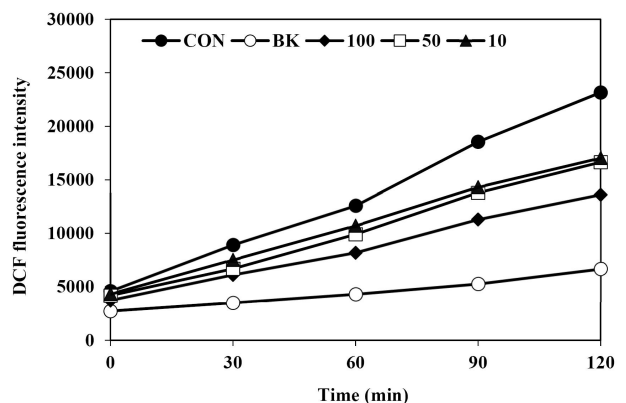


Fig. 3. Effect of *C. japonicum* crude extract on intracellular ROS generation by DCFH-DA assay. HaCaT cells were treated with DCFH-DA and exposed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. CON: with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, BK: without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

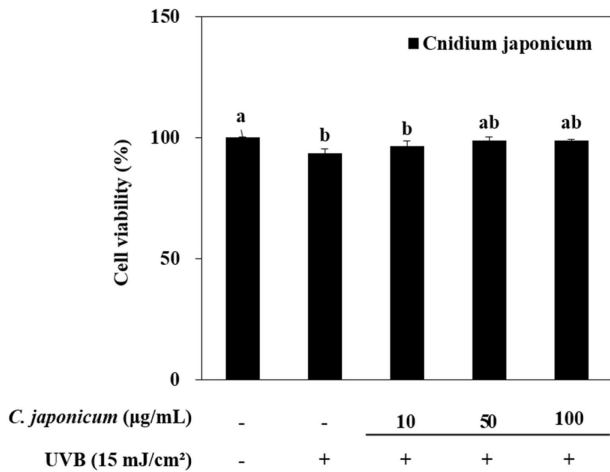


Fig. 4. Effect of *C. japonicum* crude extract on HaCaT cell viability after UVB irradiation. UVB was irradiated 15 mJ/cm<sup>2</sup>. HaCaT cells were treated with 10, 50, 100 µg/ml *C. japonicum* crude extract for 24 hr. Cell viability was determined by using the MTT analysis. <sup>a-b</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

되고 있다. Interstitial collagenase라고도 알려진 MMP-1은 주로 진피에서 가장 풍부한 구조 단백질인 피부 type 1 collagen의 분해를 담당하고, MMP-3는 세포외기질 단백질의 분해와 조직 리모델링에 관여한다. MMP-9는 세포외기질 단백질이나 collagen을 분해한다고 알려져 있다[5, 15].

본 연구에서는 갯사상자 추출물이 피부노화에 영향을 미치는 MMPs가 mRNA발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-PCR을 진행하였다. 그 결과 UVB비조사군에 비해 UVB 단독 조사군에서 MMP-1, MMP-3, MMP-9의 mRNA발현이 증가하였으며, 갯사상자 추출물을 처리하였을 때 MMPs의 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 또한 Western blot 실험을 통해 갯사상자 조추출물이 UVB 조사로 유도된 MMPs 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, UVB 비조사군에 비해 UVB 단독 조사군에서 MMP-1, MMP-3, MMP-9의 protein 발현이 증가하였으나, 갯사상자 조추출물을 처리하였을 때 농도의존적으로 UVB 단독 조사군보다 MMPs의 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

갯사상자 조추출물이 MAPK 신호전달경로에 미치는 효과 노화에 관여하는 MMPs는 자외선 자극에 따라 MEK/MAPK 인산화 기전을 통하여 단백질의 전사가 일어나는 것으로 알려져 있다[11]. UVB 자극은 ERK, JNK 및 p38 kinase의 인산화를 활성화시키고, 활성화된 MAPK kinase는 핵 내로 translocation 되는 전사 인자의 양을 증가시킨다. 그 결과 MMP-1, MMP-3 및 MMP-9과 같은 단백질의

