

## 쿠메스트롤의 미토콘드리아 생합성 증가를 통한 피부 광노화 예방 효과

김수경·김정기·서대방·이상준<sup>†</sup>

아모레퍼시픽 기술연구원 뷰티푸드 연구소  
(2012년 5월 4일 접수, 2012년 8월 6일 수정, 2012년 8월 16일 채택)

### Beneficial Effect of Coumestrol on Ultraviolet B-Induced Skin Photoaging through Mitochondrial Biogenesis

Sukyung Kim, Jeong Kee Kim, Dae-Bang Seo, and Sang Jun Lee<sup>†</sup>

Beauty Food Research Institute, Amorepacific Corporation R&D center, 314-1 Bora-dong, Giheung-gu, Yongin-si,  
Gyeonggi-Do 446-729, Korea

(Received May 4, 2012; Revised August 6, 2012; Accepted August 16, 2012)

**요약:** 쿠메스트롤은 식물이 스트레스에 대해 합성하는 phytoalexins의 일종으로, 알팔파 새싹, 클로버, 콩나물에서 일반적으로 발견된다. 본 연구에서는 쿠메스트롤의 자외선에 의해 유도되는 피부 진피세포 광노화 예방 효능에 관한 연구를 실시하였다. 쿠메스트롤 전처리는 자외선 B 조사에 의해 감소된 Sirt1 단백질 발현 및 활성과 하위 미토콘드리아 생합성 관련 유전자인 PGC-1 $\alpha$ , NRF1, TFAM의 발현 변화를 감소시켰다. 또한, ATP 및 ROS 생성량을 정상화시키고 피부 노화를 유도하는 최종당화산물 생성을 억제하였다. 이상의 결과에서 쿠메스트롤은 자외선 조사에 의해 발생하는 진피 세포 내 미토콘드리아 손상 및 이에 따른 당화 단백질 생성을 감소시킴으로써 피부 광노화 현상으로부터 보호할 수 있음을 확인하였다.

**Abstract:** Coumestrol is one of phytoalexins synthesized in response to environmental stress, and commonly found in natural foods such as alfalfa sprouts, clovers, and soybean. In the present study, we investigated the mechanism underlying protective effect of coumestrol against UVB-induced photoaging in human dermal fibroblasts. We found that pretreatment with coumestrol enhanced the UVB-suppressed mitochondrial biogenesis through regulation of Sirt1 expression and activity, and its downstream gene regulation such as PGC-1 $\alpha$ , NRF1, and TFAM. Moreover, the ATP and ROS production was restored to normal status and the formation of advanced glycation endproducts leading to skin photoaging in skin fibroblasts was blocked by coumestrol pretreatment before UVB irradiation. These findings indicate that coumestrol might potentially prevent skin photoaging induced by mitochondrial damage and glycated protein production in dermal fibroblasts.

**Keywords:** coumestrol, advanced glycation endproducts, mitochondrial biogenesis, Sirt1, photoaging

## 1. 서 론

피부는 끊임없이 분열하는 기관이며, 신체 최외곽에 위치하여 자외선, 대기 오염과 같은 스트레스에 직접 노출되어 쉽게 손상이 발생하므로 이를 방어하기 위해 높은 에너지를 필요로 하는 기관이다. 따라서 미토콘드리아

아를 통한 산화적 인산화, 해당과정, 크레아틴-인산 시스템을 통해 에너지를 공급받게 되는데, 피부 진피의 경우 에너지 생산 효율이 높은 미토콘드리아의 산화적 인산화 과정이 가장 주요한 것으로 알려져 있다. 하지만 노화가 진행됨에 따라 미토콘드리아 DNA 손상이 축적되어 이로부터 합성되는 복합체(complex) 단백질 구조에 변형이 나타나면 에너지 생산을 위한 미토콘드리아 막전위차가 형성되지 못해 산화적 인산화 과정이 정상적으로 이

<sup>†</sup> 교신 저자 (e-mail: leesjun@amorepacific.com)

