

# 미세먼지 PM10으로 손상을 유도한 각질형성세포에서 청각 (*Codium fragile*) 추출물의 항노화 효과

김보애\*#

목원대학교 테크노과학대학 화장품공학과

## Anti-aging effect of *Codium fragile* extract on keratinocytes damaged by fine dust PM10

Bo Ae Kim\*#

Department of Cosmetic Engineering, College of Technology Sciences, Mokwon University, Daejeon, Korea.

### ABSTRACT

**Objectives** : Fine dust caused by environmental pollution cause oxidative damage and skin aging. In this study, The possibility of using the *Codium fragile* extract (CFE) as an anti-aging product for skin improvement was evaluated by confirming the protective effect of skin cells from PM10 (particulate matter 10) through inhibition of ROS and MMPs.

**Methods** : In this study, elastase and collagenase inhibitory activities were evaluated. Cell viability was evaluated by treating keratinocytes (HaCaT cell line) with CFE at various concentrations. The cytoprotective effect from PM10 in keratinocytes was evaluated using the 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) assay. ROS (reactive oxygen species) was measured in keratinocytes damaged by PM10 using DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) fluorescence staining. As an anti-aging effect of CFE, MMP-1 (matrix metalloproteinase-1) and MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) inhibitory activities were evaluated.

**Results** : As a result, CFE decreased the activity of elastase and collagenase. As a result of evaluating the toxicity of CFE, it is non-toxic at a concentration of 10 to 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Although cell viability of HaCaT cells treated with PM10 decreased, cell viability increased by 38% when treated with CFE 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Also, ROS decreased by 8.4%, and MMP-1 and MMP-9 decreased at CFE 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

**Conclusions** : CFE showed excellent cell protection effect, and it is considered that it can be used in anti-aging products for skin improvement by effectively inhibiting ROS and MMPs from keratinocyte damage caused by fine dust.

**Key words** : PM10, Keratinocyte, Oxidative stress, ROS, MMPs, Skin aging

## I. 서론

전 세계적인 산업 발전과 사람들의 소비적 행태는 심각한 환경오염 문제를 발생시킨다. 특히, 대기오염물질은 호흡기, 피부, 심혈관, 뇌신경 질환에 치명적인 질병을 유발하며 현대

인의 주요 사망원인이 되고 있다<sup>1,2)</sup>. 피부는 우리 몸을 둘러싼 최외각 기관이지만 대기오염에 의하여 피부 건강에 악영향을 미치며 각종 염증성 질환과 조기 피부노화를 유도한다<sup>3)</sup>. 대기오염물질에는 오존 ( $\text{O}_3$ ), 이산화질소 ( $\text{NO}_2$ ), 이산화황 ( $\text{SO}_2$ ) 등의 기체 성분과 다양한 조성의 부유 입자상 물질이 포함된다<sup>4)</sup>.

\*#Corresponding and First author : Bo Ae Kim, Department of Cosmetic Engineering, College of Technology Sciences, Mokwon University, Doanbuk-ro 88, Seo-gu, Daejeon 35349, Korea.

· Tel : +82-42-829-7569  
· Received : 12 June 2023

· Fax : +82-42-829-7561  
· Revised : 10 July 2023

· E-mail : kba@mokwon.ac.kr  
· Accepted : 25 July 2023

크기가 10  $\mu\text{m}$  미만인 부유 입자상 물질을 PM10 (particulate matter 10)이라고 하며 건설현장, 매립지에서 발생하는 먼지, 연소물질, 꽃가루 등도 포함된다. 독성물질이 아닌 탄소로 이루어진 단일 성분이라 하더라도 입자가 미세하면 폐로 흡입되거나 세포 표면에 독성을 나타낼 수 있다. 특히 문제가 되는 경우는 PM10이 aryl hydrocarbon 등의 각종 유기화합물과 납, 카드뮴, 코발트와 같은 중금속을 함께 포함하는 것이며, 대기에서 이산화황, 유기화합물과의 화학반응을 통해 형성되는 경우이다<sup>5,6</sup>. PM10은 눈, 코, 구강, 귀 등을 통해 체내로 유입될 수 있으며, 피부 모공이나 피부장벽이 약화된 경우 피부에 충분히 침투될 수 있다. PM10의 성분은 세포 내외에서 화학반응이나 생물학적 대사를 통해 활성산소종 (ROS)을 발생시켜, 산화적 손상과 염증 반응을 일으킨다<sup>7,8</sup>. 한편, 다양한 종류의 항산화제가 PM10에 의해 유발되는 산화 스트레스와 염증 반응을 완화시켜 피부 건강을 보호하는 데 도움이 될 수 있을 것으로 기대되고 있다<sup>9,10</sup>. 미세먼지는 피부와 호흡기에 직접적으로 접촉함으로써 손상을 유도한다. 특히 미세먼지는 피부장벽기능 감소, 건선, 아토피성 피부염, 여드름과 같은 염증성 피부질환의 진행에 영향을 미친다<sup>11</sup>. 각질형성세포는 사람의 피부에서 가장 외측에 위치한 세포이다. 유해한 외부 항원에 대한 최외각의 방어선으로 세포 표면에 다양한 패턴 인식 수용체 (pattern recognition receptors)를 발현해 세포가 다양한 병원체를 인식하고 면역 반응이 진행된다. 각질형성세포는 cytokine, chemokine를 포함한 염증 세포 활성화에 기여하는 다양한 분자를 생성한다. 각질형성세포는 피부 면역 항상성의 조절하고 유지하는데 중요한 역할을 하며, 각질세포 손상에 의한 피부장벽 불균형은 피부염증의 발달 및 진행과 관련이 있다<sup>12</sup>.

