



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

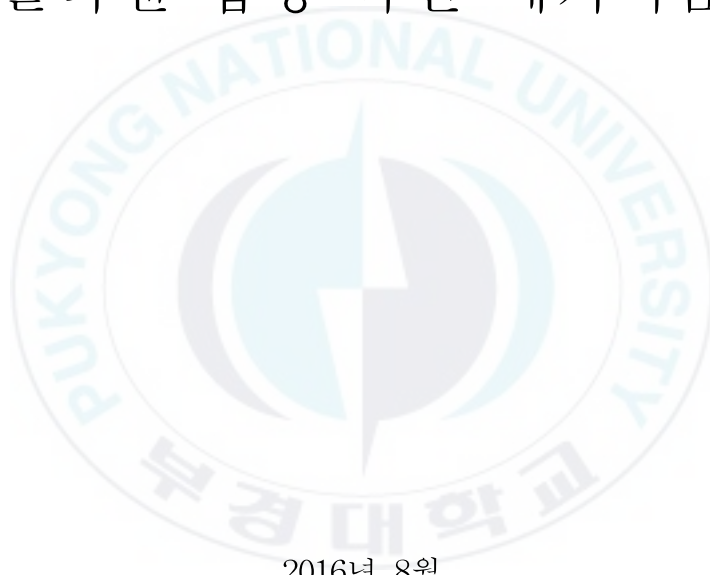
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

김(*Pyropia yezoensis*) peptide에
의한 인체 피부 섬유아세포에서의
콜라겐 합성 촉진 메커니즘



2016년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

식품생명과학과

김 초 룡

이 학 석 사 학 위 논 문

김(*Pyropia yezoensis*) peptide에
의한 인체 피부 섬유아세포에서의
콜라겐 합성 촉진 메커니즘

지도교수 남택정

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2016년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

식품생명과학과

김 초 룡

김초룡의 이학석사 학위논문을
인준함.

2016년 8월 26일



주 심 이학박사 정 운 주 (인)

위 원 이학박사 류 은 순 (인)

위 원 농학박사 남 택 정 (인)

목 차

LIST OF TABLE	i
LIST OF FIGURES	ii
ABBREVIATIONS	iv
ABSTRACT	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 재료	4
1) 시약 및 재료	4
2. 실험방법	5
1) 시료의 제조	5
2) 세포 배양	5
3) MTS assay	6
4) Type I procollagen EIA kit assay	6
5) Immunofluorescence analysis	6
6) TGF β -RI inhibitor 처리	7
7) Western blot analysis	7
① Total cell lysate 추출	7
② 단백질 발현 및 분석	8
8) Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)	8
① RNA 추출 및 cDNA 합성	8
② mRNA 발현 및 분석	9
9) 통계학적 처리	11

III. 결과 및 고찰	12
1. 김(<i>Pyropia yezoensis</i>) peptide (PYP)의 제조	12
2. PYP에 의한 Hs27 세포 독성 확인	14
3. PYP에 의한 콜라겐 합성 촉진 효과	16
1) Type 1 collagen 발현 증가	16
2) 엘라스틴(elastin)의 발현 증가	20
3) MMPs의 발현 감소 및 TIMPs의 발현 증가	23
4. PYP에 의한 콜라겐 합성 촉진 신호전달분석	28
1) TGF- β /Smad signal pathway에 미치는 영향	28
2) IGF-1 signal pathway에 미치는 영향	40
IV. 결론 및 요약	45
V. 참고 문헌	50

LIST OF TABLE

Table 1. Oligonucleotide sequences of the primer used in Real-Time PCR.



LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Purification of *P. yezoensis* peptide (PYP) on Shiseido capcell pak C18 column chromatography.
- Fig. 2. Cell cytotoxicity of PYP on Hs27 cells.
- Fig. 3. Effect of PYP treatment on type I procollagen synthesis in Hs27 cells.
- Fig. 4. PYP affects the protein expression of type I collagen in Hs27 cells.
- Fig. 5. PYP affects the mRNA expressions of COL1A1 and COL1A2 in Hs27 cells.
- Fig. 6. PYP affects the protein expression of elastin in Hs27 cells.
- Fig. 7. PYP affects the mRNA expression of elastin in Hs27 cells.
- Fig. 8. Effect of PYP treatment on protein expressions of collagen synthesis regulating enzymes in Hs27 cells.
- Fig. 9. PYP decreases the mRNA expression of MMP-1 in Hs27 cells.
- Fig. 10. PYP increases the mRNA expressions of TIMP-1, 2 in Hs27 cells.
- Fig. 11. Effect of PYP treatment on TGF- β 1 protein expression in Hs27 cells.
- Fig. 12. Effect of PYP treatment on TGF- β 1 mRNA expression in Hs27 cells.
- Fig. 13. Effect of PYP on MAPK signal pathway in Hs27 cells.
- Fig. 14. Effect of PYP on TGF- β /Smad signal pathway in Hs27 cells.
- Fig. 15. PYP increases the expression of Sp1 in Hs27 cells.
- Fig. 16. Effects of SB431542 on PYP-induced TGF- β /Smad signal pathway in Hs27 cells.
- Fig. 17. Effects of SB431542 on PYP-induced MMP-1 protein expression in Hs27 cells.
- Fig. 18. Effects of SB431542 on PYP-induced TIMP-1, 2 mRNA expressions in Hs27 cells.
- Fig. 19. Effects of SB431542 on PYP-induced COL1A1 and COL1A2 mRNA expressions in Hs27 cells.
- Fig. 20. PYP up-regulates IGF-1 protein expression in Hs27 cells.

Fig. 21. PYP activates IGF-1R signal pathway in Hs27 cells.

Fig. 22. PYP activates PI3K/Akt/mTOR/p70S6K signal pathway in Hs27 cells.

Fig. 23. Activation of TGF- β /Smad signaling pathway in Hs27 cells by PYP.

Fig. 24. Activation of IGF-1 signaling pathway in Hs27 cells by PYP.



ABBREVIATIONS

BCA : bicinchoninic acid
BSA : bovine serum albumin
cDNA : complementary DNA
COL1A1 : collagen, type I, alpha 1
COL1A2 : collagen, type I, alpha 2
DEPC : diethylpyrocarbonate
DMEM : dulbecco's modified eagle's medium
ECM : extracellular matrix
ERK : extracellular-signal related kinase
FBS : fetal bovine serum
GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
IGF-1 : insullin-like growth factor-1
IGF-1R : type I IGF receptor
IRS1 : insullin receptor substrate 1
JNK : c-jun N-terminal kinase
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MMPs : matrix metalloproteinases
mTOR : mammalian target of rapamycin
PBS : phosphate-buffered saline
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PYP : *Pyropia yezoensis* peptide
Real-time PCR : real-time polymerase chain reaction
RIPA buffer : radioimmunoprecipitation assay buffer
SDS-PAGE : sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

SFM : serum free medium

Sp1 : specificity protein 1

TGF- β : transforming growth factor-beta

TGF β -RI : transforming growth factor beta-receptor I

TGF β -RII : transforming growth factor beta-receptor II

TIMPs : tissue inhibitors of metalloproteinases



Mechanism of collagen synthesis by *Pyropia yezoensis* peptide in human dermal fibroblast Hs27 cells

Cho-Rong Kim

Department of Food and Life Science, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Pyropia yezoensis is a marine algae that exhibits anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-tumor and anti-aging activities. In this present study, we investigated the effect of *P. yezoensis* peptide (PYP) on collagen synthesis and the mechanism focusing on the TGF- β /Smad and IGF-1 signal pathways in human dermal fibroblast Hs27 cells.

