

인간 피부각질세포에서 Hydrogen peroxide로 유도된 산화적 스트레스에 대한 붉은 토끼풀 추출물의 세포 보호 효과

신미송^{1,*} · 이유경¹ · 최서영¹ · 황지선² · 송박용³
박현철¹ · 김근기¹ · 손홍주¹ · 김유진¹ · 이광민^{1,†}

¹부산대학교 생명환경화학학과

²대구경북첨단의료산업진흥재단 신약개발지원센터

³부산대학교 의과대학 융합의학교실

(2023년 3월 24일 접수; 2023년 4월 17일 수정; 2023년 4월 19일 채택)

Protective Effects of *Trifolium pratense* L. Extract against H₂O₂-induced Oxidative Stress in HaCaT Keratinocytes

Mi Song Shin^{1,*} · You Kyeong Lee¹ · Seo Young Choi¹ · Ji Sun Hwang² · Parkyong Song³
Hyeon Cheal Park¹ · Keun Ki Kim¹ · Hong-Joo Son¹ · Yu-Jin Kim¹ · Kwang Min Lee^{1,†}

¹Department of Life Science and Environmental Biochemistry, Life and Industry Convergence Research Institute, Pusan National University, Miryang 50463, Republic of Korea

²New Drug Development Center, Daegu-Gyeongbuk Medical Innovation Foundation, K-MEDI hub, Daegu 41061, Republic of Korea

³Department of Convergence Medicine, Pusan National University School of Medicine, Yangsan 50612, Republic of Korea

(Received March 24, 2023; Revised April 17, 2023; Accepted April 19, 2023)

요약 : 산화적 스트레스는 세포 및 조직 손상을 통해 피부의 탄력 및 보습 기능 저하, 피부 노화 촉진 등을 비롯한 다양한 피부질환을 일으킨다. 본 연구의 목적은 인간 피부각질세포 (HaCaT keratinocyte)에서 산화적 스트레스에 대한 붉은 토끼풀 추출물의 효능을 검토하여, 피부에 효과적으로 사용할 수 있는 기능성 소재로서의 활용 여부를 확인하고자 하였다. 본 연구에서는 붉은 토끼풀 추출물이 인간 피부각질세포에서 산화적 스트레스에 따른 세포사를 억제시키는 것을 확인하여, 이를 조절하는 보호기전을 규명하였다. 이는 붉은 토끼풀 추출물이 Caspase-3 비활성, 세포사 촉진단백질 Bax 발현 억제, 세포생존 촉진단백질 Bcl-2 발현 증가 및 MAPK 신호전달계 단백질의 인산화 억제를 통해 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스를 보호할 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서 붉은 토끼풀 추출물은 피부의 산화적 손상을 감소시키는 유용한 소재로 평가되며, 이는 피부보호 및 미용을 위한 다양한 제품 및 산업에 활용 가능성이 높은 것으로 판단된다.

[†]Corresponding author

(E-mail: leekm@pusan.ac.kr)

주제어 : 붉은 토끼풀, 과산화수소, 인간피부각질세포, 산화적 스트레스, 피부손상

Abstract : Oxidative stress plays a significant role in the pathogenesis of various skin conditions, resulting in cellular and tissue damage that can contribute to the development of skin tone unevenness, roughness and wrinkles. In this study, we found that *Trifolium pratense* L. extract (TE) attenuated oxidative-induced damage in HaCaT cells and elucidated the underlying molecular mechanism. Our finding demonstrated that TE effectively protected HaCaT cells against H_2O_2 -induced cell death by inhibiting caspase-3 activation, downregulating Bax and upregulating Bcl-2, and attenuating the activation of three mitogen-activated protein kinases (MAPKs). Our results suggest that TE has remarkable cytoprotective properties against oxidative damage in HaCaT cells and could serve as a complementary or alternative approach to prevent and treat skin damage.

Keywords : *Trifolium pratense* L , hydrogen peroxide, human keratinocyte cell line, oxidative stress, skin damage.

1. 서론

피부는 인간 신체 구조 중 최외각에 위치하고 있으며 표피층, 진피층, 피하지방층으로 구성되어 있다. 인체의 항상성을 유지해 몸을 보호할 뿐 아니라 화학적, 물리적, 생물학적 기능으로 체내 보호 외에도 에너지 저장, 땀과 피지의 분비, 비타민 D 합성 작용, 체온유지 등 많은 역할을 수행하고 있다 [1, 2]. 특히 피부 표피층인 각질형성세포(keratinocytes)는 태양광선 및 잘못된 식습관, 외부자극 및 산업화에 따른 환경오염 등과 같은 외부환경으로부터 직접적으로 노출되어 있다. 이러한 요인들에 지속적으로 노출되면 피부에 산화적 스트레스(oxidative stress)와 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 발생시킨다 [3]. 이러한 산화적 스트레스(oxidative stress)와 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 신체의 항상성 시스템을 약화시키고 피부조직 및 세포의 손상과 유전정보 교란, 단백질 변성을 유도하여 생체 손상으로 이어지며 피부의 보습 및 탄력 기능의 저하와 노화촉진, 비만 등을 유발한다 [4].

