

감초추출물(*Glycyrrhiza glabra* Extract)의 피부에서의 DNA 손상 방지효과

신재영[†] · 강내규

LG 생활건강 기술연구원 기반연구소
(2022년 3월 14일 접수, 2022년 3월 22일 수정, 2022년 3월 24일 채택)

Protective Effect of *Glycyrrhiza glabra* Extract on UV-induced Skin DNA Damage

Jae Young Shin[†] and Nae Gyu Kang

LG Household & Health Care (LG H&H) R&D Center, 70, Magokjoongang 10-ro, Gangseo-gu, Seoul 07795, Korea
(Received March 14, 2022; Revised March 22, 2022; Accepted March 24, 2022)

요약: 자외선인 ultraviolet B (UVB)는 피부각질세포의 DNA 잔기에 손상을 준다. 특히, DNA의 pyrimidine 잔기 손상인 cyclobutane pyrimidine dimers (CPD)의 형성은 피부 광노화의 대표적인 지표로 여겨진다. 본 연구에서는 피부 각질세포에서 UVB에 의한 DNA 손상을 완화 시키는 소재로 감초추출물(*Glycyrrhiza glabra* extract, *G. glabra* extract)의 효능을 확인하였다. 먼저 피부각질세포에서 UVB 의존적으로 CPD형성이 증가하는 것을 확인하였다. 이후 감초추출물에 의해 UVB 유발 CPD 형성이 유의하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 추가로 DNA 손상회복 인자의 mRNA 발현이 감초추출물에 의해 증가하는 것도 확인하였다. 결론적으로 본 연구를 통해 감초추출물의 피부각질세포에서의 DNA 보호 효과를 확인할 수 있었다.

Abstract: Ultraviolet B (UVB) damages DNA residues in skin keratinocytes. In particular, the formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPD), a pyrimidine residue damage in DNA, is considered a representative indicator of skin photoaging. In this study, we confirmed defensive effect of *Glycyrrhiza glabra* (*G. glabra*) extract against UVB induced DNA damage. First of all, we confirmed UVB dependent amount of CPD formation in human keratinocyte cell line. UVB induced CPD was decreased by *G. glabra* extract by dose dependent manner. In addition, it was confirmed that the expression of mRNA of DNA damage recovery factors was increased by *G. glabra* extract. Consequently, through this study, it was possible to confirm the DNA protection effect of *G. glabra* extract in skin keratinocytes.

Keywords: ultraviolet B, *Glycyrrhiza glabra*, CPD, DNA damage, DNA repair

1. 서론

UVB는 피부 표피 및 진피 상부까지 영향을 미친다. 특히 주름생성, 탄력감소, 멜라닌생성 등과 같은 피부 광노화 현상과 깊은 연관이 있고, 염증반응, 홍반 등 피부 병변을 유발하기도 한다[1,2]. 세포 또는 분자 수준에서 UVB는 피부각질세포에 DNA 손상을 유발하며, 발생한 DNA 손상은 하위 분자들의 돌연변이를 일으켜 세포 자체의 기능 저

하를 가져온다[3]. 또한, DNA 손상은 UVB에 의한 reactive oxygen species (ROS)에 의해 더욱 가속화되는 경향을 보이며 세포주기 정지, 또는 세포사멸을 일으킨다[4,5].

UVB에 의한 DNA 손상 중 가장 대표적인 것은 cyclobutane pyrimidine dimer (CPD)의 생성이다[6,7]. 이는 DNA상에 pyrimidine의 흡광과장이 UVB (280 ~ 320 nm)의 파장과 일치하여 chromophore로 작용을 함으로써 DNA의 상보적 결합이 깨지게 되는 현상을 말한다[8]. 깨진 pyrimidine기는 인접한 pyrimidine기와 결합을 이루고 이런 DNA 손상은 nucleotide excision repair (NER)에 의해 자연

[†] 주 저자 (e-mail: sjy2811@lghnh.com)
call: 02-6980-1211

적으로 일정 수준 복구가 가능하지만 손상정도가 복구능력을 넘어가거나, 손상이 축적되면 복구가 어려워진다. 특히, 인체가 노화하게 되면 DNA 수선인자의 발현이 줄어들어 DNA 손상이 축적되고, 축적된 CPD는 수선이 되지 못하여 세포는 주기가 정지되거나 자연사멸에 이르게 된다. 그로 인해 피부 구성인자 또한 합성이 저해되어 피부 광노화가 진행된다[9].

