

## Fisetin의 항산화 활성 및 미용기능식품 소재로서의 가능성 고찰

김의수<sup>1</sup>, 장해동<sup>1</sup>, 김교남<sup>2\*</sup><sup>1</sup>한남대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>경남대학교 식품생명학과

## Anti-oxidative Function of Fisetin and Its Potential as an Anti-oxidant Nutri-cosmetics

Eui-Su Kim<sup>1</sup>, Hae-Dong Jang<sup>1</sup>, Gyo-Nam Kim<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Hannam University<sup>2</sup>Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University

**Abstract** The term of nutri-cosmetics refers to nutritional supplements which can support the function and the structure of the skin. The fisetin is a flavonol which belongs to the flavonoid group of polyphenols. Although the anti-carcinogenic property of fisetin have been widely studied, anti-oxidative function of fisetin in HaCaT keratinocytes is unknown. In this study, we examined the in vitro chemical and cellular anti-oxidant activities of fisetin in HaCaT keratinocytes and we further discussed its potential as an anti-oxidant nutri-cosmetics. We employed scavenging assay for the 1,1-diphenyl-2,5-picrylhydrazyl (DPPH) radicals and cellular anti-oxidant activity of fisetin was investigated in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated HaCaT keratinocytes as judged by the 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)-based assay. The fisetin effectively scavenged DPPH radicals (IC<sub>50</sub> 54 μM) when compared to the scavenging activities of L-ascorbic acid (IC<sub>50</sub> 87 μM) acid and trolox (IC<sub>50</sub> 74 μM), well-known anti-oxidants. In addition, the fisetin significantly ameliorates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in HaCaT keratinocytes in dose-dependent manner. The fisetin showed more strong cellular anti-oxidant activity than those of L-ascorbic acid and trolox in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated HaCaT keratinocytes. In agreement with result of the cellular anti-oxidant activity, we observed markedly suppressed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress by the pre-treatment of 100 μM fisetin under the fluorescence microscopy analysis. These results provide the scientific evidences for the development of skin targeted nutri-cosmetics which has anti-oxidant function.

**Keywords:** Fisetin, Nutri-cosmetics, Anti-oxidant, HaCaT keratinocytes, Oxidative stress

## I. 서론

노화 과정이란 시간에 따라 세포의 기능이 저하되는 과정으로 세포내 항상성은 노화 과정과 밀접한 관련을 가지고 있다(이선영 등, 2011). 또한 노화는 생물체 내외의 여러 요인으로부터

초래되는 산화적 스트레스를 억제하는 능력을 상실하게 한다. 생체 내에서 에너지 생산을 위한 산화 과정 중에 상당량의 활성산소들이 생성된다. 이들 활성산소는 정상적인 상태에서 생체 내 제거 기작에 의해 대부분 소거되지만, 순간적으로 활성산소가 다량으로 발생되거나 만성적으로 활성산소가 발생되어 항산화 방어 시스템의 균형이 깨지면 피부질환을 비롯한 각종 질병의 원인이 된다고 알려져 있다(Lim *et al.*, 2009; 정은영 등, 2010; 윤미영 등, 2009). 여러 연구자들에 의해 산화적 스트레스는 지질 과산화, 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 멜라닌 생성을 촉진시킴으로써 피부의 탄력을 감소시키고 주름 및 기미·주근깨 등의 각종 피부질환을 유발하여 피부 노화를 가속화시키는 것으로 보고되었다. 따라서 피부 노화를 지연시키고 억제하기 위해서는 생체 내 뿐만 아니라 피부에서 과잉의 활성

\*Corresponding author: Gyo-Nam Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, 11 (Woryeong-dong) Woryeongbuk 16-gil, Masanhappo-gu, Changwon-si, Gyeongsangnam-do 631-701, South Korea  
Tel.: +82 55 249 6330, Fax: +82 505 999 2171  
E-mail: gnkim@kyungnam.ac.kr

Received May 3, 2012; Revised June 27, 2012;  
Accepted June 29, 2012; Published August 30, 2012

산소를 억제하고 효율적으로 제거할 수 있는 항산화 방어 시스템이 필요하다(이선영 등, 2011; 김형우 등, 2009).