활성산소종(reactive oxygen species) 중 Superoxide(O_2^-), Hydroxyl radical(OH), Hydrogen peroxide(H_2O_2), 일중항산소(1O_2)는 생체의 대사과정에서 생성되기도 하며 외부자극에 지속적으로 노출되어 생체 내에서 산화 생성물을 합성한다. 이렇게 생성된 활성산소종은 피부 손상에 있어서 막대한 영향을 미친다 [5]. 이들은 생체 내 단백질의 아미노산을 산화시켜 단백질의

기능 저하와 세포소기관의 손상을 야기하기도 하며 [6, 7], DNA에도 손상을 주어 각질형성세포의 보습 기능 및 탄력의 저하로 인한 노화의 촉진, 그리고 피부세포의 염증과 괴사 등을 유발한다 [8, 9]. 따라서, 피부세포를 보호하고 노화, 비만을 지연시키기 위해서는 생체 내 뿐 아니라 피부의 과잉 활성산소 발생을 억제하는 체내 항산화 방어 시스템을 향상시키는 것이 중요하다 [10]. 피부를 개선시키는 화합물의 발굴 및 연구는 지속적으로 이루어지고 있으나, 화합물의 경우 독성과 부작용을 함유한 경우가 많아 이를 보완한 천연물 소재와 관련된 연구가 주목받고 있다.

붉은 토끼풀(*Trifolium pratense* L., Red clover)은 전 세계적으로 분포해 있으며 북미와 유럽에서 60여 년 전 한국으로 도입된 여러해살이 초본종이다 [11]. 토끼풀속(*Trifolium*)은 꽃의 색에 따라 분류할 수 있으며 민간요법으로도 널리 사용되어왔다 [12]. 붉은 토끼풀은 다량의 phenolic compound를 포함하고 있어 체내에서 다양한 생리대사에 영향을 끼치는 것으로 보고되었다. 또한, 감기, 해열, 천식, 지혈 및 염증 완화 효능이 있다고도 알려져 뛰어난 항염증 효과를 가진 것으로 확인되었다 [13, 14]. 선행연구들에서 붉은 토끼풀의 항염증, 항산화와 같은 다양한 연구가 진행되었으나, 피부에서 붉은 토끼풀의 기능성을 평가한 연구는 아직 보고된 바가 없었다. 이에 본 연구에서는 인간 피부각질세포 (HaCaT keratinocyte)에서 산화적 스트레스에 대한 붉은 토끼풀 추출물의 효능을 알아보고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시료준비

실험에 사용한 붉은 토끼풀 (*Trifolium pratense* L.) 메탄올 추출물(Code number : KPM028-036)는 한국식물추출물은행 (Daejeon, Republic of Korea)에서 분양받아 Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St Louis, MO)에 녹여 사용하였다.

2.2. 세포배양

본 실험에 사용된 인간 epithelial keratinocyte 인 HaCaT 세포주는 Addexbio (San Diego, CA)로부터 분양받아 사용하였다. HaCaT cells의 배지로는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY)과 1% 항생제(50 g/mL streptomycin과 50 U/mL penicillin)가 첨가된 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Welgene Inc., Gyeongsan, Republic of Korea)을 사용하였으며 37 °C, 5% CO₂ 조건의 incubator 에서 배양하였다. 모든 실험과정에서 세포는 80~90%의 confluence 범위에 도달하도록 배양하여 사용하였고 2 ~ 3일에 한 번씩 배양함과 동시에 배양액을 교체해주었다. 계대배양 시 배양액 제거 후, Phosphate-buffered saline (PBS)로 세척 후 0.25% trypsin- ethylene-EDTA를 이용하여 세포를 cell culture dish에서 분리하여 진행하였다. 추출물 효능 평가를 위해, 배양된 세포주에 붉은 토끼풀 추출물을 다양한 농도 (50, 100, 150, 200 µg/mL)로 18시간 동안 선처리 한 뒤, 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척 후 H₂O₂ 1mM를 12시간 동안 반응시켰다.

