J. Soc. Cosmet. Sci. Korea
Vol. 41, No. 3, September 2015, 287-294

pISSN 1226-2587
eISSN 2288-9507
http://dx.doi.org/10.15230/SCSK.2015.41.3.287

감태(*Ecklonia cava*) 추출물의 항산화 및 세포보호 활성

유 차 영 · 김 시 윤* · 박 정 원* · 성 수 안* · 김 다 애* · 박 지 현* · 현 송 화 · 박 수 남†

서울과학기술대학교 정밀화학과 화장품종합기술연구소, *반포고등학교
(2015년 9월 4일 접수, 2015년 9월 11일 수정, 2015년 9월 17일 채택)

Antioxidant and Cellular Protective Activities of *Ecklonia cava* Extracts against Reactive Oxyegen Species

Cha Young Yoo, Si Yun Kim*, Jung Won Park*, Soo An Sung*, Da Ae Kim*, Jee Hyun Park*, Song Hua Xuan, and Soo Nam Park†

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D center, Seoul National University of Science and Technology, 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
*Seoul Ban-po high school, 71 Gomurae-ro, Seocho-gu, Seoul 137-801, Korea
(Received September 4, 2015; Revised September 11, 2015; Accepted September 17, 2015)

요 약: 본 연구에서는 갈조류인 감태의 추출물과 그 분획들의 항산화 활성을 측정하였다. 모든 실험에서 감태의 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획을 사용하였다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성(FSC_{50})에서 에틸아세테이트 분획(FSC_{50} = 6.98 μg/mL)과 아글리콘 분획(7.03 μg/mL)은 비교물질인 (+)-α-tocopherol(8.98 μg/mL)과 유사한 활성을 나타냈다. 루미놀 발광법을 이용하여 Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계에서 활성산소 소거 활성(총 항산화능, OSC_{50}) 결과, 모든 추출물과 분획들 중에서 아글리콘 분획(OSC_{50} = 14.48 μg/mL)이 가장 큰 항산화능을 나타내었으나, 강력한 항산화제인 L-ascorbic acid (6.88 μg/mL)보다는 낮았다. $^1O_2$로 유도된 사람 적혈구 세포 손상에 있어서 50% 에탄올 추출물은 5 ~ 50 μg/mL에서 농도 의존적인 세포보호 효과를 나타냈다. 10 μg/mL에서 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획의 세포보호 효과(τ_{50})는 각각 442.0 min 및 539.9 min으로 세포보호 활성이 크게 나타났다. 3종류의 감태 추출물 및 분획은 10 μg/mL에서, 비교물질인 지용성 항산화제 (+)-α-tocopherol (40.6 min)보다 훨씬 더 큰 세포보호 활성을 나타냈다. 이러한 결과들은 감태 추출물과 그 분획물들이 항노화 관련 화장품 분야에서 항산화제로서 이용 가능성이 있음을 시사하였다.

Abstract: In this study, we investigated the antioxidative effects of brown seaweed *Ecklonia cava* extract and its subfractions. All experiments were performed with 50% ethanol extract, ethyl acetate fraction and aglycone fraction of *E. cava*. The free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activities (FSC_{50}) of ethyl acetate fraction (FSC_{50} = 6.98 μg/mL) and aglycone fraction (7.03 μg/mL) are similar to that of (+)-α-tocopherol (8.98 μg/mL) which is a reference control. Reactive oxygen species (ROS) scavenging activity (total antioxidant capacity, OSC_{50}) of the aglycone fraction (OSC_{50} = 14.48 μg/mL) on ROS generated in Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2 system using the luminol-dependent chemiluminescence assay was the strongest among all extract and fractions. However, all samples showed lower antioxidant activities than that of L-ascorbic acid (6.88 μg/mL) known as a powerful antioxidant. The protective effect of 50% ethanol extract on the $^1O_2$-induced cellular damage of human erythrocytes was dependent on the concentration

† 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)
call: 02)970-6451

from 5 to 50 μg/mL. Both ethyl acetate fraction and aglycone fraction showed strong cellular protective activities at 10 μg/mL, where the cellular protective effects (τ_{50}) of each fraction were recorded 442.0 min and 539.9 min, respectively. Three kinds of extract/fractions of *E. cava* showed much greater cellular protective activities at 10 μg/mL than that of liposoluble antioxidant (+)-α-tocopherol (40.6 min) which is a reference control. These results suggest *E. cava* extracts and its fractions can be applied as an antioxidant ingredient in a field of cosmetics.