최근 피부의 건강과 아름다움을 위한 소비자들의 다양한 제품의 수요가 급증하였다. 특히 피부는 영양과 밀접한 관련이 있다는 인식 변화에 따라 이제는 바르는 화장품에서 벗어나 특정 영양소 성분을 이용한 먹는 화장품, 즉 피부미용식품(nutri-cosmetics, beauty foods)의 개발이 가속화 되고 있다. 대표적인 항산화 피부미용식품 소재로는 L-ascorbic acid와 tocopherol이 있다. 이들 비타민의 항산화 활성은 이미 잘 알려져 있으며 피부의 콜라겐 합성 및 탄력 유지에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(조윤희, 2005). 최근 웰빙과 더불어 천연 피부미용식품 및 유기농 피부미용식품에 대한 관심이 높아지고 있다. 그러므로 식물 및 식품유래 추출물이나 이들의 생리활성 물질에 대한 과학적인 검증과 안정성 연구가 요구되어진다.

Benz- $\gamma$ -pyrone의 구조를 갖는 페놀 화합물 플라보노이드(flavonoids)는 식물계에 널리 분포하며 플라보놀(flavonols), 플라본(flavones), 안토시아닌(anthocyanidins), 이소플라본(isoflavones), 그리고 네오플라보노이드(neoflavonoids) 등의 하위 그룹을 포함하는 색소성분이다. 녹차의 카테킨(catechins), 양파의 퀘세틴(querctetin), 두류의 제니스테인(genistein)은 비교적 잘 알려진 천연물 유래 플라보노이드이며 화장품 소재로의 개발로도 광범위하게 이어지고 있다. 자연계에 존재하는 다양한 플라보노이드는 생물체내 세포신호전달, 유전자 및 단백질의 발현, 세포분화 등에 관여하여 노화, 암, 그리고 심혈관계 질환을 예방할 수 있다는 연구결과들이 다수 보고되었다(Robert J *et al.*, 2001; Kelly EH *et al.*, 2002; Yao K *et al.*, 2008). 이러한 플라보노이드 중 플라보놀 그룹에 속하는 3,3',4',7-tetrahydroxy flavone (fisetin)은(Figure 1) 딸기, 사과, 감, 양파, 포도, 그리고 오이 등과 같은 과일이나 채소에 많이 함유된 성분이다(Arai Y *et al.*, 2000). 최근에는 율무 추출물로부터 얻은 fisetin이 전지방세포(preadipocytes)에서 지방세포(adipocytes)로 분화되는 과정인 adipogenesis를 억제하고 UVB에 의한 세포사멸을 감소시킨다는 보고(김세건 등, 2010; 김돈영 등, 2005; 정세진 등, 2007)를 비롯하여 항산화, 항염, 및 항암 효과를 포함하는 다양한 생리활성이 보고되었다(Maher P, 2006; Higa S *et al.*, 2003).

그럼에도 불구하고 fisetin을 피부 및 미용분야에 적용한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 특히 HaCaT keratinocytes를 포함한 인간유래 세포주에서 fisetin의 항산화 활성을 평가하고 항산화 피부미용식품 소재로서의 가능성에 대한 보고는 전무하다. 따라서 본 연구에서는 플라보노이드 일종인 fisetin의 항산화 활성을 평가하고 항산화 피부미용식품 소재로서의 가능성을 탐색 하였다. 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거법과 인간유래 HaCaT keratinocytes 모델에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 산화적

스트레스를 얼마나 효율적으로 제거할 수 있는지를 DCFH-DA 실험법과 형광현미경 이미지 분석을 통해 확인하였으며, 각각의 실험에서는 항산화 피부미용식품 소재로 잘 알려진 L-ascorbic acid와 trolox (비타민 E 수용성 유도체)가 양성 대조군으로 사용되었다.

## II. 연구방법

### 1. 실험재료

실험에 사용한 인간유래 HaCaT keratinocytes는 CLS (Cell Lines Service, Eppelheim, Germany)에서 구입하여 사용하였다. Ethanol과 methanol은 (주)삼전에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Hank's balanced salt solution (HBSS), streptomycin, penicillin은 Gibco BRL, (Carlsbad, USA)에서 구입하여 사용하였다. DCFH-DA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DPPH, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), L-ascorbic acid, trolox는 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader 및 형광분석기(fluorescence reader)는 Tecan (Salzburg, Austria)을, 형광현미경(fluorescence microscopy)은 Olympus Optical (Tokyo, Japan)의 기기를 사용하였다.

