

'제5회 삼양 이건(以建) 학술연구 지원' 최종보고서

● 기본정보

연구 과제명		식품 소재를 이용한 피부 개선 물질 발굴 기초연구		
연구 책임자	학교명	부산대학교	학과 / 학년	생명환경화학과/ 4학년
	성명	신미송		
연구기간		2022.07.08. ~ 2022.12.07		

● 연구 개요

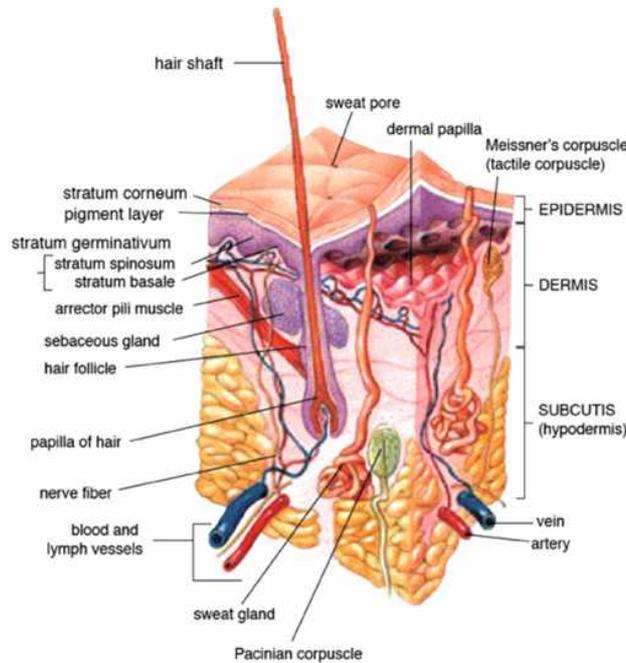
번호	구분	세부 내용
1	• 피부세포주 자료 수집 및 스트레스 선별	• 표피층 구성세포, 진피층 구성세포 자료 수집 • 세포 스트레스 유발 물질인 UV, H ₂ O ₂ 작용기전 자료 수집을 통해 H ₂ O ₂ 를 stress inducer로 선택
2	• 세포 배양조건 확립	• 적합한 세포주로 HaCaT을 선별 • DMEM, FBS 기반 배양조건 확립 및 세포 밀도에 따른 배양조건 확립
3	• 단백질 발현량 측정을 위한 immunoblotting condition 구축	• 기반연구 조건 확립 - CSP3 activation 조건 확립 - MAPKs (P-ERK, P-JNK, P-38) activation 조건 확립 - NFκB & p53 activation 조건 확립
4	• 생물자원소재 선별 및 cell viability 평가	• 생물자원소재 확보뒤 screening 진행 완료 • 1차 후보물질 8종이 선정됨 • 추가적인 실험을 통해 2차 후보물질 1종 도출함 • 도출된 1종의 후보물질에 대한 신호전달계 단백질 분석 및 세포사멸에 대한 저항성 확인

● 연구 수행 세부내역

1. 상세 연구 내용

I. 다양한 피부 세포주에 대한 조사를 통해, 외부환경 변화에 따른 피부 손상 예방에 적합한 피부 세포주를 선별함.

• 신체에서 가장 큰 면역기관인 피부는 1차 방어조직이자 가장 큰 단면적을 지닌 기관으로서 생물학적, 물리적, 화학적 방법으로 유해한 환경으로부터 신체를 보호하고 있음. 인간의 피부 구조는 크게 3가지로 나뉘보자면 표피층, 진피층, 피하지방층으로 이루어져 있음.



▲ 그림 1

• 표피층 구성세포

1) Langerhans cell(LC) : 표피층에 존재하며 항원제시세포(antigen presenting cell; APC)로서 dendritic cell(DC)에 속함. 항원을 포획하여 T 세포에 제시하여 면역반응을 유도하고, IL-1 β 를 분비함.

2) Keratinocytes cell line : Keratinocyte는 각질세포 또는 각질형성세포로서, 표피 세포(epidermis cell)의 95%를 차지하며 각질을 형성함. 이는 세포외기질의 구성, 분화, 성장, 염증, 항균 방어 등과 피부의 기능에 중요한 역할을 함. Keratinocyte cell은 화학물질, 물리적 외상, 미생물과 같은 스트레스 유발인자의 자극 후에 tumornecrosis factor(TNF)- α 과 IL-1 같은 전염증성 물질을 분비하고 표면항원의 발현을 증가시킴으로써 다른 면역세포와의 상호작용으로 피부 면역계를 형성함.

• 진피층 구성 세포

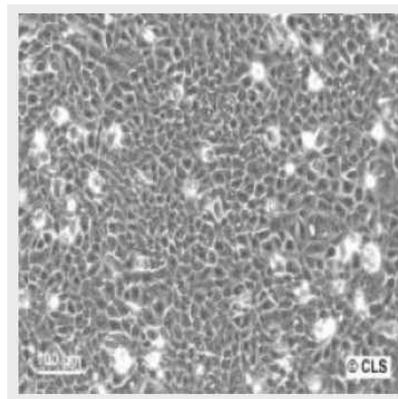
1) 진피층에 존재하며 신경펩타이드 등의 자극에 의해 다양한 mediator를 분비, high-affinity IgE receptor 발현하여 IgE 매개성 알러지 반응을 유발하는 Dermal Mast cells.

2) 표피층에 존재하는 Langerhans cell(LC)처럼 림프절로 이동하여 신체의 면역 활성을 유도하고, class II MHC 발현, 혈관 주변에 위치하면서 혈액에 존재하는 면역세포들 이동 및 활성을 초래하는 Dermal Dendritic cells.

3) 진피층의 주요 세포로서 각질형성세포와 연합해 cytokine network를 형성하는 Dermal Fibroblasts(섬유아세포)

피부의 구성 세포에 대한 문헌 조사 결과, 외부환경 변화에 따른 피부손상 예방을 위한 기능성 식품소재 발굴의 관점에서 다양한 생리적 및 환경적 스트레스에 자주 노출되어있는 Keratinocytes cell이 중요하다고 판단되었음. 따라서 외부환경 변화에 따른 피부 손상 예방에 적합한 피부 세포는 Keratinocytes cell로서 각질형성세포주인 HaCaT cell line으로 선별하였음.

< HaCaT 세포주 형태 >



▲ 그림 2

출처 : <https://www.selectscience.net/products/hacat/?prodID=225877>

HaCaT cell	Human, Adult, low Calcium, High Temperature
Organism	Keratinocyte
Phenotype	Adherent
Origin	Epithelial keratinocyte

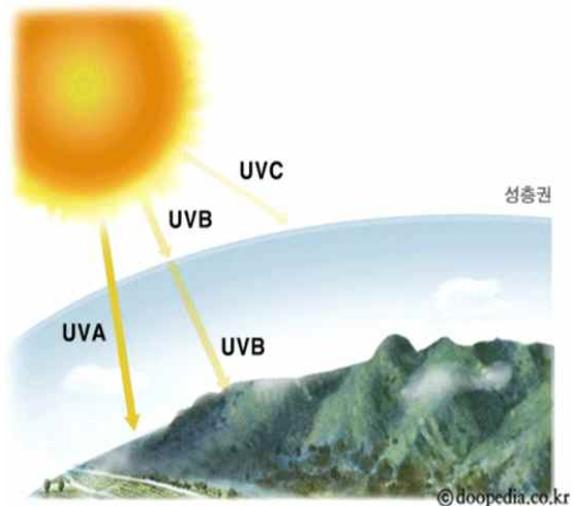
II. 적합한 피부 세포주를 기반으로 외부환경 변화에 따른 스트레스 선별

1) UV (Ultra Violet)

- 태양의 자외선(UV)은 파장에 따라서 UVC(λ 100~290nm), UVB (λ 290~320nm), 그리고 UVA(λ 320~400nm)로 구분됨. UVC는 지구의 오존층에 의해서 거의 완전하게 흡수되는데 비해서, UVA와 UVB는 피부에 해로운 손상을 줄 수 있을 정도로 지구 지표면에 도달함.

