

# 녹조류 (Green algae) 중 청각과 (Codiaceae) 항산화 효과

현유재, 박미경, 현진원

제주대학교 의학전문대학원 생화학교실

## Abstract

### Antioxidant effect of Codiaceae(Green algae)

Yu Jae Hyun, Mei Jing Piao, and Jin Won Hyun

Department of Biochemistry, Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

Ultraviolet B(UVB) increased intracellular reactive oxygen species (ROS), resulting in cellular damage. So it is important to find the antioxidant to prevent from UVB-induced skin damage. Green algae (*Codium fragile* (Suringar) Hariot, *Codium platylobium* Areschoug, *Codium intricatum* Okamura, and *Codium contratum* Kiehlman) showed the intracellular ROS scavenging effect. However, these algae show some cytotoxic effect in HaCaT cells at same concentration tested in 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate assay. Therefore, it needs to evaluate cytotoxic effect of these algae against melanoma cells. (J Med Life Sci 2012;9:54-56)

Key Words : UVB, antioxidant, cytoprotective effect

## 1. 서론

피부는 여러 가지 외부 환경에 노출되어 있다. 그 중 하나가 태양광(Solar light)으로부터 받는 자외선(Ultraviolet ray; UVR)이다. 피부에 지속적인 자외선 노출은 기미, 주근깨, 색소침착, 노화를 비롯하여 피부암(skin cancer)을 유발한다<sup>1,2)</sup>.

이러한 자외선(UVR)은 파장의 길이에 따라 단파장자외선(UVC: ~280 nm), 중파장자외선(UVB: 280~320 nm), 장파장자외선(UVA: 320~400 nm)으로 나뉘며 UVC는 오존층에서 걸러지고 UVB와 UVA만이 피부에 도달한다. 파장이 짧은 UVB의 경우 UVA보다 높은 에너지를 가지고 있어 피부에 더 큰 손상을 줄 수 있다. UVB는 DNA에 직접적으로 cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs)와 pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts와 같은 광생성물(photoproducts)을 생성하여 손상을 주거나 활성 산소종 (Reactive oxygen species: ROS)을 발생하여 간접적으로 산화적인 손상을 준다<sup>3,4)</sup>. 따라서 지속적인 UVB 노출에 의한 피부노화, 색소침착, 피부암의 치료와 예방에 있어서 자외선에 의해 생성되는 ROS를 소거할 수 있는 항산화제를 찾는 것이 중요하다. 현재 ascorbic acid, vitamin E가 각질형성세포에서 UVB로부터 유도된 손상에 보호효과가 있다는 보고<sup>5)</sup>를 비롯해 항산화제에 대한 연구는 활발하지만 아직 해조류에서는 드물고 단순히 항산화효과를 확인하는데 그치는 경우가 많다<sup>6)</sup>. 따라서 본 연구

에는 UVB로부터 유도되는 ROS를 통한 세포의 산화적 손상에 제주도 연안에 서식하는 해조류 중 녹조류에 속하는 청각(*Codium fragile* (Suringar) Hariot), 띠청각(*Codium platylobium* Areschoug), 덩불청각(*Codium intricatum* Okamura), 몽우리청각(*Codium contratum* Kiehlman)의 항산화 효과를 알아보고 사람의 각질형성세포에서 UVB로부터 유도되는 ROS로 인한 산화적 손상에 어떤 영향을 미치는지 알아보고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 재료

실험에 사용된 시료 청각(*Codium fragile* (Suringar) Hariot), 띠청각(*Codium platylobium* Areschoug), 덩불청각(*Codium intricatum* Okamura), 몽우리청각(*Codium contratum* Kiehlman) 추출물은 제주생물종다양성연구소 (Jeju, South Korea)에서 제공 받았다. 실험에 사용한 HaCaT 세포는 사람의 각질형성세포(keratinocyte)로 10% heat-inactivated fetal calf serum, streptomycin (100 µg/mL), penicilline (100 unit/mL)을 포함한 RPMI 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다. 실험에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