루어지지 않아 ATP (adenosine triphosphate) 생성이 감소하고 동시에 전자 유출이 증가하여 활성산소종이 증가하게 된다[1]. 이로 인해 피부 세포에 에너지 공급이 원활히 이루어지지 않으면 세포는 이를 상쇄하기 위해 비-미토콘드리아 기작을 통해 에너지를 생산하게 되는데, 대표적인 기작이 해당 과정이다[2,3]. 실제로 노화된 진피 세포에서 포도당 흡수가 높아지고 젖산 생성이 증가한다고 보고되고 있다[4]. 하지만 해당 과정이 증가하는 경우, 이 과정 중에 발생하는 glyceraldehyde-3-phosphates 등의 중간 생성물이 반응성 높은 카르보닐기를 가지고 있어 피부 세포외기질에 존재하는 콜라겐, 엘라스틴과 쉽게 당화 반응을 일으키게 된다[5]. 당화 반응은 환원당의 카르보닐기가 아미노산과 비효소적 결합을 통하여 비가역적 최종당화산물(advanced glycation end-products, AGEs)을 생성하는 과정을 말한다. 당화 반응은 당뇨병을 가지는 사람에게서 급격히 나타나지만, 정상 혈당을 가지는 사람에서도 노화가 진행됨에 따라 발생하는 것으로 알려져 있다. 특히 피부 진피의 90%를 차지하는 콜라겐은 반감기가 비교적 길어 당화 반응 생성물이 축적되기 쉬운 것으로 보고되며, 실제로 피부에서 최종당화산물이 자연적으로는 20대 후반부터 매년 평균 3.7%, 광노화가 진행되는 경우 그 이상의 양이 생성되어 축적되어 콜라겐의 용해도 등의 물리적 변화를 가져오고 세포 내 산화적 스트레스를 증가시키며 진피의 수축능을 감소시켜 피부 탄력감소, 주름 생성, 피부 색변화를 가져오는 것으로 알려져 있다[6-9]. 또한 미토콘드리아 기능 이상으로 인해 활성산소종이 증가하는 경우, 이들 물질이 멜라닌 생성을 촉진하고 교원섬유와 탄력섬유의 합성을 감소시켜 주름을 생성시키는 것으로 알려져 있으며, 각질층의 수분 함량을 감소시켜 DNA 조직에 손상을 야기하고 체내의 단백질, 지방, 세포막, 핵산 등을 산화시켜 피부 노화를 더욱더 촉진시키는 것으로 알려져 있다[9]. 따라서 자외선에 의한 미토콘드리아 손상을 방지하여 그 기능을 보전함으로써 산화 스트레스 및 최종당화산물 발생을 저해하는 것이 피부 노화를 억제하기 위한 방법의 하나로 제시될 수 있다[10].

쿠메스트롤(Coumestrol, CMS)은 알팔파 새싹, 클로버류, 콩과 식품에서 주로 발견되는 식물성 에스트로겐으로 식물이 세균, 화학 물질과 같은 스트레스에 방어하기 위하여 분비하는 phytoalexins의 일종이기도 하다[11]. 쿠메스트롤은 강력한 에스트로겐 수용체 결합 능력을 통해 난소적출 랫드 모델에서 골 손실을 방지하고 탄수화물과 지질 대사에 영향을 주며, 항산화 효능을 가지는 것

으로 보고되어 있다[12-14]. 식물에서 분비되는 대표적인 phytoalexins은 포도껍질에서 발견되는 레스베라트롤(resveratrol)로 최근에는 노화를 조절하는 단백질로 알려진 Sirt1 (silent mating type information regulator 2 homolog 1)의 발현 조절 효능을 통해 항산화, 항염, 에너지 대사 등을 조절하는 효능이 알려졌으며, 일부 이와 관련된 기능이 피부 노화를 억제하는 것으로 연구되었다[15,16]. 따라서 본 연구에서는 유사한 항산화, 에스트로겐 효능을 나타내는 또 다른 phytoalexins의 일종인 쿠메스트롤을 이용하여 Sirt1 단백질을 통한 피부 노화 억제 효능을 확인하고자 하였다. 이를 위해 피부 진피 유래 섬유아세포에 쿠메스트롤을 전처리한 후 자외선을 조사하여 Sirt1 단백질 발현 및 활성에 미치는 영향을 평가하고, 이에 따른 쿠메스트롤의 미토콘드리아 손상 및 기능변화를 확인하였다. 또한 자외선에 의해 미토콘드리아 기능이 손상되어 나타나는 피부 노화 원인 물질인 최종당화산물 생성량을 평가함으로써 쿠메스트롤이 피부 노화에 미치는 영향에 대하여 평가하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 시약 및 기기명

Coumestrol (CMS), Vitamin C, DMSO (Dimethyl sulfoxide)는 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였고, Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Lab., Japan), ATP determination kit (Molecular Probes, USA), Reactive Oxygen Species Detection reagents (Invitrogen, USA), OxiSelect™ Advanced Glycation End Product ELISA Kit (Cell Biolabs, Inc., USA), First Strand cDNA synthesis (Fermentas, USA), QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen, USA) FastPure™ DNA kit (Takara, Japan), iQ™ SYBR Green Supermix (Invitrogen, USA), TaqMan primer (PGC-1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ): Hs01016719\_m1, NRF-1 (Nuclear respiratory factor 1): Hs00231457\_m1, TFAM (Mitochondrial transcription factor A): Hs00273372\_s1, GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase): Hs99999905\_m1, Applied Biosystems, USA), primer (4,977bp deletion, 83bp conservative region [17], Bioneer, Korea) RIPA buffer (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), BCA protein assay kit (Pierce, USA), 4 ~ 12% NuPAGE gels, iBlot™ Dry Blotting System (Invitrogen, USA), anti-Sirt1 an-

**Table 1.** Primer Details

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Cytochrome oxidase subunit II	CAGGCCGACTAAATCAAGCAAC	CTAGGACAATGGGCATAAAGCT
Cyclophilin A	TTCCTCCTTTCACAGAATTATTCCA	CCGCCAGTGCCATTATGG

tibody (Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-β-actin antibody, anti-p53 antibody, anti-Acetyl-p53 (Lys382) antibody (Cell Signaling, USA), polyclonal anti-rabbit antibody (BD sciences, USA), ECL Plus™ Western blotting detection reagents (Amersham, USA), JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine chloride, Invitrogen, USA) 제품을 사용하였다. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), FBS (Fetal bovine serum), penicillin-streptomycin solution 시약은 Lonza (Walkeisuville, MD, USA), DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)는 WelGENE Inc. (Daegu, Korea), Trypsin-EDTA는 Gibco (NY, USA) 제품을 사용하였다. 기기는 자외선 조사등 (G15T8E Ultraviolet 9K UVB, Sankyo Denki, Japan), Luminescence Image Analyzer (LAS-3000, Fuji, Japan), Flow Cytometry System (FACS Calibur, Beectom Dickinson, USA), Multimode microplate reader (M200pro, Tecan, Austria)를 사용하였다.