Hs27 cells were incubated in serum-free medium with various concentrations of PYP (250, 500 and 1,000 ng/ml) for 24 h. Using the MTS assay, we found that PYP did not affect cell viability. Moreover, we confirmed that PYP increased type 1 collagen expression using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), western blot and real-time PCR analysis. In addition, we identified changes in various enzymes as well as the mechanism behind PYP-induced collagen synthesis. PYP decreased MMP-1 protein and mRNA levels and increased TIMP-1 and TIMP-2 protein and mRNA levels.

Transforming growth factor- β (TGF- β) plays important roles in regulating cellular processes such as cell growth, differentiation, migration, apoptosis

and ECM components. PYP increased TGF- β 1 ligand protein and mRNA levels. TGF- β 1 induces activation of various intracellular signal pathway including mitogen-activated protein kinases (MAPK) and TGF- β /Smad signal pathway. PYP activated TGF- β /Smad signal pathway, but did not influence into MAPK signal pathway. Furthermore, activated TGF- β /Smad signal pathway by treatment with PYP induced transcription factor specificity protein 1 (Sp1). To investigate effect of TGF- β /Smad signal pathway on PYP-induced collagen synthesis, cells were treated TGF β -RI inhibitor (10 μ M, SB431542) for 2 h. SB431542 reduced the increased COL1A1, COL1A2 and TIMP-1, 2 mRNA expression levels by treatment with PYP, and increased the decreased MMP-1 protein expression level by treatment with PYP.

Insullin-like growth factor-1 (IGF-1) regulates cell metabolism, differentiation, growth, survival and ECM component synthesis. PYP increased IGF-1 ligand expression and activated IGF-1 signal pathway including phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR)/ribosomal protein S6 kinase beta-1 (p70S6K) signal pathway.

These results indicate that PYP promotes collagen synthesis by activating both TGF- β /Smad and IGF-1 signal pathways. So, PYP could be a potential source of functional cosmetic and food materials to have effect of promoting collagen synthesis.

I. 서론

최근 경제수준의 향상과 현대의학의 발전으로 인해 평균수명이 증가되었으며, 사람들의 피부건강과 미용에 대한 관심이 증가되었다(Kim et al., 2008). 또한 피부의 노화를 억제하기 위해 다양한 연구가 진행되어 왔으며, 피부에 항노화 효과를 나타내는 기능성 화장품 및 식품들이 개발되고 있다(Mukherjee et al., 2011).

피부는 상피조직인 표피(epidermis)와 결체조직인 진피(epidermis) 그리고 피하지방층(subcutaneous)으로 이루어져 있다. 그 중 진피는 기질(ground substance)과 교원섬유(collagen fiber) 및 탄력섬유(elastic fiber) 등의 섬유성 단백질로 구성되어 있으며, 피부의 90% 이상을 구성하는 중요한 구조이다(Costin and Hearing, 2007). 진피에 존재하는 섬유아세포에 의해 세포외 기질(Extracellular matrix, ECM) 성분인 교원섬유와 탄력섬유 등 여러 다양한 기질 성분이 만들어진다. 진피 성분의 80-90%를 차지하는 단백질인 콜라겐은 피부에 장력을 제공해주고 탄력섬유와 결합하여 피부에 탄력성과 신축성을 부여해준다(Yoon et al., 2012). 콜라겐은 대표적으로 유형 I, II, III, IV, V, VI 등이 진피에 분포되어 있으며, 그 중 I 형이 약 80%, III 형이 약 15%의 비율을 차지한다. 콜라겐의 항상성은 여러 종류의 효소들의 작용으로 인해 유지된다. 콜라겐의 분해는 matrix metalloproteinases (MMPs)의 작용으로 인해 촉진되고, tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)에 의해 억제된다. 노화가 진행되면 MMPs의 발현은 서서히 증가되고 TIMPs의 발현은 줄어든다. 이는 콜라겐의 분해를 촉진해 피부 탄력을 감소시키고 피부의 노화를 촉진시키게 된다(Kim et al, 2010; Kähäri and Saarialho, 1997).

피부의 노화는 크게 연령의 증가에 따른 내인성 노화(intrinsic aging)와 자외선 및 스트레스 등의 외부 환경의 영향으로 인한 외인성 노화

(extrinsic aging)로 구분되어진다. 내인성 노화의 특징으로 피부에 가늘고 얇은 잔주름이 생기고 탄력이 감소된다. 그리고 콜라겐과 같은 세포외 기질 성분이 소실되어 피부의 장력과 탄성이 감소되며 혈관이 약화되어 쉽게 멍이 들게 된다. 이와 반대로 외인성 노화는 주로 자외선에 의한 노화현상이 특징적으로 나타난다. 내인성 노화에 비해 피부결이 거칠고 주름이 굵고 깊게 생기며 탄력 섬유가 증가하여 피부의 변성이 일어나고 기미, 주근깨 등의 색소침착현상이 나타난다(Naylor et al., 2011; Kammeyer and Luiten, 2015).

Transforming growth factor- β (TGF- β)는 세포의 성장, 분화, 이동, 세포 사멸 및 세포외 기질 성분의 생산과 같은 세포 내 여러 과정을 조절하는 중요한 역할을 한다(Dennler et al, 2002). TGF- β 는 콜라겐, 엘라스틴 및 피브로넥틴 등의 ECM 단백질의 합성을 유도하고 콜라겐 합성 및 profibrotic cytokine의 자극 등 다양한 메커니즘을 상향조절시킨다. TGF- β 는 1형과 2형의 수용체를 가지는데, 하위 신호전달경로를 활성화시키기 위해 TGF- β ligand가 세포 표면에 존재하는 2형 수용체(TGF β -RII)에 결합하면, 2형 수용체는 1형 수용체(TGF β -RI)에 결합하여 인산화를 시키고 하위 신호전달 경로가 활성화된다(Leask and Abraham, 2004).

Insullin-like growth factor-1 (IGF-1)은 세포의 성장, 증식, 분화, 생존, 세포외 기질 성분의 합성을 조절하는 주요한 성장인자이며(Edmondson et al., 2003), 수용체인 type I IGF receptor (IGF-1R)와의 결합을 통하여 하위 신호전달 경로들을 활성화시킨다. 활성화된 IGF-1R은 insullin receptor substrate 1 (IRS1)의 인산화를 유도하고 인산화된 IRS1은 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR)/ribosomal protein S6 kinase beta-1 (p70S6K) signal pathway를 활성화시켜 세포 내의 다양한 반응을 일으키게 된다(Tai et al., 2003).