Address for correspondence : Jin-Won Hyun  
Department of Biochemistry, Jeju National University School of Medicine, 102 Jejudaehakno, 690-756, Jeju, Korea  
E-mail : jinwonh@jejunu.ac.kr

## 2-2 DPPH radical 소거활성 측정

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)와 25, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g/mL}$  농도의 청각, 띠청각, 덩불청각, 몽우리청각을 혼합한 후 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 반응시키고 520nm에서 측정하였다. 대조군으로 NAC (2 mM)을 사용하였고 DPPH의 흡광도에서 감소된 흡광도를 통해 radical 소거활성을 측정하였다.

## 2-3 세포내 ROS 소거 능력

HaCaT 세포에서 과산화수소 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), UVB 자극에 의한 세포내 ROS를 측정하기 위해 DCF-DA assay를 시행하였다. 96 well plate에 HaCaT 세포를  $1.5 \times 10^5$  cell/mL씩 넣고 16시간 배양 후에 각각 시료 청각, 띠청각, 덩불청각, 몽우리청각 (25, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g/mL}$ )과 대조군으로 NAC (2 mM)을 처리한 후 1시간 후에  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM), UVB (30  $\text{mJ/cm}^2$ )로 자극을 주었다.  $\text{H}_2\text{O}_2$ (1 mM)로 자극을 준 후 30분 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하고 DCF-DA 시약을 첨가한 후 30분동안 반응시킨다음 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) 생성물을 PerkinElmer LS-5B spectrofluorometer (PerkinElmer, Waltham, MA)로 측정하였다. UVB (30  $\text{mJ/cm}^2$ )로 자극을 준 후 24시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하고 DCF-DA 시약을 첨가한 후 30분 동안 반응시킨 다음 측정하였다.

## 2-4 세포 독성 측정

시료의 HaCaT 세포에서의 독성을 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay로 측정하였다. HaCaT 세포를 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cell/mL 씩 넣고 16시간 후에 각 시료 (청각, 띠청각, 덩불청각, 몽우리청각)을 25, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 50  $\mu\text{L}$ 의 MTT 시약(2mg/ml)을 첨가하고 4시간 동안 반응 시켰다. 상층액을 제거하고 200  $\mu\text{L}$ 의 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 결정을 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 2-5 통계분석

모든 결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었으며, Tukey' s test를 통해 P value가 0.05이하 일 때 유의성을 인정하였다.

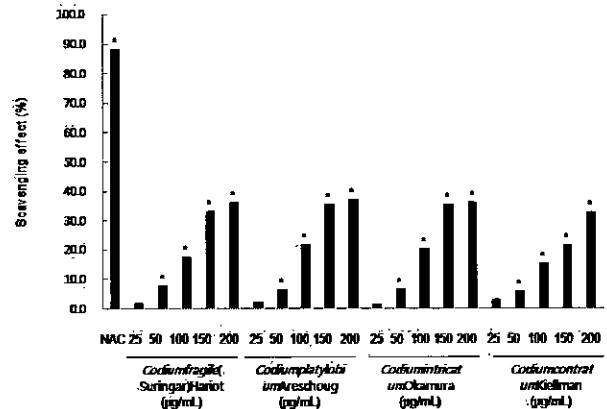
## 3. 결과 및 고찰

### 3-1 DPPH radical 소거활성

녹조류 중 구멍갈파래 (*Uva pertusa*)에서 추출한 다당류가 초과산화 이온 ( $\text{O}_2^-$ ), 수산화 라디칼 ( $\cdot\text{OH}$ ) 소거효과를 가지고 있다는 보고<sup>9)</sup> 와 녹조류, 갈조류, 홍조류에서 항산화 효과를 가진다는 보고가 있다<sup>9)</sup>.

