

## 해파리 콜라겐 추출물의 보습 효과

김동욱·백태선·김윤정·최성규·이대우<sup>†</sup>

(주)더마랩 기술연구소

(2016년 2월 4일 접수, 2016년 4월 29일 수정, 2016년 5월 27일 채택)

### Moisturizing Effect of Jellyfish Collagen Extract

Dong Wook Kim, Tae Seon Baek, Yun Jeong Kim, Sung Kyu Choi, and Dae Woo Lee<sup>†</sup>

R&D Center, Dermalab Ltd., 231 Munmakgongdan-gil, Munmak-eup, Wonsu-si, Gangwon-do 26362, Korea  
(Received February 4, 2016; Revised April 29, 2016; Accepted May 27, 2016)

**요약:** 본 연구에서는 해파리로부터 콜라겐 추출물을 제조하였고, 이에 대한 보습 효과를 측정하였다. 보습 효과는 caspase 14 발현, filaggrin, hyaluronan synthase-3 (HAS-3), aquaporin-3 (AQP-3) 및 desmocollin (DSC)을 측정하였다. 그 결과, caspase 14 mRNA 발현은 비교물질인 retinoic acid (RA)와 유사한 효과를 나타냈다. 그리고 콜라겐 추출물은 20 mg/mL의 농도에서 각각 211.7%, 139.9%, 212.5% 및 116.8%의 filaggrin, HAS-3, AQP-3 및 DSC 발현 증가를 나타냈다. 따라서, 본 연구에서 해파리 콜라겐 추출물은 보습 효과를 갖는 화장품 소재로서의 개발 가능성이 클 것으로 기대할 수 있다.

**Abstract:** In this study, we investigated the moisturizing effects of collagen extract from jellyfish. The moisturizing effects were measured by the caspase 14 expression, filaggrin, hyaluronan synthase-3 (HAS-3), aquaporin-3 (AQP-3) and desmocollin (DSC). As a results, effect of caspase 14 mRNA expression of collagen extract are similar to that of retinoic acid (RA) which is a reference control. And the collagen extract showed inhibitory of filaggrin, HAS-3, AQP-3 and DSC mRNA expression of 211.7%, 139.9%, 212.5% and 116.8% respectively, at the concentration of 2%. Therefore, our study suggested that jellyfish collagen extract has considerable potential as a cosmetics ingredient with moisturizing effect.

**Keywords:** *Nemopilema nomurai*, collagen, moisturizing, jellyfish, cosmetics

## 1. 서 론

최근 피부에 대한 관심이 높아지면서 화장품에 대한 소비량이 증가하고 있다. 이러한 화장품의 효능을 나타내는 소재에 대한 관심이 높아지고 최근 천연물로부터 다양한 소재가 연구되고 있다. 그리고 고령화 사회로 접어들어감에 따라 피부 노화에 대한 연구들의 중요성이 증가하고 있다.

피부의 가장 바깥층인 각질층은 외부 환경에 대한 일차 방어 기능을 담당하며, 외부로부터의 물리화학적

자극 및 미생물 등으로부터 생체를 보호하고 체액, 수분의 증발 등을 적절히 조절하여 생체의 항상성을 유지한다[1]. 이러한 피부의 고유 성질 외에 피부를 부드럽고 탄력 있게 해주는 역할은 각질층에 존재하는 수분에 의해 크게 좌우된다[2]. 수분은 인체의 필요한 각종 생리활성 물질을 운반하는 작용을 하며 피부가 부드럽고 촉촉한 상태를 유지할 수 있도록 해준다[3].

건강한 피부 유지에는 각질 세포간 지질성분과 아미노산, 요소, 유기산 등의 천연보습인자와 피지가 관여하며 이러한 요소들의 균형이 깨지거나 결핍될 때 건조피부가 유발될 수 있으며, 건조피부는 표피, 진피, 피하지방층을 포함한 피부 전 층에서 일어나는 변화라

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: dwlee@dermalab.co.kr)  
call: 070)4863-2429

기 보다는 주로 표피 상층부에서 일어나는 변화 때문에 생기는 것으로 알려져 있다. 피부장벽 역할을 하는 표피 상층부의 각질층에서 일어나는 변화가 건성 피부의 중요한 원인이 된다[4].

각질층의 구조가 파괴되면 경피 수분 손실을 일으키고, 피부 소양감을 일으키는 것으로 이외에도 피부의 화끈거림, 피부 벗겨짐, 피부의 갈라짐, 발작 등을 일으킬 수 있다[5]. 이러한 증상으로 인해 피부 생리학적 기능을 무너트려 피부암(skin cancer), 노화(senescence), 홍반(erythema), 부종(edema)과 같은 염증을 유발하며, 인체에서 가장 흔하게 자주 발생하는 것으로, 염증반응은 인체나 조직에 물리적 작용, 화학 물질, 세균 감염 등의 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 상처 부위를 복구하고 재생하려는 기전이 진행된다[6,7]. 따라서, 천연보습인자는 수분을 직접적으로 보유하거나 흡습하여 표피의 수분을 유지시키기에 중요하다.