감초추출물은 전통적으로 폐질환, 전염성 간염, 기관지염 등에 널리 쓰인 약재이고, 약리적 효능 또한 널리 연구되고 있다. 약 30종의 *Glycyrrhiza*가 재배, 분포되고 있지만, 이중 *G. uralensis*와 *G. glabra* 두 종이 말린 감초 뿌리 약재로 사용되고 있다. 약리적 효능 이외에 *Glycyrrhiza*는 화학적 미백제인 하이드로퀴논의 천연 미백 대체제로 사용되고 있으며, 홍반 감소, 피부 염증 완화, 항산화 효과 등의 효능으로 화장품산업에 많이 이용되고 있다[10-12].

본 연구에서는 UVB에 의한 피부각질세포의 손상이 감초추출물에 의해 어떻게 회복이 되는지를 연구하고자 하였다. UVB에 노출된 피부각질세포는 UVB의 증가에 따라 DNA 손상이 심화 되는 경향을 보였다[13]. 하지만 감초추출물에 의해 피부각질세포에서 DNA 손상이 억제되는 것을 확인하였고, DNA 수선 인자의 발현이 증가 되는 것을 확인함으로써 감초추출물이 자외선에 의한 피부 손상을 방어할 수 있는 소재로의 활용 가능성을 볼 수 있었다.

2. 실험방법

2.1. 감초추출물(*G. glabra* Extract)의 제조

감초추출물은 화코스텍(Korea)에서 제공하는 polyol soluble licorice extract GK 원료를 사용하였다. 추출 방법은 감초 뿌리 부 10 g을 50% butylene glycol 200 g을 가하여 상온에서 5일간 냉침 하였다. 이를 #4 Whatman 여과지에 여과 후 0.45, 0.22 μ m 필터에 순차적으로 여과하여 시험에 사용하였다. 원료는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 고농도로 녹여 사용하였다.

2.2. 인간 유래 피부각질세포주 배양

인간 유래 피부각질세포주(HaCaT) (Addexbio technologies, USA)는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Gibco-BRL, Gaithersburg, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin/streptomycin solution이 첨가된 배양액 조건에서 배양하였다. 0.25% trypsin-EDTA (Invitrogen, USA)를 이용하여 계대 배양을 진행하였다.

2.3. 감초추출물의 독성평가

감초추출물의 HaCaT에서의 독성을 평가하기 위해 cell counting kit-8 (CCK8) assay (Dojindo molecular technologies, USA)를 진행하였다. HaCaT에 감초추출물을 처리 후, 해당 업체에서 제공하는 프로토콜에 따라 CCK8 assay를 실행하였다. Epoch microplate spectrophotometer (BioTelk, USA)를 이용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. UVB 조사

HaCaT의 UVB에 의한 CPD 광독성을 평가하기 위해 UVB를 조사하였다. HaCaT을 35 mm 배양용 플레이트에 2×10^5 cells/well에 깔고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24 h 배양하였다. DMEM에 포함된 phenol red가 UVB 흡수를 할 수 있기때문에, 배양 배지를 제거한 후 phosphate buffered saline (PBS)로 배양용 플레이트를 wash하고 350 μ L의 PBS를 첨가해 세포가 마르지 않을 정도만 잠가게 해 준다. 배양용 플레이트 커버를 제거한 후, Vilber Lourmat사(France)의 Bio-sun UV irradiation system으로 315 nm 파장의 UVB를 20 mJ/cm²로 조사해 준다. UVB 조사가 끝나면 PBS 제거 후, FBS와 항생제가 포함된 DMEM으로 채워 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24 h 배양해 준다.

2.5. CPD (Cyclobutane Pyrimidine Dimer) Assay

UVB에 의한 DNA 손상정도를 평가하기 위해 HaCaT을 사용하여 CPD assay를 진행하였다. HaCaT에 감초추출물을 선처리하고 UVB를 조사하여 QIAamp genomic DNA kits (Qiagen, USA)로 genomic DNA를 정제하였다. 정제한 DNA를 농도를 측정하고 OxiSelect™ UV-induced DNA damage ELISA Kit (Cell Biolabs, STA-322, USA)을 이용하여 DNA 손상 정도를 측정하였다[14].