최근 천연물 중 해조류의 풍부한 영양성분과 다양한 생리활성기능이 밝혀지면서 해조류를 이용한 기능성 식품 및 약품 등을 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중에서 김(*Pyropia yezoensis*)은 중국, 일본, 한국 등의 동아시아 지역에서 풍부하게 재배되는 홍조류의 한 종류로서, 건조중량의 25-40%의 탄수화물과 25-50%의 단백질을 포함하는 다양한 생리활성물질의 원천이다(Kitano et al., 2012). 또한 항산화효과(Nakayama et al., 1999), 항암효과(Kwon and Nam, 2006), 항피로효과(Tingting and Peimin, 2007), 항염증효과(Shin et al., 2011), 혈압저하효과(Qian et al., 2014)와 UVA에 의한 광노화 보호효과(Ryu et al., 2014) 등과 같은 다양한 생물학적 기능을 가진 것으로 알려져 있다. 이처럼 김의 다양한 생리활성기능이 연구되어졌지만, 인체 피부 섬유아세포에서의 콜라겐 합성 촉진 기능에 대한 연구는 아직 밝혀진 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 인체 피부 섬유아세포인 Hs27 세포에 김 peptide를 처리했을 때 세포 내 콜라겐 합성 촉진효과를 나타내는 것을 확인하였으며 이에 대한 작용 기전을 밝히고자 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 재료

본 실험에서 사용한 김 peptide는 PEPTRON (Daejeon, Korea)으로부터 합성하였다. 실험에 사용한 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)으로부터 구입한 인체 피부 섬유아세포주인 Hs27을 사용하였다. 세포배양에 사용된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin/streptomycin (P/S), Phosphate-buffered saline (PBS)는 Gibco BRL (Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)제품을 사용하였고 Trypsin, Bovine serum albumin (BSA), Protease inhibitor 등은 Sigma Chemical CO. (Logan, UT, USA)제품을 사용하였다. 세포의 배양과 생존율을 측정하기 위하여 MTS/PMS Solution (CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit)은 Promega에서 구입, 사용하였으며 세포 단백질 농도를 측정하기 위해 BCA protein Assay kit (Pierce, USA)를 구입, 사용하였다.

Western blot에서 Protein standard marker는 Dual color marker (BIO-RAD, USA)제품을 사용하였고, 사용한 각종 antibody는 Santa Cruz (CA, USA), Cell signaling (Beverly, MA, USA), Bethyl (Montgomery, TX, USA)에서 구입하였으며, TGF β -RI inhibitor는 SB431542 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) 제품을 사용하였다. Detection Reagent로 Super signal West Pico Luminol/Enhancer Solution과 Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution (Pierce, USA)을 이용해 Kodak film

(Rochester, NY, USA)에 감광하거나 Bioanalytical Imaging System C300 (Azure Biosystems, Inc., Dublin, CA, USA) 분석 장비로 단백질 밴드를 정량하였다. Real-time PCR에서 세포의 RNA 회수는 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였고, cDNA의 합성은 RevoScript™ RT preMix (Intron Biotechnology Inc., Seongnam, Korea)를 이용하였다. 분석 장비로는 Eco™ Real-Time PCR system (Illumina Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하였고, cDNA의 검출에 TOPreal™ qPCR 2X PreMIX SYBR Green (Enzynomics Inc., Deajeon, Korea)를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 시료의 제조

Pyropia yezoensis peptide (PYP)는 PEPTRON (Daejeon, Korea)으로부터 합성하였다. PYP는 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 탈이온수에 녹여 HPLC로 정제하였는데, HPLC로 사용한 칼럼은 Shiseido capcell pak C18 Column이며, 220 nm에서 나타나는 peak를 확인한 후, 0.1% TFA 내 acetonitrile 농도를 10~70% 까지 변화를 주어 1 ml/min 유속으로 용출시켰다.

2) 세포 배양

인체 피부 섬유아세포인 Hs27 (ATCC/CRL-1634) 세포는 10% FBS, 1% P/S를 첨가한 DMEM을 사용하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포가 80% 정도 confluent되면 PBS로 세척한 후 trypsin 처리하여 계대배양하고 배지는 2-3일 마다 교환하였으며, 15차 이하로 계

대배양한 세포를 실험에 사용하였다.

3) MTS assay

PYP가 Hs27 세포에 대하여 독성을 나타내는지 확인하기 위하여 MTS assay를 시행하였다. Hs27 세포를 48-well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 배양한 후에 PYP를 대조군과 함께 250, 500, 1,000 ng/ml의 농도로 처리하였다. 샘플처리 24시간 후 MTS/PMS solution (Promega, Medison, WI, USA)을 첨가하여 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 ELISA plate reader (BIO-RAD, USA)로 490nm 흡광도에서 측정하였다.

4) Type I procollagen EIA kit assay

Hs27 세포를 6-well plate에 1×10^6 cells/well의 밀도로 분주하고, 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 24시간 배양한 후에 PYP가 농도별로 포함된 serum free media (SFM)에 24시간 더 배양하였다. 배지를 제거하고 세포를 PBS로 2번 washing 한 뒤 cell extract buffer (PBS, 0.5% Triton X-100, 1mM EDTA, 1mM PMSF, pH 7.2)로 세포를 회수하여 원심분리(14,000 rpm, 10min, 4 °C) 후 상층액을 실험에 사용하였다. 상층액 내 procollagen 양은 procollagen type I C-peptide EIA kit (MK101, Takara, Japan)를 사용하여 측정하였으며, 총 단백질 양으로 보정하였다.

5) Immunofluorescence analysis

Hs27 세포를 8-well glass coverslip (SPL Lifesciences Co., Gyeonggi-do, Korea)에 5×10^4 cells/well 로 배양한 뒤, PYP를 대조군과

함께 250, 500, 1,000 ng/ml 농도로 24시간 동안 처리하였다. 그 후 세포를 차가운 PBS로 3회 세척한 뒤 4% paraformaldehyde 용액으로 15분 동안 반응해 고정시키고, 0.5% Triton X-100 용액에서 10분 동안 반응해 투과시킨 다음 1% BSA 용액에 1시간 동안 blocking 하였다. Primary antibody로 Anti-COL-1 (sc-59772, anti-mouse, 1:100)를 4 °C에서 overnight 반응시킨 후 Alexa Fluor® 488-conjugated secondary antibody (Invitrogen, 1:500)를 1시간 동안 처리하였으며, 2 µg/ml 농도로 희석한 DAPI 용액으로 핵을 염색시킨 뒤 chamber를 제거하고 slide에 mounting medium (sigma, M1289)을 처리한 후 커버 슬립으로 고정하여 형광현미경으로 관찰하였다.

6) TGFβ-R I inhibitor (SB431542) 처리

Hs27 세포를 10% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양한 다음 serum free-DMEM 배지로 교환하여 4시간 더 배양하였다. 4시간 경과 후, SB431542를 10 µM의 농도로 처리하였다. 2시간 후 PYP를 1,000 ng/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 실험에 사용하였다.