천연보습인자는 filaggrin이 분해되어 생성된 아미노산과 그 대사산물로 구성되며, 이외에 각종 무기염류도 포함된다[8,9]. Filaggrin은 profilaggrin으로부터 합성이 되는데, 이것은 표피 과립층에서 생성되어 비활성 및 불용성인 상태로 저장되며, 표피의 칼슘 수치 증가에 의해 촉진되는 탈인산화 및 단백질 분해과정 등의 여러 단계를 거쳐서 filaggrin으로 전환된다. 또한 filaggrin은 각질층으로 방출되어 세포골격을 형성하는 keratin filaments와 결합하고, transglutaminase (TGMs)에 의한 교차결합과 peptidylarginine deiminase-3 (PAD3)에 의한 변형 과정을 통하여 견고해진다. 이후 caspase 14 등의 여러 분해 효소들에 의해 유리아미노산으로 최종 분해되어 천연보습인자로서 기능을 한다[10]. 표피 전체 아미노산의 40% 이상을 세리신(sericine), 글리신(glycine)이 차지하고 있는데, 이는 표피에서 주요 천연보습인자로서 표피의 수분 유지 기능을 한다[11,12]. 또한 filaggrin과 천연보습인자의 아미노산 서열의 유사성은 filaggrin이 천연보습인자의 아미노산의 유일한 근원단백질임을 증명하였다[13,14]. Filaggrin의 부족은 비정상적인 피부장벽의 형성을 초래하며, 아미노산 피부의 보습상태에 중요한 역할을 한다는 연구가 다수 보고되었다.

각질형성세포에 존재하는 결합체는 표피에서 가시층 각질형성 세포간 결합과 세포 내 keratin으로

구성된 장력섬유를 구성하는 중간섬유 세포골격(intermediate filament cytoskeleton)에 고정되어, 세포로 하여금 외부적인 기계적 자극으로부터 손상되지 않도록 보호하는 역할을 한다. 이 결합체는 구조가 견고하여 발달 과정 중 표피세포의 중층화나 소기관의 구조 유지에 중요한 역할을 하게 된다[15-17]. 결합체는 전자현미경 소견상 세포질 내 판(plaque)과 세포막 사이의 코어(core)로 구성된 특징적인 형태를 보인다. 생화학적으로 분석해보면 판은 4가지 단백질로, 코어는 4가지 당단백으로 구성되어 있으며, 중요한 성분을 보면 판에는 plakoglobin과 desmoplakin 등이 있고, 코어에는 desmoglein과 desmocollin (DSC) 등이 있다. DSC 아형으로 3종류가 알려져 있고, DSC 1과 3은 주로 피부에 분포하고 있으나, DSC 2는 다른 조직에도 산재하고 있다고 알려져 있다[18].

Glycosaminoglycan (GAG)의 일종인 hyaluronic acid (HA)는 콜라겐, 엘라스틴과 함께 피부 3대 요소 가운데 하나로 친수성이 강해 물과 결합하여 겔을 형성하는 성질이 있어 피부 수분 유지에 중요한 역할을 하는 천연 보습제로 알려져 있다[19,20]. HA는 연령의 증가에 따라 피부에서 감소되며 자외선의 장기 노출과 같은 환경적 요인에 의해서도 부정적 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 이러한 HA의 감소는 피부 수분 함량의 감소와 함께 탄력의 감소, 거친 피부 및 주름 등의 원인으로 알려져 있다. 따라서 HA의 합성을 유도하거나 분해를 억제하는 물질은 피부 보습과 노화 방지에 효과적이며, 특히 hyaluronic acid synthase (HAS) 중 HAS-2와 HAS-3은 HA 합성에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 최근 HAS의 유전자 발현 증가를 통해 HA의 생산을 촉진시키고자 하는 연구가 활발하게 이루어지고 있다[21,22].

Aquaporin (AQP)은 세포막을 통한 선택적 수분 이동을 촉진시키는 통합 막 단백질군이다. 현재까지 포유류에서 13개의 AQP (AQPO ~ AQP12)가 존재하는 것으로 알려져 있다[23]. 피부 및 피부 부속기에도 여러 종류의 AQP가 발현되는 것으로 보고되고 있는데, AQP-3은 피부 표피 기저막의 각질세포에서 발현된다[24]. 또한 모낭도 피부부속기관의 일종이며, 모낭을 형성하는 세포층은 표피각질세포와 연결되어 있고 모낭세포도 AQP-3를 발현하므로, AQP-3가 피부뿐 아니라 모낭 주기 및 모발 증식에도 중요한 역할을 담당

한다[25].

강장동물인 해파리(*Nemopilema nomurai*)는 한반도 및 태국 주변 해역에서 자주 관찰되는 몸집이 큰 해파리이다. 최근 해수 온도의 상승 등으로 개체수가 급격히 증가하여 우리나라 연안에서 수산어구의 파괴와 어획물의 작업지연 등을 유발하여 정상적인 조업을 불가능하게 하고 있다. 따라서, 수산업 분야 및 일상 생활에 피해를 입히고 있는 해파리의 방제뿐만 아니라, 수산자원의 산업적인 활용 방안에 대한 연구가 필요한 실정이다. 현재까지 보고된 해파리에 대한 연구는 해파리 콜라겐 추출, 식품 및 화장품 이용 등이 있다[26-28]. 최근 해파리 성분 중 뮤신은 수분 손실을 막아 주며, 상처 피부를 빠르게 재생시켜 주는 효과가 보고되었다[29]. 그리고 해파리는 단백질과 칼슘, 인, 요오드, 철 및 비타민 등과 같은 무기질이 풍부하고 주성분이 단백질과 수분이며, 당과 지질, 그리고 콜레스테롤이 흔적량에 불과하여 저칼로리 식품 소재로 이용되고 있다[30].