우리는 제주 연안에 서식하는 여러 해조류 중에서 녹조류인 청각, 띠청각, 덩불청각, 몽우리청각 4종류에 대해 항산화 효과를

알아보기 위해 먼저 DPPH radical의 소거활성을 측정하였다. DPPH는 질소 중심의 radical로 전자의 비 편재화에 의해 안정화된 상태로 존재하는 radical이다<sup>9)</sup>. 520 nm에서 최대흡광도를 가지며 시료의 환원력에 의해 흡광도가 낮아지는 원리를 소거능력을 보았다. 각각 해조류 시료의 농도는 25, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g/mL}$ 로 농도가 높아질수록 DPPH radical 소거활성 능력은 높아졌다 (Fig.1).



**Figure 1.** DPPH radical scavenging effect. The level of the DPPH radical was measured spectrophotometrically at 520 nm. NAC (2 mM) was used as a positive control. Sample concentration is 25, 50, 100, 150 or 200  $\mu\text{g/mL}$ . \* indicates significantly different from control ( $p < 0.05$ )

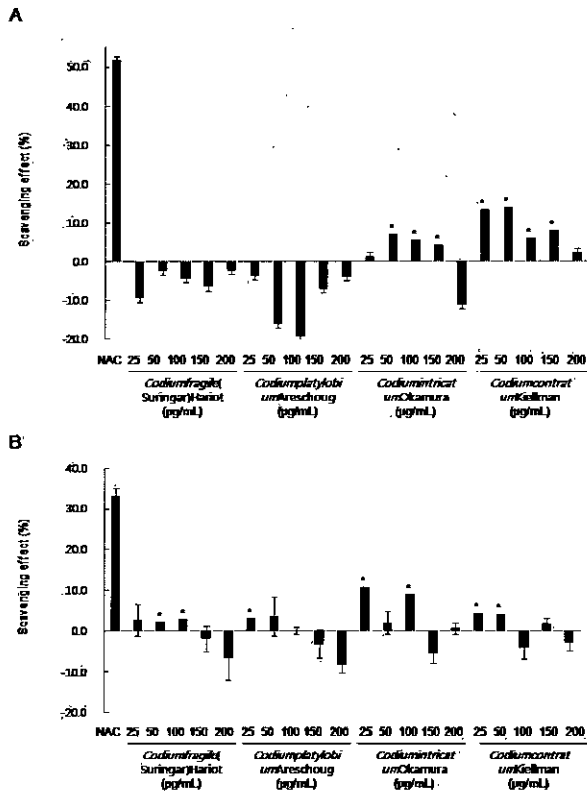
### 3-2 세포내 ROS 측정

DPPH assay를 통해 확인한 해조류 시료의 radical 소거 능력이 세포 내에서도 유효한지 알아보기 위해 다음실험을 진행하였다.

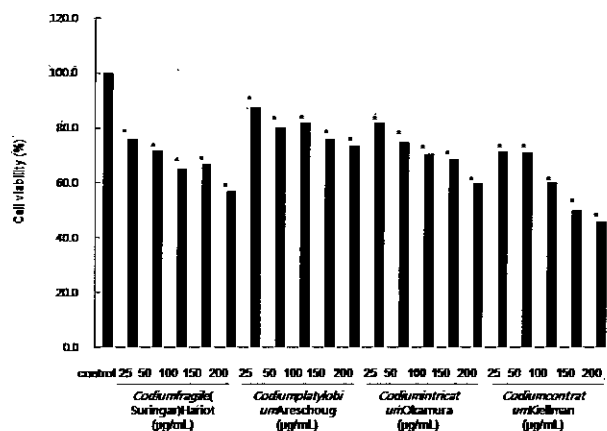
사람의 각질형성세포 (Keratinocyte)인 HaCaT 세포에서  $\text{H}_2\text{O}_2$ , UVB 자극에 의한 세포 내 ROS 소거활성 능력을 DCF-DA assay로 알아보았다. 자극에 의한 ROS 소거활성을 보기 위해 녹조류인 청각, 띠청각, 덩불청각, 몽우리청각을 각각 25, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g/mL}$  농도로 전처리 하였다.  $\text{H}_2\text{O}_2$  자극에 의해 생성되는 ROS 소거에서는 대부분 시료에서 효과를 나타내지 않았으며 몽우리청각의 경우 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 효과가 높았다 (Fig.2 A). UVB 자극에 의한 세포 내 ROS 소거활성 효과 역시 크게 나타나지는 않았지만 모든 시료가 높은 농도에서보다 25, 50  $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 효과를 나타내었으며 덩불청각이 25  $\mu\text{g/mL}$ 에서  $10.7 \pm 14.2\%$ 로 가장 큰 효과를 보였다 (Fig. 2 B).