### 2. DPPH 라디칼 소거능 분석

DPPH 라디칼 소거법은 항산화 물질의 전자 및 수소공여능을 측정하는 항산화 측정법으로 주로 phenolic 구조와 aromatic amine 화합물에 많이 이용된다. DPPH 라디칼 소거능은 Chen 등의 방법을 일부 변형하여 측정하였다(Chen HM *et al.*, 1998). Ethanol에 용해시킨 200  $\mu$ M의 DPPH 용액 1.95 ml에 농도별 fisetin 50  $\mu$ l를 넣어 잘 혼합한 뒤, 30 min 동안 상온에서 반응시켜 ELISA reader (Tecan)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 fisetin 대신 50  $\mu$ l의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하였으며 DPPH 라디칼 소거능은 아래의 방법으로 계산하였다. 실험결과는 DPPH 라디칼을 50% 저해하는 농도인 IC<sub>50</sub>값으로 표현하였다.

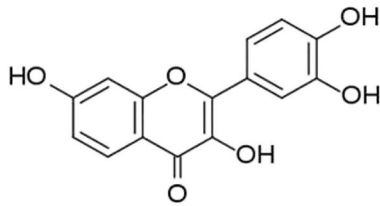
$$\text{DPPH 라디칼 소거능 (\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A: Fisetin 처리군의 흡광도

B: 대조군의 흡광도

### 3. HaCaT 세포의 배양

HaCaT keratinocytes는 불활성화된 10%(v/v) FBS, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 그리고 100 U/ml의 penicillin을 포함한



**Figure 1.** Chemical structure of fisetin.

DMEM 배지로 37°C의 온도, 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 배양하였다. HaCaT keratinocytes는 1주에 약 3-4회 1:2 비율로 계대배양하였다.

#### 4. MTT 실험을 통한 세포독성 테스트

MTT assay를 통하여 HaCaT keratinocytes에 대한 fisetin의 세포독성을 분석하였다. MTT assay는 탈수소효소 (dehydrogenase)에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 활성을 측정함으로써 fisetin의 세포독성을 분석할 수 있다.

HaCaT keratinocytes는 12-well culture plate에 전배양하여 준비 하였으며, 준비된 fisetin은 언급된 농도별로 HaCaT keratinocytes에 24 h 처리한 후 5 mg/ml의 MTT 용액을 1 h 처리하였다. 그 후 DMEM 배지를 제거하고 처리된 HaCaT keratinocytes를 1 ml의 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 씻어 주었다. 수용액에 용해되지 않는 MTT formazan을 400 µl의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 가하여 녹여 준 다음 ELISA reader (Tecan)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5. DCFH-DA를 이용한 fisetin의 세포내 항산화 활성 분석

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도시킨 산화적 스트레스에 대한 fisetin의 세포내 항산화 활성을 DCFH-DA를 이용하여 분석하였다. DCFH-DA를 이용한 세포내 항산화 활성 분석은 Lautraite 등의 방법을 일부 변형하여 사용하였다(Lautraite *et al.*, 2003). DCFH-DA는 세포막을 통해 세포로 유입되면 세포질에 존재하는 esterase에 의해 DCFH로 가수 분해되는데 세포 내 활성산소가 존재하게 되면 쉽게 DCF로 산화되어 excitation 파장 485 nm, emission 파장 535 nm에서 그린색의 강한 형광을 나타낸다. Fisetin을 HaCaT keratinocytes에 처리한 뒤 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화적 스트레스를 유발하면 세포내 항산화 활성 정도에 따라 차이적인 DCF 형광강도를 나타내므로 이를 이용하여 fisetin의 세포내 항산화 활성을 분석할 수 있다.