본 연구는 해파리로부터 화장품 소재로서의 유효성을 규명하고 산업소재화의 가능성을 확인하기 위하여 콜라겐 추출물을 제조하고, 그 콜라겐 추출물로부터 보습 효과를 알아보려고 한다.

## 2. 실험 방법

### 2.1. 재료

해파리는 (주)참맛원에서 구입하였고, 깨끗이 수세한 후 잘게 마쇄하여 실험에 사용하기 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하였다.

해파리 콜라겐 추출물의 염투석을 위해 사용된 Biotech CE Trial Kit, 100-500 Dal은 Spectrum laboratories, Inc (USA)에서 구입하였으며, PCR은 TC-96G/H(b)B (Hangzhou bioer Technology co., LTD, CHINA)로 증폭하였다. 그리고 전기영동 후 아가로스 겔 분석은 DGS-200D (코리아랩텍, KOREA)을 사용하여 효과를 확인하였다. 실험에 사용된 세포주 human keratinocyte cell line (HaCaT cell line)은 ATCC (USA)에서 구입하였으며, 그 밖의 시약은 특급시약을 사용하였다.

### 2.2. 일반성분 분석

해파리의 콜라겐 추출물은 AOAC방법[31]에 따라 분석하였다. 수분은 상압가열건조법, 단백질은 Kjeldahl법 그리고 탄수화물은 phenol-황산법으로 측정하였다.

### 2.3. 아미노산 분석

해파리 콜라겐 추출물의 아미노산은 시료 10 mg을 정평하여 ampoule에 넣고 6 N HCl 2.0 mL를 가하여  $110^{\circ}\text{C}$ 에서 24 h 가수분해하였다. 이 가수분해액을 glass filter로 여과하고 감압 건조하여 HCl을 제거한 후, 아미노산 자동분석기용 loading buffer ( $\text{Na}^+$  form, pH 2.2)로 25 mL되게 정용하였다. 이 중 일정량을 취하여 아미노산 자동분석기(Hitachi, Japan)로 분석하였다.

### 2.4. 당 분석

해파리 콜라겐 추출물의 당은  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 에 현탁한 후 1 M로 희석하여  $100^{\circ}\text{C}$ 에서 2 h 30 min 동안 실시하였다. 그리고 중성당은  $\text{NaBH}_4$ 로 환원하고, 아세틸화하였다. Alditol acetates의 정량은 gas chromatography (GC)로 분석하였다. GC의 분석은 Restek Rtx 225WCOT column ( $15\text{ m} \times 0.32\text{ mm ID}$ ;  $0.25\ \mu\text{ film}$ )이 장착된 CarloErba Vega GC를 이용하여 온도프로그램  $90^{\circ}\text{C}$  (1 min),  $90 \rightarrow 150^{\circ}\text{C}$  ( $45^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ),  $150^{\circ}\text{C}$  (1 min),  $150 \rightarrow 210^{\circ}\text{C}$  ( $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ),  $210^{\circ}\text{C}$  (1.5 min)으로 실시하였다. 구성당 함량은 각 peak의 면적비와 구성당의 alditol acetate의 분자량으로부터 계산된 mol%로부터  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 환산하였다. Ironic acids의 정량은 비색적 방법으로 측정하였다. 즉 시료를 상온에서 3 h 동안  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 에 현탁한 후 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 로 희석하여  $100^{\circ}\text{C}$ 에서 1 h 분해하였다.

### 2.5. 해파리 콜라겐 추출물의 제조

마쇄한 해파리에 0.2% NaCl을 가한 다음  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 24 h 동안 교반한 후 원심분리에 의하여 겔상 침전물을 얻는다. 여기에 3배의 에탄올을 가하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 정치한다. 이어서 분리된 침전물은 다시 물에 용해한 후 염 제거를 위하여 투석을 실시한다. 투석한 콜라겐 추출물을 농축 및 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

**Table 1.** The Primers for PCR Analysis

Name		Sequence
Filaggrin	Forward:	5'-GATGACCCAGACACTGCTGA-3'
	Reverse:	5'-TGGTTTTGCTCTGATGCTTG-3'
Caspase 14	Forward:	5'-CTTTGGTGACACACAGTATTAG-3'
	Reverse:	5'-ATCACCTGGCCCTTATTGTC-3'
HAS-3	Forward:	5'-ACTGCCTTCAAGGCCCTTGG-3'
	Reverse:	5'-AATGTTCCAGATGCGGCCAC-3'
AQP-3	Forward:	5'-TGACCTTCGCAATGTGCTTC-3'
	Reverse:	5'-TGAAGAGGCGAGGTCCAAAGT-3'
DSC	Forward:	5'-AGTGTGAGTTTGTTCATCACAGGTC-3'
	Reverse:	5'-CCATGGCCTCACAGCCTTTA-3'
GAPDH	Forward:	5'-CTCTGCTCCTCCCTGTTCT-3'
	Reverse:	5'-CTTGACTGTGCCGTTGAACT-3'

## 2.6. 세포 배양

HaCaT 세포는 10%의 fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)와 100 U/mL의 streptomycin, 100 U/mL의 penicillin 항생제(Gibco, USA)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, USA) 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다.