2.6. Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

감초추출물에 의한 DNA 수선인자의 발현을 조사하기 위해 HaCaT에서 mRNA 분석을 실시하였다. 감초추출물을 선처리 후 UVB 조사하여 RNA easy mini kit (Qiagen, USA)으로 RNA를 분리하여 정량 하였다. 1.0 μ g의 RNA를 GeneAmp® RNA PCR kit (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 역전사(reverse transcription)하였다. 역전사 반응은 Mycycler® PCR 기기(Biorad, USA)를 이용하여 수행하였다. 합성된 cDNA를 Taqman universal master mix (Applied biosystems, USA)와 유전자 특이적인 프라이머를 이용하여 Real-time PCR system (Applied biosystems, USA)으로 발현

을 측정하였다. Real-time PCR에 사용된 프라이머는 GAPDH, XPA, XPC, ERCC1, ERCC4 이다.

2.7. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

UVB에 의한 염증 완화효능을 확인하기 위해 감초추출물을 처리한 HaCaT의 배양액에 존재하는 IL-1β 단백질의 농도를 ELISA 기법으로 확인하였다. Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA (R&D Systems, USA)를 이용하여 단백질 정량을 하였다. Capture antibody를 PBS에 희석하여 immunoplate (SPL, Korea)에 코팅 후, UVB와 감초추출물을 처리한 HaCaT의 배양액을 2 h 동안 반응시켰다. 이후, detection antibody를 처리하고 streptavidin-HRP 반응을 통해 450 nm 파장의 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTelk, USA)에서 흡광을 측정하였다.

2.8 통계적 분석

실험 결과는 평균값과 표준편차로 나타내었고, student's t-test법을 이용하여 p-value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. UVB 의존적 CPD 형성 측정

피부각질세포는 UVB에 의해 DNA 손상을 입으며 CPD를 생성한다. 이에 UVB의 세기 의존적으로 CPD가 생성됨을 확인하기 위해 각각 0, 5, 10, 20, 40 mJ/cm²의 UVB를 조사하였고 세포가 80%이상 생존하는 범위 내에서 CPD를 측정하였다. UVB 의존적으로 CPD 형성이 증가하는 것을 확인하였고, UVB 무처리군에 비해 2 배에서 11 배까지의 CPD가 생성되었다(Figure 1A). 또, UVB 세기에 따른 생존율을 평가하기 위해 UVB를 각각 0, 5, 10, 20, 40 mJ/cm²로 처리를 하였고, 40 mJ/cm²이상부터는 세포 생존율이 80% 이하로 떨어지는 양상이 나타남을 볼 수 있었다(Figure 1B). 세포 생존율이 80%이상 유지되면서 CPD의 발현양상을 볼 수 있는 UVB 조사정도를 20 mJ/cm²로 정해 실험을 진행하였다.

3.2. 세포독성 및 UVB손상 억제효과 평가

UVB에 의한 여러 가지 피부 손상 중 DNA 손상을 원인으로 하는 여러 질병 모델이 활발히 연구 중이다[15]. 특히나, DNA 손상은 8-OHdG, CPD dimer의 형성, gamma H2AX

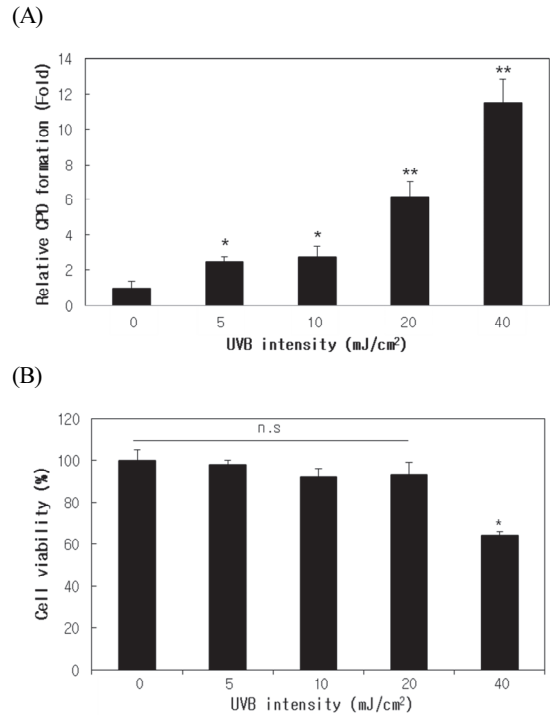


Figure 1. Effect of UVB to HaCaT. (A) Increase of CPD formation in dose-dependent UVB irradiation. (B) Survival rate of HaCaT in dose-dependent UVB irradiation. Each bar in the graph represents mean ± SD.