2.3. MTT assay를 통한 세포 생존율 측정

인간 피부각질세포 (HaCaT keratinocyte)에서 붉은 토끼풀 추출물 및 H₂O₂ 처리에 따른 증식 변화 정도를 확인하기 위해서 MTT assay 원리를 이용하였다. 이를 위해 HaCaT cells를 96-well plate에 6×10⁴ cells/well의 농도로 100 µL씩 접종하여 24시간 배양한 후 붉은 토끼풀 추출물을 다양한 농도로 (50, 100, 150, 200, 300 µg/mL) 24시간 처리하였다. 배지를 제거하고 MTT (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)를 0.5 mg/mL 농도로 희석하여 100 µL씩 분주하고 37°C에서 1시간 동안 다시 반응시켰다. 반응이 끝난 다음 MTT 시약을 제거하고 DMSO 를 200

µL씩 분주하여 각 well에 생성된 formazin을 모두 녹인 후 microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하여 540nm 에서 흡광도를 측정하였고. 각 세포에 대한 독성은 각각의 대조군의 평균 흡광도 값을 구하여 평균 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.

2.4. Western blot analysis에 의한 특정

단백질 발현 분석

인간 피부각질세포인 HaCaT cells의 단백질은 적당량의 lysis buffer [Protease inhibitor, radioimmunoprecipitation assay(RIPA) buffer (50mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS)]로 추출하였다.

Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)로 단백질을 정량한 다음 동량의 sample buffer와 혼합하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)을 이용하여 전기영동을 실시하였다. 분리된 단백질들을 Nitrocellulose(NC) membrane에 옮긴 후 3% Bovine serum albumin (BSA)를 포함한 Tris-buffered saline (TBS)로 상온에서 1시간 blocking하였고 각각의 1차 항체를 처리한 뒤 4 °C에서 over night 반응시켰다. 이후 TBS-T로 세척한 다음 Horseradish peroxidase(HRP)가 결합되어 있는 2차 항체와 상온에서 1시간 반응시키고 30분간 세척 후, chemiluminescence detection kit로 band를 검출하였다. 본 실험에서 사용된 항체들은 cleaved caspase-3, Bax, Bcl-2, p38, P-p38, ERK 1/2, P-ERK 1/2, JNK 1/2, P-JNK 1/2, GAPDH는 Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA)에서 구입하여 사용하였다.

2.5. 통계분석

본 실험의 결과는 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 Mean ± Standard Error of the Mean (SEM)으로 값을 표시하였다. Origin 8.0 프로그램 (OriginLab Corporation, Northampton, MA)의 one way analysis of variance를 이용하여 p < 0.05 미만일 때 통계적 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 붉은 토끼풀 추출물이 HaCaT cells 생존율에 미치는 영향

붉은 토끼풀 추출물의 세포 보호 효과를 규명하기 위해 HaCaT cells에 대한 붉은 토끼풀 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정하였다. MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 탈수소효소 작용으로 인해 노란색의 수용성 MTT terazolium이 청자색을 띠는 비수용성 MTT formazan으로 환원되는 정도를 이용하여 측정하는 검사법으로 540nm에서 측정된 흡광도는 살아있는 정상기능의 세포 농도를 반영하는 것으로 알려져 있다 [15]. 붉은 토끼풀 추출물을 50, 100, 150, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도별로 처리하여 세포 독성을 조사하였다. 그 결과, 농도 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지는 대조군과 큰 차이가 없는 세포 생존율을 나타내었으나, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 대조군에 비해 70% 이하의 세포 생존율을 나타냈다 (Fig. 1A). 이를 바탕으로, HaCaT cells에서 붉은 토끼풀 추출물의 세포 보호 효과 효능검증을 위한 처리 농도는 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하로 설정하여 농도 의존적으로 실험을 진행하였다.

3.2. 붉은 토끼풀 추출물이 H₂O₂로 유도된 산화스트레스로 인한 HaCaT 세포생존율에 미치는 영향

ROS의 한 종류인 H₂O₂는 HaCaT cells에서 산화적 스트레스의 주된 유발인자 중 하나로 널리 알려져 있다 [16, 17]. 따라서, 붉은 토끼풀 추출물의 피부 보호 효과를 조사하기 위해 HaCaT cells에서 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스 세포 모델을 사용하여 실험을 진행하였다. HaCaT cells에 H₂O₂와 붉은 토끼풀 추출물 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 농도 의존적으로 처리하여 MTT assay를 실시한 결과, H₂O₂ 단독처리군에서 현저히 감소하였던 세포 생존율이, 붉은 토끼풀 추출물 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 선처리군에서는 세포 생존율이 유의미하게 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. (Fig. 1B). 이는 붉은 토끼풀 추출물이 HaCaT cells에서 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스에서 기인한 세포 독성에 대한 보호 효과가 있다는 것을 의미하며, 피부의 산화적 손상을 감소시켜 줄 수 있는 유용한 소재로서

의 가능성으로 평가된다.