Keywords: *antioxidant, reactive oxygen species, brown algae, Ecklonia cava, phlorotannin*

1. 서 론

피부 노화는 피부 세포 및 조직에서 나타나는 복합적인 생물화학적 현상이다. 피부 노화의 원인은 일반적으로 두 가지 과정으로 분류하고 있다. 첫째는 선천적 또는 내인적 노화(innate or intrinsic aging)로서, 생물학적 시간(the biologic clock)에 따라 다양한 장기 및 조직이 비가역적으로 퇴화됨으로써 나타나는 노화이다. 두 번째는 외인적 노화(extrinsic aging)로서 이는 외부 환경 요소에 노출된 결과로서 나타난다. 외인적 노화 중 가장 대표적인 현상은 "광노화(photoaging)"이며 주원인은 피부가 자외선(ultraviolet rays, UV)에 지속적으로 노출될 때 나타난다[1-3].

지구 표면에 도달하는 태양광선 중 자외선 영역은 UVB (280 ~ 320 nm)와 UVA (320 ~ 400 nm)로 나뉜다. 이 영역의 자외선은 피부 광노화에 있어서 핵심적인 역할을 나타낸다. 피부는 표피, 진피 및 피하지방으로 구성되어 있다. UVB는 피부의 표피까지 침투한다. 반면에 UVA는 표피를 통과하여 진피까지 침투한다. 에너지가 큰 UVB는 표피에 있는 DNA 염기나 방향족 곁사슬을 갖는 단백질의 아미노산 등과 같은 발색단에 흡수되어 유기 라디칼이나 라디칼 양이온 또는 라디칼 음이온 등을 생성시킴으로써 피부노화에 영향을 미칠 수 있다. 장파장의 UVA는 포르피린 등의 광증감물질에 의한 흡수를 통하여 싱글렛 옥시젠($^1O_2$)을 비롯한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성시킨다[4]. 이러한 활성산소종의 종류로는 $^1O_2$이나 과산화수소(H_2O_2)와 같은 비라디칼 화합물과 수퍼옥사이드 음이온 라디칼($O_2^{\bullet-}$)이나 하이드록실 라디칼(•OH)과 같은 산소 중심의 라디칼 그리고 활성산소로 유도된 이차 라디칼인 •OR, •OOR 등이 포함된다. 이들 활성산소는 진피층의 콜라겐 섬유와 같은 매트릭스 조직을 파괴함으로써 피부노화를 가속화시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[5].

피부가 자외선에 노출되면 피부에는 활성산소종이 과잉으로 생성되고 광화학적인 반응이 일어나는 산화적 스트레스 하에 놓이게 된다. 이러한 산화적 스트레스 하에서는 피부 세포 구성 성분인 지질, 단백질 및 DNA 등의 생체 고분자가 산화되고 파괴된다. 하지만 피부에는 활성산소종을 없애는 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화효소와 비타민 E 및 C, 글루타치온 등의 비효소적 항산화제가 피부 항산화 방어망을 구축하여 피부를 보호한다. 하지만 피부가 자외선에 지속적으로 노출되면 과잉의 활성산소가 생성되고 피부의 항산화 방어망은 붕괴되어 피부노화는 가속화된다[6-10]. 따라서 자외선에 의해 피부에서 생성된 활성산소를 제거하는 또는 활성산소의 생성을 억제하는 적절한 항산화제 개발은 피부 항산화방어망을 구축하고 피부 노화를 억제하는데 매우 중요하다고 사료된다[11-13].

최근 의약품, 식품 및 화장품 분야에서 기능성 소재 개발 및 응용에 관한 연구가 활기를 띄고 있다. 생체친화형이면서 안전성이 확보된 천연 육상 식물 추출물 또는 갈조류와 같은 해양 식물 추출물에서 약리적으로 잠재적 가치가 있는 생물학적 활성을 나타내는 성분들이 많이 보고되었다[14,15].

감태(*Ecklonia cava*)는 다시마목 미역과에 속하는 갈조류의 일종으로, 한반도와 일본 등 온대 연안에 분포한다. 감태는 한국의 제주도에서 풍부하게 생산되며, 식품 첨가물, 가축 사료, 비료, 의약품 분야에서 널리 사용된다[16]. 감태에는 carotenoid, fucoidan 및 phlorotannin 등의 성분들이 존재하는 것으로 알려져 있다[17]. 최근 많은 연구에서 감태 추출물이 항산화, 항염증, 항알러지, tyrosinase 저해활성 및 collagenase 발현 저해 등의 활성이 있는 것으로 보고되었다[18-21].