청각 (*Codium fragile*)은 청각과에 속하는 녹조류이며 우리나라, 동아시아, 오세아니아 해안에 분포한다<sup>13</sup>. 우리나라 경상도에서는 청각을 말려서 양념과 버무려 김장의 속재료로 사용해 풍미를 더하며, 경남, 제주지역에서는 나물 등의 식재료로 사용되고, 일본과 중국은 물론 하와이에서도 식용으로 이용된다<sup>14</sup>. 예로부터 청각은 정약전 자산어보 (茲山魚譜)에서 해송 (海松)으로 기록되어 있으며, 외형은 원주상으로 바깥층으로 향하여 곤봉상의 가지로 된 포낭지 (胞囊枝)가 울타리 모양을 하고 있다. 동의보감, 본초강목, 식성본초, 식료본초 등의 고서의 기록이 있는 것으로 보아 예로부터 청각을 식용으로 사용했다는 것을 알 수 있다<sup>15</sup>. 또한 청각을 달여 마시면 구충효과, 수종치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 기생충에 의한 감염, 배변장애 등을 치료하기 위한 전통의학 치료제인 구충제로 사용되어져 왔다. 청각 추출물은 항산화, 그리고 항염 및 항암 효과와 면역 활성을 가지며, 여러 분야에서 응용할 수 있는 유용한 해조류이다<sup>16</sup>. 녹조류인 청각은 탄수화물, cellulose, pectin, mannan 및 xylan 등의 다당류를 풍부하게 포함하고 있다<sup>17-19</sup>.

본 연구의 목적은 PM10에 노출된 각질형성세포에서 청각 에탄올 추출물의 세포보호효과, ROS, MMPs를 효과적으로 저해함으로써 피부의 개선을 위한 항노화 제품에 활용할 수 있는지를 평가하는 것이다. PM10의 노출은 ROS의 생성을 유도하며 MMP-1, MMP-9 등의 증가를 초래하므로<sup>20</sup> 본 연구의 시험 항목으로 설정해 수행하였다. PM10 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로

손상을 유도한 각질형성세포에서 elastase, collagenase activity, MTT assay를 이용한 세포생존율, DCF-DA 형광 염색을 이용한 ROS 측정, MMP-1, MMP-9 발현으로 CFE의 유효성을 평가하였다. 본 연구 결과에서 청각 에탄올 추출물이 미세먼지에 의한 피부세포 독성을 안전하고 효과적으로 완화하는데 도움을 줄 수 있는 것으로 확인되었으며, 세포내 ROS 감소, MMPs 활성 평가를 통해 피부의 개선을 위한 항노화 제품에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 추출물 제조

본 실험에 사용된 청각은 전남 완도에서 채취된 것을 사용하였으며, 다음과 같이 추출되었다. 건조 후 분쇄한 청각 100 g 과 주정 70% 에탄올 (주정판매월드, Jeonju, Korea) 0.9 L를 용매로 가하여 45°C에서 40 KHz (Vibra-cell, Sonics VC750, USA)에서 1시간 동안 초음파 추출하였다. 이후 추출용액을 원심분리 4,000 rpm에서 5분 동안 상등액을 분리하였다. 분리된 추출액은 Whatman No 1 filter paper로 여과하고 rotary vacuum evaporator (EYELA, N-1000, Tokyo, Japan)로 농축하였으며 최종 8.7%의 수득률을 나타내었다. 추출물은 -70°C에서 보관하면서 생리활성시험을 수행하였다.

### 2. 시약

세포배양에 사용된 fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, dulbecco's modified eagle medium(DMEM), trypan blue stain은 Gibco BRL Co. (Grand Island, USA)에서 구입하였고, fine dust PM10 (ERM-CZ100), haemocytometer (Marienfeld GmbH, Marienfeld, Germany), 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), porcine pancreatic elastase는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)에서 구입하였다.

### 3. Elastase와 collagenase 저해능 측정

#### 1) Elastase 저해능 측정

Elastin을 분해하여 주름 형성을 유도하는 효소인 elastase의 저해능을 측정하였다. 청각 추출물 0.1 mL와 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 1 mL, 0.8 mM N-succinyl-(Ala)3- $\rho$ -nitroanilide 기질 용액 0.1 mL을 혼합하고, 1.0 U/mL porcine pancreatic elastase 0.1 mL을 첨가 후 37°C에서 30분 동안 반응을 시켰으며 410 nm의 파장에서  $\rho$ -nitroaniline 생성량을 흡광도로 측정하였다<sup>21-23</sup>. Elastase 저해활성도는 다음 계산식을 이용하여 산출하였다.

Inhibitory activity (%)

$$= [1 - \text{시료첨가군 (OD}_{30 \text{ min}} - \text{OD}_{0 \text{ min}}) / \text{무첨가군 OD}_{0 \text{ min}}] \times 100$$

## 2) Collagenase 저해능 측정

주름 유발과 관련되는 효소인 collagenase 저해 효과를 측정하였다. 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 청각 추출물 농도별로 0.1 mL, 4-phenylazobenzyl oxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/mL) 농도인 기질용액 0.25 mL을 혼합 후 collagenase 0.2 mg/mL 농도로 0.15 mL를 첨가했다. 상온 26°C (±3)에서 20분 반응시킨 후 0.5 mL의 6% 구연산으로 반응을 정지하고, ethyl acetate 2 mL 처리하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>24,25</sup>. Collagenase 저해활성도는 다음 계산식을 이용하여 산출하였다.