HaCaT 세포를 3×10<sup>5</sup> cells/well의 수로 24 h 전배양하고 fisetin을 30 min 동안 처리하였다. 배지를 제거한 후 50 µl

의 HBSS로 1회 세포를 씻어 주었다. 그 후 DMEM 배지를 제거하고 형광의 간섭을 받지 않는 HBSS로 교체해 주었다. 600 µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 가하고 30 min 동안 배양한 후 40 µM의 DCFH-DA를 처리해 준 후 30 min 추가 배양하였다 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 총 1시간). 형광분석기 (Tecan)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 형광의 강도를 측정하여 fisetin의 세포내 항산화 활성을 정량분석 하였다.

#### 6. 현광현미경 분석을 통한 세포내 항산화 활성 분석

Fisetin의 세포내 항산화 활성은 현광현미경 분석을 통해서 확인하였다. 활성산소에 의해 산화된 DCF는 현광현미경상에서 그린색의 강한 형광강도를 나타내기 때문에, 형광강도의 증가는 세포내 활성산소의 증가를 나타낸다.

HaCaT 세포를 3×10<sup>5</sup> cells/well의 수로 12-well culture plate에 24 h 전배양하고 fisetin을 30 min 동안 처리하였다. 배지를 제거한 후 50 µl의 HBSS로 1회 세포를 씻어 주었다. 그 후 DMEM 배지를 제거하고 형광의 간섭을 받지 않는 HBSS로 교체해 주었다. 600 µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 가하고 30 min 동안 배양한 후 40 µM의 DCFH-DA를 처리해 준 후 30 min 추가 배양하였다. Fisetin의 세포내 항산화 활성은 현광현미경 (Olympus Optical)을 통해 이미지화 하였다.

#### 7. 통계분석

모든 데이터는 평균±표준편차로 표현하였으며, 데이터의 통계처리는 Statistical Package for Social Science (SPSS, Chicago, USA)을 이용하여 분석하였다. 신뢰수준 p<.05에서 평균값들에 대한 유의성을 검증하였다. 각 항목은 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 시행하여 F값을 구하고, Duncan's test를 이용하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다.

### Ⅲ. 연구결과 및 고찰

#### 1. Fisetin의 DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거법은 항산화 기능성을 분석하는데 있어 널리 이용되는 방법이다. Fisetin의 DPPH 라디칼 소거능은 Table 1에 나타났다. L-Ascorbic acid와 trolox는 잘 알려진 항산화제로써 본 실험의 양성 대조군으로 사용되었다. DPPH 라디칼을 50% 저해하는 농도인 fisetin의 IC<sub>50</sub>은 54 µM이었으며, L-ascorbic acid와 trolox는 각각 87 µM 그리고 74 µM 이었다. DPPH 라디칼 소거능은 fisetin > trolox > L-ascorbic acid 순으로 높은 것으로 나타났다. 세포실험을 제외한 in vitro 항산화 분석법은 크게 3가지의 라디칼 소거기전에 기인한 것으

**Table 1.** Scavenging activity of fisetin on DPPH radicals

Test sample	IC <sub>50</sub> <sup>a)</sup> (μM)
Fisetin	54 ± 1.6 <sup>a</sup>
L-Ascorbic acid	87 ± 3.4 <sup>c</sup>
Trolox	74 ± 2.9 <sup>b</sup>

Data are mean with standard deviation (n=9) obtained from three individual experiments.

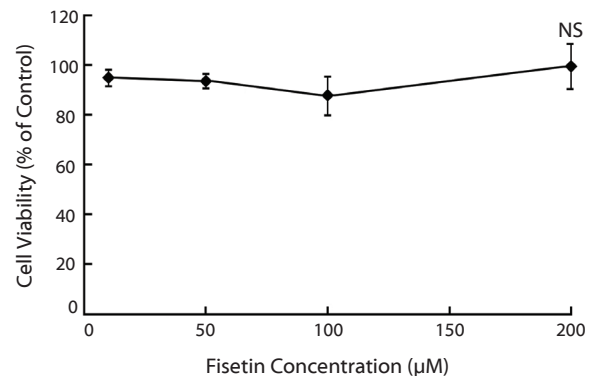
Different letters within a column indicate significant differences (p<.05) by Duncan's test.