본 연구에서는 감태 추출물의 기능성 화장품 소재로서의 가능성이 있는지 확인하고자 50% 에탄올 추출

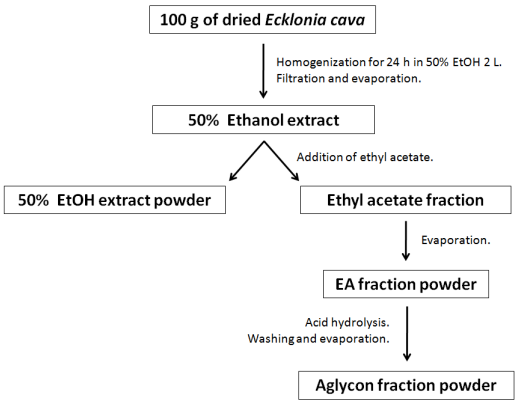

Figure 1. Fractionation scheme of *E. cava* 50% EtOH extract and its fractions.

물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획물을 제조하였으며, 이들 추출물 및 분획물에 대하여 free radical 소거활성, luminol 발광법을 이용한 Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계에 있어서 활성산소 소거활성인 총 항산화능 평가 및 광노화에서 가장 중요한 활성산소인 $^1O_2$으로 유도된 사람 세포 손상에 대한 세포보호 효과를 평가하고자 하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

DPPH 실험에서 UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50을 사용하였으며, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를 사용하였다. 적혈구 광용혈 실험에서는 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품을 사용하였으며, pH 미터는 Mettler-Toledo Ltd. (Korea) 제품을 사용하였다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), luminol, heparin, rose-bengal은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 그 외 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. 완충 용액 제조에 사용된 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, NaCl, H_2SO_4 그리고 에탄올(EtOH), 에틸아세테이트(EtOAc), n-헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 비교물질로 사용한 (+)-α-tocopherol (1,000 IU vitamin E/g)과 L-ascorbic acid는 Sigma (USA)에서 구입하였다. 본 실험에 사용한 감태는 2015년 7월 경 제주도 서귀포시에서 채집한 것으로 홍일당에서 무료로 샘플을 제공받았으며, 50% 에탄올로 추출하여 사용하였다.

2.2. 감태의 분획 및 추출

건조된 감태 100 g을 잘게 자른 후 50% 에탄올 2 L에 24 h 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 농축하여 50% 에탄올 추출물 파우더를 얻었으며, 일부를 에틸아세테이트로 분획한 후 감압 농축하여 건조된 에틸아세테이트 분획 파우더를 얻었다. 에틸아세테이트 분획 파우더의 일부를 산으로 가수분해하여 당을 제거시킨 아글리콘 분획물을 얻었다. 실험방법은 H_2SO_4와 아세톤을 혼합한 용액에 에틸아세테이트 분획 파우더 일정량을 첨가한 후 4 h 동안 중탕가열하면서 환류・냉각시켰다. 환류 시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 적정 후 증류수로 세척하여 산, 염기 및 당 등을 모두 제거하였다. 이 용액을 다시 에틸아세테이트로 분획한 후 감압・농축하여 제조된 아글리콘 파우더를 실험에 사용하였다(Figure 1).

2.3. 감태 추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical 소거 활성을 평가하기 위해 DPPH법을 이용하였다. 비교적 안정한 라디칼인 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 전자주게 능력을 통하여 시료의 환원력을 측정한다. 실험 방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가한 후 감태 추출물 1 mL를 농도별로 첨가하여 섞은 후 실온에서 10 min 동안 방치한 후 spectrophotometer로 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 시료가 포함되지 않은 용매를 첨가한 것으로, DPPH radical의 최대 흡광도를 나타낸다. 실험군(experiment)은 시료를 첨가한 것으로, 시료에 의해 DPPH의 활성이 저해될 경우 517 nm에서의 흡광도가 감소하게 된다. 시료 바탕실험군(sample blank)은 DPPH를 첨가하지 않고 시료만을 첨가한 것으로, 시료 자체의 흡광도를 나타낸다. 이 흡광도(A)로부터 다음 식에 의해 DPPH의 활성 저해율(%)을 나타내었다. 자유 라디칼 소거 활성은 DPPH의 농도가 50% 감소하