7) Western blot analysis

① Total cell lysate 추출

PYP를 농도별로 처리한 Hs27 세포를 PBS로 2회 세척하고 protease inhibitor (1 mg/ml aprotinin, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml pepstatin A, 200 mM Na₃VO₄, 500 mM NaF, 100 mM PMSF)를 첨가한 RIPA buffer (1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)를 분주하여 30분간 4 °C에서 방치한 후 얼음 위에서 회수한 cell lysate를 원심분리(14,000 rpm, 10 min, 4 °C)하여 그

상층액을 BCA protein assay kit로 단백질양을 정량하여 사용하였다.

② 단백질 발현 및 분석

30 μg 으로 정량한 단백질을 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 전기영동한 후 PVDF membrane (Millipore, USA)으로 Transfer하였다. 이 때 표준분자량을 확인하기 위해 dual color marker를 사용하였다. 전기영동한 membrane은 실온에서 1% BSA/TBS-T로 1시간 동안 blocking 시킨 후 확인하고자 하는 각각의 1차 antibody를 희석해 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 반응시킨 후 TBS-T로 10분간 3회 세척한 다음 2차 antibody를 1:10,000-20,000 비율로 희석하여 반응시켰다. 반응시킨 membrane을 다시 TBS-T로 10분간 3회 세척한 후 Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution과 Super Signal West Pico Luminol/Enhancer solution (Rockford, IL, USA)을 사용하여 KODAK X-ray film에 감광시키거나 Bioanalytical Imaging System C300 이미지 분석 장비로 단백질 밴드를 현상한 후 밴드의 밀도를 Science Lab 2005 (Fujifilm, Japan)를 이용하여 비교분석하였다.

8) Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)

① RNA 추출 및 cDNA 합성

RNA를 추출하기 위하여 TRIzol 용액을 이용한 phenol-chloroform 추출 기법을 사용하였다. TRIzol 용액을 각 well당 1 ml씩 넣어 회수하고, 200 μl 의 chloroform을 처리하여 잘 섞어준 뒤 4 $^{\circ}\text{C}$, 12,000 g에서 15분 동안 원심분리 하였다. 투명색의 상층액을 분리하여 isopropanol과 1:1의 비율

로 섞어준 뒤, 실온에서 10분간 반응 후 12,000 g에서 10분간 원심분리 하였다. 생성된 pellet을 1% DEPC water로 희석한 75% EtOH에 씻어내고 7,500 g에서 5분간 원심분리 하였다. 최종 추출된 pellet을 상온에서 10분간 건조한 뒤 0.1% DEPC water 50 μ l에 녹인 후, 60 $^{\circ}$ C에서 10분간 heating하여 RNase의 활성을 제거한 뒤 UV spectrometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 260/230, 260/280 nm의 ratio를 측정하여 순도가 확인된 RNA를 Reverse Transcriptase PreMix Kit를 사용하여 50 $^{\circ}$ C에서 1시간, 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

② mRNA 발현 및 분석

확인하고자 하는 각 유전자의 mRNA 발현을 확인하기 위해 real-time PCR을 실시하였다. Real-time PCR 반응은 총 20 μ l 내에 cDNA 2 μ l 와 10 μ l의 2X SYBR Green PreMIX, 5 pmol forward primer 1 μ l, 5 pmol reverse primer 1 μ l를 첨가하였고, 나머지는 RNase free 증류수로 채워주었다. Real-time PCR은 초기변성 95 $^{\circ}$ C에서 10분, 변성은 95 $^{\circ}$ C에서 10초, annealing은 60 $^{\circ}$ C에서 15초, 신장반응은 72 $^{\circ}$ C에서 15초로 하여 40 cycle을 진행했다. 모든 반응이 종료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve 분석을 실시하였으며, 결과는 housekeeping gene인 GAPDH의 유전자 발현량으로 normalization하였다. 실험에 사용된 각 primer sequence는 Table 1에 기록되어있다.

Table 1. Oligonucleotide sequences of the primer used in real-time PCR.

Gene name	Primer sequence
COL1A1	forward 5'-AGGGCCAAGACGAAGACATC-3' reverse 5'-AGATCACGTCATCGCACAACA-3'
COL1A2	forward 5'-TCTGGATGGATTGAAGGGACA-3' reverse 5'-CCAACACGTCCTCTCTCACC-3'
elastin	forward 5'-CTTCAGAGCAGTTCCCATTC-3' reverse 5'-AATCCCCAAATATCCAGGACAA-3'
MMP-1	forward 5'-CCCAAAAGCGTGTGACAGTAAG-3' reverse 5'-CTTCCGGGTAGAAGGGATTTG-3'
TIMP-1	forward 5'-TGACATCCGGTTCGTCTACA-3' reverse 5'-TGCAGTTTTCCAGCAATGAG-3'
TIMP-2	forward 5'-GCGGTCAGTGAGAAGGAAGTGGA-3' reverse 5'-GAGGAGGGGGCCGTGTAGATAAAC-3'
TGF- β 1	forward 5'-AGCGACTCGCCAGAGTGGTTA-3' reverse 5'-GCAGTGTGTTATCCCTGCTGTCA-3'
IGF-1	forward 5'-TCTTCAGTTCGTGTGTGGAGACAG-3' reverse 5'-GGGTGCGCAATACATCTCCAG-3'
GAPDH	forward 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3' reverse 5'-TGGTGGTCCAGGGGTCTTAC-3'

9) 통계학적 처리

본 실험의 분석결과는 각각의 군별로 평균과 표준편차(mean±S.D.)를 사용하여 표기하였으며, 모든 자료는 window용 SPSS 프로그램(Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 처리하였고, 반복측정에 의한 ANOVA test와 Duncan's multiple range test를 적용하였다. 이 때, 모든 통계적 유의도 수준은 $p < 0.05$ 에서 살펴 보았다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 김(*Pyropia yezoensis*) peptide의 제조

김(*Pyropia yezoensis*) peptide는 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 탈이온수에 녹여 Shiseido capcell pak C18 Column의 HPLC로 정제하여 220 nm의 범위에서 peak를 확인한 후(Fig. 1), 0.1% TFA 내 acetonitrile 농도를 10~70%까지 변화를 주어 1 ml/min 유속으로 용출시켰다. 이와 같은 시료의 분자량은 Mass analysis (HP 1100 Series LC/MSD)를 이용해 1,622 Da 위치에서 확인하였으며 Sequence는 D-P-K-G-K-Q-Q-A-I-H-V-A-P-S-F 이다. 본 실험에 사용된 시료는 김 peptide로써 PYP로 명명하였다.