## 2.7. MTT Assay

세포독성은 3-(4,5-dimethylthazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma Chemical Co., USA) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 방법을 변경하여 측정하였다. HaCaT 세포를 1 × 10<sup>5</sup> cells/well 농도로 96-well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 처리하여 배양기(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 24 h 배양하였다. 5 µg/mL의 MTT 용액을 한 well 당 100 µL씩 첨가하고 4 h 후 microplate reader (BIO TEK Instruments, USA)로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 2.8. RT-PCR

6-well 배양용 플레이트에 5 × 10<sup>5</sup>개의 HaCaT 세포를 배양용 조건에서 깔고 24 h 배양한 후에 시료를 처리하여 16 h 배양한 HaCaT 세포를 수확하여 RNA easy mini kit (Qiagen, USA)를 이용하여 RNA 추출한 후, PrimeScript RT-PCR kit (Takara, Japan)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 사용하여, 94 °C에서 30 s 동안 denaturation 시키고, 50 ~ 63 °C에서 1 min

annealing 시킨 다음, 72 °C에서 1 min 동안 extension시키는 cycle을 30회 반복한 뒤, 마지막 extension은 72 °C에서 1 min 동안 PCR machine에서 수행하였다. 각 PCR 생성물은 전기영동을 통하여 분석하였다. 그리고 DGS-200D로 겔을 분석하여 효과를 확인하였다. 각각의 프라이머의 염기서열은 Table 1과 같다.

## 2.9. Filaggrin 발현 증가 효과

HaCaT 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5 × 10<sup>5</sup> cells/well로 조절한 후, 12-well plate에 접종하고 18 h 동안 배양하였다. 배양한 뒤 시료를 처리하고 24 h 동안 배양하였다. 배양된 세포에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 filaggrin의 발현 증가율을 확인하였다.

## 2.10. Caspase 14 발현 증가 효과

HaCaT 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5 × 10<sup>5</sup> cells/well로 조절한 후, 12-well plate에 접종하고 18 h 동안 배양하였다. 배양한 뒤 시료를 처리하고 24 h 동안 배양하였다. 배양된 세포에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 caspase 14의 발현 증가율을 확인하였다.

## 2.11. Hyaluronan Acid Synthase-3 (HAS-3) 발현 증가 효과

HaCaT 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5 × 10<sup>5</sup> cells/well로 조절한 후, 12-well plate에

**Table 2.** Proximate Compositions of Collagen Extract from Jellyfish

Composition	Contents (%)
Moisture	6.00 ± 0.21
Protein	33.75 ± 0.45
Carbohydrate	0.58 ± 0.09

접종하고 18 h 동안 배양하였다. 배양한 뒤 시료를 처리하고 24 h 동안 배양하였다. 배양된 세포에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 HAS-3의 발현 증가율을 확인하였다.

2.12. Aquaporin-3 (AQP-3) 발현 증가 효과

HaCaT 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5 × 10<sup>5</sup> cells/well로 조절한 후, 12-well plate에 접종하고 18 h 동안 배양하였다. 배양한 뒤 시료를 처리하고 24 h 동안 배양하였다. 배양된 세포에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 AQP-3의 발현 증가율을 확인하였다.

2.13. Desmocollin (DSC) 발현 증가 효과

HaCaT 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 5 × 10<sup>5</sup> cells/well로 조절한 후, 12-well plate에 접종하고 18 h 동안 배양하였다. 배양한 뒤 시료를 처리하고 24 h 동안 배양하였다. 배양된 세포에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 DSC의 발현 증가율을 확인하였다.

2.14. 통계처리

결과값은 3번의 독립적인 실험을 통한 평균과 표준편차로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 *t*-test를 사용하면서 ANOVA검정을 적용하였으며, \**p* < 0.05 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 해파리 콜라겐 추출물의 일반성분, 아미노산 조성 및 당 분석

해파리 콜라겐 추출물의 일반성분 분석 결과는 Table 2에 나타냈으며, protein, moisture 및 carbohydrate

**Table 3.** Amino Acid Compositions of Collagen Extract from Jellyfish

Amino acids	Contents (%)
Asp	12.2
Thr	5.4
Ser	5.8
Glu	13.1
Gly	5.0
Ala	6.8
Cys	1.7
Val	3.8
Met	1.3
Ile	3.4
Leu	8.1
Tyr	4.0
Phe	4.7
Lys	10.0
His	2.6
Arg	7.1
Pro	5.0
Total	100.0

가 각각 33.75%, 6.00% 및 0.58%로 확인되었다. 그리고 주요 아미노산은 Table 3에서 보는 바와 같이 glutamic acid (13.1%), aspartic acid (12.2%), lysine (10.0%)였으며, 이들의 함량은 전체 구성아미노산의 35.0% 이상을 차지하고 있었다. 그리고 콜라겐과 관련된 glycine (5.1%), proline (5.0%)로 전체 구성아미노산의 10.0% 이상을 차지하고 있었다. 그 외에 threonine, serine, alanin, leucine, arginine 등의 아미노산이 포함되어 있었다. 이와 관련하여 [32]의 연구에서는 숲뿌리해파리의 경우 skin 부위에서 glycine (22.7%), proline (12.9%)였고, umbrella 부위에서는 glycine (18.3%), proline (8.0%)로 보고되었다. 아미노산 조성으로부터 미루어 보아 이를 구성하는 주요 아미노산은 종 및 부위에 따른 차이가 있으며, 콜라겐 이외의 다수의 단백질이 존재하고 있음을 확인할 수 있다. 그리고 해파리 콜라겐 추출물의 당 분석 결과 Table 4에서와 같이 glucose (76.2%), galactose (11.3%), arabinose (7.0%) 등으로 이루어져 있으며 총 6종으로 구성되어 있는 것으로 나타났다.