**2.2. 세포 배양**

인간 섬유아세포 (Normal human dermal fibroblast, NHDF, neonatal)는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)로부터 분양받아 사용하였고, 이를 10 % (v/v) FBS, 페니실린 100 U/mL, 스트렙토마이신 100 µg/mL의 항생제가 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 조건의 동물세포배양기에서 배양하였다. 실험은 7에서 9계대의 섬유아세포를 사용하였다.

**2.3. 쿠메스트롤의 세포 독성 측정**

쿠메스트롤이 진피 섬유아세포의 세포 사멸에 영향을 미치지 않는 농도를 확인하기 위하여 수용성 tetrazolium salt를 이용한 Cell Counting Kit-8을 이용한 발색 분석법을 이용하여 triplicate로 측정하였다. 세포를 96-well plate에 5 × 10<sup>3</sup> cells/well의 농도로 세포를 분주하여 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 하에서 24 h 동안 배양하여 세포를 부착시키고, 쿠메스트롤을 농도별로 처리하여 다시 24 h 동안 배양 후 CCK-8의 농도가 10 %가 되도록 배양액에 희석하고 세포 배양기에서 1 h 동안 배양하여 450 nm에서 흡광도

를 측정하였다.

**2.4. 자외선 조사 및 단백질 분석**

진피 섬유아세포를 6-well plate에 5 × 10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 분주한 후 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 하에서 24 h 동안 배양하여 세포가 배양 플레이트에 80 ~ 90 %가 차도록 키웠다. 다음날 세포의 배양 배지를 제거하고 쿠메스트롤 2.5 µM, 비타민 C 10 µM, 또는 DMSO를 처리하여 다시 24 h 동안 배양한 후 배지를 제거하고 DPBS로 두 번 세척 후 DPBS 존재 하에 UVB 15 mJ/cm<sup>2</sup>를 조사하였다. 이에 다시 배지를 첨가하여 24 h 배양 후 세포를 수거하여 차후 실험을 진행하였다.

대조군과 실험군의 세포에 RIPA buffer 50 µL를 가하여 단백질 추출한 후 BCA 법으로 정량하여 30 µg의 단백질을 4 ~ 12 % NuPAGE gels에 전기영동하여 분리하였다. 이를 iBlot™ Dry Blotting System을 이용해 PVDF membrane에 전달 후 polyclonal anti-Sirt1 또는 anti-β-actin 항체로 4 °C에서 16 h 동안 반응시켰다. Membrane을 TBS-T 용액으로 3회 세척 후 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit 2차 항체로 1 h 동안 반응시키고 ECL Western blotting detection reagents로 발색반응을 유도하여 LAS-3000 장치를 통해 결과를 확인하였다.

**2.5. 미토콘드리아 수 측정**

세포 내 미토콘드리아 수는 미토콘드리아에서 합성되는 COX II (Cytochrome oxidase subunit II) 양을 핵에서 만들어지는 cyclophilin A의 양으로 나누어 미토콘드리아 DNA 카피 수를 계산함으로써 측정하였다[18]. FastPure DNA kit로 genomic DNA (gDNA)를 분리한 후, gDNA 50 ng, COX II, cyclophilin A 프라이머 및 iQ SYBR Green Supermix를 이용하여 real-time PCR 반응을 수행하였다. 실험에 사용된 프라이머는 Table 1과 같다.

**2.6. 미토콘드리아 막전위(Mitochondrial Membrane Potential, ΔΨ)**

미토콘드리아 막전압을 측정하기 위하여 JC-1 dye를 사용하였다. 진피 세포를 형광측정용 96-well black plate

에 well당  $2.0 \times 10^4$ 개로 분주하고 페니실린/스트렙토마이신 1%, FBS 10%가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 1일간 배양하고 물질 처리 및 자외선 조사를 통해 얻어진 세포를 DPBS로 세척한 후 10 µg/mL로 제조된 JC-1을 넣고 20 min 간 배양하였다. 이를 다시 DPBS로 세척하여 여분의 염색약을 제거하고 적당량의 DPBS를 가하여 형광플레이트 리더(Green : Ex = 485 nm, Em = 530 nm / Red : Ex = 530 nm, Em = 590 nm)로 형광 강도를 측정하여 Red / Green의 비율을 자외선 조사 대조군의 것과 비교하여 상대적으로 나타내었다.