3.3. 붉은 토끼풀 추출물이 H₂O₂로 유도된 산화스트레스로 인한 HaCaT cells의 Caspase-3 활성화에 미치는 영향

H₂O₂는 산화스트레스의 주된 발생물질로서 세포사의 매개체 역할을 함으로써 Cysteine aspartic acid protease (caspase) cascade의 활성을 통해 피부세포 내 세포사를 유발할 수 있다 [18-21]. H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 붉은 토끼풀 추출물의 보호 효과가 Caspase cascade의 저해에 의한 것인지 확인하기 위해, 주요 effector로서 세포사를 활성화하는 것으로 알려진 caspase-3의 활성 저해 여부를 확인하고자 하였다. 따라서, Caspase-3의 활성화 형태인 cleaved caspase-3의 단백질 양을 측정하기 위해 Western blot assay를 수행하였다. H₂O₂ 단독처리군에서 cleaved caspase-3 단백질 양이 대조군에 비해 증가하는 모습을 관찰할 수 있었고, 붉은 토끼풀 추출물 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 선처리군에서는 cleaved caspase-3의 단백질 양이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2A, 2B). 이는 붉은 토끼풀 추출물이 caspase 활성 의존적 세포사 경로를 조절함으로써, HaCaT cells에서 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스에서 기인한 세포 독성에 대한 보호 효과가 있다는 것을 의미한다.

3.4. 붉은 토끼풀 추출물이 H₂O₂로 유도된 산화스트레스로 인한 HaCaT cells의 Bax 및 Bcl-2 발현에 미치는 영향

다음으로, 세포사 관련 유전자인 Bcl-2 family member에 속하는 세포사 촉진단백질(pro-apoptosis)인 Bax와 세포생존 촉진단백질(anti-apoptosis)인 Bcl-2의 발현량을 측정하여 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 붉은 토끼풀 추출물의 보호 기전을 추가로 확인하고자 Western blot assay를 수행하였다. H₂O₂ 단독처리군에서 세포사 촉진단백질인 Bax의 발현량이 증가한 반면, 세포생존 촉진단백질 Bcl-2의 발현량은 대조군에 비해 감소하였다. 그러나 붉은 토끼풀 추출물을 선처리한 세포에서는 H₂O₂에 의해 증가한 Bax 단백질의 발현이 농도 의존적으로 감소하였고, H₂O₂에 의해 감소된 Bcl-2 단백질의 발현은 농도 의존적으로 증가하였다. (Fig. 3A, 3B). 이 결과는, 붉은 토끼풀 추출물이 세포

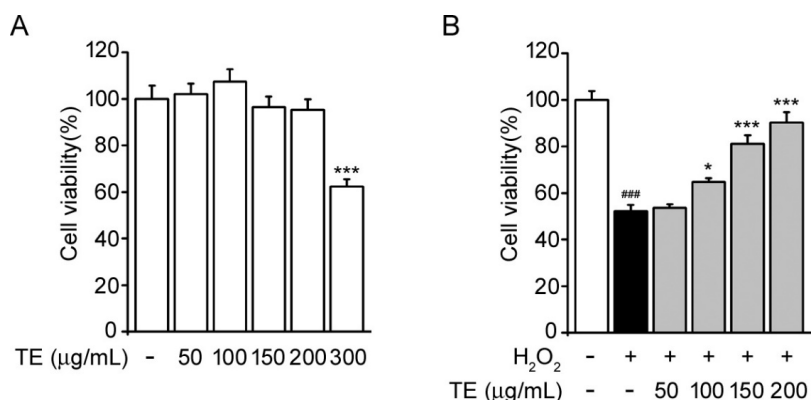


Fig. 1. Effects of *Trifolium pratense* L. extract (TE) on cell viability in HaCaT cells. (A) Cytotoxicity of TE on HaCaT cells. HaCaT cells were treated with different concentrations of TE (50, 100, 150, 200, 300 μg/mL). ****P* < 0.005, significantly different from the control group. (B) Effect of TE on the hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative stress in HaCaT cells. Cell viability was evaluated using a MTT assay. The bar graph represents the mean ± S.E.M of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed, with **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.005 indicating significant differences from the H₂O₂ group, and ###*P* < 0.005 indicating significant differences from the control group.