발현 등 DNA break의 형태에 따라 다양하지만, UVB에 의한 손상 중 가장 대표적인 것은 pyrimidine 잔기의 dimer 형성이다[16]. 감초추출물의 세포독성을 평가하였다. 감초추출물을 0, 1, 4, 10, 20 μg/mL로 처리를 하고 24 h 배양하여 세포독성을 관찰하였다. CCK8 분석을 이용하여 농도별 감초추출물 처리 군과 DMSO 처리 군 대비 세포 생존율을 확인한 결과 10 μg/mL까지 95%이상 세포 생존율을 보이지만, 20 μg/mL부터 60%이하의 세포 생존율을 보임을 확인하였다(Figure 2A). 다음으로 감초추출물의 UVB에 의한 CPD 생성을 억제하는 효과를 확인하기 위해 UVB 조사 전 감초추출물을 FBS와 항생제가 포함된 DMEM 배지에 희석하여 6 h 동안 선처리 하였다. 20 mJ/cm²의 UVB 조사 후 다시 감초추출물을 처리하여 24 h 배양 후 DNA 손상 정도를 확인하였다. UVB 조사에 따른 DNA상의 피리미딘 잔기 dimer 형성 정도를 측정하였고 감초추출물을 1, 4, 10 μg/mL의 농도로 처리하였을 때 미처리군에 비해 각각 45%, 64%, 77%의 CPD 생성억제 효능을 보였다(Figure 2B).

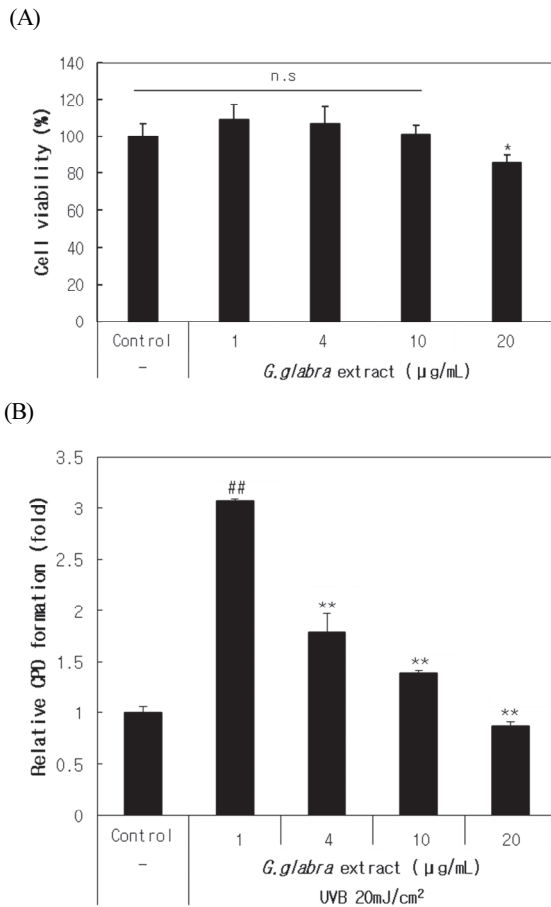


Figure 2. CPD induction by UVB irritation and suppression by treating *G. glabra* extract. (A) Cytotoxicity of *G. glabra* extract to HaCaT in dose dependent manner. (B) DNA damage prevention effect of *G. glabra* extract was pretreated before 20 mJ/cm² of UVB exposure to HaCaT. DNA damage was evaluated by measuring CPD formation. Each bar in the graph represents mean ± SD.