는 데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC_{50}, μg/mL)로 표기하였다.

$$\%\,Inhibition = \left(1 - \frac{A_{experiment} - A_{sample\ blank}}{A_{control}}\right) \times 100\%$$

2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe^{3+}–EDTA/H_2O_2계에 있어서 활성산소 소거활성(총 항산화능)

Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계는 각종 ROS를 생성시키며, 철이나 구리 같은 전이금속은 촉매로서 작용하여 반응성이 큰 hydroxyl radical (•OH)을 발생시킨다. 이 계를 이용하여 luminol과 ROS 간의 반응으로 나타나는 화학발광(chemiluminescence)을 측정함으로써 시료의 총 항산화능을 평가할 수 있다. 총 항산화능에는 시료의 환원력뿐만 아니라, 활성산소의 생성을 억제하는 킬레이트 능력도 영향을 줄 수 있다.

실험 방법은 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 감태 추출물과 2.5 mM EDTA 40 μL, 5 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 10 μL, 35 mM luminol 80 μL를 첨가하여 섞은 후 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고, 5 min 동안 37 ℃에서 항온 시켰다. 그 후 150 mM H_2O_2 40 μL를 넣고 25 min 동안 화학발광을 측정하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 공시험(blank)은 실험군(experiment)과 조건이 동일하나 H_2O_2와 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$를 첨가하지 않은 것으로 하였으며, 대조군(control)은 시료 용액 대신 증류수를 첨가한 것으로 하여, 다음 식에 의해 저해율(%)을 구하였다. 활성산소 소거 활성의 크기는 화학발광의 세기(counts per minute, cpm)가 50% 감소하는 데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC_{50}, μg/mL)로 표기하였다.

$$\%\,Inhibition = \frac{cpm_{control} - cpm_{experiment}}{cpm_{control} - cpm_{blank}} \times 100\%$$

2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 혈액을 넣고, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리하여 적혈구와 혈장을 분리하였다. 분리한 적혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 9.6 mM, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.6 mM)로 3회 세척하여 실험에 사용하였으며, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 광학 밀도(optical density, O.D.) 값이 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 약 1.5 × 10^7 cells/mL이었다.

2.4.2. 감태 추출물의 광용혈 억제 효과

1.5 × 10^7 cells/mL 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣고, 감태 추출물을 농도별로 각각 50 μL씩 첨가하였다. 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시킨 후, 광증감제인 rose bengal (12 μM) 0.5 mL를 첨가하고 파라필름으로 시험관의 입구를 봉한 뒤 광조사하였다. 광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm × 20 cm × 25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 5 cm 거리에 평행이 되도록 배열한 후 15 min 동안 수행하였다. 광조사가 끝난 후 암반응(post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴 정도를 15 min 간격으로 700 nm에서의 투광도(transmittance, %)로부터 구하였다. 이 파장에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈 정도에 비례한다. 모든 실험은 20 ℃ 항온실에서 수행하였다.

감태 추출물이 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50%가 용혈되는 시간(τ_{50})을 구하여 비교 평가하였다. 모든 경우의 실험에서 대조군은 τ_{50}이 30.3 min으로 오차범위 ± 1.9 min 이내로 재현성이 양호하게 나타났다.

2.5. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5% 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 감태 추출물 및 분획물의 수율

건조된 감태를 50% 에탄올로 추출하여 여과 및 건조시켜 얻은 50% 에탄올 추출물의 수율은 감태 건조

Table 1. Yields of *E. cava* Extract/Fractions

	50% EtOH extract	EtOAc fraction	Aglycone fraction
Yields (%)	23.77 ± 0.05	8.53 ± 0.03	4.69 ± 0.04

중량의 23.77%였다. 50% 에탄올 추출물로부터 얻어진 에틸아세테이트 분획물의 수율은 추출에 이용한 감태의 건조 중량 대비 8.53%였으며, 에틸아세테이트 분획물로부터 산가수분해 반응을 통해 얻어진 아글리콘 분획물의 수율은 감태의 건조 중량 대비 4.69%로 얻어졌다(Table 1). 3가지 추출물/분획물은 모두 수율이 크게 나타났다. 추출물의 수율이 클수록 화장품에의 응용하기 용이하다.