<sup>a)</sup> IC<sub>50</sub> denotes the half maximal inhibitory concentration which is anti-oxidant concentration causing 50% reduction of the DPPH radicals.

로, 항산화제의 라디칼 소거기전을 유추할 수 있다. 대표적인 것이 전자 공여능을 통해 라디칼을 소거하는 기전이며, DPPH 라디칼 소거법이 여기에 속한다. 둘째는 수소 공여능을 통해 라디칼을 소거하는 방법이며 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)를 사용하는 oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay가 여기에 속한다. 마지막으로 셋째는 전자 및 수소 공여능 두가지 모두를 통해 라디칼을 소거하는 기전이 있다(Huang *et al.*, 2005). 본 실험결과를 통해 fisetin의 전자공여능이 DPPH 라디칼 소거 활성에 기여하는 것을 알 수 있었으며 다양한 식물 추출물 및 플라보노이드류의 전자공여능이 그들의 항산화 활성에 기여할 수 있다는 우리의 이전 연구결과에 부합한다(Kim *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2010).

## 2. HaCaT keratinocytes에 대한 fisetin의 세포독성

HaCaT keratinocytes에 대한 fisetin의 세포독성은 MTT 실험법을 통해 평가하였다. Fisetin을 10, 50, 100 그리고 200 μM의 농도로 24시간 동안 처리한 결과, 아무것도 처리하지 않은 대조군 대비 94.6%, 93.4%, 87.6%, 99.2%의 세포 생존율을 각각 나타냈으며 유의적인 차이는 없었다(Figure 2). 몇몇 연구자들이 암세포 모델에서 fisetin을 처리한 경우 세포사멸을 유도한다고 보고하였다. Chen 등은 20-80 μM의 fisetin을 24 h 처리하였을 때 간암 세포주인 SK-HEP-1의 유의적인 세포사멸을 보고 하였으며(Chen YC *et al.*, 2002) Khan 등은 10-60 μM의 fisetin을 48 h 처리하였을 때 전립선암 세포주 LNCaP에서 세포사멸을 관찰 하였다(Khan N *et al.*, 2008). 하지만 본 실험에서 정상 세포주인 HaCaT keratinocytes에 fisetin을 농도별로 24 h 처리하였을 때 대조군 대비 유의적이 세포독성을 나타내지 않았다. Ahmad 등은 녹차의 대표적인 플라보노이드인 epigallocatechin-3-gallate (EGCG)가 암 세포주와 정상 세포주에서 전사인자인 nuclear factor κB의 발현을 다르게 조절함으로써 암세포 선택적인 세포사멸을 나타낸다고 보고 하였다(Ahmad N *et al.*, 2000). 본 실험결과를 fisetin이



**Figure 2.** Effect of fisetin treatment on viability of HaCaT keratinocytes.

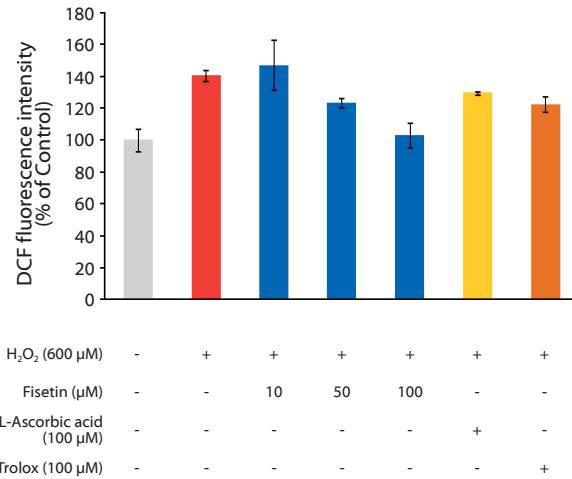
HaCaT keratinocytes were subjected to MTT assay for determining cell viability after 24 h treatment with fisetin. Percentage viability of HaCaT keratinocytes exposed to 10, 50, 100, and 200 μM of fisetin. NS) Not significant

암 세포주와 정상 세포주에서 세포 사멸과 관련한 전사인자나 유전자 및 단백질 발현을 다르게 조절할 수 있음을 보여주는 결과라 생각된다. 추후 세포모델에 따른 fisetin의 역할에 대한 심도있는 연구가 추가로 요구된다.