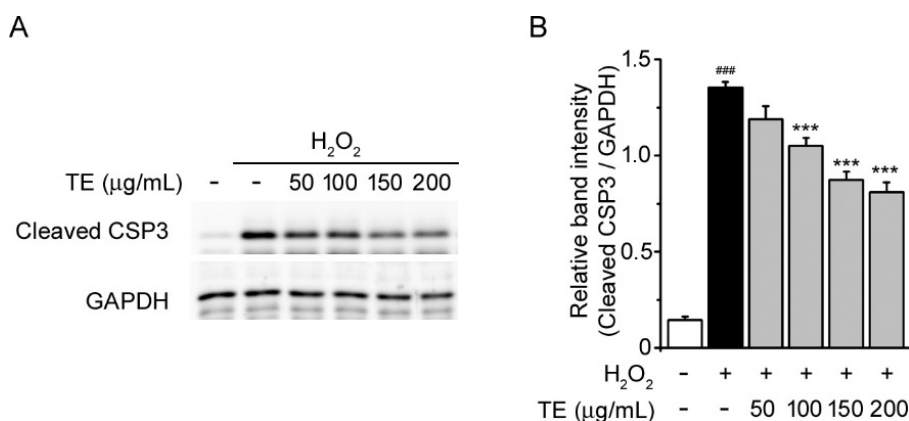


Fig. 2. Effect of *Trifolium pratense* L. extract (TE) on H₂O₂-induced caspase-3 activation in HaCaT cells. (A) Protein extracts from HaCaT cells treated with the indicated concentrations of TE in the presence of H₂O₂ were subjected to Western Blot analysis to measure the level of cleaved caspase-3. GAPDH protein was utilized as a loading control protein. (B) The bar graph represents the relative band intensity of cleaved caspase-3 normalized to GAPDH. Statistical analysis was performed, with **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.005 indicating significant differences from the H₂O₂ group, and ###*P* < 0.005 indicating significant differences from the control group.

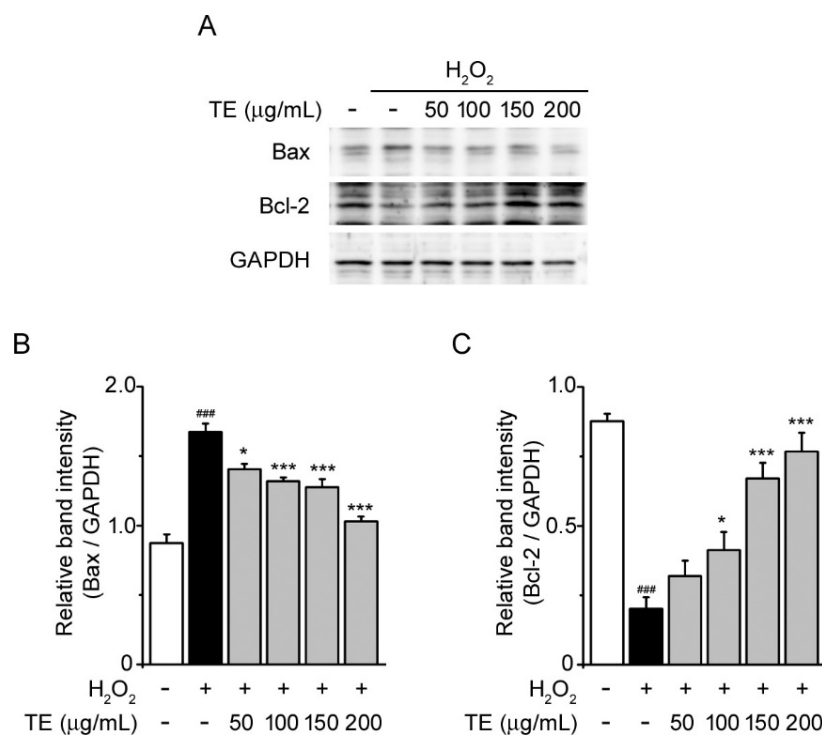


Fig. 3. Effect of *Trifolium pratense* L. extract (TE) on Bax and Bcl-2 expression in HaCaT cells exposed to H₂O₂.

(A) Protein extracts from HaCaT cells treated with the indicated concentrations of TE in the presence of H₂O₂ were subjected to Western Blot analysis to measure the expression levels of Bax and Bcl-2 proteins. GAPDH protein was utilized as a loading control protein. (B) The bar graph represents the relative band intensity of Bax normalized to GAPDH. (C) The bar graph represents the relative band intensity of Bcl-2 normalized to GAPDH, as determined by densitometric analysis. Statistical analysis was performed, with $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, and $***P < 0.005$ indicating significant differences from the H₂O₂ group, and $###P < 0.005$ indicating significant differences from the control group.

사 촉진단백질 Bax의 발현을 억제시키고, 세포생존 촉진단백질 Bcl-2의 발현 증가를 통해, 산화적 스트레스에 의한 세포사 유도를 억제하였음을 의미한다.