Inhibitory activity (%)

$$= [1 - \text{시료첨가군 (OD}_{30 \text{ min}} - \text{OD}_{0 \text{ min}}) / \text{무첨가군 OD}_{0 \text{ min}}] \times 100$$

## 4. 세포배양과 PM10 처리

사람 각질형성 세포주 (human keratinocyte cell)는 HaCaT세포 (Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)를 사용하였다. 세포는 10% (v/v) FBS를 포함한 DMEM 배지를 사용했으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 계대 배양하였다. PM10을 DMEM 배지에 첨가하여 50 µg/mL이 최종 농도가 되도록 하였다.

## 5. MTT assay

청각 추출물의 농도에 따른 독성과 PM10으로부터의 세포 보호효과를 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였다. HaCaT 세포를 96-well plate에 1×10<sup>4</sup>cells/well이 되도록 분주하고, 시료를 다양한 농도로 처리한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 배양하였다. 여기에 5 mg/mL MTT 용액 0.02 mL를 첨가하여 3시간 반응시킨 후 배양액을 제거하고 각 well에 DMSO 0.15 mL를 처리하여 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 ELISA reader 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

## 6. ROS 생성 측정

세포를 형광 표지인자인 DCF-DA로 ROS 생성을 측정하였다. HaCaT 세포에 10 µM DCF-DA를 처리하여 5분 단위로 측정하며 발광 정도를 관찰하였으며 20분 반응하였다. 이후 세포를 1% SDS를 포함한 완충용액 (20 mM Tris-Cl, 2.5 mM의 EDTA, pH 7.5)에 용해한 후, 13,000 rpm 에서 30분 원심분리하고 상등액을 획득하였다. 형광 강도는 흡수 파장 488 nm 및 방출 파장 525 nm에서 형광 현미경 (Nikon, Eclipse TS100 Epi-fluorescence, Tokyo, Japan)으로 형광 강도를 측정하였다. 음성대조군의 형광강도를 기준으로 하여 백분율 (% of control)로 수치화하였다.

## 7. MMP-1와 MMP-9 측정

HaCaT 세포를 96-well plate를 사용해 5 × 10<sup>4</sup>개로 하여 청각 추출물을 무혈청 배지에 용해하여 농도별로 24시간 배양시킨 후 전처리하였다. 이후 배지를 제거하고 PBS로 세척 후 PM10을 포함한 배지에 노출시켜 세포 손상을 유도한 후 세포 배양 상등액을 189 × g에서 5분 동안 원심분리하고 MMP-1 및 MMP-9 level을 총 MMP-1 (cat. no. DMP100,) 및 MMP-9 (cat. no. DMP900) ELISA kit (R&D Systems Inc., MN, USA)를 사용하여 fluorescence microplate reader (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, USA)에서 측정하였다.

## 8. 통계적 검증

실험 결과를 mean ± SEM으로 나타내었고, SPSS (Statistical Package for Social Science)WIN 25.0 프로그램을 활용하여 분석하였다. 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 독립표본 t-검정과 일원배치 분산분석 (ANOVA)을 실시하였으며, 사후검정은 Duncan을 실시하였다. 유의수준은 p < 0.05 미만인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

# III. 결 과

## 1. Elastase 저해활성

본 실험에서 양성대조군은 elastase 저해활성이 높은 ursolic acid를 사용하였으며<sup>26</sup> 100 µg/mL 농도에서 15.77±0.45%의 저해활성을 나타내었고, 시료를 처리하지 않은 음성대조군은 0의 값을 나타내었다. 청각 에탄올 추출물 (CFE) 처리한 실험군의 경우 10, 20, 40, 80 µg/mL 농도에서 각각 11.63±1.13, 12.87±1.48, 13.50±0.88, 15.53±0.57%의 저해활성을 나타내었다 (Figure 1).

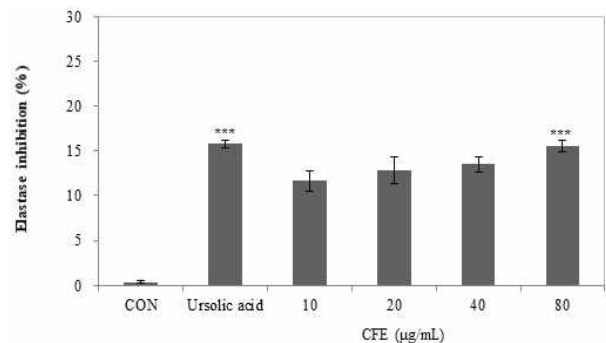


Figure 1. Elastase inhibitory activity of ethanol extract from *Codium fragile* (CFE). Data shown is from representative experiment repeated three times with similar results. The values are the mean±standard error of mean \*\*\* p<0.001 compared the control group.

## 2. Collagenase 저해활성

Collagenase 저해활성 측정을 위해 양성대조군으로 EGCG (epigallocatechin gallate)를 사용하였으며<sup>27)</sup> 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서  $21.74 \pm 1.85\%$ 의 활성을 나타내었다. 시료를 처리하지 않은 음성대조군은 0의 값을 나타내었다. 청각 에탄올 추출물 처리한 실험군의 경우 10, 20, 40, 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $6.20 \pm 0.71$ ,  $11.17 \pm 1.65$ ,  $12.60 \pm 0.65$ ,  $16.14 \pm 0.78\%$  저해활성을 나타내었다 (Figure 2).

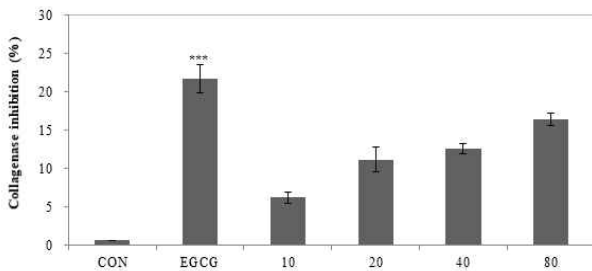


Figure 2. Collagenase inhibitory activity of ethanol extract from *Codium fragile* (CFE). Data shown is from representative experiment repeated three times with similar results. The values are the mean  $\pm$  standard error of mean \*\*\*  $p < 0.001$  compared the control group.