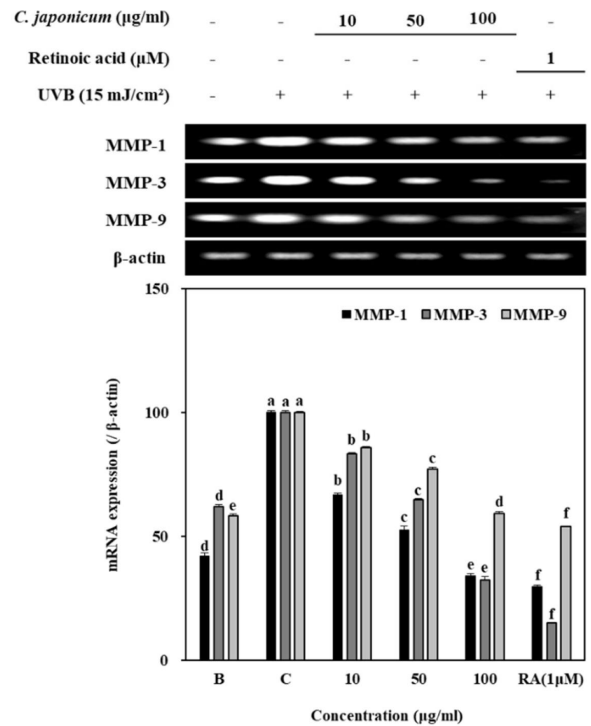


Fig. 5. Effect of *Cnidium japonicum* crude extract on mRNA expression levels of MMP-1, MMP-3 and MMP-9 in HaCaT cells exposed with 15 mJ/cm<sup>2</sup> of UVB. <sup>a-f</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

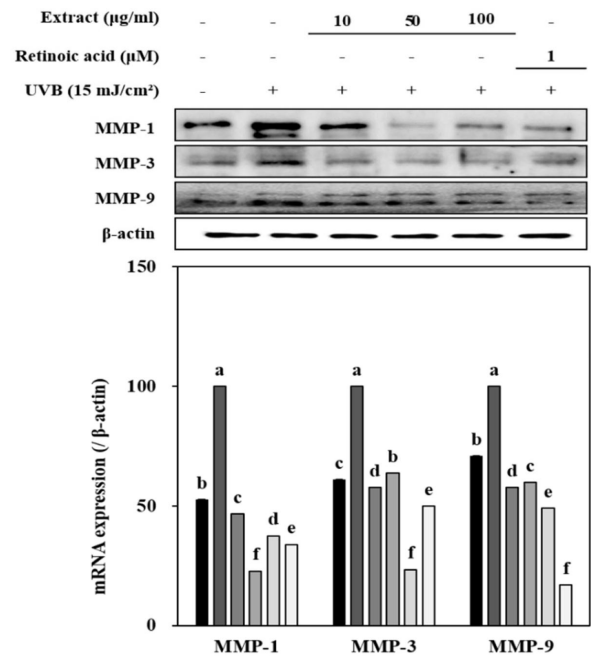


Fig. 6. Effect of *Cnidium japonicum* crude extract on protein expression levels of MMP-1, MMP-3 and MMP-9 in HaCaT cells exposed with 15 mJ/cm<sup>2</sup> of UVB. <sup>a-f</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