3.5. 붉은 토끼풀 추출물이 H₂O₂로 유도된 산화스트레스로 인한 HaCaT cells의 MAPK 신호전달계에 미치는 영향

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달체계는 외부환경 스트레스와 면역, 항염증, 세포사 활성화에 중요한 역할을 한다 [22]. MAPKs 계열에 속하는 단백질로는 p38,

ERK1/2, JNK1/2가 있으며 p38 및 ERK1/2 인산화는 pro-inflammatory cytokine의 생성과 방출에 관여하며, JNK1/2 인산화는 iNOS, COX-2와 같은 염증성 단백질의 발현에 관여한다고 알려져 있다 [23]. H₂O₂ 유도 산화 스트레스가 MAPK 신호전달체계의 활성화에 의해 세포사가 유발될 수 있다는 많은 선행연구를 바탕으로 [24-26], 붉은 토끼풀 추출물의 세포사 억제기전을 이해하고자 MAPKs 신호전달계 단백질의 발현량과 인산화 여부를 Western blot assay 통해 확인하였다. H₂O₂ 단독처리군에서, 처리되지 않은 대조군에 비해 p38, ERK1/2, JNK1/2의 인산

화가 현저하게 증가하는 모습을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4A). 그러나, 붉은 토끼풀 추출물 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 선처리군에서는 ERK 1/2 인산화와 JNK 1/2 인산화가 감소되었으며 (Fig. 4C and 4D), 특히 p38 인산화의 경우 붉은 토끼풀 추출물 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$ 선처리군에서 모두 농도 의존적으로 감소되었다 (Fig.

4B). MAPKs (p38, ERK 1/2, JNK 1/2) 단백질 발현량은 H_2O_2 단독처리군과 붉은 토끼풀 추출물 선처리군에서 모두 차이가 나타나지 않았다. 이 결과는 붉은 토끼풀 추출물이 MAPK 신호전달계 단백질의 인산화 수준 감소를 통해 H_2O_2 유도 산화스트레스로부터 HaCaT cells를 보호할 수 있음을 의미한다.

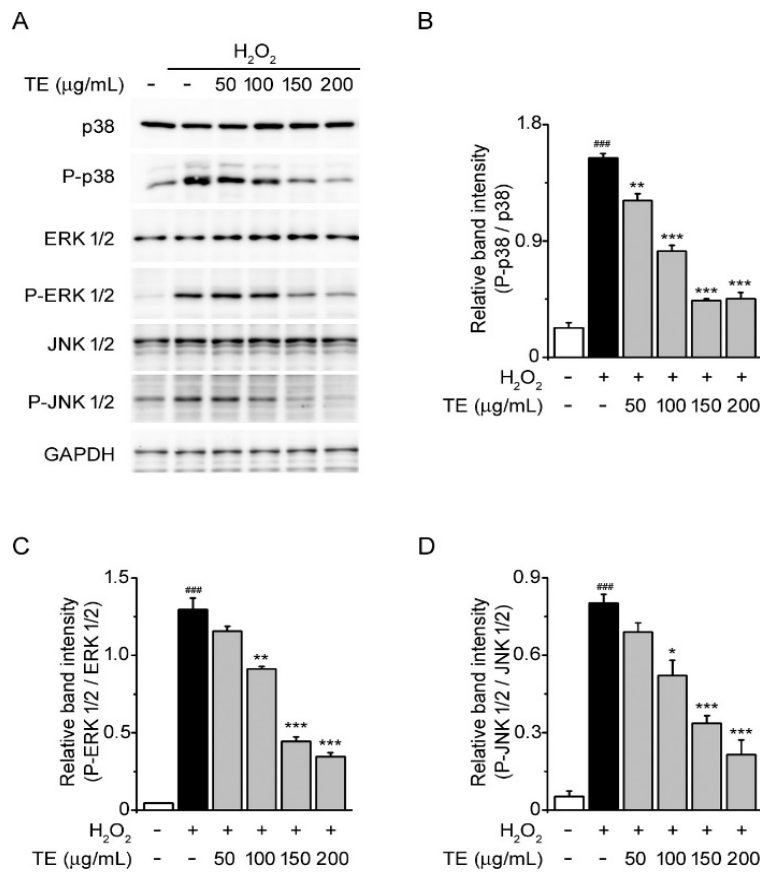


Fig. 4. Effect of *Trifolium pratense* L. extract (TE) on the p38, ERK 1/2 and JNK 1/2 in HaCaT cells exposed to H_2O_2 .

(A) Western blot bands corresponding to p38, Phospho-p38 (P-p38), ERK1/2, Phospho-ERK 1/2 (P-ERK 1/2), JNK1/2, and Phospho-JNK 1/2 (P-JNK 1/2). GAPDH was used as the loading control. (B) Relative band intensity of P-p38 normalized to total p38 protein expression (C) Relative band intensity of P-ERK 1/2 normalized to total ERK 1/2 protein expression (D) Relative band intensity of P-JNK 1/2 normalized to total JNK 1/2 protein expression. Statistical analysis was performed, with * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.005$ indicating significant differences from the H_2O_2 group, and ### $P < 0.005$ indicating significant differences from the control group.