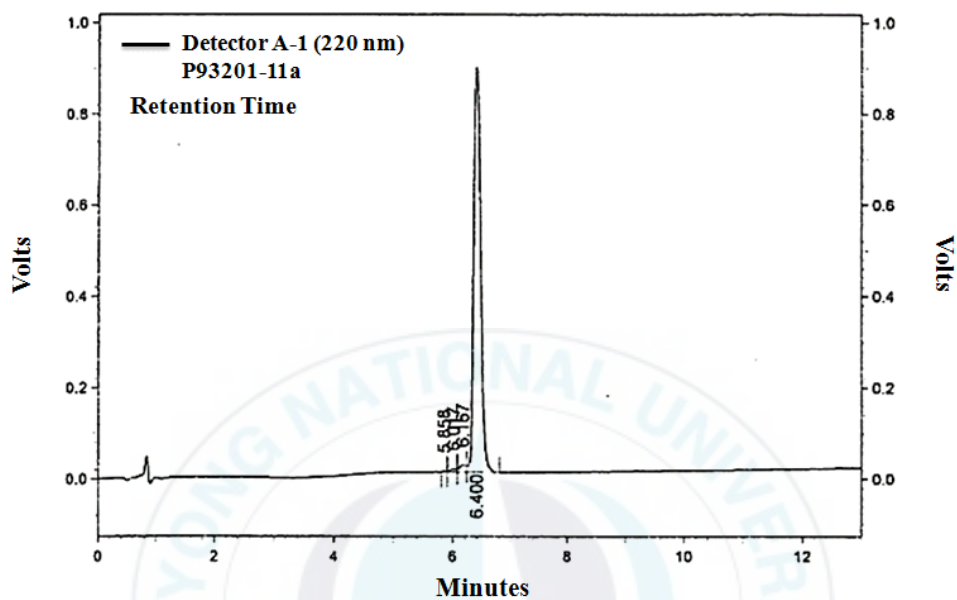


Fig. 1. Purification of *P. yezoensis* peptide (PYP) on Shiseido capcell pak C18 column chromatography.

2. PYP에 의한 Hs27 세포독성 확인

PYP의 Hs27 세포에 대한 독성을 조사하기 위하여 MTS assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. Hs27 세포에 PYP를 대조군과 함께 250, 500, 1,000 ng/ml 농도로 24시간 처리하였다.

MTS 분석 결과, PYP는 Fig. 2에서 나타난 것처럼 PYP 처리군이 대조군과 비교하여 별다른 차이가 없으므로 PYP가 세포생존율에는 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 PYP가 Hs27 세포 성장과 유지에 있어서 변화를 나타내지 않았으므로 위의 농도로 본 실험을 진행하였다.



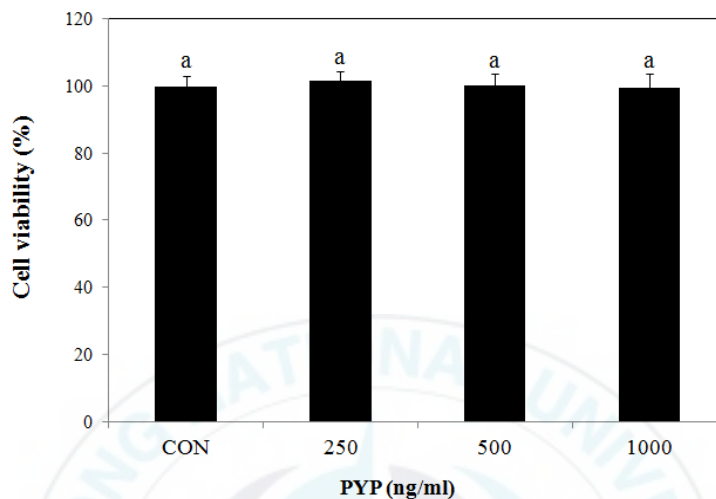


Fig. 2. Cell cytotoxicity of PYP on Hs27 cells. Hs27 cells were seeded in 48-well plate at a density of 1×10^4 cells/well with medium supplemented with 10% FBS. After incubation for 24 h, cells were treated with PYP in the indicated concentrations for 24 h. The cell viability was confirmed by using MTS assay. The results indicated mean $\pm$ S.D. in the three independent experiments.

3. PYP에 의한 Hs27 세포 콜라겐 합성 촉진 효과

1) Type I collagen 발현 증가

앞선 실험에서 Hs27 세포에 대한 PYP의 독성이 없음을 확인하였다. 이후 PYP의 피부노화방지에 대한 효과가 있는지 확인하기 위하여 Hs27 세포에 PYP를 24시간 처리한 후 콜라겐 합성 정도의 변화를 확인하였다. 피부의 노화는 진피 속에 존재하는 콜라겐 분해와 연결된다. 콜라겐은 세포외 기질에 존재하는 주요 단백질 중의 하나로 피부의 지지체 역할을 한다. 인체는 나이가 들어감에 따라 피부 구조를 지지하던 콜라겐이 엘라스틴과 함께 서서히 분해되어 감소하게 되며, 이는 피부의 탄력을 무너뜨리고 주름 생성을 유발 시킨다(Kim et al., 2010).

콜라겐은 procollagen 전구체로부터 합성되며, 각각 COL1A1 (collagen, type I, alpha 1), COL1A2 (collagen, type I, alpha 2) 유전자로부터 발현되는 $\alpha 1$ 사슬 두 개와 $\alpha 2$ 사슬 한 개가 3중 나선 형태로 꼬여서 생성된다. 그리고 procollagen은 아미노말단(N-terminal)과 카복시말단(C-terminal)에 propeptide라 불리는 peptide sequence를 가지고 있으며, 이러한 특이 peptide sequence를 이용해 procollagen의 양을 측정할 수 있다(Lee et al., 2008; Rossert and Dupont, 1999).

콜라겐의 발현 변화를 알아보기 위해 procollagen type I c-peptide EIA kit를 이용하여 procollagen의 생성량을 측정하였다. 분석 결과, 대조군에 비교하여 PYP를 처리한 군(250, 500, 1,000 ng/ml)의 procollagen양이 9.9%, 21.0%, 34.9%로 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 3). 그리고 type I collagen의 단백질 발현과 COL1A1과 COL1A2의 mRNA 발현을 western blot, immunofluorescence analysis 그리고 real-time PCR 방법으로 확인한 결과, procollagen의 결과와 동일하게 모두 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 4, Fig. 5).

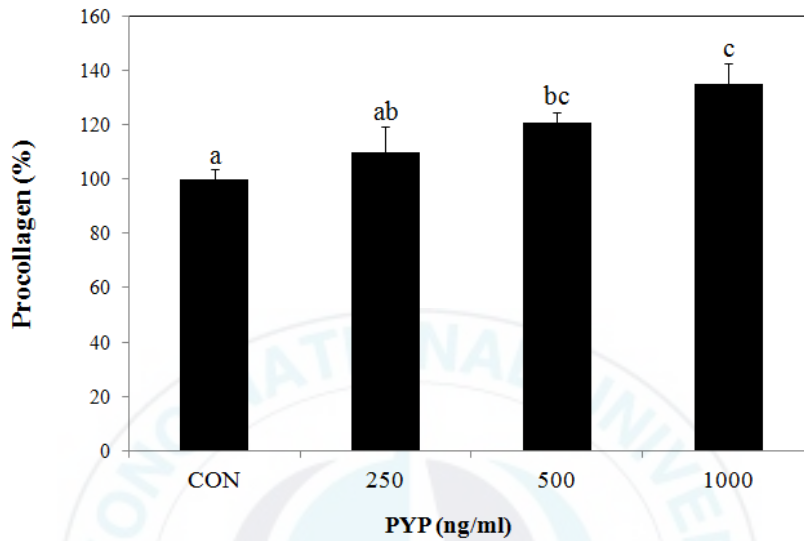


Fig. 3. Effect of PYP treatment on type I procollagen synthesis in Hs27 cells. Hs27 cells were seeded in 6-well plate at a density of 1×10^6 cells/well with medium supplemented with 10% FBS. After incubation for 24 h, cells were treated with PYP in the indicated concentrations for 24 h. The pellet were collected from each well and procollagen type I c-peptide was determined using the EIA kit. The results indicated mean $\pm$ S.D. in the three independent experiments.