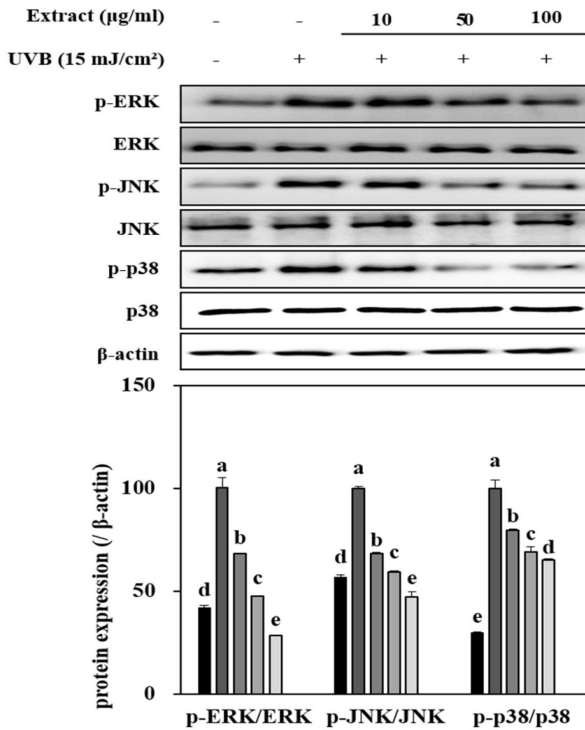


Fig. 7. Effect of *C. japonicum* crude extract on protein expression levels of ERK, JNK and p-38 MAPK phosphorylation in HaCaT cells exposed with 15 mJ/cm<sup>2</sup> of UVB. <sup>a-e</sup>Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

전사를 촉진하여 세포외기질 단백질이나 collagen 분해를 유발하게 된다[11]. 갯사상자 조추출물의 MMP 발현 억제 효과가 MAPKs 신호전달에 의한 것인지 알아보기 위하여 조추출물을 농도별로 처리한 후 UVB 15 mJ/cm<sup>2</sup>을 조사하여 Western blot 실험을 진행하였다(Fig. 7). UVB 비조사군에 비해 UVB 단독 조사군에서 ERK, JNK 및 p38의 인산화 증가됨을 확인하였으며, 갯사상자 추출물을 처리하였을 때 추출물의 농도가 높을수록 인산화를 감소시키는 것을 확인하였다. 이는 UVB 조사로 유도된 MAPKs 인자에서 ERK, JNK 및 p38의 인산화를 억제시킴으로써 갯사상자 조추출물이 세포를 보호하는 효과를 가지는 것으로 확인하였다.

### 고 찰

현대의학의 발달로 평균수명이 늘어나면서 인간은 단순히 오래 사는 것이 아니라 건강한 삶을 살아가는 것에 대한 관심이 높아지고 있다. 그 중 자외선으로 인한 피부 질환과 노화는 현대인에게 있어 중요한 관심거리로 여겨진다. 친환경적인 소비추세에 따라 소비자들은 부작용이 적으면서 항노화, 피부재생 등의 기능을 가진 천연소재를

이용한 제품에 대한 관심도가 증가하고 있고 그에 따른 천연소재를 활용한 연구의 필요성이 증가하는 실정이다. 본 연구에서 사용한 갯사상자는 염생식물로, 많은 선행연구에 따르면 염생식물은 염분이 높은 환경에서 적응하여 염분에 의해서 야기된 ROS의 해로운 역할에 효과적인 항산화 방어기작이 식물의 염분 내성을 증가시키는데 필수적이며 생성된 활성산소종을 효과적으로 제거하는 것으로 알려져 있다[20].

자외선으로 인한 피부손상은 피부에 주름과 홍반 등을 일으키는 주요한 원인으로 알려져 있다[7]. 피부노화와 관련된 인자인 MMPs는 피부 표피세포와 섬유아세포 등에서 발생해 피부 손상을 야기한다. MMPs 중 MMP-1, MMP-3 및 MMP-9은 피부 노화와 관련된 인자로서 자외선의 종류 중 하나인 UVB조사로도 피부에 영향을 미치게 된다. 또한 MAPK는 세포 신호 전달에 영향을 미치는 MMPs의 상위 신호전달 경로로서 기질단백질 분해로 인한 피부 노화에 영향을 미친다고 알려져 있다[9, 24].