**Table 4.** Polysaccharides Compositions of Collagen Extract from Jellyfish

Polysaccharides	Contents (%)
Fuc	0.3
Ara	7.0
Xyl	3.7
Man	1.4
Glu	76.2
Galac	11.3

### 3.2. 세포 독성

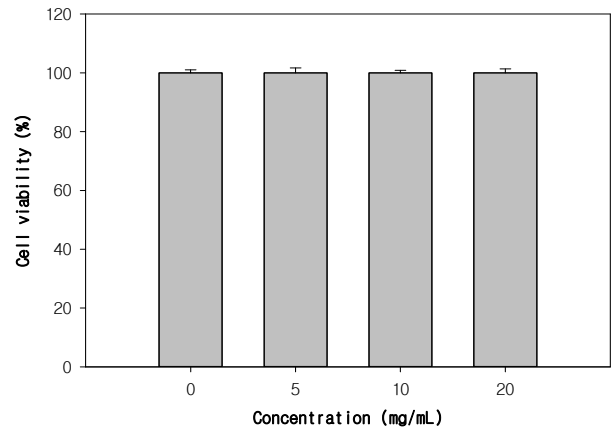
해파리 콜라겐 추출물을 최종농도 5, 10 및 20 mg/mL로 세포에 처리하여 배양한 결과, Figure 1과 같이 HaCaT 세포에 대해 100.0%의 세포생존율을 나타냈다. 따라서, 세포독성이 나타나지 않은 최종농도 5, 10 및 20 mg/mL에서 실험을 진행하였다.

### 3.3. 해파리 콜라겐 추출물의 Filaggrin 발현 증가 효과

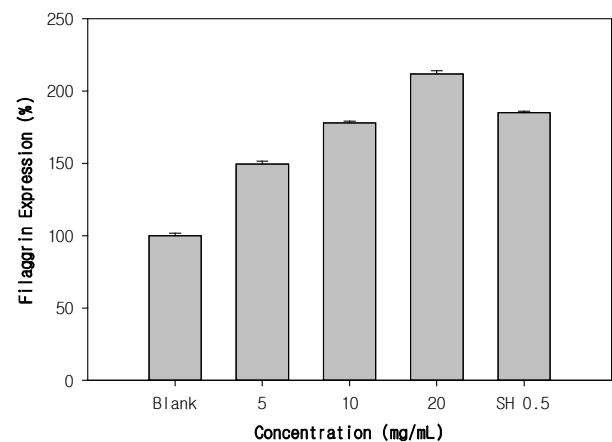
본 연구에서는 filaggrin 발현 증가에 대해서 해파리 콜라겐 추출물을 농도별로 측정함으로써 각 샘플의 효과를 확인하였다(Figure 2). 아무것도 처리하지 않은 blank를 기준으로 해파리 콜라겐 추출물을 세포독성이 나타나지 않았던 최고농도 20 mg/mL로 처리한 결과, filaggrin 발현이 211.7%로 나타났으며, blank 대비 111.0% 상승한 것을 확인했다. 그리고 5, 10 및 20 mg/mL에서 각각 149.4% 및 177.9%의 효과를 나타냈다. 또한 대조군으로 사용된 sodium hyaluronic (SH)의 경우 filaggrin 발현이 185.0%로 나타나 이와 비교하였을 때, 해파리 콜라겐 추출물은 HA 0.5 mg/mL와 filaggrin 발현 증가 효과가 유사 또는 우수한 것을 확인하였다.

### 3.4. 해파리 콜라겐 추출물의 Caspase 14 발현 증가 효과

Caspase 14 발현 증가에 대해서 해파리 콜라겐 추출물을 농도별로 측정함으로써 각 샘플의 효과를 확인하였다(Figure 3). 아무것도 처리하지 않은 blank를 기준으로 해파리 콜라겐 추출물을 세포독성이 나타나지 않았던 최고농도 20 mg/mL로 처리한 결과, caspase 14 발현이 118.6%로 나타났으며, blank 대비 18.6% 상승한 것을 확인했다. 그리고 5 및 10 mg/mL에서 각각 102.5% 및 106.9%의 효과를 나타냈다. 또한 대조군으로 사용된 retinoic acid (RA)의 경우 caspase 14 발현이



**Figure 1.** Cell viability of *Nemopilema nomurai* on HaCaT cells by MTT assay. The cells were treated various concentrations of samples. Each value is the result of mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