4. 결론

산화스트레스는 신체의 항상성 시스템 약화, 피부조직 및 세포의 손상, 유전정보 교란 그리고 단백질 변성을 유도하여 생체 손상으로 이어지며 피부의 보습 및 탄력 기능저하와 노화 촉진을 유발한다. H_2O_2 는 산화적 스트레스의 주요 유발인자 중 하나로 널리 알려져 있으며, [27] 인간 피부 각질세포를 포함한 대부분의 세포에서 산화적 스트레스에 의한 미토콘드리아 기능 장애와 DNA 손상이 세포사를 유도하여 피부질환을 야기시키는 것으로 보고되었다 [28, 29]. 따라서 본 연구에서는 인간 피부각질세포 HaCaT keratinocyte에서 산화적 스트레스에 대한 붉은 토끼풀 추출물의 효능을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 인간 피부각질세포에서 붉은 토끼풀 추출물을 처리하여 MTT assay를 통해 세포 생존율을 평가한 결과 200 $\mu\text{g/mL}$ 까지 유의성 있는 세포 독성은 관찰되지 않았다.

2) 붉은 토끼풀 추출물은 H_2O_2 유도 산화스트레스로 감소된 세포 생존율을 농도 의존적으로 증가시켰다.

3) 붉은 토끼풀 추출물은 H_2O_2 유도 산화스트레스로 증가된 cleaved caspase-3의 단백질 양을 농도 의존적으로 감소시켰다.

4) 붉은 토끼풀 추출물은 H_2O_2 유도 산화스트레스로 증가한 세포사 촉진단백질 Bax의 발현량을 감소시켰고, 감소한 세포생존 촉진단백질 Bcl-2의 발현량은 증가시켰다.

5) 붉은 토끼풀 추출물은 H_2O_2 유도 산화스트레스로 증가한 MAPKs (p38, ERK 1/2, JNK 1/2) 단백질의 인산화를 농도 의존적으로 감소시켰다.

종합하자면, 붉은 토끼풀 추출물이 인간 피부 각질세포에서 H_2O_2 에 의해 유도된 산화적 스트레스에서 기인한 세포 독성에 대한 보호 효과가 있다는 것을 나타내며, 이러한 보호기작은 적어도 Caspase-3 비활성, 세포사 촉진단백질 Bax 발현 억제, 세포생존 촉진단백질 Bcl-2 발현 증가 및 MAPK 신호전달계 단백질의 인산화 억제를 통해 이루어짐을 의미한다. 이와 같은 결과를 바탕으로, 붉은 토끼풀 추출물은 피부의 산화적 손상을 감소시켜 줄 수 있는 유용한 소재로 평가되며,

이는 피부보호 및 미용을 위한 다양한 제품 및 산업에 활용 가능성이 높은 것으로 사료된다. 또한, 본 연구 결과는 추후에 붉은 토끼풀을 이용하여 피부에서의 다양한 효능 및 기전을 연구하는데 기초적인 자료가 될 것으로 판단된다.

감사의 글

이 과제는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음

References

1. D. Roosterman, T. Goerge, S. W. Schneider, N. W. Bunnett, M. Steinhoff, "Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ", *Physiol Rev.*, Vol.86, No.4 pp. 1309-1379, (2006).
2. V. S. Sylvie, F. Bonte, "Skin hydration: a review on its molecular mechanisms", *J. Cosmetic Dermatol*, Vol.6, No.2 pp. 75-82, (2007).
3. S. -H. Seo, M. O. Choi, "Protective effects of *Lonicerae Japonicae* Flos against hydrogen peroxidase-induced oxidative stress on Human keratinocyte, HaCaT cells", *Kor. J. Herbology*, Vol.28, No.4 pp. 57-62, (2013).
4. J. -A. Park, "Antioxidant effects of *Rumex crispus* L. leaf extracts and protective effects on Human HaCaT Keratinocyte", *J. Kor. Soc. B&A*, Vol.12, No.2 pp. 189-198, (2011).
5. M. Ott, V. Gogvadze, S. Orrenius, B. Zhivotovsky, "Mitochondria, oxidative stress and cell death", *Apoptosis*, Vol.12, No.5 pp. 913-922, (2007).
6. S. Parthasarathy, D. Steinberg, J. L. Witztum, "The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis", *Annual Review of Medicine*, Vol.43, No.1 pp. 219-225, (1992).