3.2. 감태 추출물의 항산화 활성

3.2.1. DPPH법을 이용한 자유 라디칼 소거 활성

자외선에의 노출과 같은 외부 스트레스에 의해 피부에서 생성되는 과잉의 ROS는 세포 및 조직에 손상을 주어 노화를 가속화시킨다. 이러한 ROS에는 superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical (•OH)과 같은 라디칼 종이 포함되어 있다. 라디칼은 원자가 전자 궤도함수에 쌍을 이루지 않은 홀 전자가 존재하여 에너지가 높고 반응성이 매우 크다. 자유 라디칼은 세포막에서 지질 과산화반응을 개시하며 연쇄적인 자동산화 반응 과정으로 세포를 손상시킨다. 대표적인 항산화제인 비타민 E는 생성된 지질라디칼에 전자를 제공하여 연쇄 반응을 종결시키고 세포를 보호한다. 위와 같이 시료의 전자 주게 능력을 측정하여 추출물의 항산화능을 평가할 수 있다. 비교적 안정한 라디칼로 존재하는 DPPH를 이용하여, 517 nm에서의 흡광도 변화를 통해 시료의 항산화능을 평가한다. 시료가 DPPH 분자에 수소 원자 또는 전자를 제공해주는 능력, 즉 항산화 효과가 클수록 517 nm에서의 흡광도는 더 감소하게 된다.

따라서 본 실험에서는 감태 추출물의 자유 라디칼 소거 활성은 FSC_{50}으로 나타내었다(Figure 2). 대조군으로는 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol을 사용하였다. 실험 결과, 50% 에탄올 추출물의 FSC_{50}은 22.15 μg/mL, 에틸아세테이트 분획은 6.98 μg/mL, 그리고 아글리콘 분획은 7.03 μg/mL로 나타났다. 대조군인 (+)-α-tocopherol (FSC_{50} = 8.98 μg/mL)과 비교하였을 때, 50% 에탄올 추출물은 라디칼 소거활성이 약 2.5배 정도 낮았으나, 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 (+)-α-tocopherol보다도 라디칼 소거 활성이 더 크게 나타났다. 이는 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획물에는 항산화 활성이 큰 성분들이 많이 들어 있음을 시사한다.

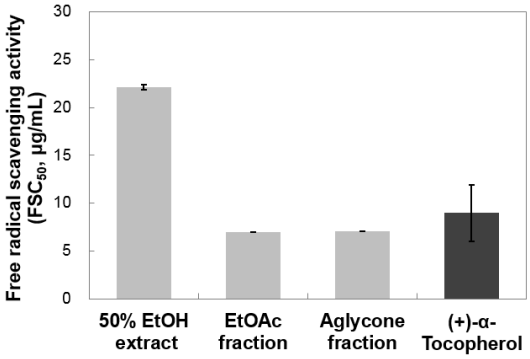

Figure 2. Free radical scavenging activities of extract/fractions from *E. cava* and reference.

3.2.2. 루미놀 화학발광법을 이용한 Fe^{3+}–EDTA/H_2O_2계에 있어서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계에서는 H_2O_2와 Fe^{2+}에 의해 •OH을 포함한 다양한 ROS가 생성된다. 이 Fenton 반응에서 철 또는 구리와 같은 전이금속은 H_2O_2 내 결합이 쉽게 끊어질 수 있도록 전자를 제공해줌으로써 반응을 촉매 한다.

Luminol은 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산으로 전환되며, 다시 바닥상태로 떨어지면서 420 ~ 450 nm에서 빛을 방출한다. 항산화제에 의해 ROS가 소거되면 luminol이 아미노프탈산으로 전환되는 양이 감소하며 그에 따라 화학발광이 감소하게 된다.

본 실험에서는 루미놀 화학발광법을 이용하여 감태 추출물의 활성산소 소거능을 비교 평가하였다(Figure 3). 비교 물질로는 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid를 사용하였다. 총 항산화능은 OSC_{50}으로 나타냈다. 감태 50% 에탄올 추출물의 OSC_{50}은 25.25 μg/mL, 에틸아세테이트 분획 18.19 μg/mL, 아글리콘 분획 14.48 μg/mL 순으로 총 항산화능이 증가하는 경향을 나타냈다. 모든 시료에서 총 항산화능은 비교 물질인 L-as-

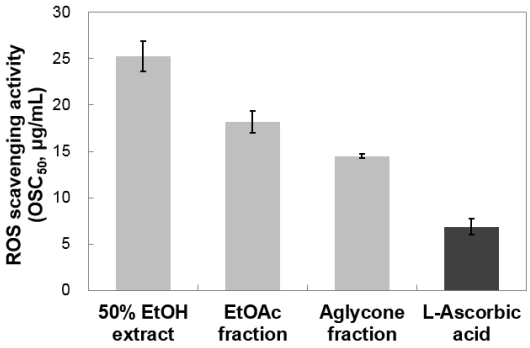

Figure 3. Reactive oxygen species scavenging activity of extract/fractions from *E. cava* and reference in luminol-dependent Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2 system.