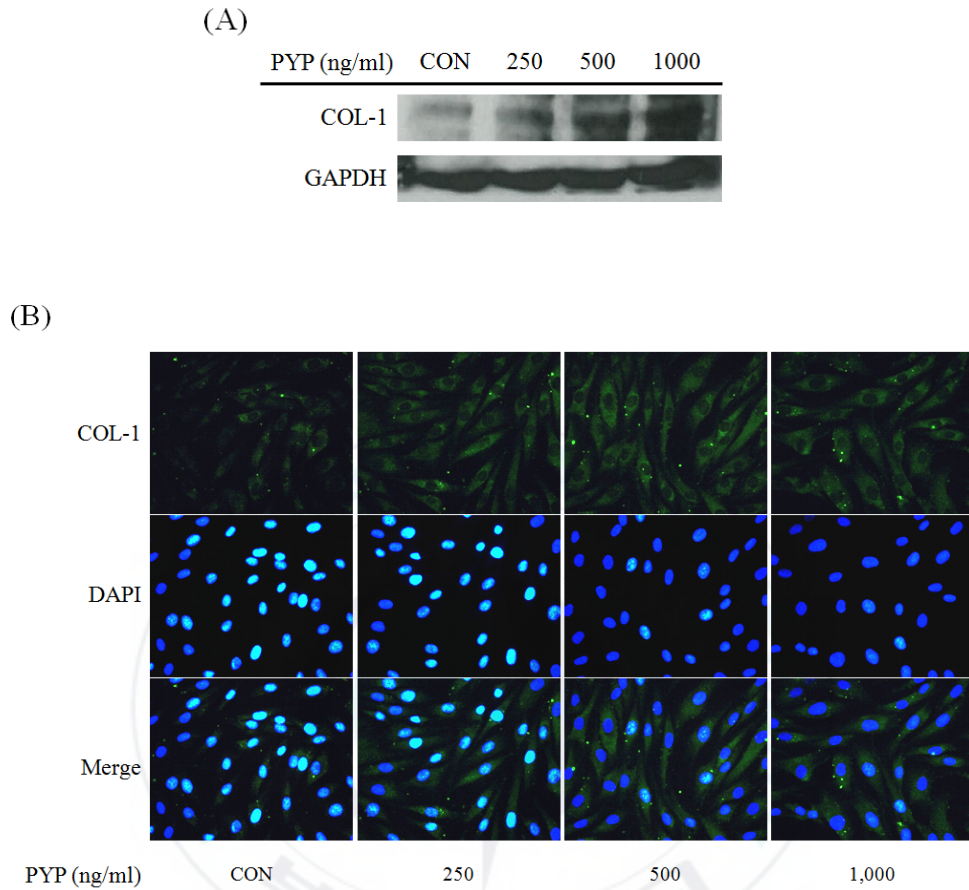


Fig. 4. PYP affects the protein expression of type I collagen in Hs27 cells. Hs27 cells were treated with indicated concentrations of PYP for 24 h. (A) Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blot using anti-COL-1 and anti-GAPDH antibodies. (B) Type 1 collagen proteins were probed by anti-COL-1 primary antibody and Alexa Fluor[®] 488-conjugated secondary antibody. The nuclei were stained with DAPI and the images were captured by confocal microscopy analysis.

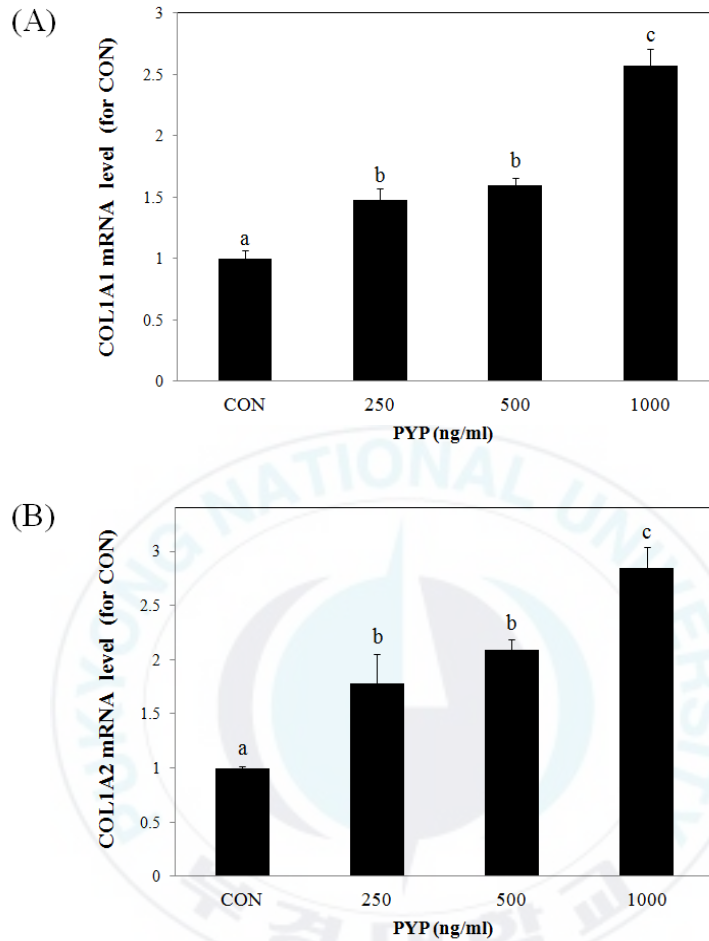


Fig. 5. PYP affects the mRNA expressions of COL1A1 and COL1A2 in Hs27 cells. Cells were treated with PYP for 24 h. cDNA extracts were prepared and analyzed by real-time PCR using (A) COL1A1, (B) COL1A2 and GAPDH primers.

2) 엘라스틴(elastin)의 발현 증가

엘라스틴은 피부 건조 중량의 약 0.6%를 차지하는 경단백질로 진피의 콜라겐과 콜라겐 사이에 존재하고 결합조직으로 얹혀있으며, 탄력성이 있어 피부에 유연성과 신축성을 부여한다. 엘라스틴의 구성 아미노산은 소수성 아미노산인 프롤린(proline)과 글리신(glycine)이 많이 함유되어 있다. 엘라스틴의 기본단위는 트로포엘라스틴(tropoelastin)이며, 이것의 결합을 통해 엘라스틴이 생성된다(Ryhanen and Uitto, 1983; Debelle and Tamburro, 1999). 나이가 들면서 진피에 존재하는 콜라겐이 파괴되고, 이와 함께 엘라스틴의 수와 직경이 감소하며 잘게 끊어진 것처럼 길이가 짧아진다. 이로 인해 피부의 탄력이 감소하여 피부가 늘어지고 주름이 생기게 된다(Sephel and Davidson, 1986). 노화로 인한 피부의 엘라스틴 함량의 감소를 방지하는 것이 피부 노화 방지에 중요하게 작용하기 때문에, 본 실험에서 PYP가 콜라겐과 마찬가지로 엘라스틴의 합성을 촉진시키는지 확인하였다.