- 지표면에 도달하는 자외선의 90~99%는 UVA이고, 1~10%가 UVB임. UVA는 UVB보다 덜 해롭지만 긴 파장을 갖고 있기에 피부 깊숙한 진피층까지 침투하여 섬유아세포와 콜라겐에 손상을 주어 피부 노화를 유발함. UVB는 진피 상부와 각질층에 더 많은 손상을 주기 때문에 피부암, 피부 홍반, 일광화상을 유발함. 신체에 대한 영향은 UVA보다 UVB가 1,000배나 크기 때문에 UVB가 인체에 해로운 영향을 주는 주요요인임.

자외선의 종류



▲ 그림 3

- UV는 반응성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하기 때문에 지질과 핵산, 단백질에 광산화 손상을 일으킴. UV 자극으로 인해 유발된 염증반응은 피부 노화에도 관련됨. 피부 최외각에 존재한 각질형성세포는 외부 스트레스를 받으면 여러 가지 cytokine을 생성하게 되며, 시냅스를 통한 전달로 주위 각질세포에서도 cytokine을 생성함. 이로 인한 ROS의 증가는 세포핵에 위치한 active transcription factor인 AP-1을 자극하여 진피와 표피에서의 collagen 분해효소인 MMPs(Matrix Metallo proteinase)의 발현을 촉진하고 진피 세포인 fibroblast의 collagen 유전자 발현을 방해하여 피부 내 탄력을 저하시키고 주름이 생성되면서 피부 노화를 야기함. 결국 피부세포는 UV로부터 지속적인 노출은 피부에서의 염증반응과 노화를 가속화하기 때문에 유해 파장으로부터 세포를 보호할 필요성이 있음.

2) H₂O₂

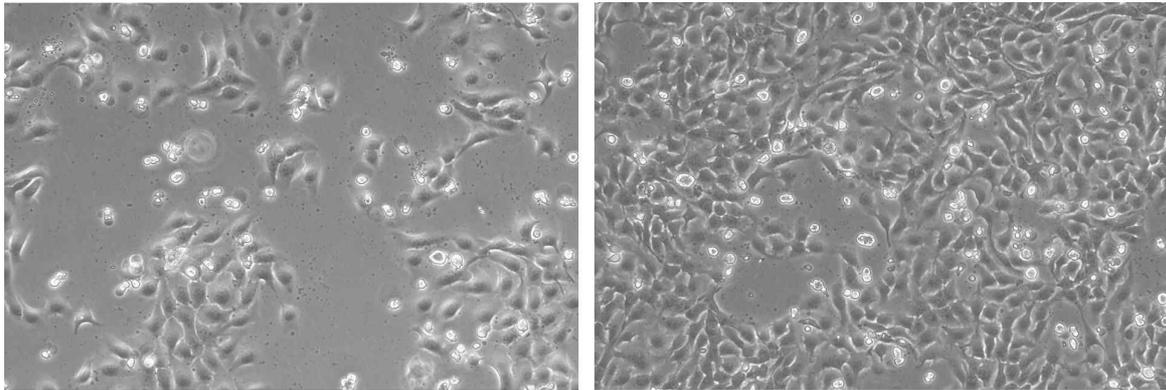
- H₂O₂는 활성산소종의 하나로 세포의 생장과 소멸, 노화 등을 결정짓는 중요한 요소임. 활성산소란 자유라디칼(free radicals)을 포함한 생체내의 불안정한 산소를 지칭함. 이러한 활성산소는 불안정하기에 강하게 활성화하여 주위의 물질과 매우 강하게 반응하기 때문에 UV와 같은 외부자극요인의 지속적 피부 노출은 H₂O₂와 같은 활성산소의 지나친 생성으로 세포 손상을 일으키고 더 나아가 유전자와 단백질 구조를 변화시켜 피부 노화를 가속화 함.

- H₂O₂는 세포와 조직 안팎으로 자유롭게 확산되며 주로 피부의 표피층에 축적되기 때문에 산화 스트레스 모델에 사용되는 가장 일반적인 산화제 중 하나임. 세포 내 H₂O₂ 수준의 증가는 다양한 산화 촉진 반응으로 인해 ROS를 과도하게 증폭 생성하게 되고 각질세포에 산화적 스트레스를 심화하여 세포막의 구조를 파괴하고 핵산, 단백질과 같은 생체 분자들의 손상을 유발함. 이는 세포 손상 및 사멸을 유도하는 결과를 초래함.

- 피부각질세포를 포함한 대부분의 세포에서 ROS의 축적에 의한 미토콘드리아 기능 장애와 관련된 DNA 손상이 세포자멸사를 유도하는 것으로 보고되고 있음. 이와 같은 문헌조사 결과를 바탕으로 세포 내 산화 방어 시스템은 산화 스트레스와 관련된 질병의 예방 및 치료에 필수적이라 할 수 있음. 따라서, 본 연구에서는 H₂O₂를 스트레스 물질로 선정을 하여 산화 스트레스를 유도한 HaCaT 세포 손상 모델에서 식품자원소재의 발굴 및 항산화 활성을 통한 세포보호 효과를 나타내는지 살펴보고자 함.

III. 적합한 피부 세포주로 선정된 HaCaT cell culture

• 인간 epithelial keratinocyte인 HaCaT 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% 항생제(50 g/ml streptomycin과 50 U/ml penicillin)가 첨가된 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)으로 37 C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였음. 2 ~ 3일에 한 번씩 배양함과 동시에 배양액을 교체해주었음. 모든 실험과정에서 세포는 80~90%의 confluence 범위에 도달하도록 배양하여 사용함.



<low density>

<high density>

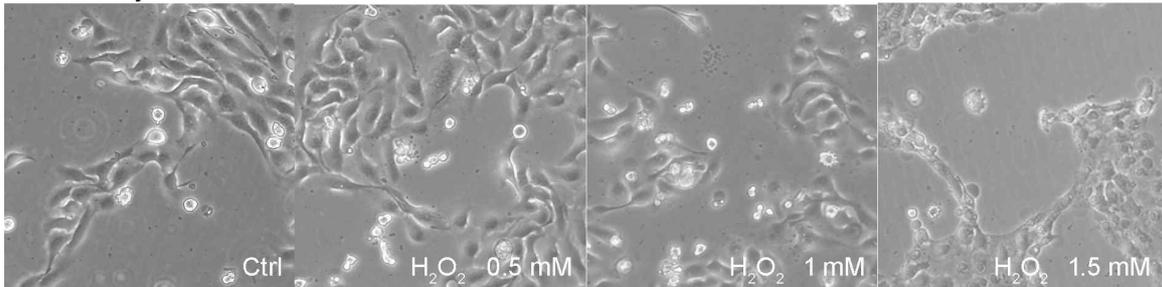
▲ 그림 4

• 세포 증식에 따른 과밀도 현상을 해결하기 위해 2~3일마다 1:2~1:4로 계대배양하였음. 계대배양시 media 제거 후, Phosphate-buffered saline (PBS)로 세척 후 0.25% trypsin- ethylene-EDTA를 이용하여 세포를 배양접시에서 분리하여 계대배양을 진행함.

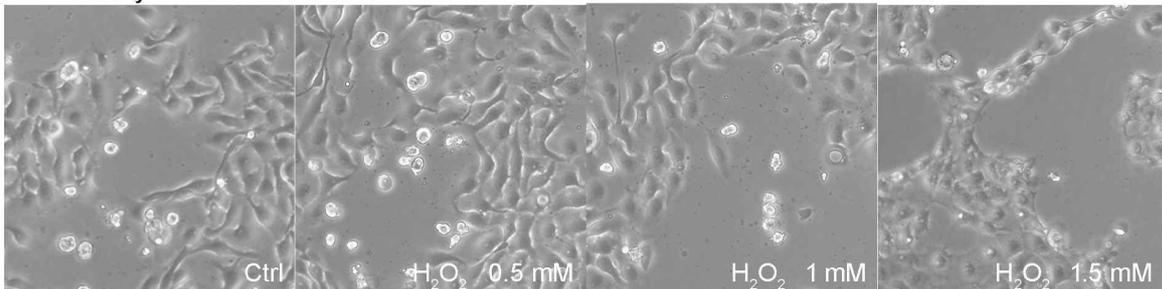
IV. morphological assay를 통한 세포 형태 분석

• 계대배양한 HaCaT cell (인간각질형성세포)을 이용하여 다양한 밀도군 (25, 50, 100%)으로 세포를 부착한 후, 스트레스 물질로 선정된 과산화수소(hydrogen peroxide: H_2O_2)를 다양한 농도 (0.5, 1, 1.5 mM)별로 처리하고 12시간 동안 배양한 결과를 morphological assay를 통한 세포 형태 분석을 진행함.