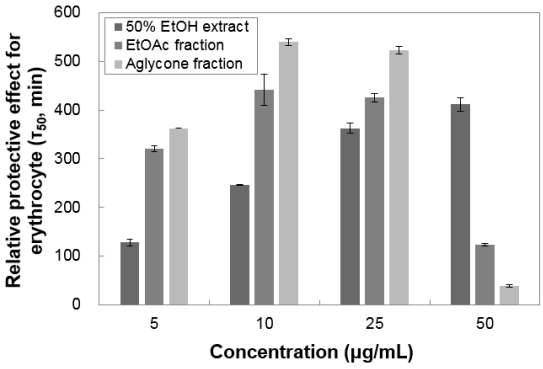

Figure 4. Cellular protective effects of extract/fractions from *E. cava* on rose-bengal sensitized photohemolysis of human erythrocytes.

corbic acid (6.88 μg/mL)보다 작게 나타났지만 화장품에 응용하기에는 적절한 항산화능을 가진 소재로 간주된다.

3.2.3. $^1O_2$으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포보호 효과

피부에 자외선이 조사되면 피부에 존재하는 광증감제(porphyrin 또는 riboflavin)에 의해 다양한 ROS가 생성된다. 그 중 singlet oxygen ($^1O_2$)은 반응성이 매우 큰 활성 산소종으로 광증감 반응의 주 생성물이다. $^1O_2$를 포함한 ROS는 피부 항산화 방어막을 붕괴시키고 세포막 구성 성분인 인지질을 산화시켜 지질 과산화 반응을 개시한다. 이러한 자동산화반응에 의해 세포막이 손상되고 세포는 파괴된다. 따라서 사람의 적혈구 세포를 이용한 광용혈 실험을 통해 활성산소에 의한 세포 손상을 방어하는 항산화제의 세포보호 효과를 측정할 수 있다. 본 실험에서는 rose-bengal로 유도된 $^1O_2$에 의한 세포 손상에 대하여 감태 추출물의 항산화 능력을 평가하였다.

적혈구 파괴에 대한 감태 추출물의 세포보호 효과를 추출물 또는 분획의 농도별로 비교하여 그래프로 나타내었다(Figure 4). 세포보호 능력은 적혈구가 50% 용혈 되는 데 걸리는 시간인 τ_{50}으로 나타내었다. 감태 추출물은 분획별 5, 10, 25, 50 μg/mL의 농도로 적혈구 광용혈 실험에 사용하였다. 분획별로 농도에 따른 세포보호 효과를 비교한 결과, 50% 에탄올 추출물에서 세포보호 효과가 농도 의존적으로 증가하였다. 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 10 및 25 μg/mL에서 높은 세포보호 효과를 나타내었으나, 50 μg/mL의 농도에서는 오히려 세포보호 효과가 감소하는 것으로 나타났다. 5 μg/mL에서 50% 에탄올 추출물에 비해 에틸아세테이트 분획의 τ_{50}이 두 배 이상 증가한 것으로 보아 에틸아세테이트 분획에서 $^1O_2$으로 유도된 적혈구 용혈을 억제하는 항산화 물질의 함량이 증가한 것으로 예상해 볼 수 있다. 10 μg/mL 농도에서의 τ_{50}은 50% 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획에서 각각 246.5 min, 442.0 min, 539.9 min으로 나타났다. 세포보호 효과는 50% 에탄올 추출물 < 에틸아세테이트 분획 < 아글리콘 분획 순으로 나타났으며, 이는 25 μg/mL 농도에서도 동일한 경향으로 나타났다. 대조적으로 50 μg/mL에서는 50% 에탄올 추출물의 τ_{50}이 411.8 min으로 세포보호 효과가 가장 컸으며, 에틸아세테이트 분획은 124.0 min, 아글리콘 분획은 39.3 min으로 이는 5 μg/mL 50% 에탄올 추출물의 τ_{50}보다도 작은 수치를 나타냈다. DPPH와 총항산화능 결과를 볼 때 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 농도가 증가하면서 항산화 활성은 증가하나 세포를 대상으로 하는 실험에서는 세포보호 효과가 나타나지 않고 오히려 광증감작용에 의한 세포 용혈을 촉진하는 작용을 나타내는 성분이 들어 있는 것으로 판단된다. 이와 같이 적혈구의 세포막을 교란시켜 적혈구 세포의 용혈을 촉진하는 성분에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