위도와 고도에 따른 사람이 받는 자외선 선량은 다르고 Americans를 기준으로 일년에 평균적으로 200,000-300,000 mJ/cm<sup>2</sup>의 UV의 양에 노출된다. 평균값인 250,000 mJ/cm<sup>2</sup>을 365로 나눈 값으로 하루 조사량을 계산해본 결과 약 684.9 mJ/cm<sup>2</sup>이고 31.5분 동안 햇빛에 노출되면 본 연구에서 제시한 UVB의 양에 노출되는 것과 같다고 할 수 있다 [14].

따라서 본 연구에서는 갯사상자의 조추출물이 UVB 조사로 유도된 활성산소종을 억제하는 효과가 있는지와 MMP-1, MMP-3 및 MMP-9의 저해 기전에 대한 실험을 진행하여 갯사상자 조추출물이 향후 광노화로부터의 억제 효과를 가진 천연소재로의 역할을 할 수 있을지 그 효능을 밝히고자 하였다.

갯사상자 조추출물의 ROS 억제 효과를 알아보기 위해 세포독성을 보이지 않는 농도인 10, 50, 100 µg/ml에서 실험을 진행하였으며 그 결과 농도 의존적으로 ROS의 생성이 감소된 것을 확인하였다. 또한 피부노화와 관련이 있는 MMP-1, MMP-3 및 MMP-9의 발현은 mRNA 및 단백질 단계에서 모두 농도 의존적으로 감소한 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 노화 인자의 활성을 조절하는 MAPK 전사 인자의 발현 억제효과에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구결과는 갯사상자의 조추출물이 피부노화 억제효과를 가지는 천연 화장품 소재로서의 개발 가능성을 제시하였다.