## 3. 세포보호 효과

PM10으로 손상을 유도한 HaCaT 세포의 독성과 청각 추출물의 보호효과에 의한 세포생존율을 평가하기 위하여, MTT assay를 수행하였다. 보호효과 실험에 앞서 청각 추출물의 10, 20, 40, 80, 100, 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 같이 다양한 농도로 세포 독성을 평가하였다. 그 결과 100, 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 독성을 나타내었으며, 이후에 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이하의 독성이 없는 농도로 실험을 수행하였다. 세포손상을 유도하는 PM10의 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각질형성세포는  $55.12 \pm 5.65\%$ 로 세포생존율이 감소하였다. 반면 청각 에탄올 추출물을 함께 처리한 실험군의 경우 10, 20, 40, 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 각각  $58.16 \pm 7.29$ ,  $60.69 \pm 1.47$ ,  $70.93 \pm 1.30$ ,  $76.13 \pm 16.00\%$ 로 시료의 최고농도의 경우 PM10 단독 처리군에 비해 세포생존율이 38% 증가하여 세포보호 효과를 나타내었다 (Figure 3).

## 4. PM10으로 산화적 손상을 유도한 세포내 ROS 평가

청각 에탄올 추출물이 PM10 노출에 의해 일어나는 각질형성세포 내의 활성산소 감소에 영향을 나타내는지를 평가하기 위해 DCF-DA 형광 측정을 수행하였다. 그 결과 PM10 단독 처리군에서는 ROS가  $175.40 \pm 9.41\%$ 로 음성대조군에 비해 약 35% 증가하였다. 반면 청각 에탄올 추출물을 10, 20, 40, 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 처리한 실험군에서는 ROS 수치가 각각  $170.77 \pm 2.21$ ,  $17.60 \pm 9.92$ ,  $147.77 \pm 19.50$ ,  $127.53 \pm 4.39\%$ 로 유의하게 감소되었다. 특히 최고농도인 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 PM10 단독 처리군에 비해 8.4%의 ROS가 감소되어 청각추출물이 미세먼지에 의한 세포의 산화적 손상을 감소시키는 것으로 나타났다 (Figure 4).

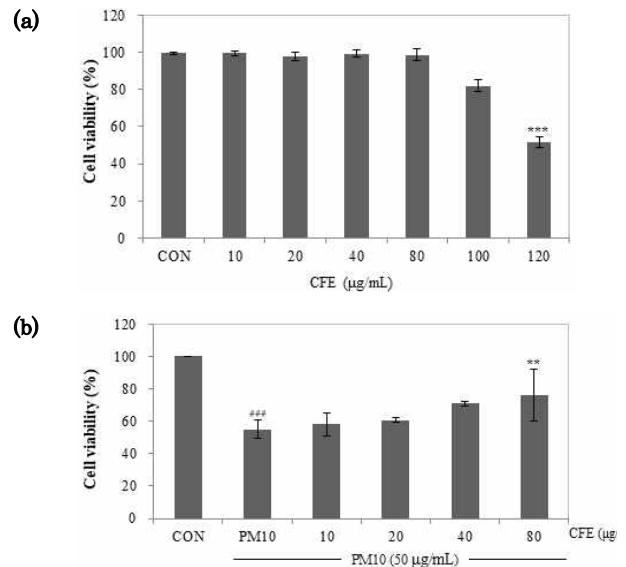


Figure 3. Protective effect of ethanol extract from *Codium fragile* (CFE) on the PM10 induced cytotoxicity. HaCaT cells were exposed to PM10 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and treated with various concentrations (10, 20, 40, 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of CFE. The data is expressed as percentage cell viability and represent the means. (a) Cell viability with various concentrations of CFE, (b) Protective effect of CFE on keratinocytes damaged by PM10. Data shown are from representative experiment repeated three times with similar results. The values are the mean  $\pm$  standard error of mean. ###  $p < 0.001$  as compared the control group, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the PM10-treated control group.

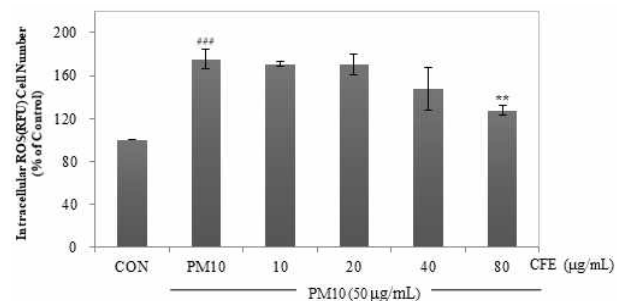


Figure 4. Cellular antioxidant activity of ethanol extract from *Codium fragile* (CFE) in PM10 induced oxidative stress in HaCaT cells. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels generated by PM10 were detected using a spectrofluorometer after DCF-DA staining. Data shown is from representative experiment repeated three times. The values are the mean  $\pm$  standard error of mean. ###  $p < 0.001$  as compared the control group, \*\*  $p < 0.01$  compared with the PM10-treated control group.