### 3-3 세포독성

청각, 띠청각, 덩불청각, 몽우리청각의 HaCaT 세포에서의 독성을 측정하였다. 각 시료의 농도는 25, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{g/mL}$ 로 농도가 높아질수록 세포에서의 독성은 증가하였다 (Fig.3).



**Figure 2.** Intracellular ROS scavenging effect. (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced intracellular ROS scavenging effect. (B) UVB-induced intracellular ROS scavenging effect. The level of intracellular ROS generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or UVB was detected using a spectrofluorometer to measure DCF fluorescence. NAC (2 mM) was used as a positive control. Sample concentration is 25, 50, 100, 150 or 200 µg/mL. \* indicates significantly different from control (p<0.05)



**Figure 3.** Cell viability. Cells were seeded, and sample was added at a concentration of 25, 50, 100, 150 or 200 µg/mL. Cell viability was determined using the MTT assay. \* indicates significantly different from control (p<0.05)

UVB 자극에 의한 세포내 ROS 소거 능력에서 덩불청각을 비롯한 각 시료의 25, 50 µg/mL농도에서 세포내 ROS 소거능력이 있었기에 UVB에 대한 세포 보호효과를 기대하였지만 아무것도 처리하지 않은 세포 (control)의 세포 생존률을 100%로 보았을 때 청각 25 µg/mL에서 76.0 ± 4.9%, 띠청각 25 µg/mL에서 87.5 ± 0.7%, 덩불청각 25 µg/mL에서 82.0 ± 3.9%, 몽우리청각 25 µg/mL에서 71.5 ± 3.4%의 세포생존률을 나타내었다.

이는 피부 보호효과보다는 흑색종 (melanoma) 또는 편평 세포암 (squamous cell carcinoma)과 같은 피부암 (skin cancer)의 치료에 효과가 있는지 앞으로 좀 더 연구해볼 가치가 있다.

## 5. 참고 문헌

- 1) Gruijl FR. Skin cancer and solar UV radiation. *Eur J Cancer*. 1999;35(14):2003-2009.
- 2) Swalwell H, Latimer J, Haywood RM, Birch-Machin MA. Investigating the role of melanin in UVA/UVB- and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(3):626-634.
- 3) Christopher K, Len R, Bernd E. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis*. 1997;18(4):811-816.
- 4) Aitken GR, Henderson JR, Chang SC, McNeil CJ, Birch-Machin MA. Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes. *Clin Exp Dermatol*. 2007;32(6):722-727.
- 5) Ikehata H, Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res*. 2011;52(2):115-125.
- 6) Stewart MS, Cameron GS, Pence BC. Antioxidant nutrients protect against UVB-induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol*. 1996;106(5):1086-1089.
- 7) Qi H, Zhang Q, Zhao T, Chen R, Zhang H, Niu X, Li Z. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *Int J Biol Macromol*. 2005;37(4):195-199.
- 8) Mayalen Z, Daniel R, Yolanda FP. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *J Appl Phycol*. 2007;19:449-458
- 9) Yokozawa T, Chen CP, Dong E, Tanaka T, Nonaka GI, Nishioka I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem Pharmacol*. 1998;56(2):213-222.