3.3. 감초추출물의 UVB 유발 염증 완화 효능

UVB에 의한 DNA 손상 후, 피부에는 염증반응 또한 동반된다. 감초추출물의 피부각질세포 DNA 손상 억제효능이 피부 염증반응도 억제할 수 있을지 확인해보았다. 피부각질세포에 20 mJ/cm²의 UVB 조사 전 6 h, 조사 후 24 h 감초추출물을 1, 4, 10 µg/mL 처리하여 IL-1β의 발현 정도를 확인하였다. UVB의 조사 없이는 피부각질세포의 IL-1β의 발현은 변하지 않았으나, UVB 조사에 따라 미조사시의 7배 IL-1β분비가 늘어나는 경향은 확인하였다. 감초추출물의 1, 4, 10 µg/mL 처리에 따라 각각 34%, 49%, 73%의 IL-1β분비 억제가 됨을 확인하였다(Figure 3). UVB에 의한

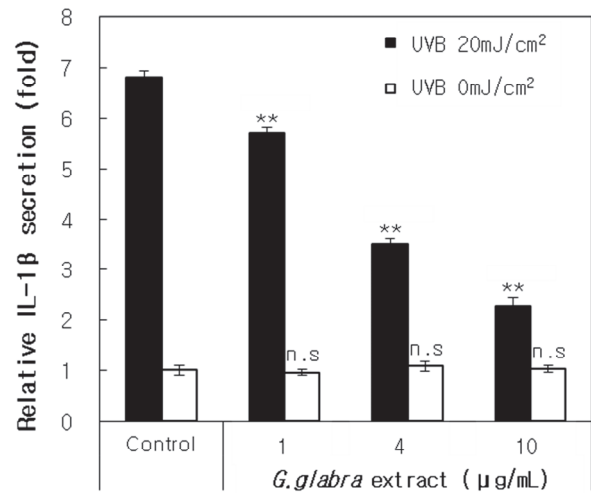


Figure 3. Decrement of inflammatory cytokine by *G. glabra* extract treatment. UVB induced IL-1β level was significantly decreased by dose dependent manner. Each bar in the graph represents mean ± SD.

피부각질세포의 DNA 손상과 이에 따른 염증반응까지 감초추출물이 억제해 주는 것을 확인하였다.

3.4. DNA 수선 인자 발현증가 평가

감초추출물의 DNA 손상 억제 및 염증 완화 효능에 대해 DNA 수선 인자 발현 조절 여부를 확인하였다. CPD의 수선을 담당하는 NER pathway 관여 인자들의 발현양상을 통해 UVB에 대한 DNA 손상회복을 확인하였다[17]. NER pathway에 관여하는 DNA 수선 인자들 중 XPA, XPC는 DNA 손상 초기 손상 부위를 인지하는 역할을 담당하고, ERCC1, ERCC4는 각각 3', 5'에서 특정 구조에 대한 제한 효소의 역할을 담당한다[18]. UVB 조사 전 6 h, 조사 후 24 h 감초추출물을 처리하여 DNA 수선 인자인 XPA, XPC, ERCC1, ERCC4의 mRNA 발현을 측정하였다. XPA, XPC의 mRNA의 발현은 1, 4, 10 µg/mL 농도에 따라 1.5 배에서 2.5 배까지 농도 의존적으로 발현양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. ERCC1, ERCC4의 발현은 각각 2 배, 1.4 배까지 농도 의존적으로 발현양이 증가하는 것을 확인하였다(Figure 4). 이로 미루어 보아 NER 과정에서 최초 DNA 손상 인자를 담당하는 XPA, XPC의 발현을 촉진 시킴으로써 손상 초기 손상인자의 역할을 향상시키고 이들과 함께 작용하는 endonuclease ERCC1, ERCC4의 활성도 증가시킴을 확인하였다.