10 μg/mL에서 세포보호 효과를 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol과 비교한 결과, (+)-α-tocopherol (40.6 min) < 50% 에탄올 추출물(246.5 min) < 에틸아

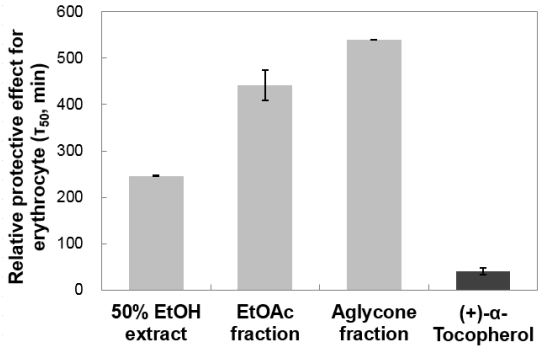

Figure 5. The cellular protective effects of extract/fractions from *E. cava* and (+)-α-tocopherol at 10 μg/mL on the photohemolysis of human erythrocytes.

세테이트 분획(442.0 min) < 아글리콘 분획(539.9 min) 순으로 나타났으며 세 분획 모두 (+)-α-tocopherol보다 높은 세포보호 효과를 나타내었다(Figure 5). 감태 추출물을 화장품에 항산화 소재로 이용할 경우는 세포에서 항산화 활성을 나타내는 농도를 고려하는 것이 필요하다고 사료된다.

4. 결 론

1) DPPH법을 이용한 감태 추출물의 분획별 자유 라디칼 소거 활성(FSC_{50}) 결과, 에틸아세테이트 분획(6.78 μg/mL) > 아글리콘 분획 (7.03 μg/mL) > (+)-α-tocopherol (8.98 μg/mL) > 50% 에탄올 추출물(22.15 μg/mL)로 나타났다. 따라서 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획이 지용성 항산화제인 (+)-α-tocopherol보다 높은 자유 라디칼 소거 활성을 나타내었다.
2) 루미놀 화학발광법을 이용한 Fe^{3+}-EDTA/H_2O_2계에서 감태 추출물의 활성산소 소거 활성(OSC_{50}) 결과, L-ascorbic acid (6.88 μg/mL) > 아글리콘 분획(14.48 μg/mL) > 에틸아세테이트 분획(18.19 μg/mL) > 50% 에탄올 추출물(25.25 μg/mL)이었으며, 감태 추출물 분획 중에서 아글리콘 분획의 총 항산화능이 가장 우수한 것으로 나타났다.
3) $^1O_2$으로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 감태 추출물의 세포보호 효과(τ_{50}) 측정 결과, 10 μg/mL에서 아글리콘 분획(539.9 min) > 에틸아세테이트 분획(442.0 min) > 50% 에탄올 추출물(246.5 min) > (+)-α-tocopherol (40.6 min) 순으로 나타났으며, 50 μg/mL를 제외한 모든 농도에서 아글리콘 분획의 세포보호 효과가 가장 큰 것으로 나타났다.

이상의 결과들로 감태 추출물과 그 분획물들이 *in vitro* 항산화능 평가 중, 화학발광법을 이용한 총 항산화능 및 DPPH법에서 라디칼 소거활성 측정 결과 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획이 비교물질인 L-ascorbic acid 및 (+)-α-tocopherol과 유사한 항산화능을 나타내었으며, *in vivo* 광용혈 실험을 통해 $^1O_2$으로 유도된 세포보호 효과에 있어서는 (+)-α-tocopherol보다 훨씬 더 우수한 세포보호효과를 나타내는 것을 확인하였다.

본 저자들은 감태 추출물과 그 분획물들이 화장품에서 항산화제로서의 응용 가능성이 있음을 확인하였으며, 추후 주요 항산화 성분 분석 및 항노화 효능 평가를 통해 기능성 화장품으로서의 가능성이 있는지를 확인해 볼 필요가 있다고 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 2015 반포고등학교 R&E 연구 사업(2015-0937)으로 진행되었고 이에 감사드립니다.