## 3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화적 스트레스가 유도된 HaCaT keratinocytes에서 fisetin의 세포내 항산화 활성 분석

비록 fisetin이 in vitro DPPH 라디칼 소거법에서 농도 의존적인 항산화 활성을 나타냈지만 인간유래 피부세포 모델에서 fisetin이 항산화 활성을 나타내는지에 대해 확인하였다. 최근 세포내 활성산소를 측정하는 방법으로 여러 연구자들에 의해 DCFH-DA법이 널리 이용되고 있다. 동물세포의 세포막 투과성을 가진 DCFH-DA가 세포질로 유입되게 되면 세포질에 존재하는 esterase에 의해 DCFH-DA는 DCFH로 가수분해 되고, 활성산소가 존재하게 되면 형광을 띄지 않던 DCFH는 활성산소에 의해 빠르게 산화되어 강한 그린색의 형광을 띄는 DCF로 전환된다. 그러므로 형광현미경 및 형광분석기를 통해 DCF의 형광강도를 측정하면 정성 및 정량 분석이 가능하다.

본 실험에서 우리는 HaCaT keratinocytes에 600 μM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 HaCaT keratinocytes에 산화적 스트레스를 유도하였다. 본 실험에서는 fisetin을 먼저 30분간 처리한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 30분간 처리하여 산화적 스트레스를 유도하였다. 그 이유는 fisetin에 의한 산화적 스트레스 예방효과의 가능성에 대해 분석하고자 한 의도이며 또한 fisetin과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 medium 환경에서 직접적으로 반응할 수 있는 가능성을 배제시키기 위함이다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화적 스트레스를 유도한 결과 대조군(100%) 대비 40.5%의 활성산소가 증가하였다(Figure 3). 반면 30 min 동안



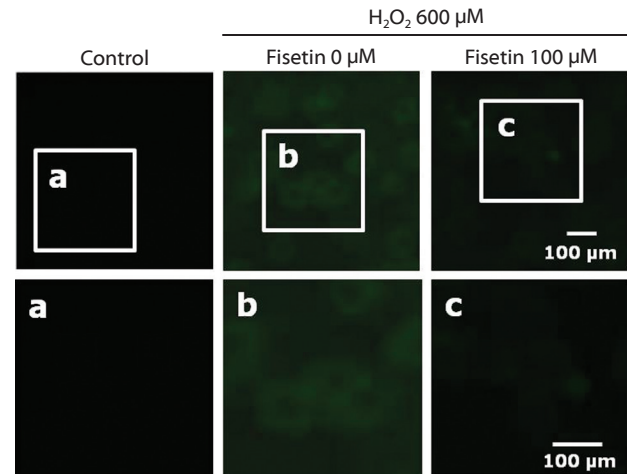
**Figure 3.** Cellular anti-oxidant activity of fisetin in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in HaCaT keratinocytes.

Cellular anti-oxidant activity was evaluated in 10, 50 and 100 μM fisetin-pretreated HaCaT keratinocytes in the absence or presence of 600 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Data are mean with standard deviation (n=9) obtained from three individual experiments. Different letters indicate significant differences (p<.05) by Duncan's test.

fisetin을 10, 50 그리고 100 μM의 농도로 처리한 뒤 600 μM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 결과 fisetin은 농도 의존적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스를 억제하였다(Figure 3). 비록 10 μM의 fisetin 처리에서는 유의적인 차이는 없었지만 50 그리고 100 μM의 fisetin 처리는 HaCaT 세포내 산화적 스트레스를 유의적으로 억제하였으며, 특히 100 μM의 fisetin을 처리한 HaCaT keratinocytes는 대조군(102.9%) 수준으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스가 억제된 것을 알 수 있었다(Figure 3). 본 실험에서 fisetin은 항산화 소재로 잘 알려진 L-ascorbic acid와 trolox에 비하여 더 강한 세포내 항산화 활성을 나타냈다. 이는 fisetin의 항산화 소재로서의 가능성을 확인할 수 있는 결과로 사료된다.