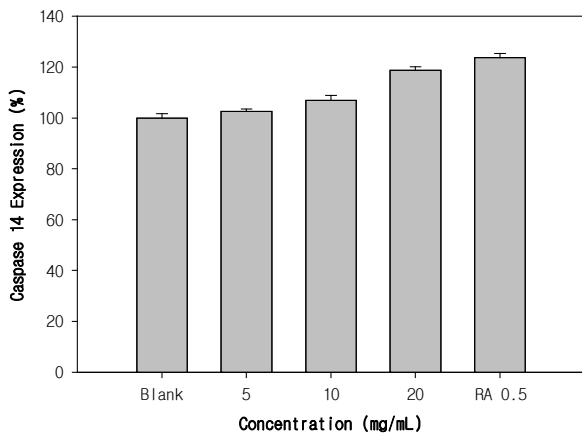


**Figure 2.** Effect of filaggrin expression was measured in HaCaT cells. The cells were treated various concentrations of sample. SH was used as a positive control for filaggrin expression at concentration 0.05%. And expression levels of mRNA were analyzed by RT-PCR. Each value is the result of mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

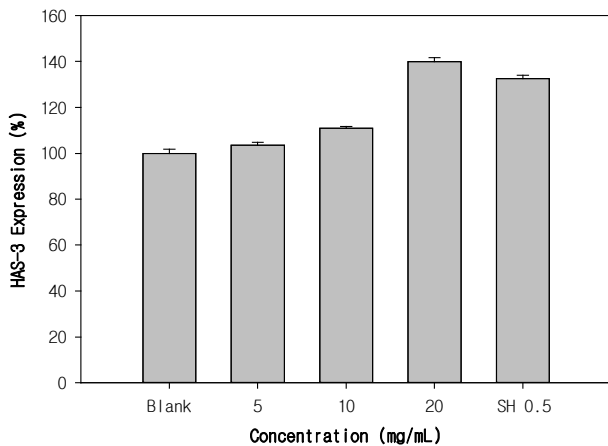
123.7%로 나타나 이와 비교하였을 때, 해파리 콜라겐 추출물은 RA 0.5 mg/mL와 caspase 14 발현 증가 효과가 유사 또는 우수한 것을 확인하였다.

### 3.5. 해파리 콜라겐 추출물의 Hyaluronan Acid Synthase-3 (HAS-3) 발현 증가 효과

HAS-3 발현 증가에 대해서 해파리 콜라겐 추출물을 농도별로 측정함으로써 각 샘플의 효과를 확인하였다

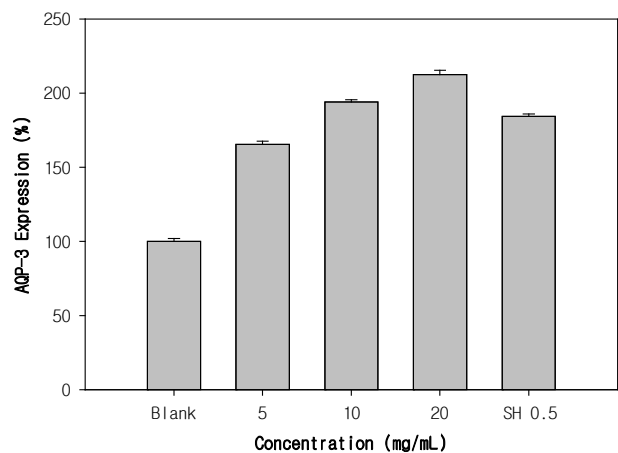


**Figure 3.** Effect of caspase 14 expression was measured in HaCaT cells. The cells were treated various concentrations of sample. RA was used as a positive control for caspase 14 expression at concentration 0.05%. And expression levels of mRNA were analyzed by RT-PCR. Each value is the result of mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.



**Figure 4.** Effect of HAS-3 expression was measured in HaCaT cells. The cells were treated various concentrations of sample. SH was used as a positive control for HAS-3 expression at concentration 0.05%. And expression levels of mRNA were analyzed by RT-PCR. Each value is the result of mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

(Figure 4). 아무것도 처리하지 않은 blank를 기준으로 해파리 콜라겐 추출물을 세포독성이 나타나지 않았던 최고농도 20 mg/mL로 처리한 결과, HAS-3 발현이 139.9%로 나타났으며, blank 대비 39.9% 상승한 것을 확인했다. 그리고 5 및 10 mg/mL에서 각각 103.5% 및 110.9%의 효과를 나타냈다. 또한 대조군으로 사용된



**Figure 5.** Effect of AQP-3 expression was measured in HaCaT cells. The cells were treated various concentrations of sample. SH was used as a positive control for AQP-3 expression at concentration 0.05%. And expression levels of mRNA were analyzed by RT-PCR. Each value is the result of mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

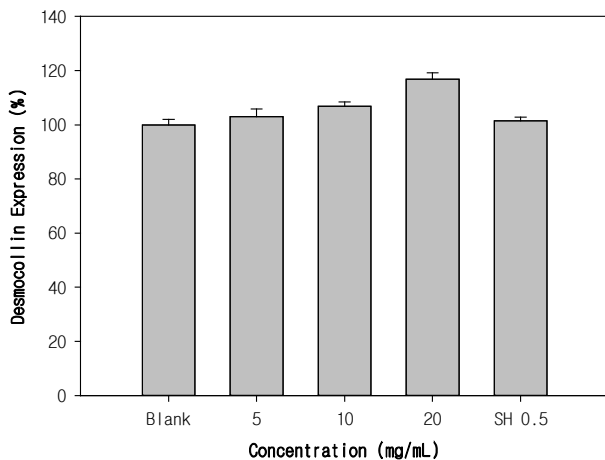
SH의 경우 HAS-3 발현이 132.4%로 나타나 이와 비교하였을 때, 해파리 콜라겐 추출물은 HA 0.5 mg/mL와 HAS-3 발현 증가 효과가 유사 또는 우수한 것을 확인하였다.