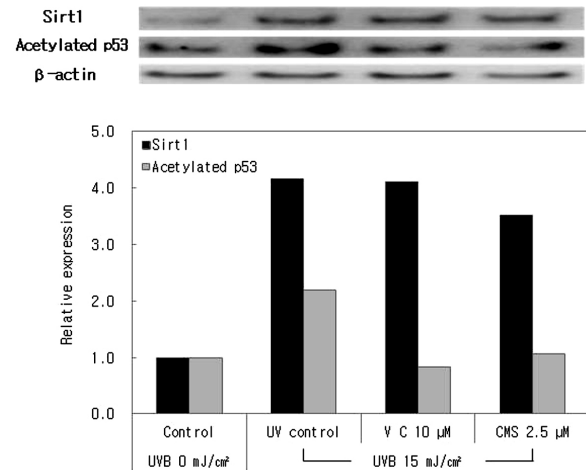
### 2.7. 활성산소종 생성 억제능 및 ATP 생성량 측정

세포 내에 생성되는 활성 산소는 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA)를 사용하여 측정하였다. H<sub>2</sub>DCF-DA는 지용성 물질로, 세포 안으로 쉽게 투과하여 esterase에 의해 가수분해되어 형광물질인 DCF (dichlorofluorescein)를 생성한다. 따라서 이를 측정함으로써 활성산소 생성량을 측정할 수 있다. 물질 처리 및 자외선 조사를 통해 얻어진 세포를 DPBS로 두 번 세척 후 트립신으로 세포를 떼어내어 세포를 수거하였다. 이에 10 µM의 농도로 PBS에 희석한 H<sub>2</sub>DCF-DA를 1 mL 가하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 30 min 간 배양 후, 초기에 활성산소종으로 산화된 DCF의 형광 강도를 형광플레이트리더(Ex = 485 nm, Em = 530 nm)로 측정하였다. 그 결과를 자외선에 의해 ROS 생성이 유도된 대조군 (자외선 대조군)을 100으로 하여 각 시료의 ROS 억제 효능을 평가하였다.

세포의 ATP 생성량은 Yang *et al.* [19]의 방법을 변형하여 측정하였다. 물질 처리 및 자외선 조사한 세포를 DPBS로 세척한 후 100 °C의 증류수를 가해 여러 번 섞어주어 세포를 수거하고 4 °C에서 5 min 간 12,000 xg로 원심분리하여 얻은 상층액을 사용하여 ATP determination kit 프로토콜에 따라 피부 세포에서 생성된 ATP 양을 측정하였다.

### 2.8. 피부 최종당화산물 생성 저해 활성 측정

회수한 세포를 초음파 처리하여 단백질을 추출한 후 최종 농도가 10 µg/mL이 되도록 DPBS에 희석하고, 이를 이용하여 자외선 조사 및 물질 처리에 의해 발생한 최종당화산물 생성량을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.



**Figure 1.** Coumestrol regulated UVB-induced Sirt1 protein expression and activity. Cells were treated for 24 h with 2.5 µM of coumestrol, 10 µM of vitamin C or DMSO before UVB irradiation. The protein levels were normalized by β-actin levels.

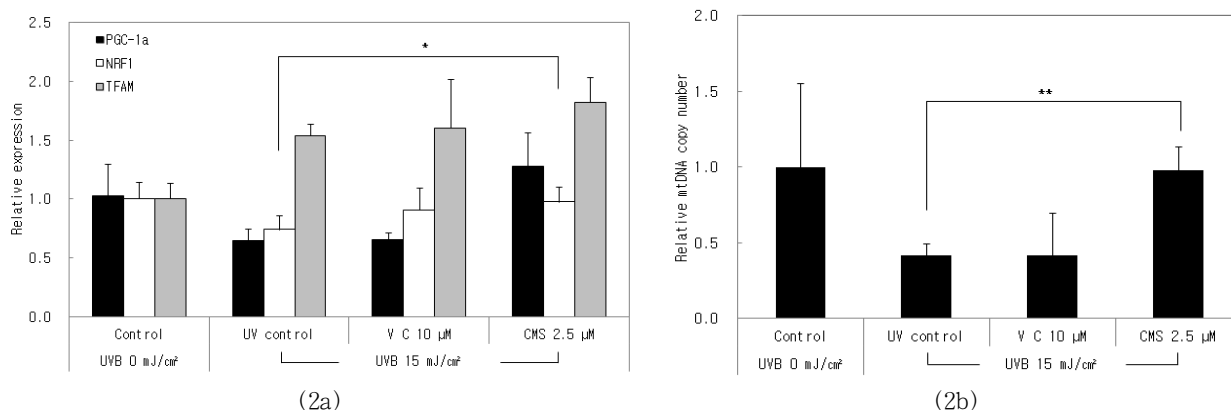
### 2.9. 통계 분석

모든 실험 결과는 평균 ± 오차 (mean ± SE)로 나타내었다. 통계처리는 Student's *t*-test로 검정하였고, 대조군과 비교하여 *P* < 0.05 이하의 경우 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 쿠메스트롤의 효능 농도 설정

사람 진피 섬유아세포에 효능을 나타내는 농도 설정하기 위하여 먼저 CCK-8 assay 이용하여 쿠메스트롤의 세포 독성 농도를 확인하였다. 그 결과 쿠메스트롤은 5.0 µM 이하의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다(Data not shown). 이후 Sirt1 발현을 최대로 증가시키는 쿠메스트롤 최적 농도를 설정하기 위하여 쿠메스트롤을 1.0, 2.5, 5.0 µM의 농도로 진피 섬유아세포에 24 h 처리 후 웨스턴 블롯을 통해 Sirt1 단백질 발현 변화를 측정하였다. 쿠메스트롤은 세 농도에서 농도비의존적으로 Sirt1 단백질 발현을 각각 9, 103, 61% 증가시켜 쿠메스트롤 2.5 µM이 연구에 적합한 것으로 평가되었고, 쿠메스트롤 2.5, 5.0 µM을 섬유아세포에 처리하여 p53의 아세틸화 수준을 통해 Sirt1 활성 변화를 확인한 결과에서 역시 쿠메스트롤 2.5 µM이 Sirt1 활성을 최대로 증가시키는 것으로 나타나 이를 차후 효능 실험 농도로 설정