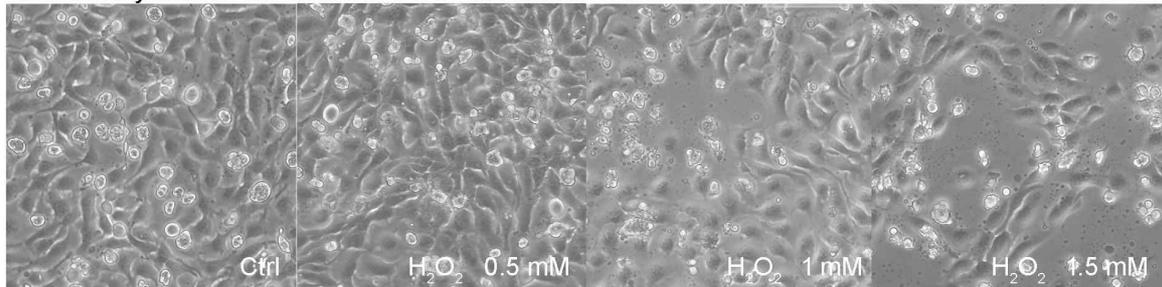
Cell density : 25%



Cell density : 50%



Cell density : 100%

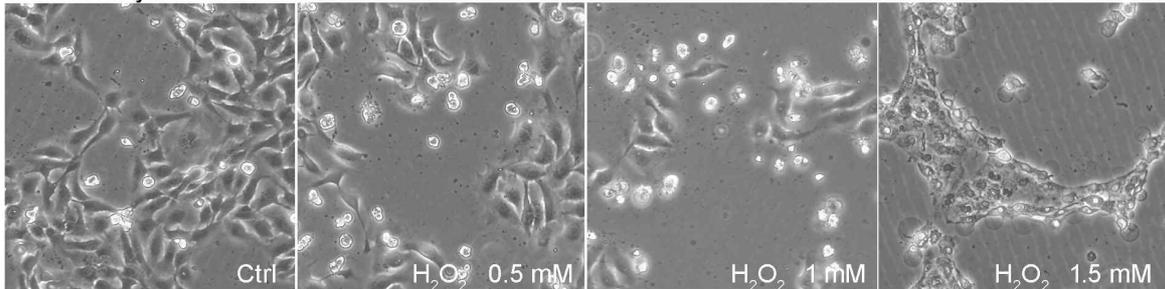


▲ 그림 5

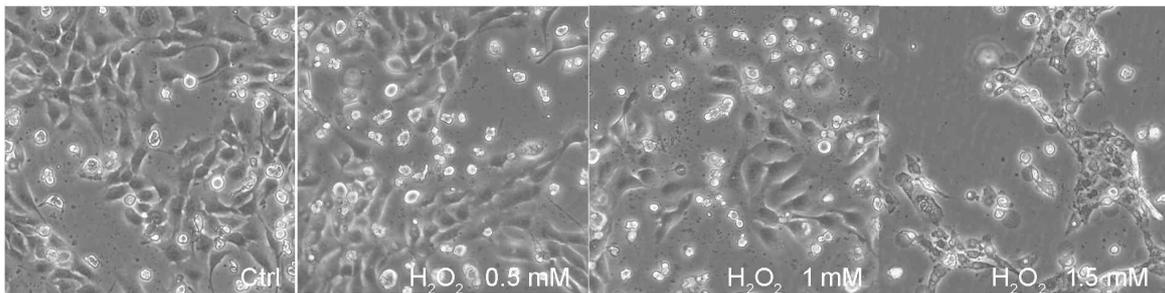
• H_2O_2 0.5mM, 1mM, 1.5mM 농도를 처리한 후 12시간 동안 배양한 HaCaT cell의 현미경 이미지를 보면, cell density 25%군에서 세포사의 표현형을 H_2O_2 1mM와 1.5mM에서 관찰할 수 있었음. cell density 50%군에서도 control에 비해 H_2O_2 1mM와 1.5mM에서 세포사의 표현형이 관찰되었음. 또한, cell density 100%군에서도 H_2O_2 1mM와 1.5mM에서 세포사의 표현형을 확인할 수 있었음. cell density 차이가 동일하게 H_2O_2 0.5mM에서는 cell stress를 받지 않음을 확인할 수 있었지만, 세포 밀도의 차이로 인해 cell density 25%와 100%군에서 H_2O_2 1mM와 1.5mM에서 세포사의 표현형의 정도의 차이는 존재하였음. 이에 따라, 인간 각질형성세포 HaCaT cell에서 H_2O_2 에 의한 스트레스는 세포 밀도가 영향을 끼친다는 것을 알 수 있음.

• 계대배양한 HaCaT cell (인간각질형성세포)을 이용하여 다양한 밀도군 (25, 50, 100%)으로 세포를 부착한 후, 스트레스 물질로 선정된 과산화수소(hydrogen peroxide: H_2O_2)를 다양한 농도 (0.5, 1, 1.5 mM)별로 처리하고 24시간 동안 배양한 결과를 morphological assay를 통한 세포 형태 분석을 진행함.

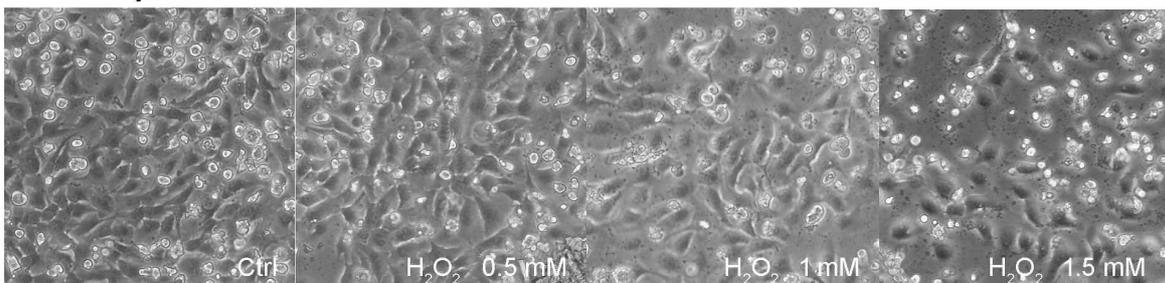
Cell density : 25%



Cell density : 50%



Cell density : 100%



▲ 그림 6

• H_2O_2 0.5mM, 1mM, 1.5mM 농도를 처리한 후 24시간 동안 배양한 인간 keratinocyte HaCaT cell의 현미경 이미지를 보면, cell density 25%군에서 세포사의 표현형을 H_2O_2 1mM와 1.5mM에서 관찰할 수 있었음. cell density 50%군에서도 control에 비해 H_2O_2 1mM와 1.5mM에서 세포사의 표현형이 관찰되었음. 또한, cell density 100%군에서도 H_2O_2 1mM와 1.5mM에서 세포사의 표현형을 확인할 수 있었음. cell density에 차이 없이 동일하게 H_2O_2 0.5mM에서는 cell stress를 받지 않음을 확인할 수 있었음. 하지만 24hr 세포 배양 시 12hr 세포배양보다 stress 받은 정도가 더 많은 것으로 보임. 이에 따라, 인간 각질형성세포 HaCaT cell에서 H_2O_2 에 의한 스트레스는 세포배양 시간에 영향받는 것을 알 수 있음.

V. *in vitro* 실험 효과 평가 및 apoptosis condition 구축

- 인간각질형성세포 HaCaT cell에서 세포 밀도와 H₂O₂의 농도, 스트레스 물질 처리 후 배양시간이 세포사멸에 중요하다는 것을 확인하였음. HaCaT 세포에서 세포 밀도에 따른 H₂O₂유도 apoptosis의 조건 최적화, HaCaT 세포에서 배양시간에 따른 H₂O₂유도 apoptosis의 조건 최적화 등의 실험을 진행하여 실험 결과를 바탕으로 외부 스트레스에 유도된 피부세포 모델에서 *in vitro* 실험을 진행하기 위해 세포 배양 조건 확립함.