### 3.6. 해파리 콜라겐 추출물의 Aquaporin-3 (AQP-3) 발현 증가 효과

AQP-3 발현 증가에 대해서 해파리 콜라겐 추출물을 농도별로 측정함으로써 각 샘플의 효과를 확인하였다 (Figure 5). 아무것도 처리하지 않은 blank를 기준으로 해파리 콜라겐 추출물을 세포독성이 나타나지 않았던 최고농도 20 mg/mL로 처리한 결과, AQP-3 발현이 212.5%로 나타났으며, blank 대비 112.5% 상승한 것을 확인했다. 그리고 5 및 10 mg/mL에서 각각 165.4% 및 194.1%의 효과를 나타냈다. 또한 대조군으로 사용된 SH의 경우 AQP-3 발현이 184.3%로 나타나 이와 비교하였을 때, 해파리 콜라겐 추출물은 HA 0.5 mg/mL와 AQP-3 발현 증가 효과가 유사 또는 우수한 것을 확인하였다.

### 3.7. 해파리 콜라겐 추출물의 Desmocollin (DSC) 발현 증가 효과

DSC 발현 증가에 대해서 해파리 콜라겐 추출물을 농도별로 측정함으로써 각 샘플의 효과를 확인하였다



**Figure 6.** Effect of DSC expression was measured in HaCaT cells. The cells were treated various concentrations of sample. SH was used as a positive control for DSC expression at concentration 0.05%. And expression levels of mRNA were analyzed by RT-PCR. Each value is the result of mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

(Figure 6). 아무것도 처리하지 않은 blank를 기준으로 해파리 콜라겐 추출물을 세포독성이 나타나지 않았던 최고농도 20 mg/mL로 처리한 결과, DSC 발현이 116.8%로 나타났으며, blank 대비 16.8% 상승한 것을 확인했다. 그리고 5 및 10 mg/mL에서 각각 102.9% 및 106.7%의 효과를 나타냈다. 또한 대조군으로 사용된 SH의 경우 DSC 발현이 101.3%로 나타나 이와 비교하였을 때, 해파리 콜라겐 추출물은 SH 0.5 mg/mL와 DSC 발현 증가 효과가 유사 또는 우수한 것을 확인하였다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 해파리(*Nemopilema nomurai*)로부터 콜라겐 추출물을 제조하여 화장품 원료로 이용하고자 보습 효과를 확인하였다. 해파리 콜라겐 추출물은 protein이 33.75%로 콜라겐과 관련된 glycine (5.1%), proline (5.0%)로 전체 구성아미노산의 10.0% 이상을 차지하고 있었다. 이러한 해파리 콜라겐 추출물은 세포독성을 나타내지 않은 농도 20 mg/mL로 처리했을 경우 HaCaT 세포에서 보습 관련 인자인 filaggrin에서는 211.7%, caspase 14는 118.6%, HAS-3는 139.9%, AQP-3는 212.5% 및 DSC는 116.8%로 나타났으며, SH

0.5 mg/mL와 비교했을 경우 유사 또는 우수한 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과에서 해파리 콜라겐 추출물은 화장품 원료로서 피부 보습 소재로의 기초 연구를 제시하였고, 이를 통해 화장품에서 보습 소재로의 활용가치가 있는 것으로 사료된다.

#### Reference

1. O. K. Jacobi, About the mechanism of moisture regulation in the horny layer of the skin, *Proc. Sci. Sect. Toilet Goods Assoc.*, **31**(5), 24 (1959).
2. J. S. Park, Skin barrier and moisturizer, *The Korean Society for Skin Barrier Research*, **9**(1), 11 (2007).
3. M. W. Greaves and J. Sondergaard, Pharmacological agents released in ultraviolet inflammation studies by continuous skin perfusion, *J. Invest. Dermatol.*, **54**(5), 365 (1970).
4. L. Hruza and A. P. Pentland, Mechanisms of UV-induced inflammation, *J. Invest. Dermatol.*, **100**(1), 35 (1993).
5. C. F. Nathan, Secretory products of macrophages, *J. Clin. invest.*, **79**(2), 319 (1987).
6. C. Maziere, M. A. Conte, J. Degonville, D. Ali, and J. C. Maziere, Cellular enrichment with polyunsaturated fatty acids induces an oxidative stress and activates the transcription factors AP-1 and NF-kappaB, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **265**(1), 116 (1999).
7. D. Gomez-Nicola, B. Valle-Argos, and M. Nieto-Sampedro, Blockade of IL-15 activity inhibits microglial activation through the NF-kappaB, p38, and ERK1/2 pathways, reducing cytokine and chemokine release, *Glia*, **58**(3), 264 (2010).
8. P. M. Elias, S. K. Ahn, M. Denda, B. E. Brown, D. Crumrine, L. K. Kimutai, L. Komuves, S. H. Lee, and K. R. Feingold, Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation specific markers, *J. Invest. Dermatol.*, **119**(5), 1128 (2002).
9. R. B. Prealand, M. K. Kuechle, S. P. Lewis, P. Fleckman, and B. A. Dale, Regulated expression of human filaggrin keratinocytes results in cytoskeletal