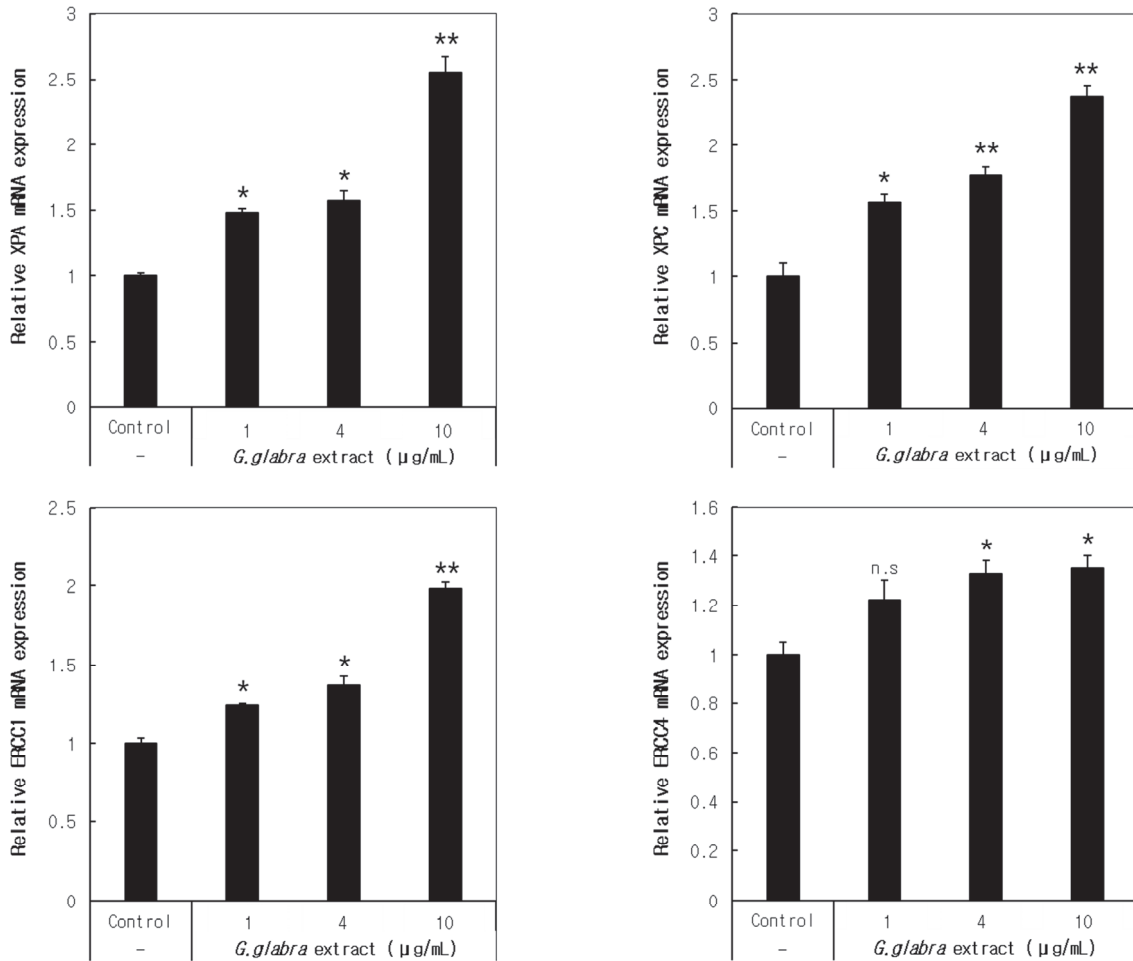


Figure 4. Relative mRNA expression of NER DNA damage repair factors. *G. glabra* extract was pretreated before 20 mJ/cm² of UVB exposure to HaCaT. Relative mRNA expression of XPA, XPC, ERCC1, ERCC4 were measured by RT-qPCR. Each bar in the graph represents mean ± SD.

4. 결 론

본 연구에서는 미백 소재인 감초추출물의 피부각질세포에서 UVB에 의한 DNA 손상방지 효과를 확인하였다. 피부각질세포에 감초추출물을 UVB 조사 전처리를 하였을 때, DNA 손상방지 효과가 있는 것으로 나타났고, 또 UVB에 의한 DNA 손상을 NER 수선 인자의 발현을 증가시킴으로써 회복시키는 것으로 확인하였다. 결과적으로 감초추출물은 자외선에 의한 피부각질세포의 DNA 손상을 방지해 주고, DNA 수선 인자의 발현을 늘려서 손상된 DNA의 회복을 유도하는 것으로 보인다. 미백, 항염 등의 효능이 이미 연구된 바 있지만, 추가적인 연구를 통해 UVB 이외

에도 많은 외인성 노화 인자들에 대한 감초추출물의 효능을 확인하고, 미백 소재로서 피부에서의 방어 메커니즘을 심화 연구하여, 노화 방지 소재로서의 연구 및 적용을 진행할 것이다.