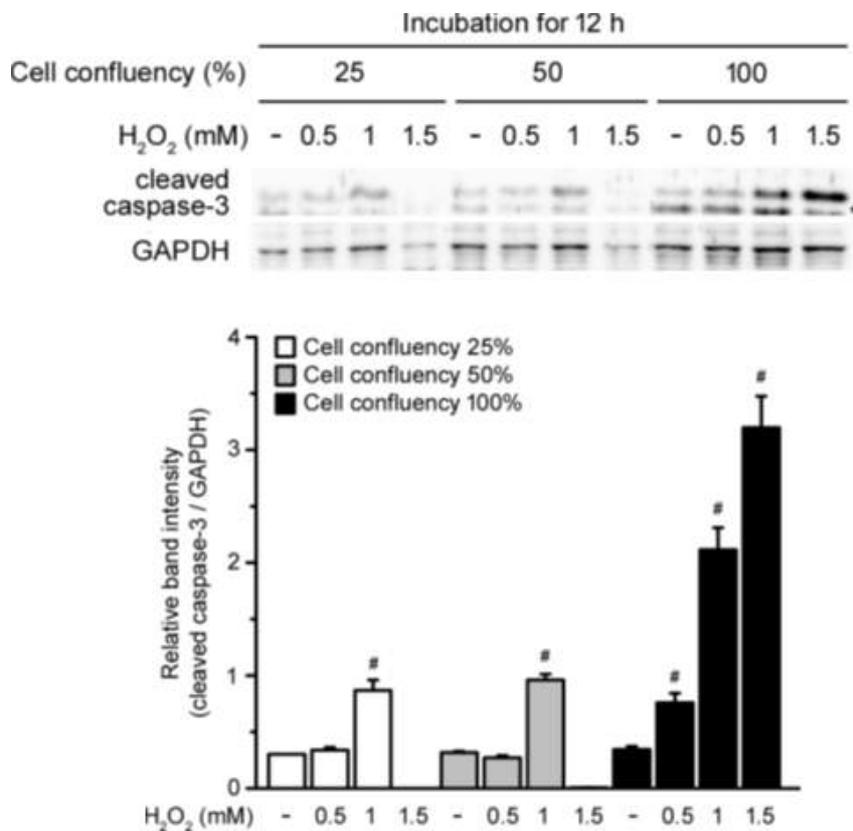
- 면역발색법 (Immunoblotting, Western blot analysis)

Total cell lysate는 Protease inhibitor를 포함한 radioimmunoprecipitation assay(RIPA) buffer (50mM Tris-HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% sodium orthovanadate, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS)로 추출함. Bradford assay로 단백질 정량한 다음 동량의 sample buffer와 혼합하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)을 이용하여 전기영동을 실시하였음. 분리된 단백질을 Nitrocellulose(NC) membrane에 옮긴 후 membrane을 3% Bovine serum albumin (BSA)를 포함한 Tris-buffered saline (TBS)로 상온에서 1시간 blocking하였음. 각각의 specific primary antibody를 처리하고 4 °C에서 overnight 반응시켰음. 이후 TBS-T로 세척 후 Horseradish peroxidase(HRP)가 결합되어 있는 2차 항체와 상온에서 1시간 반응시키고 세척 후, chemiluminescence detection kit로 band를 검출하였음.

- 계대배양한 HaCaT cell (인간각질형성세포)를 이용하여, 다양한 밀도군(25, 50, 100%)으로 세포를 부착한 후, 스트레스 물질로 선정한 과산화수소(hydrogen peroxide: H₂O₂)를 다양한 농도 (0.5, 1, 1.5 mM)별로 처리하고 12시간과 24시간으로 배양한 결과를 western blot analysis를 통해 apoptosis marker인 Cleaved caspase-3의 배양 조건 확립을 진행함.

VI. HaCaT 세포에서 H₂O₂ 처리 시간별, 농도별 세포 밀도에 따른 유도 apoptosis의 조건 최적화

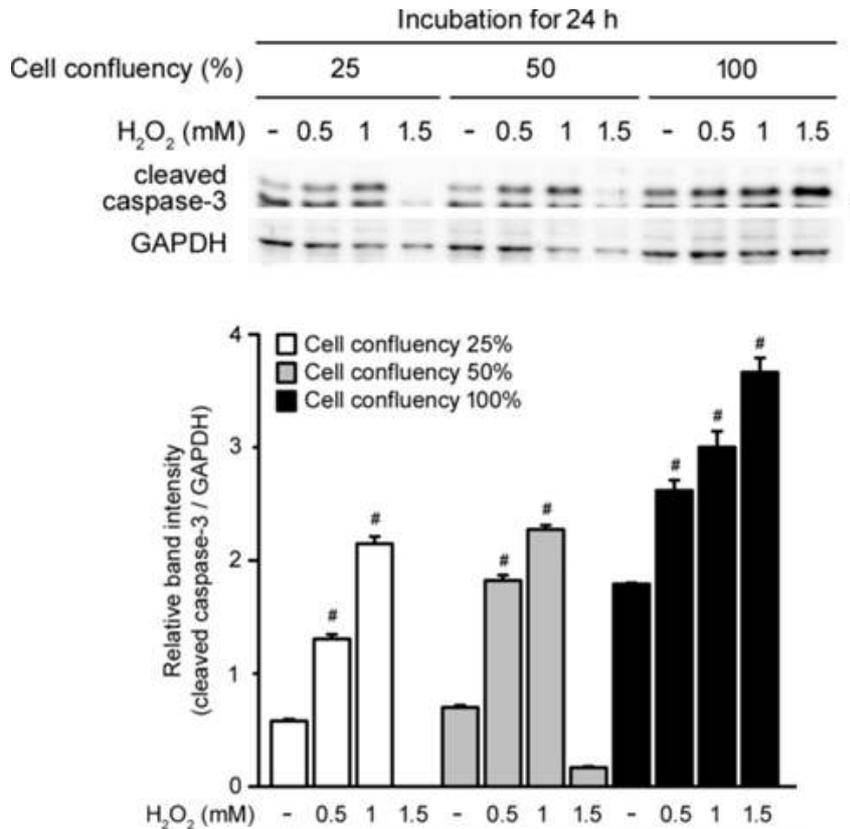
• 계대배양한 HaCaT cell(인간각질형성세포)을 이용하여, 다양한 밀도군인 25%, 50%, 100%로 세포를 부착하여 24시간 배양 후 H₂O₂ 농도를 각각 500uM, 1mM, 1.5mM 농도로 12시간 처리하여 확인하였음. 그 결과, apoptosis marker로서 사용되는 Cleaved caspase-3의 활성화 여부를 분석하고자 특정 단백질의 항체를 이용한 western blot analysis를 이용하여 실험을 진행하였음.



▲ 그림 7

• H₂O₂ 0.5mM, 1mM, 1.5mM 농도를 처리한 후 12시간 동안 배양한 HaCaT cell의 western blot analysis (그림7)에 따르면, cell density 25%군과 50%군에서 Cleaved caspase-3 band를 보면 control에 비해 H₂O₂ 1mM의 발현량이 증가하였음을 확인할 수 있음. 그에 반해 H₂O₂ 1.5mM에서는 세포사멸이 많이 진행되어 cell degradation이 발생한 것을 확인하여 cleaved caspase-3 band를 관찰할 수 없었음. 하지만 cell density 100%군에서는 cleaved caspase-3 band가 control에 비해 H₂O₂ 1mM, H₂O₂ 1.5mM에서 발현량이 증가한 것으로 확인하였음. 이에 따라, HaCaT cell (인간각질형성세포)에서 H₂O₂에 의한 스트레스와 세포사멸은 cell density가 영향을 미친다는 것을 알 수 있음.