**Figure 2.** Coumestrol stimulated mitochondrial biogenesis and related gene expression against UVB irradiation. Cells were treated for 24 h with 2.5  $\mu$ M of coumestrol, 10  $\mu$ M of vitamin C or DMSO before UVB irradiation. Gene expression levels were determined by RT-PCR using the gene specific primers, normalized to  $\beta$ -actin. (A) Relative mitochondrial DNA copy number. It was calculated by the ratio between mRNA levels of mitochondrial-encoded COX II and nuclear-encoded cyclophilin A. (B) Gene expression associated with mitochondrial biogenesis. Data presented are the mean  $\pm$  S.D. (\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ ).

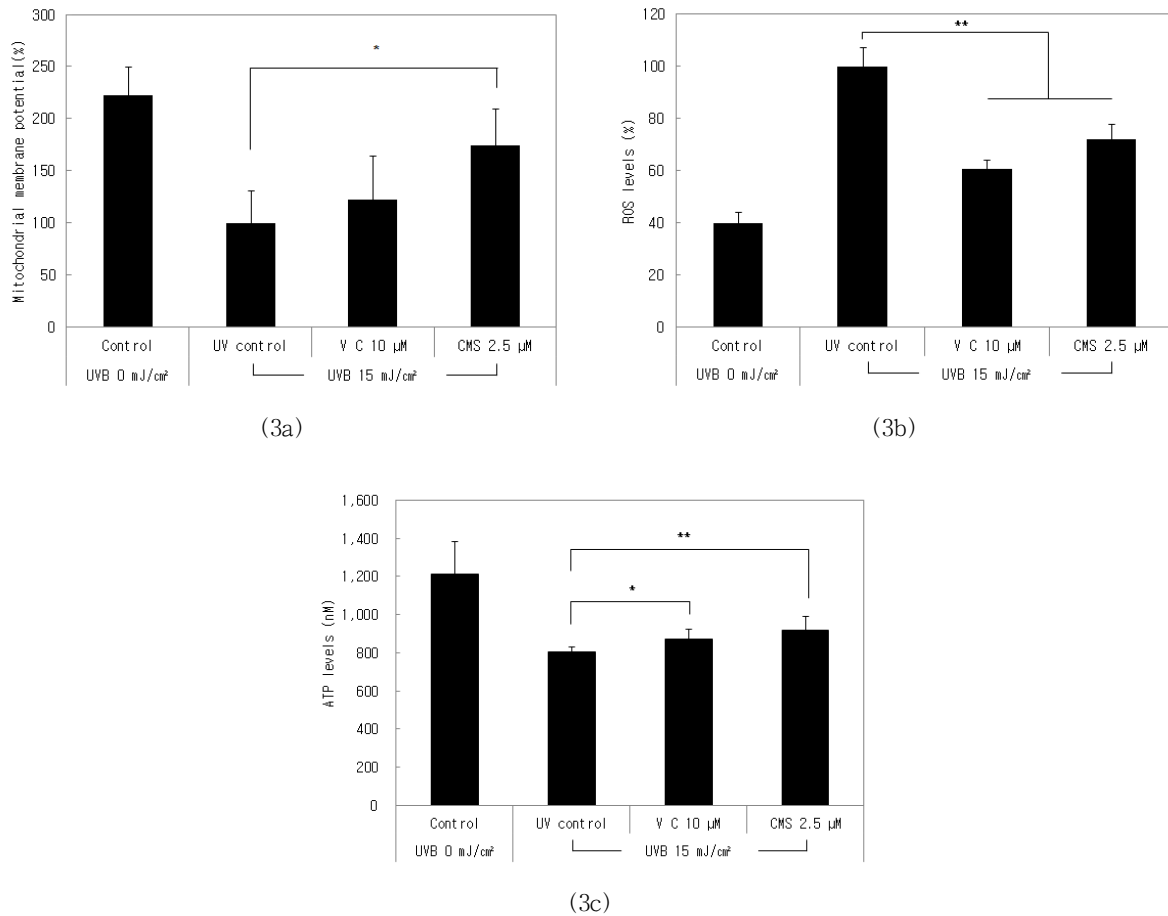
하여 실험을 진행하였다(Data not shown). 이에 더해 쿠메스트롤의 효능이 단순히 산화 물질을 제거하는 항산화 활성을 통해 나타나는 결과가 아님을 확인하기 위하여 양성 대조 물질로 비타민 C 10  $\mu$ M [20]을 사용하였다.