### 감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기본연구사업(No. 2019R1F1A1059325과 No 2022R1F1A1065328)의 연구결과입니다.

## The Conflict of Interest Statement

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

## References

- Aghaleh, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H. and Razavi, K. 2009. Salt stress effects on growth, pigments, proteins and lipid peroxidation in *Salicornia persica* and *S. europaea*. *Biol. Plant.* **53**, 243-248.
- Annie, P. and Selman, M. 2005. MMP-1: the elder of the family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 283-288.
- Burcu, S., Turkan, I., Sekmen, A. H. and Ozfidan, C. 2010. The role of antioxidant defense systems at differential salt tolerance of *Hordeum marinum* Huds. (sea barleygrass) and *Hordeum vulgare* L. (cultivated barley). *Environ. Exp. Bot.* **69**, 76-85.
- Bae, M. J. 2016. Effect of *Corydalis heterocarpa* extract on UVA induced photo-aging in human dermal fibroblasts. Silla University, Busan, South Korea.
- Bose, J., Ana, M. and Sergey, S. 2014. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *J. Exp. Bot.* **65**, 1241-1257.
- Chikamatsu, H., Maeda, M. and Nakazaki, M. 1969. Structure of torilin. *Tetrahedron* **25**, 4751-4765.
- Chin, J. R., Murphy, G. and Werb, Z. 1985. Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblasts in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. *J. Biol. Chem.* **260**, 12367-12376.
- Cho, S. I., Kang, S. S., Kim, K. R., Kim, T. H. and Lee, E. B. 1999. Isolation of Torilin from *Torilis japonica* Fruit and its Analgesic and anti-inflammatory activities. *Saenggyak. Hakhoe. Chi.* **30**, 137-144.
- Choi, C. Y. and Cho, S. C. 2017. Screening of natural compounds for cancer prevention by cytotoxicities and AP-1 reporter gene activities. *J. Converg. Inf. Technol.* **7**, 89-95.
- Choi, E. Y., Kim, E. H., Lee, J. B., Do, E. J., Kim, S. J., Kim, S. H., Park, J. Y. and Lee, J. T. 2016. Mechanisms for anti-wrinkle activities from fractions of black chokeberries. *J. Life Sci.* **26**, 34-41.
- Choi, E. Y., Lee, J. B., Kim, D. H., Kwon, Y. S., Cheon, J. Y. and Lee, J. T. 2017. Mechanisms of suppression of matrix metalloproteinases in UVB-irradiated HaCaT keratinocytes of colored rice varieties. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **46**, 562-571.
- Choi, E. Y., Sohn, H. Y. and Lee, J. T. 2019. The antioxidant and anti-aging effects of treatment with *Schisandra chinensis* seeds fractions in UVB irradiated human HaCaT cells. *J. Life Sci.* **29**, 1071-1079.
- Fujita, S. 1990. Miscellaneous contributions to the essential oils of plants from various territories. LI. On the components of essential oils of *Torilis japonica* (Houtt.) DC. *Yakugaku Zasshi* **110**, 771-775.1.
- Godar, D. E. 2001. UV doses of American children and adolescents. *Photochem. Photobiol.* **74**, 787-93
- Hansna, E., Ben Hamed, K., Cela, J., Munne-Bosch, S. and Abdelly, C. 2011. Early effects of salt stress on the physiological and oxidative status of *Cakile maritima* (halophyte) and *Arabidopsis thaliana* (glycophyte). *Physiol. Plant.* **142**, 128-143.
- Ha, S. K., Lee, J. H. and Lee, S. H. 2019. Protective effect of UV-induced *Arthrospira Platensis* (Spirulina) mutant on UV-B irradiated human dermal fibroblasts injury. *J. Chitin Chitosan.* **24**, 239-245.
- Jang, Y. A. and Lee, J. T. 2018. Anti-wrinkle effect of berberine by inhibition of MMP-2 and MMP-9 activity in fibroblasts. *J. Appl. Biol. Chem.* **61**, 9-15.
- Jeong, Y. H., Kim, S. Y., Jeong, G. H. and Kim, T. H. 2018. Anti-glycation and radical scavenging activities of *Ligustri Fructus* by extraction method. *Kor. J. Herbol.* **33**, 95-100.
- Jun, K. S. 2011. Effects of ethanol extract from sodokeum on UVB-induced damage in human keratinocyte HaCaT cells. Wonkwang University, Jeonbuk, South Korea.
- Jung, H., Jeong, H. J., Shin, K., Kim, Y. S., Moon, J. H. and Lee, T. H. 2018. Protective effect of *Thymus quinquecostatus* extracts UVB-induced matrix metalloproteinase-1 via suppressing MAPKs phosphorylation in human keratinocyte. *J. Appl. Biol. Chem.* **61**, 417-421.
- Kim J. Y., Lee, Y. J., Kim, W. S., Moon, S. K. and Kim, Y. T. 2022. Antioxidant and physiological activities of different solvent extracts of *Cnidium japonicum*. *Kor. J. Fish Aquat. Sci.* **55**, 310-318.
- Kim, K. S., Han, S. H., An, I. S. and Ahn, K. J. 2016. Protective effects of ellagic acid against UVA-induced oxidative stress in human dermal papilla. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **14**, 191-200.
- Kim, Y. J., Lee, Y. R., Cheon, J. W. and Lee, H. S. 2010. Anti-aging effect of *Ligustrum japonicum* extract in the human fibroblast cells. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.* **36**, 95-301.
- Kitajima, J., Suzuki, N. and Tanaka, Y. 1998. Guaiane-type sesquiterpenoid glycosides from *Torilis japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* **46**, 1743-1747.
- Kum, H. M. 2009. Protective effects of epigallocatechin-3-gallate on UVB-induced damage in human keratinocytes. Pukyong National University. Busan, South Korea.
- Lee, H. J. 2015. Inhibitory effects of hesperidin on the ultraviolet B-induced photo-aging. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **13**, 631-636.
- Lee, S. A. 2010. Protective effect of *Polygonum multiflorum* on cell damage in UVB-irradiated HaCaT keratinocytes. Daejeon University, Daejeon, South Korea.
- Lee, S. K. 2017. Anti-melanogenic effect of *Limonium tetragonum* extracts on mouse melanoma cells. Silla University, Busan, South Korea.
- Marta, T., Irina, C., Margarida, B., Sonia, H. and Rafael,