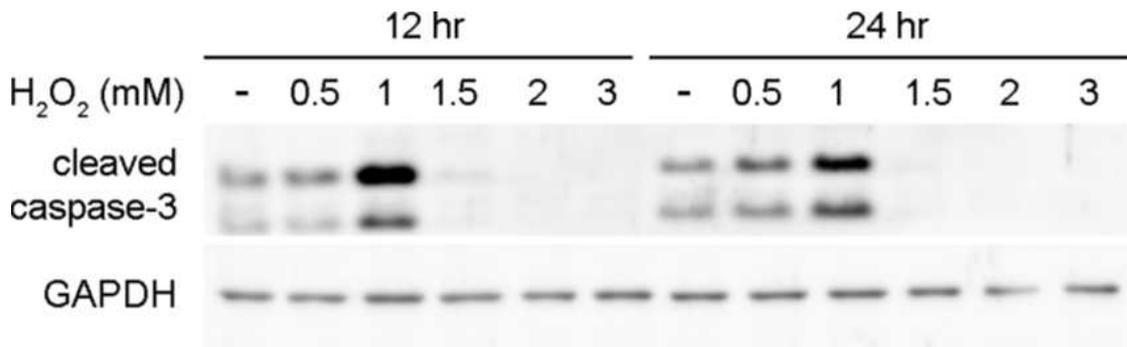
• 계대배양한 HaCaT cell(인간각질형성세포)을 이용하여, 다양한 밀도군인 25%, 50%, 100%로 세포를 부착하여 24시간 배양 후 H₂O₂ 농도를 각각 500uM, 1mM, 1.5mM 농도로 24시간 처리하여 확인하였음. 그 결과, apoptosis marker로서 사용되는 Cleaved caspase-3의 활성화 여부를 분석하고자 특정 단백질의 항체를 이용한 western blot analysis를 이용하여 실험을 진행하였음.



▲ 그림 8

• H₂O₂ 0.5mM, 1mM, 1.5mM 농도를 처리한 후 24시간 동안 배양한 HaCaT cell의 western blot analysis(그림8)에 따르면, 12시간 처리한 western blot 결과(그림7)와 동일하게 cell density 25%, 50%에서 control에 비해 H₂O₂ 500uM, 1mM에서 cleaved caspase-3 발현량이 증가하였음. 하지만 12시간 처리한 western blot 결과에 비해 24시간 처리했을 때, cleaved caspase-3에서 control에 비해 H₂O₂ 1mM의 발현량이 더 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 또한 cell density 100%군에서는 배양 시간(incubation time)에 차이 없이 control과 H₂O₂ 1mM, 1.5mM에서 cleaved caspase-3의 활성화를 관찰할 수 있음. 이에 따라 HaCaT cell (인간각질형성세포)에서 H₂O₂에 의한 스트레스와 세포사멸은 cell density뿐만 아니라 배양시간(incubation time)이 영향을 미친다는 것을 알 수 있음. 따라서, 실험에 사용될 적절한 cell confluency는 80%가 적당한 것으로 설정하였음.

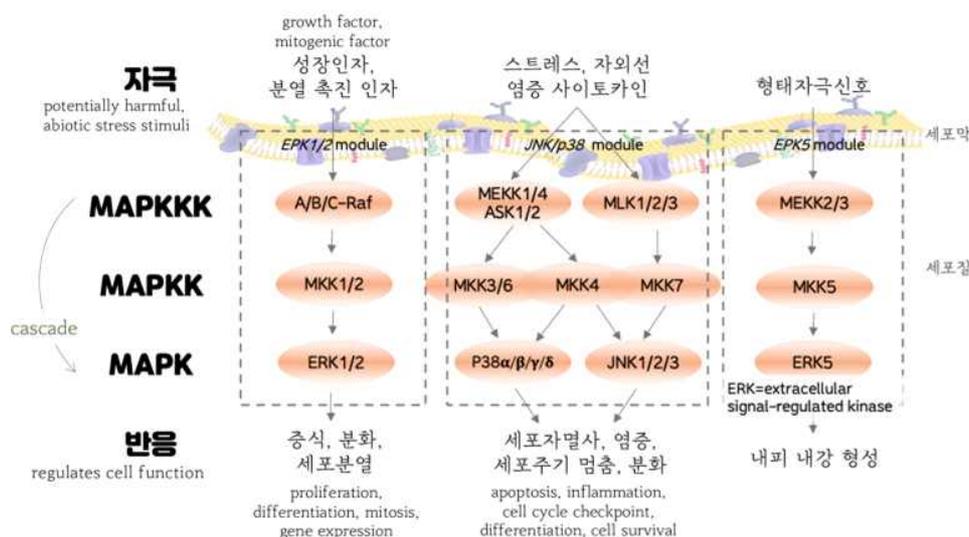
• 위 실험 결과를 바탕으로 HaCaT cell에서 H₂O₂를 처리한 뒤 induction되어 apoptosis marker인 cleaved caspase-3 발현량을 알 수 있는 조건으로는 H₂O₂ 1mM 농도로 12시간 처리한 후 sampling하는 것으로 설정하였음.



▲ 그림 9

HaCaT cell (인간각질형성세포)에서 H₂O₂ 적정처리 농도와 배양시간(incubation time) 별 스트레스 확립을 비교분석 및 결과확인을 위해 H₂O₂ 농도별, 처리시간별, cell density 별로 실험을 진행하였음. 실험 결과 H₂O₂ 1.5mM 이상의 H₂O₂ 농도와 12시간 이상의 처리시간은 세포에 과도한 스트레스를 줄 수 있음을 확인하였음. 따라서 H₂O₂에 의한 세포사멸을 일으키지 않으면서, H₂O₂가 적당량의 세포 손상을 줄 수 있는 농도는 H₂O₂ 1mM로 도출할 수 있었음.

VII. HaCaT 세포에서 H₂O₂유도에 의한 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) apoptosis의 조건 최적화

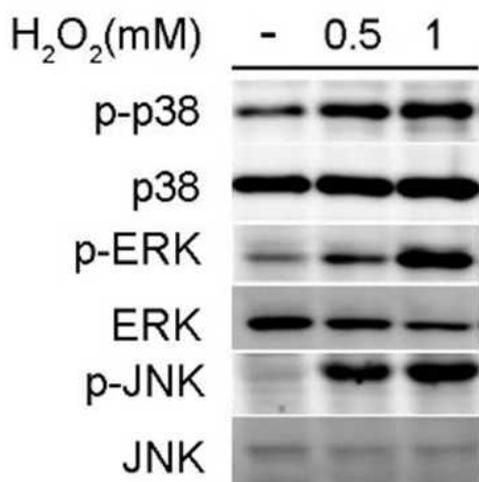


(<https://www.cusabio.com/pathway/MAPK-signaling-pathway.html>)

▲ 그림 10

- Mitogen-activated protein kinase(MAPK)는 진핵생물의 세포 내부에 존재하는 단백질 인산화효소(protein kinase)의 일종으로 세린/트레오닌 아미노산 잔기에 특이적으로 인산화를 일으키는 인산화효소로서 알려져 있으며, MAPK는 분열촉진인자(mitogen), 삼투 스트레스, 열충격(heat shock), 전염증 사이토카인(proinflammatory cytokine) 등의 다양한 자극에 대한 세포의 반응을 일으키는 것으로 보고되어있음. 또한, 세포의 증식과 분화, 유전자 발현조절, 세포자멸(apoptosis) 등의 다양한 세포 기능을 조절하는 신호전달에 관여하는 것으로 알려져 있음.

- MAPK는 염증성 사이토카인 발현에 중요한 조절인자로서 extracellular signal regulated kinase(ERK), c-Jun-Nterminal kinase(JNK), p38 등의 신호전달경로를 가지고 있으며, 이 신호 전달 체계는 H₂O₂와 같은 염증 유발 인자의 자극에 의해 인산화가 활성화되면 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine)의 발현을 증가시키는 것으로 보고되어있음.



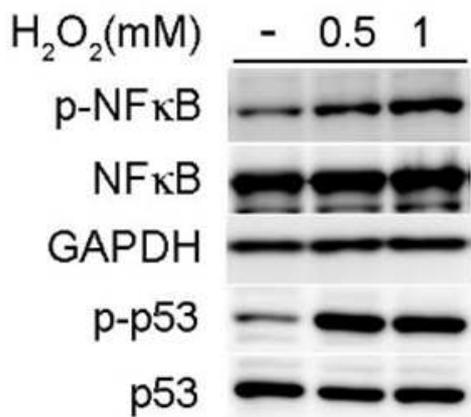
▲ 그림 11

HaCaT cell (인간각질형성세포)에 H₂O₂ 0.5mM, 1mM 농도를 처리한 후 12시간 배양한 western blot (그림 11)에 따르면, control에 비해 H₂O₂ 0.5mM, 1mM 에서 MAPKs에 속한 인산화 된 ERK, JNK, p38 단백질 (P-ERK, P-JNK, P-p38)이 모두 증가되었음을 확인하였음. 또한, 인산화된 ERK, JNK, p38 (P-ERK, P-JNK, P-p38)의 정도가 H₂O₂ 0.5mM보다 1mM 처리군에서 더 높은 것으로 확인하였음.