### 3.2. 쿠메스트롤이 Sirt1 발현 및 활성에 미치는 영향

쿠메스트롤이 세포에 스트레스가 가해지는 상황에서 Sirt1의 발현 및 활성을 조절해 줄 수 있는지 확인하기 위해 진피 섬유아세포에 쿠메스트롤 2.5  $\mu$ M을 24 h 전처리하고 자외선 B 15 mJ/cm<sup>2</sup>을 조사하여 24 h 배양 후 웨스턴 블롯을 통해 Sirt1 발현 및 활성 변화를 평가하고 그 결과를 Figure 1에 나타내었다. 기존 연구에서 세포 사멸을 유도하지 않는 낮은 강도의 스트레스가 주어지는 경우 세포가 비정상적으로 Sirt1의 발현을 증가시키는 것으로 보고되었으며[21], 본 연구를 통해 피부 세포에서도 유사하게 세포 사멸이 나타나지 않는 수준의 자외선 B를 조사하는 경우 Sirt1의 발현 증가 및 활성 감소 현상이 유도되는 것을 확인하였다. 특히 쿠메스트롤 전처리 후 자외선 스트레스를 가하는 경우에 있어 Sirt1 발현이 16 % 감소하며 Sirt1 활성은 200 % 수준으로 증가하였다. 즉, 쿠메스트롤이 스트레스에 의해 유도되는 비정상적인 Sirt1 발현 및 활성을 감소시키는 것을 확인하였다.

### 3.3. 쿠메스트롤의 미토콘드리아 생합성 활성 증가 효능

Sirt1은 미토콘드리아 생합성의 주요인자인 PGC-1 $\alpha$ 를 조절함으로써 세포 노화를 억제하는 것으로 알려져 있으나 피부에서의 효능은 알려진 바 없다[22]. 따라서 Sirt1의 발현 및 활성을 조절하는 쿠메스트롤이 피부 세포에서 미토콘드리아 생합성을 조절하여 피부 광노화 현상을 경감시킬 수 있는지 확인하고자 진피 섬유아세포에 쿠메스트롤 또는 비타민 C를 전처리하고 UVB 15 mJ/cm<sup>2</sup>를 조사한 후, Sirt1에 의해 조절되는 미토콘드리아 생합성 관련 유전자 발현 변화를 정량적 PCR을 통해 확인하였다. 그 결과 쿠메스트롤 전처리가 자외선 조사에 의해 감소하는 PGC-1 $\alpha$ , NRF1, TFAM mRNA 발현을 각각 100, 40, 20 % 증가시키는 것을 확인하였다 (Figure 2a). 또한 이러한 유전자 발현 변화가 세포 내 존재하는 미토콘드리아 수를 증가시키는지 확인하기 위하여 미토콘드리아에 의해 만들어지는 COX II의 양을 핵에서 생성되는 cyclophilin A의 양으로 나누어 미토콘드리아 DNA의 카피 수를 확인하는 방법으로 세포 내 미토콘드리아 양을 측정하였다. 그 결과, 자외선 조사에 의해 미토콘드리아 수가 41 % 수준으로 감소하였으나 쿠메스트롤을 전처리하였을 경우 미토콘드리아 수가 자외선을 조사하지 않은 군과 동일한 수준으로 증가하였고 비타민 C는 미토콘드리아 수에 영향을 나타내지 못하였다(Figure 2b). 즉, 쿠메스트롤 전처리는 Sirt1 단백질



**Figure 3.** Coumestrol increased the mitochondrial membrane potential and normalized the amounts of ATP and ROS production in normal human dermal fibroblasts.

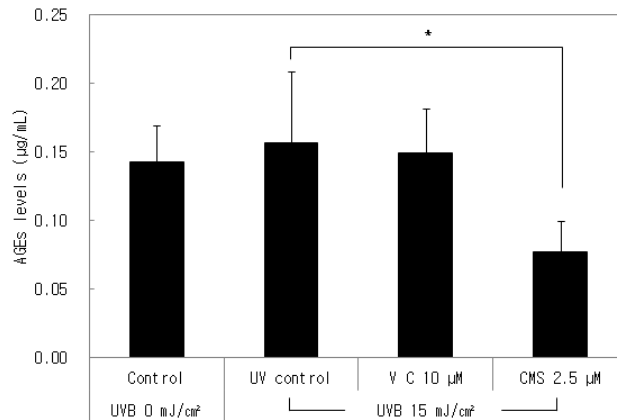
(A) Mitochondrial membrane potential, (B) Intracellular ROS content, (C) Intracellular ATP levels. Cells were treated for 24 h with 2.5 μM of coumestrol, 10 μM of vitamin C, or DMSO before 15 mJ/cm<sup>2</sup> of UVB irradiation and, then, treated cells were incubated for 24 h. Data presented are the mean ± S.D. (\*, p < 0.05, \*\*, p < 0.01).

질 발현 및 활성을 조절하여 자외선에 의해 감소되는 미토콘드리아 생합성 수준을 증가시켰음을 확인하였다. 추가적으로 미토콘드리아 생합성 증가가 자외선에 의해 손상된 미토콘드리아의 합성은 함께 증가시키지 않음을 확인하기 위하여 자외선에 의해 유발되는 것으로 알려진 미토콘드리아 DNA의 4,977 bp common deletion 발생량을 qPCR 방법으로 확인한 결과, 쿠메스트롤은 자외선에 의한 미토콘드리아 DNA 손상을 증가시키지 않음을 확인하였다(Data not shown).