#### 4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화적 스트레스가 유도된 HaCaT keratinocytes에서 fisetin의 세포내 항산화 활성 분석

형광현미경 이미지 분석을 통해 다시 fisetin의 HaCaT keratinocytes에서의 항산화 활성을 확인하였다. 활성산소에 의해 증가된 DCF는 형광현미경에서 그린색의 형광을 나타낸다. 즉, 증가된 그린색의 DCF는 HaCaT keratinocytes에 발생한 산화적 스트레스 수준과 비례함을 의미한다. 600 μM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 HaCaT keratinocytes에 산화적 스트레스를 유도한 결과 대조군과 비교해 활성산소 수준이 크게 증가된 것을 확인할 수 있었으며 100 μM의 fisetin 처리는 Figure 3의 결과와 유



**Figure 4.** Fluorescence microscopy analysis for observation of reactive oxygen species (ROS).

Fluorescence microscopy analysis was performed with DCFH-DA stained HaCaT keratinocytes after treatment with 100 μM fisetin in the absence or presence of 600 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

사하게 대조군 수준으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 스트레스를 억제된 것을 알 수 있었다(Figure 4). 이미지 분석에서 가장 강한 DCF 형광강도를 나타낸 부분을 다시 확대하여 분석한 결과는 아래쪽에 위치하였다(Figure 4).

## IV. 결론

최근 소비자들은 각종 매체로부터 다양한 정보를 습득하고 피부와 미용에 대한 관심이 높아짐에 따라 이제는 단순히 외적으로만 영양을 공급받는 아우터 뉴트리션 (outer nutrition)을 넘어서서 체내 영양 밸런스를 유지하는 이너 뉴트리션(inner nutrition)이 조화된 제품을 요구하고 있다(이상준 등, 2005). 이러한 소비자의 니즈에 부응하여 태평양과 앤프라니는 각각 비비 (V=B) 프로그램과 페어웰 링클라인을 출시하였으며 미용 기능식품 시장 또한 크게 성장하고 있다(김설미 등, 2009). 그러므로 미용기능식품 소재에 대한 과학적인 기능성 연구와 체계적인 기전확립이 요구된다.

본 연구에서는 플라보노이드에 속하는 fisetin의 항산화 미용기능식품 소재로서의 가능성을 알아보기 위하여 DPPH 라디칼 소거활성과 더 나아가 인간유래 HaCaT keratinocytes에서 fisetin의 세포독성을 평가하였다. 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 HaCaT keratinocytes에 산화적 스트레스를 유도한 뒤 fisetin의 세포내 항산화 활성을 분석하고 fisetin의 항산화 피부미용소재로서의 가능성을 고찰하였다. 본 연구의 결과를 요약하자면 다음과 같다. (i) Fisetin은 전자공여능을 바탕으로 하여 유의적

인 DPPH 라디칼 소거활성을 나타냈다. (ii) 인간유래 HaCaT keratinocytes에서 fisetin은 세포독성을 나타내지 않았다. (iii) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화적 스트레스를 유도한 HaCaT keratinocytes 모델에서 fisetin은 유의적으로 세포내 산화적 스트레스를 감소시켰으며, 같은 농도에서 항산화 소재로 잘 알려진 L-ascorbic acid와 trolox 보다 더 강한 세포내 항산화 활성을 나타냈다.

이상의 연구결과는 항산화 미용기능식품 소재로서 fisetin의 가능성을 보여주었으며, 추후 HaCaT keratinocytes내에서 어떠한 신호전달체계를 통해 항산화 활성을 나타내는지에 대한 추가적인 분자생물학적 기전연구가 필요할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

이 연구결과물은 2012학년도 경남대학교 학술연구장려금 지원에 의한 것임.

### 참고문헌

김돈영, 황은희, 박종근. NIH3T3 세포에서 UVB에 의한 세포 고사에 미치는 옷 추출물과 fisetin의 효과. *생명과학회지*, 15: 141-146, 2005.

김설미, 김은화. 안면 피부관리와 항산화 비타민 섭취의 피부건강 상태 변화. *대한피부미용학회지*, 7: 111-125, 2009.

김세진, 류동영, 김도국, 고다형, 김윤경, 이영미, 정현주. 3T3-L1 세포에 대한 옷나무 추출물의 지방축적억제효과. *생약학회지*, 41: 21-25, 2010.