Reference

1. J. Uitto and E. F. Bernstein, Molecular mechanisms of cutaneous aging: Connective tissue alterations in the dermis, *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, **3**(1), 41 (1998).
2. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**(3), 75 (1997).
3. B. A. Gilchrest, Biochemical and molecular changes in photodamaged skin, ed. B. A. Gilchrest, 168, Photodamage, Blackwell Science, Cambridge (1995).
4. K. M. Hanson and J. D. Simon, Epidermal trans-urocanic acid and the UV-A-induced photoaging of the skin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**(18), 10576 (1998).
5. F. Urbach, Biological responses to UVA radiation,

ed. F. Urbach, 1, Valdemar Publishing Company, Overland Park (1992).
6. H. Masaki, T. Atsumi, and H. Sakurai, Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **206**(2), 474 (1995).
7. B. A. Jurkiewicz and G. R. Buettnerf, EPR detection of free radicals in UV-irradiated skin: Mouse versus human, *Photochem. Photobiol.*, **64**(6), 918 (1996).
8. P. Brenneisen, J. Wenk, L. O. Klotz, M. Wlaschek, K. Briviba, T. Krieg, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Central role of ferrous/ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **273**, 5279 (1998).
9. H. N. Ananthaswamy and W. E. Pierceall, Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis, *Photochem. Photobiol.*, **52**(6), 1119 (1990).
10. R. Ogura, M. Sugiyama, J. Nishi, and N. Haramaki, Mechanism of lipid radical formation following exposure of epidermal homogenate to ultraviolet light, *J. Invest. Dermatol.*, **97**, 1044 (1991).
11. S. N. Park, D. H. Won, J. P. Hwang, and S. B. Han, Cellular protective effects of dehydroeffusol isolated from *Juncus effusus* L. and the mechanisms underlying these effects, *J. Ind. Eng. Chem.*, **20**, 3046 (2014).
12. S. N. Park, S. Y. Kim, G. N. Lim, N. R. Jo, and M. H. Lee, *In vitro* skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from *Suaeda asparagoides* extracts, *J. Ind. Eng. Chem.*, **18,** 680 (2012).
13. H. S. Rho, C. S. Lee, S. M. Ahn, Y. D. Hong, S. S. Shin, Y. H. Park, and S. N. Park, Studies on tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of benzoic acid derivatives containing kojic acid moiety, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **32**(12), 4411 (2011).
14. R. E. Moore, Algal nonisoprenoids, marine natural products, chemical and biological perspective, ed. P. J. Scheuer, 1, 44, Academic Press, New York (1978).
15. S. Koyanagi, N. Tanigawa, H. Nakagawa, S. Soeda, and H. Shimeno, Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and anti-tumor activities, *Biochem. Pham.*, **65**(2), 173 (2003).
16. S. J. Heo, E. J. Park, K. W. Lee, and Y. J. Jeon, Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds, *Bioresour. Technol.*, **96**(14), 1613 (2005).
17. M. A. Ragan and K. W. Glombitza, Phlorotannins: Brown algal polyphenols, *Progress in Phycological Research*, **4,** 130 (1986).
18. A. R. Kim, T. S. Shin, M. S. Lee, J. Y. Park, K. E. Park, N. Y. Yoon, J. S. Kim, J. S. Choi, B. C. Jang, D. S. Byun, N. K. Park, and H. R. Kim, Isolation and identification of phlorotannins from *Ecklonia stolonifera* with anti-oxidant and anti-inflammatory properties, *J. Agric. Food Chem.*, **57**(9), 3483 (2009).
19. S. J. Heo, S. C. Ko, S. H. Cha, D. H. Kang, H. S. Park, Y. U. Choi, D. K. Kim, W. K. Jung, and Y. J. Jeon, Effects of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effects against photo-oxidation stress induced by UV-B radiation, *Toxicol. In Vitro*, **23**(6), 1123 (2009).
20. Q. T. Le, Y. Li, Z. J. Qian, M. M. Kim, and S. K. Kim, Inhibitory effects of polyphenols isolated from marine alga *Ecklonia cava* on histamine release, *Process Biochem.*, **44**(2), 168 (2008).
21. M. J. Joe, S. N. Kim, H. Y. Choi, W. S. Shin, G. M. Park, D. W. Kang, and Y. K. Kim, The inhibitory effects of eckol and dieckol from *Ecklonia stolonifera* on the expression of matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**(8), 1735 (2006).