7. F. R. Laurindo, P. L. da Luz, L. Uint, T. F. Rocha, R. G. Jaeger, E. A. Lopes, "Evidence for superoxide radical-dependent coronary vasospasm after angioplasty in intact dogs", *Circulation*, Vol.83, No.5 pp. 1705-1715, (1991).
8. W. J. Cho, H. S. Yoon, Y. H. Kim, J. M. Kim, I. J. Yoo, M. D. Han, I. S. Bang, "Cytoprotective Effects and Gene Expression Patterns Observed Based on the Antioxidant Activity of Lonicera japonica Extract", *Journal of Life Science*, Vol.23, No.8 pp. 989-997, (2013).
9. B. Dan, G. Andrew, "Chinese herbal medicins. Materia Media.", pp. 85-86, WA : Eastland Press, (1986).
10. K. C. Huang, "The Pharmacology of Chinese herbs (2nd Ed.)", pp 8-9, FL : CRC., (1998).
11. Y. N. Lee, "New Flora of Korea. Vol. II.", pp. 418-421, *Kyohak Publishing Co., Ltd, Seoul.*, (2006).
12. Korea Beekeeping Association, "The Korea Beekeeping Bulletin. Serial No. 320", pp. 26-27, Korea Beekeeping Association, (2007).
13. S. Ahmad, A. Zeb, "Phytochemical profile and pharmacological properties of Trifolium repens", *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, Vol.32, No.1 pp. 20200015, (2021).
14. L. Krenn, D. H. Paper, "Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (Trifolium pratense L.)", *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm*, Vol.16, No.12 pp. 1083-1088, (2009).
15. T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J Immunol Methods*, Vol.16, No.1-2 pp. 55-63, (1983).
16. C. Frippiat, Q. M. Chen, S. Zdanov, J. P. Magalhaes, J. Remacle, O. Toussaint, "Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts", *J. Biol. Chem*, Vol.276, No.4 pp. 2531-2537, (2001).
17. K. B. Beckman, B. N. Ames, "The free radical theory of aging natures", *Physiological reviews*, Vol.78, No.2 pp. 547-581, (1988).
18. E. S. Alnemri, D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong, J. Yuan, "Human ICE/CED-3 protease nomenclature", *Cell*, Vol.87, No.2 p. 171, (1996).
19. B. S. Jeon, N. G. Kholodilov, T. F. Oo, S. Y. Kim, K. J. Tomaselli, A. Srinivasan, L. Stefanis, R. E. Burke, "Activation of caspase-3 in developmental models of programmed cell death in neurons of the substantia nigra", *J Neurochem.*, Vol.73, No.1 pp. 322-333, (1999).
20. A. Hartmann, S. Hunot, P. P. Michel, M. P. Muriel, S. Vyas, B. A. Faucheux, A. Mouatt-Prigent, H. Turmel, A. Srinivasan, M. Ruberg, G. I. Evan, Y. Agid, E. C. Hirsch, "Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, Vol.97, No.6 pp. 2875-2880, (2000).
21. T. Matura, M. Kai, Y. Fujii, H. Ito, K. Yamada, "Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells requires caspase-3 activation", *Free Radic Res.*, Vol.30, No.1 pp. 73-83, (1999).
22. G. L. Johnson, R. Lapadat, "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases", *Science (New York, N.Y.)*, Vol.298, No.5600 pp. 1911-1912, (2002).
23. H. K. Kim, "Role of ERK/MAPK signalling pathway in antiinflammatory effects of Ecklonia cava in activated human mast cell line cells", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, Vol7, No.9 pp. 703-708, (2014).
24. K. Z. Guyton, Y. Liu, M. Gorospe, Q.

- Xu, N. J. Holbrook, "Activation of mitogen-activated protein kinase by H_2O_2 : Role in cell survival following oxidant injury", *J Biol Chem.*, Vol.271, No.8 pp. 4138-4142, (1996).
25. I. Ferrer, R. Blanco, M. Carmona, B. Puig, M. Barrachina, C. Gómez, S. Ambrosio, "Active, phosphorylation-dependent mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK), and p38 kinase expression in Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies", *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, Vol.108, No.12 pp. 1383-1396, (2001).
26. H. Nakano, A. Nakajima, S. Sakon-Komazawa, J. -H. Piao, X. Xue, K. Okumura, "Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK", *Cell Death Differ*, Vol.13, No.5 pp. 730-737, (2006).
27. M. S. Cooke, M. D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease", *FASEB J.*, Vol.17, No.10 pp. 1195-1214, (2003).
28. B. M. Rim, C. W. Rim, J. Y. Choi, Y. S. Chung, H. G. Jeong, "Effects of *Lonicera japonica* extract as a biological response modifier", *Environ Mut Car.*, Vol.12, No.1 pp. 45-54, (1992).
29. Z. H. Luo, "The combined modulating effects of cerium nitrate with certain Chinese traditional drugs on altered cell-mediated immunities in scald mice", *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.*, Vol.28, No.9 pp. 562-575, (1990).