#### 3.4. 세포 내 미토콘드리아 막전위 증가 및 기능 정상화 효과

쿠메스트롤 전처리에 의해 증가된 미토콘드리아가 정

상 막전위 수준을 유지하여 미토콘드리아의 ATP 생성 수준을 자외선 조사 전 수준으로 증가시키고 유출되는 전자를 감소시켜 활성산소종 발생량을 감소시키는지 확인하였다. 그 결과 미토콘드리아 생합성이 증가한 쿠메스트롤 전처리군에서는 미토콘드리아 내막 전위값 역시 75 % 증가(p < 0.05)하였으나 비타민 C 처리군은 유의적인 변화가 나타나지 않았다(Figure 3a). 세포 내부에 존재하는 미토콘드리아의 평균 막전위가 증가함에 따라 활성산소종은 28 % 감소하였고, ATP 생성 수준이 자외선 조사군에 비해 14 % 증가하였다. 반면 비타민 C는 활성산소종이 39 % 수준으로 감소하였으나 ATP 생성량은 8 % 증가하였다(Figure 3b-c). 결과로 미루어 활성산소종을 직접 소거하는 비타민 C와 달리 쿠메스트롤



**Figure 4.** Coumestrol significantly decreased the amount of advanced glycation endproducts (AGEs) in normal human dermal fibroblasts. AGEs was measured by ELISA method. Cells were treated for 24 h with 2.5 µM of coumestrol, 10 µM of vitamin C, or DMSO before 15 mJ/cm<sup>2</sup> of UVB irradiation and, then, treated cells were incubated for 24 h. Data presented are the mean ± S.D. (\*, p < 0.05, \*\*, p < 0.01).

은 정상 막전위를 가지는 미토콘드리아의 절대량을 증가 시킴으로써 활성산소종 발생을 감소시키고 산화적 인산화 기작을 통한 ATP 생산량을 증가시키는 것으로 판단된다. 외부 자극에 의해 세포 내에 발생한 활성산소종을 즉각적으로 소거하는 능력은 비타민 C가 쿠메스트롤보다 높을 수 있지만, 쿠메스트롤은 미토콘드리아의 기능 자체를 정상화시켜 그후 발생하는 누적된 일련의 세포 내 손상을 감소 혹은 경감하는 기능은 쿠메스트롤이 더 뛰어날 수 있음을 본 실험을 통하여 확인할 수 있었다.

### 3.5. 쿠메스트롤의 피부 최종당화산물 생성 억제 활성

쿠메스트롤이 자외선으로부터의 피부 세포 내 미토콘드리아 손상을 감소시켜 피부 광노화 현상을 예방할 수 있는지 확인하기 위하여 피부 최종당화산물 생성 수준을 평가하였다. 최종당화산물은 피부 미토콘드리아가 손상되었을 경우 에너지를 생산하기 위한 우회 방법으로서 해당과정을 거칠 때 발생하는 중간 생성물이 콜라겐, 엘라스틴 등과 결합하여 생성되는 물질로, 피부 결합 조직을 손상시키고 산화 스트레스를 발생시켜 피부 광노화를 유발하는 것으로 알려져 있다. 본 연구를 통해 피부 진피 섬유아세포는 자외선 B 조사에 의해 최종당화산물 생성을 약 10 % 증가시켰으나 쿠메스트롤 전처리에 의해 자외선 무처리군의 55 % 수준까지 그 생성량을 감소시키는 것을 확인하였다(Figure 4). 즉, 쿠메스트롤은 미토콘드리아 생합성 및 기능 정상화를 통해 자외선에 의해 발생하는 미토콘드리아 손상을 감소시켜 피부 결합조직을

손상하는 최종당화산물 생성량을 감소시킬 수 있는 물질로서, 피부 광노화 예방 소재로의 이용가능성을 확인하였다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 *in vitro* 수준에서 자외선 처리에 의해 유발되는 피부 노화 현상에 대한 쿠메스트롤의 보호 효능을 확인함으로써 피부 항노화 소재로의 이용가능성을 평가하는 것을 목표로 하였다. 그 결과 쿠메스트롤은 Sirt1 발현 및 활성을 조절하여 미토콘드리아 생합성과 관련된 PGC-1α 및 하위 유전자들의 발현을 증가시킴으로써 자외선 조사에 의해 감소하는 미토콘드리아의 생합성 수준을 미토콘드리아 손상을 증가시키지 않는 범위에서 자외선 조사 전 수준으로 증가시키는 것을 확인하였다. 정상 막전위를 가지는 미토콘드리아의 생합성이 증가되어 활성산소종 발생 수준이 감소되었고, 산화적 인산화 과정을 통한 세포의 에너지 생산 기능이 정상화되어 과도한 해당 과정 활성화에 의해 발생하는 피부 노화 유도 물질인 최종당화산물 수준이 감소하였다. 즉, 쿠메스트롤은 미토콘드리아 생합성을 증가시켜 광노화에 의해 유발되는 손상으로부터 피부 진피층을 보호하는 효능을 가지고 있음이 시사되었다. 이상의 결과에 의해 쿠메스트롤이 피부 노화 예방 소재로서 화장품 소재 또는 뷰티푸드 소재로 이용가능성이 높음을 확인할 수 있다.