- disruption, loss of cell-cell adhesion, and cell cycle arrest, *Exp. Cell. Res.*, **270**(2), 199 (2009).
10. M. Watanabe, H. Tagami, I. Horii, M. Takahashi, and A. M. Kligman, Functional analyses of the superficial stratum corneum in atopic xerosis, *Arch. Dermatol.*, **127**(11), 1689 (1991).
  11. M. Hara, K. Kikuchi, M. Watanabe, M. Denda, J. Koyama, J. Nomura, I. Horii, and H. Tagami, Senile xerosis: functional, morphological, and biochemical studies, *J. Geriatr. Dermatol.*, **1**, 111 (1993).
  12. H. Sumino, S. Ichikawa, M. Abe, Y. Endo, Y. Nakajima, T. Minegishi, O. Ishikawa, and M. Kurabayashi, Effects of aging and postmenopausal hypoestrogenism on skin elasticity and bone mineral density in Japanese women, *Endocr. J.*, **51**(2), 159 (2004).
  13. S. Stevenson, L. D. Nelson, D. T. Sharpe, and M. J. Thornton,  $17\beta$ -estradiol regulates the secretion of TGF- $\beta$  by cultured human dermal fibroblasts, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **19**(8), 1097 (2008).
  14. J. B. Schmidt, Perimenopausal influence on skin, hair and appendages. Menopause-Andropause: hormone replacement therapy through the ages; new cognition and therapy concepts, eds. Krause and Pachernegg, 145, Mozart-gasse, Gablitz, Austria, (2001).
  15. S. Gestios, A. G. Huen, and K. J. Green, Working out the strength and flexibility of desmosomes, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**(4), 271 (2004).
  16. S. K. Runswick, M. J. O'Hare, L. Jones, G. H. Streuli, and D. R. Giarrod, Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning, *Nat. Cell Biol.*, **3**(9), 823 (2001).
  17. R. Windoffeer, M. Borchert-Stuhltrager, and R. E. Leube, Desmosomes: interconnective calcium dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover, *J. Cell Sci.*, **115**(8), 1717 (2002).
  18. E. Donetti, M. Bedoni, E. Boschini, C. Dellavia, I. Barajon, and N. Gagliano, Desmocollin 1 and desmocollin 1 expression in human epidermis and keratinizing oral mucosa: a comparative immunohistochemical and molecular study, *Arch. Dermatol. Res.*, **297**(1), 31 (2005).
  19. K. T. Kim, Y. H. Kim, J. G. Kim, C. S. Han, S. H. Park, and B. Y. Lee, Preparation of oligo hyaluronic acid by hydrolysis and its application as a cosmetic ingredient, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **33**(3), 189 (2007).
  20. J. Necas, L. Bartosikova, P. Braunder, and J. Kolar, Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Vet. Med.*, **53**(3), 397 (2008).
  21. P. J. Lee, H. T. Kim, K. S. Yoon, H. C. Park, and H. Y. Ha, The effect of *Astragalus membranaceus* methanol extract on hyaluronic acid production in HaCaT cells, *J. Korean Orient. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.*, **26**(1), 75 (2013).
  22. H. J. Song, H. J. Mu, and S. H. Lee, Effect of Ferulic acid isolated from *Cnidium officinale* on the synthesis of hyaluronic acid, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **39**(4), 281 (2013).
  23. P. Agre, L. S. King, M. Yasui, W. B. Guggino, O. P. Ottersen, Y. Fujiyoshi, A. Engel, and S. Nielsen, Aquaporin water channels—from atomic structure to clinical medicine, *J. Physiol.*, **542**(1), 3 (2002).
  24. M. Hara-Chikuma and A. S. Verkman, Aquaporin-3 function as a glycerol transporter in mammalian skin, *Biol. Cell.*, **97**(7), 479 (2005).
  25. J. H. Lim, Master's Thesis Dissertation, Dong-A Univ., Busan, Korea (2013).
  26. T. Nagai, W. Worawattanateekul, N. Suzuki, T. Nakamura, T. Ito, K. Fujiki, M. Nakao, and T. Yano, Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jellyfish, *Food Chem.*, **70**(2), 205 (2000).
  27. Y. P. Hsiehm, F. M. Leong, and J. Rudloe, Jellyfish as food, *Hydrobiologia.*, **451**(1), 11 (2001).
  28. H. Y. Lee, Y. H. Kim, S. Y. Um, U. S. Jung, M. S. Chang, and N. H. Lee, Melanogenesis inhibition effects of *Nemopilema nomurai* hydrolyzed extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea.*, **40**(4), 341 (2014).
  29. A. Masuda, T. Baba, N. Dohmae, M. Yamamura,

- H. Wada, and K. Ushida, Mucin (qniu mucin), a glycoprotein from jellyfish and determination of its main chain structure, *J. Nat. Prod.*, **70**(7), 1089 (2007).
30. J. F. Ding, Y. Y. Li, J. J. Xu, X. R. Su, X. Gao, and F. P. Yue, Study on effect of jellyfish collagen hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation, *Food hydrocoll.*, **25**(5), 1350 (2011).
31. AOAC, Official methods of analysis 16<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. (1995).
32. Y. G. Ha, Master's Thesis Dissertation, Andong National Univ., Andong, Korea (2010).