## 5. MMP-1와 MMP-9 저해활성

MMP-1 및 MMP-9 저해활성 평가를 수행하였으며, PM10 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 HaCaT 세포에 처리한 경우 MMP-1와 MMP-9의 양이 증가하였다. 반면 청각 에탄올 추출물 10, 20, 40, 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 농도의존적으로 MMP-1과 MMP-9의 수준은 PM10 단독 처리군에 비해 농도의존적으로 억제되었다. MMP-1 농도는 음성대조군에 비해 PM10 단독 처리군에서 9.3배, MMP-9 농도는 14배 높았다. 대조적으로, 청각 추출물 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서는 MMP-1 및 MMP-9 수준이 각각 38.5% 및

55.6 %로 유의하게 감소하였다 (Figure 5). 따라서 데이터는 청각 추출물이 미세먼지로 인해 증가하는 피부세포의 MMPs의 발현을 억제하고 주름 형성을 억제할 수 있을 것으로 판단된다.

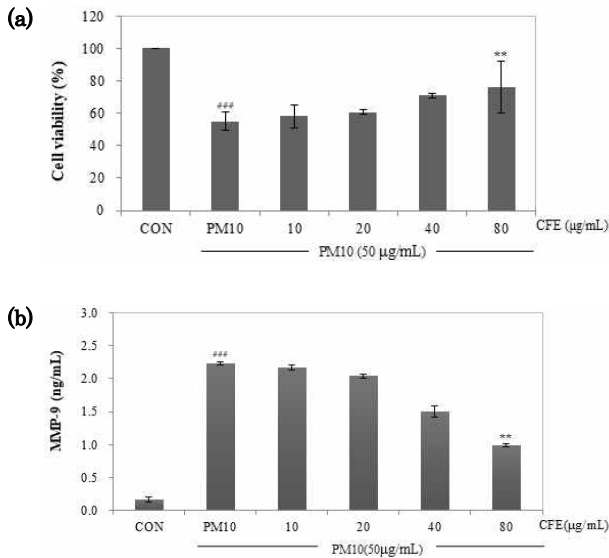


Figure 5. Effects of ethanol extract from *Codium fragile* (CFE) into matrix metalloproteinase (MMP-1 and MMP-9) secretion by PM10 induced HaCaT cells. Cells were treated with CFE before PM10 exposure. The level of secretion of (a) MMP-1, (b) MMP-9 were measured in the culture medium of PM10 treated HaCaT cells. The values are the mean  $\pm$  standard error of mean. ###  $p < 0.001$  as compared the control group, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the PM10-treated control group.

#### IV. 고 찰

미세먼지는 DNA 손상, 지질과산화 (lipid peroxidation) 및 단백질 카르보닐화 (protein carbonylation)를 유발하는 ROS를 생성하여 각질형성세포에서 산화적 스트레스를 유도한다. PM10에 의해 유발된 산화적 스트레스는 TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (interleukin 1 beta), IL-6 (interleukin 6), IL-33 (interleukin 33) 및 TSLP (thymic stromal lymphopoietin), 질환을 초래한다<sup>28)</sup>. 미세먼지에 의한 산화 스트레스가 진행된 후 결국 염증반응을 인한 세포와 조직에 심각한 손상으로 이어진다<sup>29)</sup>. 따라서 높은 ROS 소거능을 가지면서도 독성이 낮은 천연유래 ROS 소거제는 산화적 스트레스로 인한 다양한 질병을 예방하고 제어하기 위한 의약품 또는 기능성화장품 소재를 개발하는 데 이상적인 방향이 될 수 있다<sup>30)</sup>.

청각에 대한 기존 연구에서는 추출시 용매 따른 다양한 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 열수, 에탄올, 메탄올 추출물의 경우 항균, 항산화 능력을 나타내며, 에탄올 추출물의 경우 47%의 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다. 주로 천연 항산화제로서의 이용 가능성에 대한 연구가 많으며 메탄올, 에틸아세테이트, 헥산 순으로 높은 항산화능을 나타낸다<sup>31-34)</sup>. 또한 청각 에틸아세테이트, 부탄올 분획물이 UVB 노출에 의한 세포손상으로 부터 COX-2 (cyclooxygenase-2), iNOS

(inducible nitric oxide synthase), PGE<sub>2</sub> (Prostaglandin E<sub>2</sub>), NO (nitric oxide)와 같은 염증매개 인자를 효과적으로 억제하는 것으로 연구된 바가 있다<sup>35)</sup>. 이러한 선행연구를 바탕으로 하여 청각 추출물이 미세먼지에 의한 각질형성세포의 산화적 손상을 억제할 수 있는지에 대하여 일련의 실험을 수행하였다.

Elastin과 collagen은 피부 탄력을 유지하며, elastase와 collagenase는 각각 elastin과 collagen을 분해하는 효소로서 노화하거나 외부적인 요인에 의하여 이상조직이 발생하였을 때 이들 효소의 활성이 증가하여 피부주름과 탄력을 감소시킨다. 즉 피부세포의 elastase와 collagenase를 저해함은 주름개선 효과를 나타내는 것이라 할 수 있다. 본 연구에서는 청각 에탄올 추출물을 각질형성세포에 전처리하여 PM10의 elastase 저해활성을 평가하였다. 그 결과 청각 추출물 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서  $15.53 \pm 0.57\%$ 의 저해활성을 나타내어 양성대조군인 ursolic acid와 유사한 활성을 나타내는 것으로 나타났다. Collagenase 저해활성 측정에서는 청각 에탄올 추출물 처리한 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서  $16.14 \pm 0.78\%$  저해활성을 나타내었다. 이러한 결과는 청각 추출물이 주름개선효과를 위한 천연소재로서의 활용 가능성이 높다는 것을 의미한다.