References

1. C. Nishigori, D. B. Yarosh, S. E. Ullrich, A. A. Vink, C. D. Bucana, L. Roza, and M. L. Kripke, Evidence that DNA damage triggers interleukin 10 cytokine production in UV-irradiated murine keratinocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **93**(19), 10354 (1996).

2. E. Sage, Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context, *Photochem Photobiol*, **57**(1), 163(1993).
3. G. T. Bowden, Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling, *Nature Reviews Cancer*, **4**(1), 23 (2004).
4. M. Hochberg, R. Kohen, and C. D. Enk, Role of antioxidants in prevention of pyrimidine dimer formation in UVB irradiated human HaCaT keratinocytes, *Biomed Pharmacother.*, **60**(5), 233 (2006).
5. N. S. Jenny, Inflammation in aging: cause, effect, or both?, *Discovery Medicine*, **13**(73), 451 (2012).
6. I. M. Hadshiew, M. S. Eller, and B. Gilchrist, Skin aging and photoaging: the role of DNA damage and repair, *Am J Contact Dermat.*, **11**(1), 19 (2000).
7. S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, and T. Douki, Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation, *PNAS*, **103**(37), 13765 (2006).
8. R. E. Watson, N. K. Gibbs, C. E. Griffiths, and M. J. Sherratt, Damage to skin extracellular matrix induced by UV exposure, *Antioxid Redox Signal*, **21**(7), 1063 (2013).
9. S. Lavasani, G. Henriksson, M. Brant, A. Henriksson, M. Radulic, R. Manthorpe, and A. Bredberg, Abnormal DNA damage-inducible protein in cells from Sjogren's syndrome patients, *Journal of Autoimmunity*, **11**(4), 363 (1998).
10. Q. Afnan, M. D. Adil, A. Nissar-Ul, A. R. Rafiq, H. F. Amir, P. Kaiser, V. K. Gupta, R. Vishwakarma, and S. A. Tasduq, Glycyrrhizic acid (GA), a triterpenoid saponin glycoside alleviates ultraviolet-B irradiation-induced photoaging in human dermal fibroblasts, *Phytomedicine*, **19**(7), 658 (1998).
11. S. Franceschelli, M. Pesce, I. Vinciguerra, A. Ferrone, G. Riccioni, P. Antonia, A. Grilli, M. Felaco, and L. Speranza, Licocalchone-C extracted from *Glycyrrhiza glabra* inhibits lipopolysaccharide-interferon- γ inflammation by improving antioxidant conditions and regulating inducible nitric oxide synthase expression, *Molecules*, **16**(7), 5720 (2011).
12. V. K. Gupta, A. Fatima, U. Faridi, A. S. Negi, K. Shanker, J.K. Kumar, N. Rahuja, S. Luqman, B. S. Sisodia, D. Saikia, M. P. Darokar, and S. P. S. Khanuja, Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots, *Journal of ethnopharmacology*, **116**(2), 377 (2008).
13. G. P. Pfeifer and A. Besaratinia, UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer, *Photochem Photobiol Sci.*, **11**(1), 90 (2011).
14. T. Hasegawa, S. Shimada, H. Ishida, and M. Nakashima, Chafuroside B, an Oolong tea polyphenol, ameliorates UVB-induced DNA damage and generation of photo-immunosuppression related mediators in human keratinocytes, *PLOS one.*, **8**(10), e77308 (2013).
15. F. R. de Gruijl, H. J. van Kranen, and L. H. F. Mullenders, UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **63**(1), 19 (2001).
16. K. S. Oh, M. Bustin, S. J. Mazur, E. Appella, and K. H. Kraemer, UV-induced histone H2AX phosphorylation and DNA damage related proteins accumulate and persist in nucleotide excision repair-deficient XP-B cells, *DNA Repair (Amst)*, **10**(1), 5 (2011).
17. L. Li, X. Lu, C. A. Peterson, and R. J. Legerski, An interaction between the DNA repair factor XPA and replication protein A appears essential for nucleotide excision repair, *Molecular and cellular biology.*, **15**(10), 5396 (1995).
18. J. A. Marteijn, H. Lans, W. Vermeulen, and J. H. J. Hoeijmakers, Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **15**(7), 465 (2014).