## 참 고 문 헌

1. M. Greco, G. Villani, F. Mazzucchelli, N. Bresolin, S. Papa, and G. Attardi, Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts, *FASEB J.*, **17**(12), 1706 (2003).
2. S. B. Wu and Y. H. Wei, AMPK-Mediated increase of glycolysis as an adaptive response to oxidative stress in human cells: Implication of the cell survival in mitochondrial diseases, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1822**(2), 233 (2012).
3. J. F. Jongkind, A. Verkerk, and M. Poot, Glucose flux through the hexose monophosphate shunt and nadp(h) levels during *in vitro* ageing of human skin fibroblasts, *Gerontology.*, **33**(5), 281 (1987).
4. S. Prahl, T. Kueper, T. Biernoth, Y. Wohrmann, A. Munster, M. Furstenau, M. Schmidt, C. Schulze, K. P. Wittern, H. Wenck, G. M. Muhr, and T. Blatt, Aging skin is functionally anaerobic: Importance of coenzyme q10 for anti aging skin care, *Biofactors.*, **32**(1), 245 (2008).
5. A. R. Hipkiss, Does chronic glycolysis accelerate aging? Could this explain how dietary restriction works?, *Ann N. Y. Acad. Sci.*, **1067**, 361 (2006).
6. D. R. Sell, N. R. Kleinman, and V. M. Monnier, Longitudinal determination of skin collagen glycation and glycoxidation rates predicts early death in C57BL/6NNIA Mice, *FASEB J.*, **14**(1), 145 (2000).
7. M. Yamauchi, P. Prisayanh, Z. Haque, and D. T. Woodley, Collagen cross-linking in sun-exposed and unexposed sites of aged human skin, *J. Invest Dermatol.*, **97**(5), 938 (1991).
8. H. Pigeon, Reaction of glycation and human skin: The effects on the skin and its components, reconstructed skin as a model, *Pathol. Biol. (Paris)*, **58**(3), 226 (2010).
9. Y. Ogura, T. Kuwahara, M. Akiyama, S. Tajima, K. Hattori, K. Okamoto, S. Okawa, Y. Yamada, H. Tagami, M. Takahashi, and T. Hirao, Dermal carbonyl modification is related to the yellowish color change of photo-aged Japanese facial skin, *J. Dermatol. Sci.*, **64**(1), 45 (2011).
10. H. Corstjens, L. Declercq, L. Hellemans, I. Sente, and D. Maes, Prevention of oxidative damage that contributes to the loss of bioenergetic capacity in ageing skin, *Exp. Gerontol.*, **42**(9), 924 (2007).
11. S. Liu, D. M. Norris, E. E. Hartwig, and M. Xu, Inducible phytoalexins in juvenile soybean genotypes predict soybean looper resistance in the fully developed plants, *Plant Physiol.*, **100**(3), 1479 (1992).
12. S. F. Ye, I. Saga, K. Ichimura, T. Nagai, M. Shinoda, and S. Matsuzaki, Coumestrol as well as isoflavones in soybean extract prevent bone resorption in ovariectomized rats, *Endocr. Regul.*, **37**(3), 145 (2003).
13. L. Nogowski, Effects of phytoestrogen-coumestrol on lipid and carbohydrate metabolism in young ovariectomized rats may be independent of its estrogenicity, *J. Nutr. Biochem.*, **10**(11), 664 (1999).
14. H. Y. Jeon, D. B. Seo, H. J. Shin, and S. J. Lee, Effect of aspergillus oryzae-challenged germination on soybean isoflavone content and antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, **60**(10), 2807, (2012).
15. Y. Horio, T. Hayashi, A. Kuno, and R. Kunitomo, Cellular and molecular effects of sirtuins in health and disease, *Clin. Sci (Lond)*, **121**(5), 191 (2011).
16. K. Ohguchi, T. Itoh, Y. Akao, H. Inoue, Y. Nozawa, and M. Ito, Sirt1 Modulates expression of matrix metalloproteinases in human dermal fibroblasts, *Br. J. Dermatol.*, **163**(4), 689 (2010).
17. Y. N. Wang, W. Wu, H. C. Chen, and H. Fang, Genistein protects against uvb-induced senescence-like characteristics in human dermal fibroblast by p66shc down-regulation, *J. Dermatol. Sci.*, **58**(1), 19 (2010).
18. X. Kong, R. Wang, Y. Xue, X. Liu, H. Zhang, Y. Chen, F. Fang, and Y. Chang, Sirtuin 3, a new target of PGC-1alpha, plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis, *PLoS One.*, **5**(7), e11707 (2010).
19. N. C. Yang, W. M. Ho, Y. H. Chen, and M. L. Hu, A convenient one-step extraction of cellular ATP using boiling water for the luciferin-luciferase assay of ATP, *Anal. Biochem.*, **306**(2), 323 (2002).
20. Y. W. Ryoo, S. I. Suh, K. C. Mun, B. C. Kim, and K. S. Lee, The effects of the melatonin on UI-



- traviolet-B irradiated cultured dermal fibroblasts, *J. Dermatol. Sci.*, **27**(3), 162 (2001).
21. R. R. Alcendor, S. Gao, P. Zhai, D. Zablocki, E. Holle, X. Yu, B. Tian, T. Wagner, S. F. Vatner, and J. Sadoshima, Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart, *Circ. Res.*, **100**(10), 1512 (2007).
22. E. Verdin, M. D. Hirschey, L. W. Finley, and M. C. Haigis, Sirtuin regulation of mitochondria: Energy production, apoptosis, and signaling, *Trends Biochem. Sci.*, **35**(12), 669 (2010).