각질형성세포에 청각 추출물을 처리하여 PM10에 의한 손상으로 부터의 세포보호효과를 MTT assay로 평가하였다. 그 결과 PM10의 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 단독처리한 양성대조군에서는 각질형성세포의 생존율이  $55.12 \pm 5.65\%$ 로 감소하였다. 반면 청각 에탄올 추출물 실험군에서 최고농도인 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서  $76.13 \pm 16.00\%$ 의 세포생존율을 나타내어 PM10 단독 처리군에 비해 38% 세포생존율이 증가한 것을 보아 PM10으로부터의 세포보호 효과를 나타내는 것으로 판단된다. 이후 실험에서 각질형성세포 내의 ROS를 측정하기 위해 DCF-DA 형광염색을 통하여 평가하였다. 그 결과 PM10 단독 처리군에서는  $175.40 \pm 9.41\%$ 로 음성대조군에 비해 ROS가 35% 이상 증가하였는데, 청각 에탄올 추출물을 처리한 실험군에서는 ROS 수치가 감소되었다. 특히 최고농도인 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서는 PM10 단독 처리군에 비해 8.4%의 ROS가 감소되었으며, 청각 추출물이 미세먼지에 의해 증가한 ROS를 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

외부 스트레스에 의해 피부에서 생성된 ROS는 세포막에서 지질 과산화를 시작으로 일련의 산화 반응을 통해 세포를 손상시킨다. 과도한 ROS는 단백질, DNA, 지질과 같은 세포 구성요소를 손상시키고 MMPs의 발현을 촉진하여 조직 콜라겐 매트릭스 및 엘라스틴 섬유 분해를 통해 피부 노화를 가속화한다. 따라서 세포 내 ROS 억제 활성을 가진 항산화제는 피부 노화를 억제할 수 있다. ROS는 정상 세포에서 항산화 인자와 균형 있게 존재하지만, ROS가 과잉이거나 항산화 인자가 부족하면 세포 내 산화력이 증가한 상태가 된다<sup>36-38)</sup>. PM10의 노출은 ROS의 생성 및 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8과 같은 염증성 사이토카인을 생성해 산화적 손상을 유도한다. 또한 PM의 노출로 하이드록시 라디칼 (hydroxyl radical,  $\cdot\text{OH}$ ), 슈퍼옥사이드 이온 (superoxide anion,  $\text{O}_2^-$ ), 과산화수소 (hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ )와 같은 ROS가 증가하며 MMPs, 즉 MMP-1, MMP-2 및 MMP-9 등의 증가를 초래하므로<sup>39)</sup> 본 연구의 시험 항목으로 설정하여 수행하였다. MMPs는 피부 결합 조

직을 형성하는 콜라겐 섬유를 분해하고, 피부 강도와 탄력 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다. MMPs의 활성은 산화적 스트레스로부터 증가되며 결국 프로콜라겐 발현의 감소로 노화의 원인이 된다<sup>40)</sup>.

앞서 ROS 감소효능을 확인한 후 MMPs 저해활성을 확인하기 위해 PM10으로 산화적 손상을 유도한 HaCaT에서 청각 추출물의 활성을 평가하였다. 우선 PM10을 단독으로 처리한 군에서는 MMP-1와 MMP-9의 양이 증가하였고, 음성대조군과 비교하였을 때 각각 9.3, 14배 증가하였다. 반면 청각추출물을 처리한 군에서는 MMP-1 및 MMP-9 수준이 각각 38.5% 및 55.6%로 감소된 것을 확인하였다. 이들 결과를 종합해 볼 때 청각 추출물이 미세먼지에 의한 산화적 손상으로부터 피부세포 보호와 주름생성 요인을 억제하여 항노화에 효과적인 소재가 될 수 있음을 시사한다.

MMP-1 및 MMP-9 저해활성 평가를 수행하였으며, PM10 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 HaCaT 세포에 처리한 경우 MMP-1와 MMP-9의 양이 증가하였다. 반면 청각 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 MMP-1과 MMP-9의 수준은 PM10 단독 처리군에 비해 농도의존적으로 억제되었다. MMP-1 농도는 음성대조군에 비해 PM10 단독 처리군에서 9.3배, MMP-9 농도는 14배 높았다. 대조적으로, 청각 추출물 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리군에서는 MMP-1 및 MMP-9 수준이 각각 38.5% 및 55.6%로 유의하게 감소하였다 (Figure 5). 따라서 데이터는 청각 추출물이 미세먼지로 인해 증가하는 피부세포의 MMPs의 발현을 억제하고 주름 형성을 억제할 수 항노화 소재로 활용될 수 있을 것으로 평가된다.

## V. 결 론

본 연구는 PM10으로 손상을 유도한 각질형성세포에서 청각 에탄올 추출물의 세포보호, elastase, collagenase, ROS 그리고 MMP-1, MMP-9 저해활성에 대해 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 청각 에탄올 추출물 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서  $15.53 \pm 0.57\%$ 의 elastase 저해활성을 나타내어 ursolic acid와 유사한 활성을 나타냈다. Collagenase 저해활성 측정에서는 동일한 농도에서  $16.14 \pm 0.78\%$  저해활성을 나타내었다.
2. 세포보호효과를 평가하기 위해 MTT assay로 측정된 결과, 청각 에탄올 추출물 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리한 실험군에서  $76.13 \pm 16.00\%$ 의 세포생존율을 나타내어 PM10 단독 처리군에 비해 38% 세포생존율이 증가하였다.
3. DCF-DA 형광 염색을 통하여 세포내 ROS를 측정된 결과, PM10 단독 처리군에 비해 청각 에탄올 추출물 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도 처리군에서 8.4% 감소되었다.
4. PM10을 HaCaT 세포에 처리한 경우 MMP-1와 MMP-9

의 양이 증가한 반면 청각 에탄올 추출물 40, 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도 처리군에서 유의하게 감소하였다.