Hs27 세포에 PYP를 24시간 처리 후 western blot과 real-time PCR을 통해 엘라스틴의 단백질과 mRNA 발현 변화를 측정하였다. 분석 결과, 대조군에 비교하여 PYP 처리 군에서 엘라스틴의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6, Fig. 7).

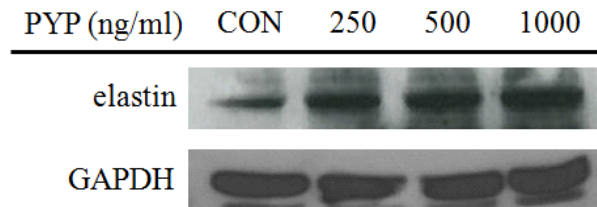


Fig. 6. PYP affects the protein expression of elastin in Hs27 cells. Cells were treated with PYP for 24 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blot using anti-elastin and anti-GAPDH antibodies.

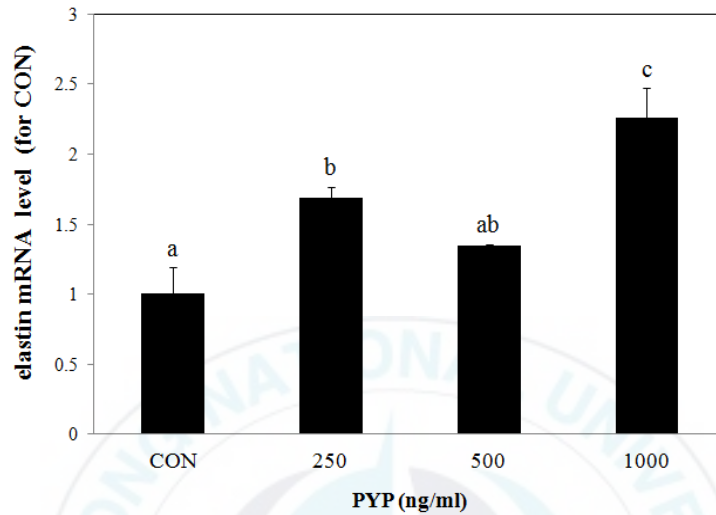


Fig. 7. PYP affects the mRNA expression of elastin in Hs27 cells. Cells were treated with PYP for 24 h. cDNA extracts were prepared and analyzed by real-time PCR using elastin and GAPDH primers.

3) MMPs의 발현 감소 및 TIMPs의 발현 증가

MMPs는 아연(zinc) 의존성 중성 단백질 분해효소군으로 세포외 기질 성분의 분해에 관여하는 주요 효소이다. 이는 구조와 기질특이성에 따라 Collagenases [MMP-1 (collagenase 1), MMP-8 (collagenase 2), MMP-13 (collagenase 3), MMP-18 (collagenase 4)], Gelatinases [MMP-2 (gelatinase A), MMP-9 (gelatinase B)], Stromelysins [MMP-3 (stromelysin 1), MMP-10 (stromelysin 2), MMP-11 (stromelysin 3)], Matrilysins [MMP-7 (matrilysin 1), MMP-26 (matrilysin 2)], Membrane-type MMPs [MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMP), MMP-16 (MT3-MMP), MMP-17 (MT4-MMP)]와 others MMPs로 분류되며 배아 발달, 형태 발생, 조직 재생 등과 같은 일반적인 생물학적 과정에서 ECM 성분을 제거하는 역할을 수행하는 필수적인 효소이다. 또한 염증, 섬유증, 관절염, 폐 질환 및 암을 비롯한 많은 주요 병리학적 과정에 관련되어있다. 그리고 피부의 노화과정에도 매우 중요한 인자로 작용하는데, 그 중에서 특히 MMP-1이 콜라겐을 특이적으로 분해시켜 피부의 노화를 촉진시키는 주요 역할을 한다(Peng et al., 2012; McCawley and Matrisian, 2000).

콜라겐을 분해시키는 MMPs는 이들의 내재성 억제제인 TIMPs에 의해 그 작용이 조절된다. 즉 TIMPs는 세포외 기질을 분해시키는 MMPs의 중요 조절자로서 콜라겐의 분해를 억제시키는 작용을 담당한다. 이들은 21-30 kDa의 분자량을 가지며 TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4 등의 4종이 알려져 있다. 이들은 다양한 유형의 세포에 의해 발현되며 4종 모두 MMPs의 활성을 억제시킨다(Ries, 2014).

피부 노화를 방지하기 위해 피부 진피의 상당 부분을 차지하는 콜라겐의 분해를 억제하는 것이 중요하다. 앞의 실험에서 PYP에 의한 콜라겐 합성 증가를 확인하였고, 이를 바탕으로 Hs27 세포에서의 콜라겐 분해와

합성을 조절하는 효소 MMP-1과 TIMP-1, TIMP-2의 단백질 및 mRNA의 발현 변화를 western blot과 real-time PCR을 통해 확인하였다. 그 결과, PYP를 농도별로 24시간 처리하였을 때 대조군에 비해 MMP-1의 발현이 농도 의존적으로 감소하였고, TIMP-1과 TIMP-2의 발현은 증가하였다(Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10). 이러한 결과들을 토대로 PYP가 Hs27 세포 내에서 MMP-1과 TIMP-1, TIMP-2 발현을 조절하여 콜라겐 합성을 촉진하는 것으로 추측된다.



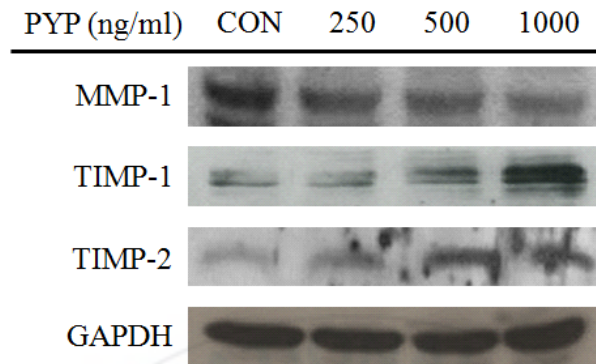


Fig. 8. Effect of PYP treatment on protein expressions of collagen synthesis regulating enzymes in Hs27 cells. Cells were treated with PYP for 24 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blot using anti-MMP-1, anti-TIMP-1, anti-TIMP-2 and anti-GAPDH antibodies.