- H₂O₂ induction에 따른 산화적 스트레스에 의한 HaCaT cell의 세포자멸사 (Apoptosis) 유도에 Mitogen-activated protein kinase(MAPK) 신호계가 관여하는지 western blot analysis를 통해 알아보았음. 그 결과, 단백질 발현량이 H₂O₂ 농도 의존적으로 증가됨을 확인하였고, phosphorylation된 MAPKs protein (P-ERK, P-JNK, P-p38)들은 H₂O₂ 1mM에서 activation되는 것을 알 수 있었음. 따라서, MAPKs protein (ERK, JNK, p38)이 HaCaT cell에서 산화적 스트레스를 받았을 시 발현되는 condition을 확립하였음. 더불어 HaCaT cell에서 산화적 스트레스에 노출 시 MAPKs signaling이 apoptosis에 직접적으로 관여할 가능성이 있음을 알아보았음.

VIII. HaCaT 세포에서 H₂O₂유도에 의한 Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF-κB) apoptosis의 조건 최적화

- Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF-κB)는 DNA의 전사 과정, 사이토카인(cytokine)의 생성과 세포의 생존에 관여하는 단백질 복합체임. NF-κB는 거의 모든 동물 세포 종류에서 발견되며 다양한 자극에 대한 세포 반응, 예를 들어 스트레스, 사이토카인, 자유 라디칼, 중금속, 자외선 노출, 산화된 지방질, 박테리아 및 바이러스 항원 등에 대한 반응에 관여하는 것으로 보고되어 있음. NF-κB는 염증 반응에서 중요한 역할을 수행하며 NF-κB의 잘못된 전사 조절은 암, 염증성 질환과 자가면역질환, 패혈증 쇼크, 바이러스 감염, 면역계의 발달 이상 등을 초래하는 것으로 알려져 있음.
- 지속적인 외부환경의 노출은 인간피부세포에서 산화적 스트레스를 유발하여 피부의 DNA, 지질, 단백질을 손상시키고 NFκB, p53과 같은 여러 전사인자를 조절하여 세포사멸과 염증 등을 일으킴. 따라서, NFκB, p53 단백질을 대상으로 인산화 발생 여부를 분석하고자 특정 단백질의 항체를 이용한 western blot을 이용하여 확인하였음.

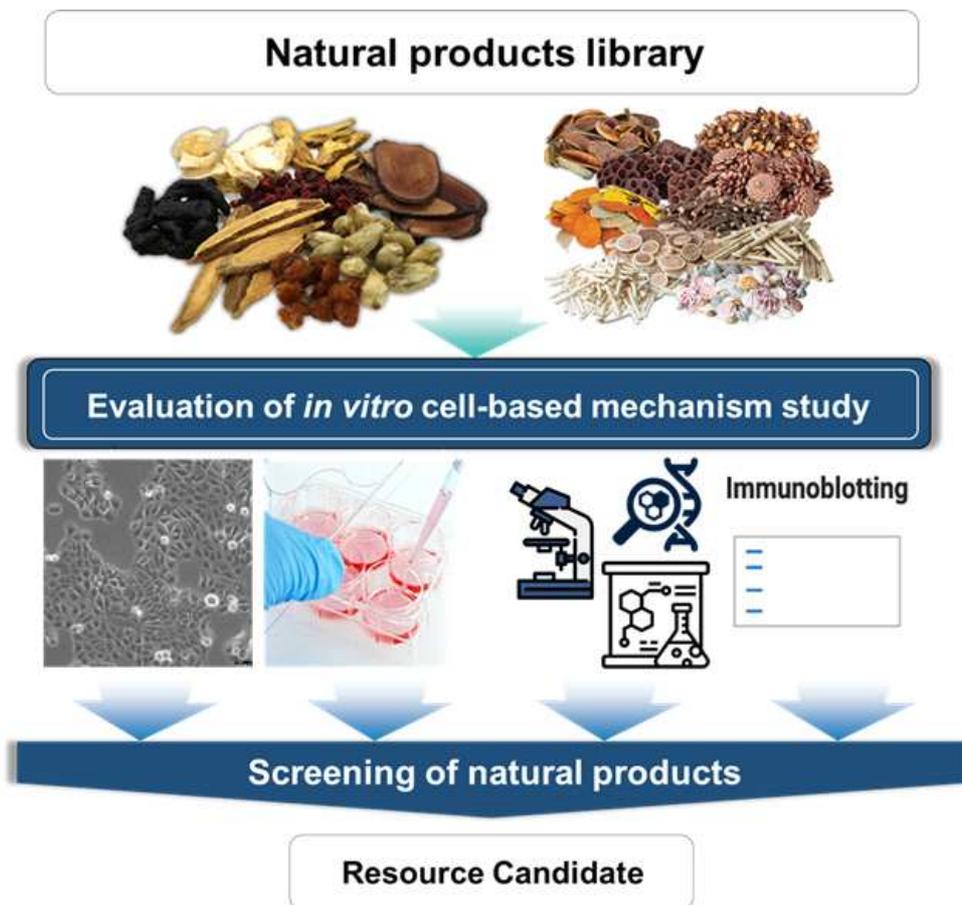


▲ 그림 12

HaCaT cell (인간각질형성세포)에 H₂O₂ 0.5mM, 1mM 농도를 처리한 후 12시간 배양한 western blot (그림 12)에 따르면, control에 비해 H₂O₂ 0.5mM, 1mM 에서 인산화된 NFκB (P-NFκB), 인산화된 p53 (P-p53) 단백질이 모두 활성화된 것을 확인하였음. 또한, 인산화된 NFκB (P-NFκB), 인산화된 p53 (P-p53)의 정도가 H₂O₂ 0.5mM보다 1mM 처리군에서 더 높은 것으로 확인하였음.

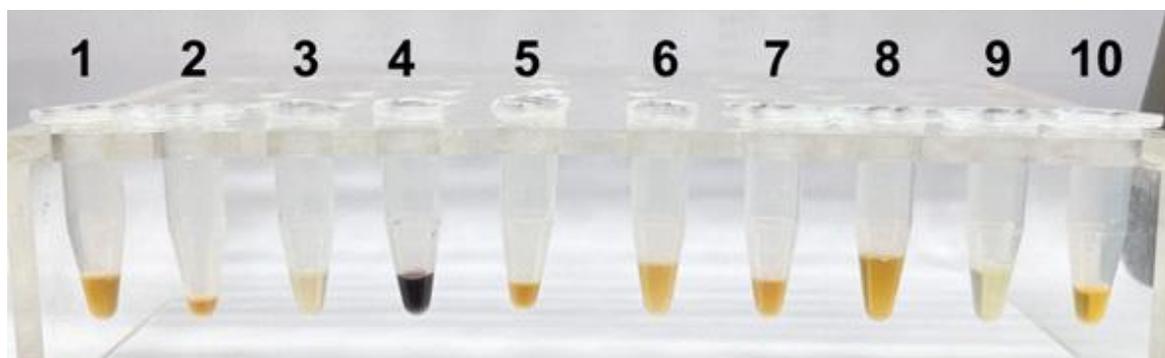
H₂O₂ induction에 따른 산화적 스트레스에 의한 HaCaT cell의 세포사멸사 (Apoptosis) 유도에 Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF-κB) 신호계가 관여하는지 실험을 통해 알아보았음. 그 결과, 단백질 발현량이 H₂O₂ 농도 의존적으로 증가됨을 확인하였고, phosphorylation된 NFκB, p53 (P-NFκB, P-p53)은 H₂O₂ 1mM에서 activation되는 것을 알 수 있었음. 따라서, NF-κB, p53와 같은 전사인자들이 HaCaT cell에서 산화적 스트레스를 받았을 시 발현되는 condition을 확립하였음. 더불어 HaCaT cell에서 산화적 스트레스에 노출 시 NFκB, p53가 apoptosis에 직접적으로 관여할 가능성이 있음을 알아보았음.