- F. 2003. Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 386-395.
30. Park, H. W., Choi, S. U., Baek, N. I., Kim, S. H., Eun, J. S., Yang, J. H. and Kim, D. K. 2006. Guaiane sesquiterpenoids from *Torilis japonica* and their cytotoxic effects on human cancer cell lines. *Arch. Pharm. Res.* **29**, 131.
31. Park, M. J. 2005. Recent advances in regulating energy homeostasis and obesity. *Kor. J. Pediatr.* **48**, 126-137.
32. Reunanen, N., Westermarck, J., Hakkinen, L., Holmstrom, T. H., Elo, I. and Eriksson, J. E. 1998. Enhancement of fibroblast collagenase (matrix metalloproteinase-1) gene expression by ceramide is mediated by extracellular signal-regulated and stress-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* **273**, 5137-5145.
33. Yu, T. H., Heo, J. H., Lyu, D. Y., Kim, H. U., Lee, S. H., Kim, J. J., Jeong, D. S., Choe, G. H., Lee, H. Y., Han, D. S. and Kang, S. U. 2003. The effect of high glucose on p38 MAPK pathway and fibronectin synthesis in cultured rat mesangial cells. *Kor. J. Nephrology* **22**, 483-493.

### 초록 : HaCaT 세포에서 UVB로 유도된 광노화에 대한 갯사상자 추출물의 효능

이은성<sup>1</sup> · 오정환<sup>2</sup> · 공창숙<sup>2,3</sup> · 서영완<sup>1,4\*</sup>

(<sup>1</sup>한국해양대학교 해양과학기술전문대학원, <sup>2</sup>신라대학교 해양식의약소재융합기술연구소, <sup>3</sup>신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과, <sup>4</sup>한국해양대학교 해양과학융합학과)

갯사상자는 염생식물의 일종으로 염분이 높은 토양에서 자생하는 식물로 선행연구에 따르면 갯사상자는 항암효과를 가진다고 알려져 있다. 그러나 UVB로 유도된 광노화에 대한 효과는 아직 알려져 있지 않은 실정이다. 본 연구에서는 갯사상자 조추출물이 산화스트레스에 미치는 영향과 UVB 유래 광손상에 미치는 효과와 그 작용기전에 대하여 밝히고자 하였다. 갯사상자 추출물의 항산화 활성은 ROS 생성 억제능을 통해 확인하였으며, 광노화에 대한 효능은 피부노화 관련 인자인 MMP-1, MMP-3 및 MMP-9 발현 저해 효과와 MAPKs 발현기전을 통해 확인하였다. 세포생존을 실험결과를 바탕으로 UVB 조사 기준은 15 mJ/cm<sup>2</sup> 로 설정하였으며, 갯사상자 추출물의 농도는 10, 50, 그리고 100 µg/ml로 설정하였다. 결과적으로 갯사상자 추출물은 농도의존적으로 활성산소종을 억제하는 효과를 가짐을 확인하였고, 피부노화 관련인자인 MMP-1, MMP-3 및 MMP-9 발현을 감소시키는 것을 확인하였다. 노화관련인자인 MMP 발현 억제는 MAPK 전사인자의 발현 억제효과에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 이들 결과로부터 갯사상자 추출물이 광노화에 효능을 가진 천연 화장품 소재로서 개발이 가능할 것으로 기대된다.