김형우, 김병주, 임세현, 김현영, 이숙영, 조수인, 김영균. 포공영 추출물의 항산화 효과 및 피부각질세포 보호 효과. *대한분초학회지*, 24: 103-108, 2009.

박수남. 플라보노이드(flavonoid): 활성산소종에 의한 산화 방어제. *화학세계*, 47: 46-47, 2007.

윤미영, 방민정, 진정화, 정광조. 샌달우드 오일의 항산화 및 항염증에 관한 효과. *대한피부미용학회지*, 7: 263-274, 2009.

이상준, 김완기. 미용식품의 국내의 시장동향. *식품과학과 산업*, 38: 2-7, 2005.

이선영, 김현주, 최신옥. 이질폴 추출물의 항산화 효능에 관한 연구. *대한화장품학회지*, 37: 61-66, 2011.

정세진, 김돈영, 한설희, 신상민, 차재영, 박노복, 이정섭, 박종근. NIH3T3 세포에서 UVB에 의한 세포고사와 DNA 단사절단에 미치는 fisetin의 효과. *생명과학회지*, 17: 64-69, 2007.

정은영, 이시경. 제주도 토착 우뚝가사리의 항산화활성 및 HaCaT 세포 재생효과. *대한피부미용학회지*, 8: 1-9,

2010.

조윤희. 피부, 영양 그리고 건강기능식품. *식품과학과산업*, 38: 8-15, 2005.

차재영, 조영수. 감귤류 플라보노이드의 생리 기능 활성. *한국농화학회지*, 44: 122-128, 2001.

Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor  $\kappa$ B in cancer cells versus normal cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 376: 338-346, 2000.

Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinai N. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J. Nutr.*, 130: 2243-2250, 2000.

Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptidic fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 49-53, 1998.

Chen YC, Shen SC, Lee WR, Lin HY, Ko CH, Shih CM, Yang LL. Wogonin and fisetin induction of apoptosis through activation of caspase 3 cascade and alternative expression of p21 protein in hepatocellular carcinoma cells SK-HEP-1. *Arch. Toxicol.*, 76: 351-359, 2002.

Higa S, Hirano T, Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, Suemura M, Kawase I, Tanake T. Fisetin, a flavonol, inhibits TH2-type cytokine production by activated human basophils. *J. Allergy Clin. Immun.*, 111: 1299-1306, 2003.

Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1841-1856, 2005.

Kelly EH, Anthony RT, Dennis JB. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 13: 572-584, 2002.

Khan N, Afaq F, Syed DN, Mukhtar H. Fisetin, a novel dietary flavonoid, causes apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer LNCaP cells. *Carcinogenesis*, 29: 1049-1056, 2008.

Kim GN, Jang HD. Flavonol content in the water extract of the mulberry (*Morus alba* L.) leaf and their

- antioxidant capacities, *J. Food Sci.*, 76: C869–C873, 2011.
- Lautraite S, Biqot-Lasserre D, Bars R, Carmichael N. Optimisation of cell-based assays for medium throughput screening of oxidative stress, *Toxicol. In Vitro*, 17: 207–220, 2003.
- Lim JK, Kang HJ, Kang SN, Lee BY. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent fractions of fine ginseng root, *Food Sci. Biotechnol.*, 18: 513–518, 2009.
- Maher P. A comparison of the neurotrophic activities of the flavonoid fisetin and some of its derivatives, *Free Radical Res.*, 40: 1105–1111, 2006.
- Oh CH, Kim GN, Lee SH, Lee JS, Jang HD. Effects of heat processing time on total phenolic content and antioxidant capacity of ginseng Jung Kwa, *J. Ginseng Res.*, 34: 198–204, 2010.
- Robert J, Els N, Danny EC, Petra G B, Klaske N, Paul AM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am. J. Clin. Nutr.*, 74: 418–425, 2001.
- Yao K, Zhang L, Zhang YD, Ye PP, Zhu N. The flavonoid, fisetin, inhibits UV radiation-induced oxidative stress and the activation of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling in human lens epithelial cells, *Mol. Vis.*, 14: 1865–1871, 2008.