결과적으로 청각 에탄올 추출물은 우수한 세포보호효과를 나타내었으며, 미세먼지에 의한 세포손상으로부터 ROS와 MMPs를 효과적으로 저해함으로 피부의 개선을 위한 항노화 제품에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

## References

1. Mukherjee A, Agrawal M. World air particulate matter: Sources, distribution and health effects. *Environ. Chem. Lett.* 2017 ; 15 : 283-309. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0611-9>
2. Ngoc LTN, Park D, Lee Y, Lee YC. Systematic Review and Meta-Analysis of Human Skin Diseases Due to Particulate Matter. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2017 ; 14 : 1458-69. <https://doi.org/10.3390/ijerph14121458>
3. Kim KE, Cho D, Park HJ. Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases. *Life Sci.* 2016 ; 152 : 126-34. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.039>
4. Krzyzanowski M. WHO Air Quality Guidelines for Europe. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 2008 ; 71(1) : 47-50. <https://doi.org/10.1080/15287390701557834>
5. Fuzzi S, Baltensperger U, Carslaw K, Decesari S, Der GHD, Facchini MC, Fowler DK, Langford B, Lohmann U. Particulate matter, air quality and climate: Lessons learned and future needs. *Atmos. Chem. Phys.* 2015 ; 15(14) : 8217-99. <https://doi.org/10.5194/acp-15-8217-2015>
6. Zhu X, Qiu H, Wang L, Duan Z, Yu H, Deng R, Zhang Y, Zhou L. Risks of hospital admissions from a spectrum of causes associated with particulate matter pollution. *Sci. Total Environ.* 2019 ; 656 : 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.240>
7. Lee CW, Lin ZC, Hsu LF, Fang Y, Chiang YC, Tsai MH, Lee MH, Li SY, Hu SC, Lee IT. Eupafolin ameliorates COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> production in particulate pollutants-exposed human keratinocytes through ROS/MAPKs pathways. *J. Ethnopharmacol.* 2016 ; 189 : 300-9. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.002>
8. Ha JW, Song H, Hong SS, Boo YC. Marine Alga *Ecklonia cava* Extract and Dieckol Attenuate Prostaglandin E<sub>2</sub> Production in HaCaT Keratinocytes Exposed to Airborne Particulate Matter. *Antioxidants.* 2019 ; 8(6) : 190-5. <https://doi.org/10.3390/antiox>

- 8060190
9. Boo YC. Can Plant Phenolic Compounds Protect the Skin from Airborne Particulate Matter?. *Antioxidants*, 2019 ; 8(9) : 379–97. <https://doi.org/10.3390/antiox8090379>
  10. Bae IA, Ha JW, Choi JY, Boo YC. Antioxidant Effects of Korean Propolis in HaCaT Keratinocytes Exposed to Particulate Matter 10. *Antioxidants*, 2022 ; 11(4) : 781–99. <https://doi.org/10.3390/antiox11040781>
  11. Kim KE, Cho D, Park HJ. Air pollution and skin diseases: adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases, *Life Sci*, 2016 ; 152 : 126–34. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.03.039>
  12. Chieosilapatham P, Kiatsurayanon C, Umehara, JV, Trujillo-Paez, Peng GHY, Nguyen LTH, Niyonsaba F. Keratinocytes: innate immune cells in atopic dermatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 2021 ; 204(3) : 296–309. <https://doi.org/10.1111/cei.13575>
  13. Lee JB, Ohta Y, Hayashi KT. Immunostimulating effects of sulfated galactan from *Codium fragile*. *Carbohydr Res.* 2010 ; 345(10) : 1452–4. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.02.026>
  14. Oh YS, Lee IK, Boo SM. An annotated account of Korean economic seaweeds for food, medical and industrial uses. *Algae*. 1990 ; 5(1) : 57–71.
  15. Chengkui Z, Tseng CK, Junfu Z, Chang CF. Chinese seaweeds in herbal medicine. *Hydrobiologia*, 1984 ; 116 : 152–4.
  16. Kang CH, Choi YH, Park SY, Kim GY. Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Codium fragile* in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Med. Food*, 2012 ; 15(1) : 44–50. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.1540>
  17. Cho KJ, Lee YS, Ryu BH. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J. Fish. Aqua. Sci.* 1990 ; 23(5) : 345–352.
  18. Rogers DJ, Jurd KM, Blunden G, Paoletti S, Zanetti F. Anticoagulant activity of a proteoglycan in extracts of *Codium Fragile* sp. atlanticum. *J. Appl. Phycol.* 1990 ; 2 : 357–61.
  19. Rogers DJ, Loveless RW. Electron microscopy of human erythrocytes agglutinated by lectin from *Codium fragile* sp. tomentosoides and pseudohaemagglutinin from *Ascophyllum nodosum*. *J. Appl. Phycol.* 1991 ; 3 : 83–6.
  20. Lee AR, Kim SH, Kim SJ, Kim KJ, Kwon O, Choi JY, Roh SS. Anti-skin-aging Effect of *Mori Folium* through decreased Advanced glycation end product (AGEs). *Kor. J. Herbol.* 2017 ; 32(5) : 7–12. <http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2017.32.5.7>
  21. Lee EH, Cho YJ. Elevation of anti-oxidative activity and inhibitory activities against tyrosinase, elastase, collagenase and hyaluronidase of *Oplismenus undulatifolius* by elicitor treatment. *J Appl Biol Chem.* 2020 ; 63(3) : 221–7. <https://doi.org/10.3839/jabc.2020.030>
  22. Kraunsoe JA, Claridge TD, Lowe G. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry.* 1996 ; 35 : 9090–6. <https://doi.org/10.1021/bi953013b>
  23. Kim CJ, Shim JK, Kwon KC, Lim JD, Choi SK, Yu CY, Lee JG. Changes in Non-saponin Fatty Acid Content and Increases in Inhibitory Activities of Collagenase and Elastase by Treatment with *Saccharomyces cerevisiae* of the Supercritical Fluid Extracted Oil of the Adventitious Roots Culture of Wild Mountain Ginseng Korean. *J. Medicinal Crop Sci.* 2018 ; 26(2) : 170–80. <http://dx.doi.org/10.7783/KJMCS.2018.26.2.170>
  24. Wunsch E, Heidrich HG. For the quantitative determination of collagenase. *Hoppe-Seyler's Physiol Chem.* 2009 ; 333 : 149–51. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1963.333.1.149>
  25. Seok JK, Lee JW, Kim YM, Boo YC. Punicalagin and (-)-epigallocatechin-3-gallate rescue cell viability and attenuate inflammatory responses of human epidermal keratinocytes exposed to airborne particulate matter PM10. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2018 ; 31(3) : 134–43. <https://doi.org/10.1159/000487400>
  26. Park JY, Hwang J, Yun JK, Han KH, Do EJ, Kim Sung OK, Kim MR. Effect of *Ssanghwa-tang* Extract on Antioxidant and Anti-aging Enzyme Activities. *Kor. J. Herbol.* 2012 ; 27(3) : 67–74. <https://doi.org/10.6116/kjh.2012.27.3.67>
  27. Youn SN, Kim YJ, Lee YJ, Kim MR, Yoo WK. Effect of ethanol extract from mixture including *Angelicae Dahuricae Radix* on Dermal Anti-aging and Whitening. *Kor. J. Herbol.* 2019 ; 34(6) : 109–15. <http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2019.34.6.109>
  28. Federico A, Morgillo, Tuccillo FC, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int. J. Cancer.* 2007 ; 121(11) : 2381–6. <https://doi.org/10.1002/ijc.23192>
  29. Choi MK, Kim J, Park HM, Lim CM, Pham TH, Ha Shin Y, Kim SE, Oh DK, Yoon DY. The DPA-derivative 11S, 17S-dihydroxy 7,9,13,15,19 (Z,E,Z,E,Z)-docosapentaenoic acid inhibits IL-6 production by inhibiting ROS production and ERK/NF- $\kappa$ B pathway in keratinocytes HaCaT stimulated with a fine dust PM10. *Ecotoxicology and Environmental Safety.*