IX. 생물자원소재 Screening



▲ 그림 13

• 추출물 형태의 생물자원소재 10종을 확보하여, DMSO에 100 mg/ml의 농도로 용해한 뒤 Natural products library로 사용하였음. 이후 실험에서 항산화 효과 가능성을 가지는 생물자원소재를 세포독성실험과 산화적 스트레스에서 효율적인 효과를 protein level에서 확인하는 실험을 통해 screening 하였음.

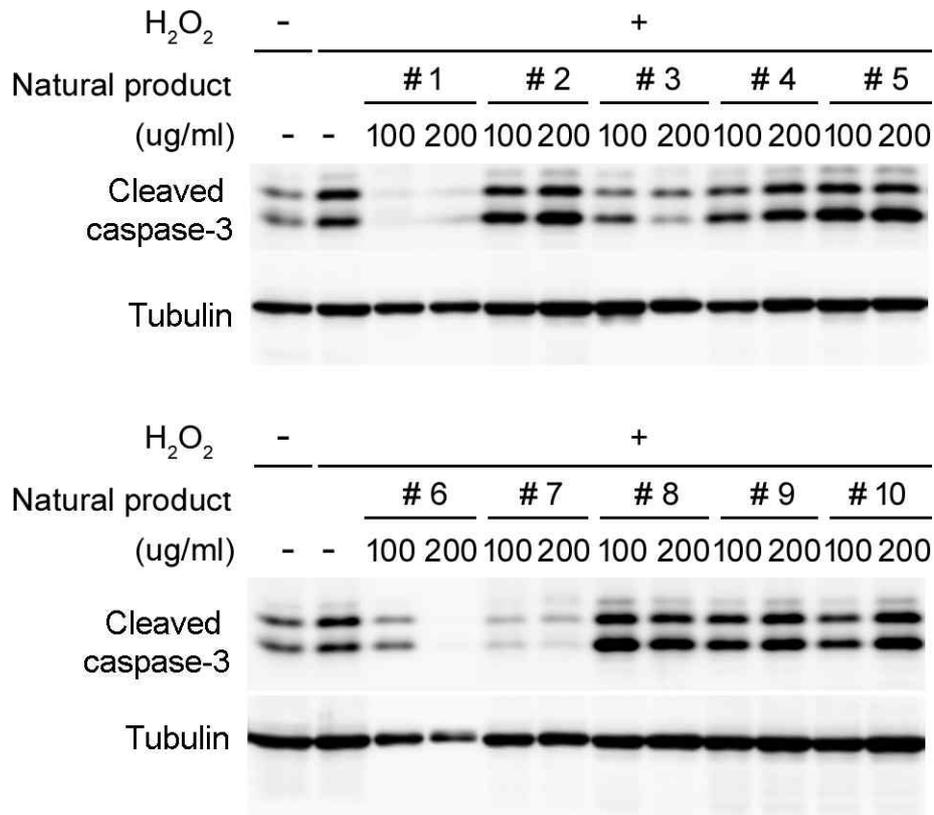


▲ 그림 14

1.감초 2.구기자 3.산수유 4.알로에 5.유채씨 6.작약 7.탱자 8.새싹보리 9.무말랭이 10. 굴

X. HaCaT에서 생물자원소재를 통한 western blot analysis

• 확보된 생물자원소재 10여종을 대상으로 H₂O₂를 처리한 HaCaT cell (인간각질형성세포)에서 항산화 효과를 가진 소재를 선정하기 위해 apoptosis marker로써 cleaved caspase-3의 발현량을 알아보는 western blot 실험을 진행하였음.



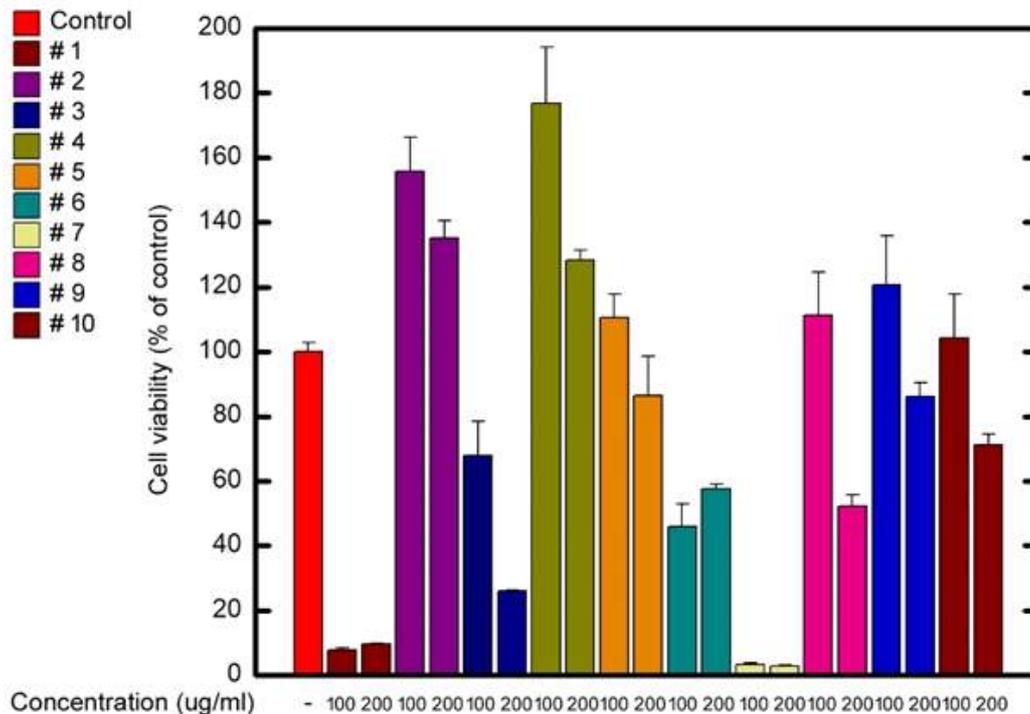
▲ 그림 15

1.감초 2.구기자 3.산수유 4.알로에 5.유채씨 6.작약 7.탱자 8.새싹보리 9.무말랭이 10. 굴

• H₂O₂ 1mM 처리한 HaCaT cell에서 생물자원소재 10종을 각각 100ug, 200ug/ml 농도 의존적으로 처리하였음. 이에 cleaved caspase-3의 발현량을 관찰한 결과(그림15), H₂O₂ treat군에 비해 2.구기자, 5.유채씨에서는 cleaved caspase-3 발현량의 차이가 없음을 관찰하였음. 그에 반해, 1.감초, 3.산수유, 4.알로에, 6.작약, 7.탱자, 8.새싹보리, 9.무말랭이, 10. 굴에서 cleaved caspase-3 발현량의 감소를 확인하였음. 생물자원소재의 항산화 효과로써 cleaved caspase-3 발현량의 감소가 발생하였는지 생물자원소재의 독성이 높아 세포 사멸이 진행되어 cell degradation이 발생하여 cleaved caspase-3 발현량이 감소하였는지에 대해 더 자세히 알아보기 위해 생물자원소재 자체의 세포독성 실험을 진행하였음.

XI. 생물자원소재 cell viability

• 인간각질형성세포주인 HaCaT cell에서 생물자원소재의 세포독성을 확인하기 위해서 WST-1 assay 원리를 이용하였음. 먼저, 생물자원소재 10종의 자체 세포독성은 96-well plate에 HaCaT cell을 6×10^5 cells/well의 농도로 100 μ L씩 접종하여 24시간 배양 후 생물자원소재 10여종을 각각 100, 200 μ M 농도로 12시간 처리하여 확인하였음. H₂O₂의 세포독성은 HaCaT cell을 동일 농도, 동일 시간 동안 배양한 후 H₂O₂ 처리한 다음 12시간 동안 배양하였음. 배양된 well에 각각 EZ-Cytox cell viability assay kit reagent (ItsBio, Korea) 10 μ L를 첨가하여 37°C에서 1 h 배양 후 microplate reader (Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였음. 각 세포에 대한 독성은 각각의 대조군의 평균 흡광도 값을 구하여 평균 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었음.