- 2022 ; 232 : 113252. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113252>
30. Kim MS, Kim MK, Han DH, Ko K, Kim SY. Antibacterial Activity and other Functions of *Codium fragile* and *Chaenomeles sinensis* Extracts by Extraction Method. *Korean S. Bio Journal*. 2018 ; 33(2) : 89–94. <http://dx.doi.org/10.7841/ksbbj.2018.33.2.89>
  31. Shin DB, Han EH, Park SS. Cytoprotective Effects of Phaeophyta Extracts from the Coast of Jeju Island in HT-22 Mouse Neuronal Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2014 ; 42(2) : 224–30. <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2014.43.2.224>
  32. Kolsi RBA, Salah HB, Hamza A, Elfeki A, Belguith K. Characterization and evaluating of antioxidant and antihypertensive properties of green alga (*Codium fragile*) from the coast of Sfax. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2017 ; 6(2) : 186–91.
  33. Lee JH, Kim BA. A Study on Seaweed Sea Staghorn (*Codium fragile*) Ethanol Extract for Antioxidant. *The journal of Convergence on Culture Technology*. 2019 ; 5(4) : 467–72. <https://doi.org/10.17703/JCCT.2019.5.4.467>
  34. Lee C, Park GH, Ahn EM, Kim BA, Park CI, Jang JH. Protective effect of *Codium fragile* against UVB-induced pro-inflammatory and oxidative damages in HaCaT cells and BALB/c mice. *Fitoterapia*. 2013 ; 86 : 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.01.020>
  35. Bailly C, El MB, Corbineau HF. From intracellular signaling networks to cell death: The dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus, Biol*. 2008 ; 331(10) : 806–14. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.022>
  36. Vurusaner B, Poli G, Basaga H. Tumor suppressor genes and ROS: Complex networks of interactions. *Free, Radic, Biol, Med*. 2012 ; 52(1) : 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.035>
  37. Dai J, Ma H, Fan J, Li Y, Wang J, Ni H, Xia G, Chen S. Crude polysaccharide from an anti-UVB cell clone of *Bupleu-rum scorzonerifolium* protect HaCaT cells against UVB-induced oxidative stress. *Cytotechnology*. 2011 ; 63(6) : 599–607. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9381-6>
  38. Seok JK, Choi MA, Ha JW, Boo YC. Role of Dual Oxidase 2 in Reactive Oxygen Species Production Induced by Airborne Particulate Matter PM10 in Human Epidermal Keratinocytes. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*. 2019 ; 45(1) : 57–67. <https://doi.org/10.15230/SCSK.2019.45.1.57>
  39. Cho S, Kim HH, Lee MJ, Lee S, Park CS, Nam SJ, Han JJ, Kim JW, Chung JH. Phosphatidylserine prevents UV-induced decrease of type I procollagen and increase of MMP-1 in dermal fibroblasts and human skin in vivo. *J. Lipid Res*. 2008 ; 49(6) : 1235–1245. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700581-JLR200>
  40. Jang YA, Kim BA. Protective Effect of Spirulina-Derived C-Phycocyanin against Ultraviolet B-Induced Damage in HaCaT Cells. *Medicina*. 2021 ; 16(3) : 273–85. <https://doi.org/10.3390/medicina57030273>