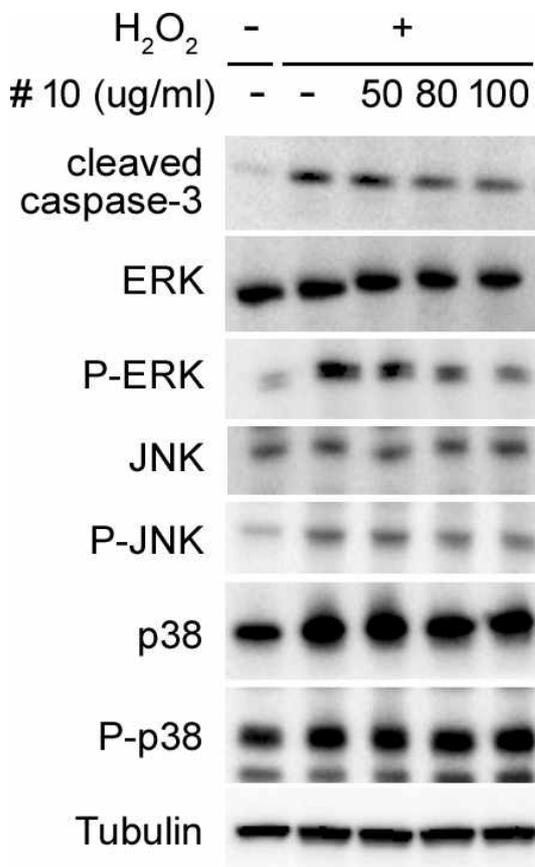
▲ 그림 16

(1.감초 2.구기자 3.산수유 4.알로에 5.유채씨 6.작약 7.탱자 8.새싹보리 9.무말랭이 10. 굴)

• HaCaT cell (인간각질형성세포)에 생물자원소재 자체독성을 확인하기 위해 WST assay를 통해 생물자원소재를 각각 100, 200 μ g/ml 농도로 처리하여 실험을 진행한 결과(그림16), 1. 감초, 3.산수유, 6.작약, 7.탱자에서는 control에 비해 100, 200 μ g 처리군에서 세포 사멸이 많이 진행되어 세포생존율이 현저히 낮음을 확인하였음. 반면에 2.구기자, 4.알로에, 5.유채씨, 8.새싹보리, 9.무말랭이, 10.굴의 세포독성을 확인한 결과 100 μ g/ml 농도에서는 control과 동일하거나 더 높은 세포생존율을 보였으나 200 μ g/ml의 5.유채씨, 8.새싹보리, 9.무말랭이, 10.굴에서는 세포 생존율이 각각 45%, 52%, 86%, 71%로 감소되었음.

• 따라서, H₂O₂ 1mM 처리한 HaCaT cell에서 생물자원소재를 각각 100ug, 200ug/ml 농도 의존적으로 처리하여, cleaved caspase-3의 발현량을 관찰한 결과 (그림15)에서 1.감초, 3.산수유, 6.작약, 7.탱자 에서 cleaved caspase-3의 발현량이 감소된 것은 추출물의 보호 효과에 의한 것이 아니라, 그 생물소재자체 독성에 의해서 세포에 과도한 스트레스를 유발하여 cleaved caspase-3의 발현이 검출되지 않은 것으로 추측되어질 수 있음.

• 2가지 데이터를 분석한 결과(그림15, 그림16) 산화적 스트레스에 효과가 있는 소재로서는 생물소재 자체로 세포독성을 일으키지 않으면서, cleaved caspase-3의 발현량이 감소한 생물소재인 10번을 선정하였음. 10번 균의 산화적 스트레스에 대한 효과를 알아보기 위해 H₂O₂ 1mM를 처리한 HaCaT cell에 후보물질인 10번 소재를 50, 80, 100ug/ml의 농도로 cleaved caspase-3와 더불어, MAPK 신호전달체계를 western blot을 통해 알아보았음.



실험결과 H₂O₂가 에 의해 표적 단백질의 활성화가 이루어진 것이 확인 되었고, 생물소재 처리군 (80, 100ug/ml)에서는 cleaved caspase-3와 ERK의 인산화 (P-ERK)가 감소 된 것이 관찰되었음. 하지만 JNK, p38의 인산화(P-JNK, P-p38)는 control과 생물소재 처리군(50, 80, 100ug/ml)을 비교하였을 때, 변화가 없는 것으로 확인할 수 있었음.

▲ 그림 17

2. 연구 수행 결과

- 화장품 산업은 인류의 오랜 꿈 가운데 하나인 미(美)에 대한 욕망을 바탕으로 지금까지 꾸준히 발전해 왔음. 특히 21세기에 들어서 고령인구의 증가로 인한 소비자층의 확대와 환경, 화장품 원료의 안전성에 대한 관심 급증으로 인해 현재 안전이 보장되면서 노화 예방 효능이 우수한 천연 유래 화장품 원료 개발이 시급한 실정임.

- 피부는 외부환경과 가장 많이 접촉하는 조직으로서 자외선을 차단하고, 세균과 독소 등 위험 요소의 침입을 방지하며, 땀의 분비로 체온을 조절하고, 몸 안의 수분을 유지하는 등 다양한 생리적 기능을 담당하는 기관으로 알려져 있음. 신체 내 중요한 구조인 피부에서 지속적인 외부 스트레스의 노출은 산화적 스트레스를 유발시킴. 산화적 스트레스의 지속적인 노출은 피부의 DNA, 지질, 단백질을 손상시키고 항산화 시스템을 감소시키는 등 세포자멸사를 유도하는 것으로 보고되고 있음. 따라서 세포 내 산화 방어 시스템은 산화 스트레스와 관련된 질병 예방 및 치료에 필수적이라고 할 수 있음.

- 본 연구팀은 HaCaT cell (인간각질형성세포)를 이용하여 H₂O₂를 통한 산화적 스트레스를 유도하고 항산화 효과를 가지고 있는 생물소재 발굴 기초 연구를 기획하였음. 이를 통해 생명현상의 비밀을 풀기 위한 중요한 세포 내 신호전달을 규명하고, 더 나아가 관련 유전자를 발굴하는 것을 기반으로 세포보호 및 항산화 효과를 기초로 한 항노화 화장품, 기능성 생물자원 발굴을 기대하고 있음.

- 사전기획 연구를 통해 1) H₂O₂의 적정농도, 2) H₂O₂의 처리시간, 3) 이에 따른 apoptosis marker인 cleaved caspase-3의 발현량 증가 4) ERK 인산화(P-ERK)의 증가 5) p38 인산화(P-p38)의 증가 6) JNK 인산화(P-JNK)의 증가 7) p53 인산화(P-p53)증가 8) NFκB 인산화 (P-NFκB)의 증가 조건을 확립하였고 이는 H₂O₂ induction 된 HaCaT cell에서 수행되었음. 10종의 Natural product를 확보하여 1차 screening을 하였을 시, 1.감초, 3.산수유, 4.알로에, 6.작약, 7.탱자, 8.새싹보리, 9. 무말랭이, 10.굴이 1차 후보 물질로 선정이 되었고, cell viability assay를 통해 2차 후보물질이 1종 (10번 굴)이 도출되었음. 2차 후보물질로 도출된 10번 추출물을 기반으로 농도별 western blot 실험을 하였을 시에 효과적으로 cleaved caspase-3가 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였음. 또한, ERK의 인산화(P-ERK) 역시 감소되는 것을 확인할 수 있었음. 이는 H₂O₂에 의해 유발되는 산화적 스트레스가 10번 생물소재에 의해 저해되고, 더불어 ERK의 인산화(P-ERK) 감소에 따른 신호전달체계와 관련이 있는 것으로 해석할 수 있음.

• 본 연구에서 구축된 *in vitro* condition을 바탕으로 인간 피부세포주에서 세포 스트레스에 대한 세포 신호 전달 기작 분석 방법을 확인할 수 있었고, 향후 전임상 동물실험 및 사람 대상 임상 테스트 진행 시 기초 지식을 제공하여, 질병을 예방 및 치료할 수 있는 유전자 치료제 개발에 기여할 수 있을 것으로 판단됨. 뿐만 아니라, 추가적인 소재확보를 통해서, 더 많은 후보 물질을 본 연구에서 구축된 시스템을 활용하여 지속적으로 후보물질 발굴이 가능할 것으로 사료됨.

3. 주요 연구 변경 사항

※ 해당사항 없음

4. 기타 의견

※ 해당사항 없음