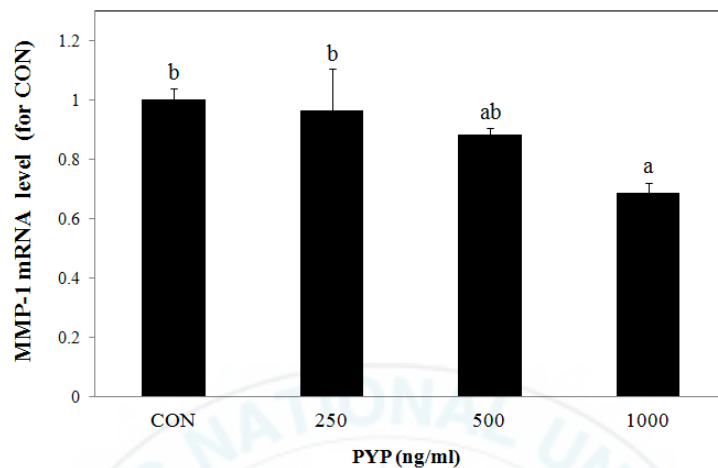


Fig. 9. PYP decreases the mRNA expression of MMP-1 in Hs27 cells. Cells were treated with PYP for 24 h. cDNA extracts were prepared and analyzed by real-time PCR using MMP-1 and GAPDH primers.

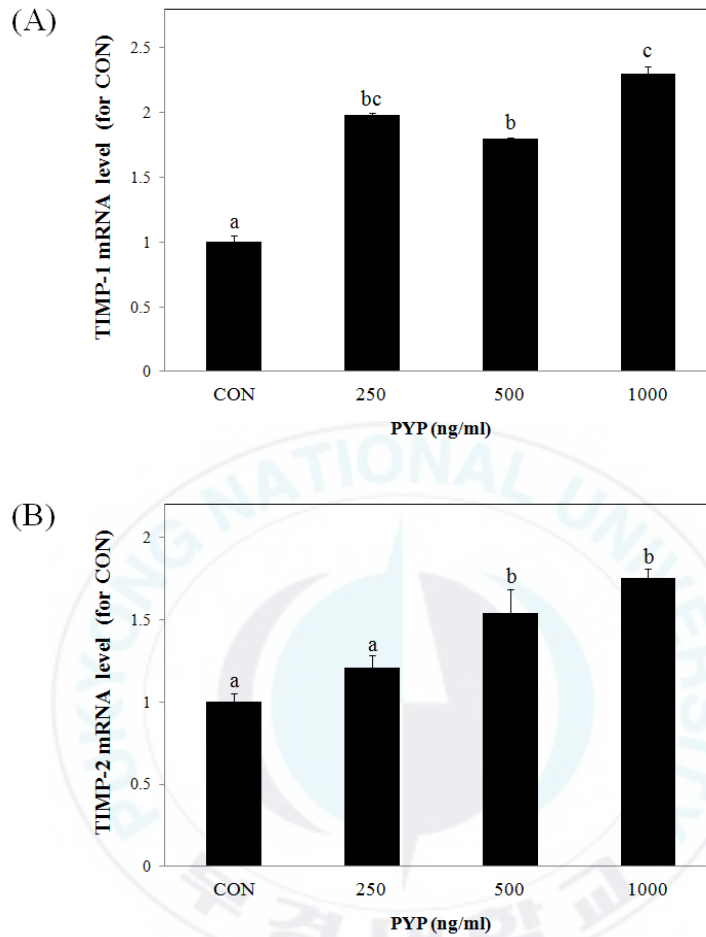


Fig. 10. PYP increases the mRNA expressions of TIMP-1, 2 in Hs27 cells. Cells were treated with PYP for 24 h. cDNA extracts were prepared and analyzed by real-time PCR using (A) TIMP-1, (B) TIMP-2 and GAPDH primers.

4. PYP에 의한 콜라겐 합성 촉진 신호전달분석

1) TGF- β /Smad signal pathway에 미치는 영향

PYP를 농도별로 24시간 처리한 Hs27 세포에서의 콜라겐 합성 촉진에 관여하는 주요인자로 알려진 TGF- β 1의(Zhao et al., 2015) 단백질과 mRNA의 발현 증가를 확인하였다(Fig. 11, Fig. 12). TGF- β ligand는 TGF β -RII에 결합을 하면, TGF β -RII가 TGF β -RI에 결합함과 함께 인산화 시킨다. 앞의 단계를 거쳐 활성화된 수용체 복합체로 인해 하위 경로가 활성화가 된다. 콜라겐 합성 조절에 관여하는 TGF- β 로 유도되는 하위 경로로는 대표적으로 Smad-independent 경로 중 하나인 mitogen activated protein kinases (MAPKs) pathway가 존재하고 Smad-dependent 경로인 TGF- β /Smad pathway가 존재한다. MAPKs에는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 kinase 그리고 c-Jun N-terminal kinase (JNK)가 포함되어 있으며 이들은 upstream MAPK kinases에 의해 인산화되어 활성화된다. 그리고 TGF- β /Smad pathway는 활성화된 수용체 복합체가 하위 인자인 receptor-activated smads (R-Smads, Smad2/3)를 인산화 시키고, 여기에 common-smad (Co-Smad, Smad4)가 결합을 하여 Smad2/3/4 복합체를 형성한다. Smad2/3/4 복합체는 이후에 세포질에서 핵 내로 이동해 여러 유전자들의 전사를 유도시킨다. 그리고 inhibitory Smad인 Smad7이 앞의 signal pathway의 활성을 억제시킨다(Leask and Abraham, 2004).

PYP를 24시간 처리한 Hs27 세포에서 MAPK signal pathway와 TGF- β /Smad signal pathway에 어떠한 영향을 미치는지 western blot을 통해 알아보았다. 분석 결과 MAPK family인 p-ERK1/2, p-p38, p-JNK 모두 단백질 발현의 변화는 없었고(Fig. 13), TGF- β /Smad signal pathway의 p-Smad2/3 발현은 증가하였으며, Smad7의 발현은 감소하였다(Fig. 14).

이 결과를 통해 PYP가 TGF- β ligand에 의해 유도되는 하위 경로 중 MAPK signal pathway에는 영향을 미치지 않고, TGF- β /Smad signal pathway를 활성화시켜 콜라겐 합성을 촉진시키는 것으로 확인된다.

앞의 결과를 토대로 TGF- β /Smad signal pathway의 활성화로 인해 유도되는 전사인자 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. Specificity protein 1 (Sp1)은 GC-rich 프로모터에 결합하는 zinc finger 전사인자로 세포의 종양형성과 사멸, 세포주기조절, 신생혈관형성 등과 같은 과정에 관여한다(Wierstra, 2008). 그리고 Sp1은 Smad2/3/4 복합체와 상호작용하여 TGF- β 로 인해 유도되는 전사반응을 조절한다고 알려져 있다. Sp1은 또한 인체 피부 섬유아세포에서 COL1A1과 COL1A2 프로모터에 결합하여 type I procollagen의 발현을 촉진하는 것으로 보고되었다(Park et al., 2012; Zhang et al., 2000).

TGF- β /Smad signal pathway의 활성을 통한 콜라겐 합성 촉진이 Sp1 전사인자의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 Hs27 세포에 PYP를 24시간 처리한 후, Sp1 단백질 발현 변화를 western blot을 통해 측정하였다. 분석 결과, PYP에 의해 Sp1의 단백질 발현이 대조군에 비하여 증가하였다. 이 결과를 통해 PYP가 TGF- β /Smad signal pathway를 활성화시키고, 이로 인해 Sp1의 전사가 증가되어 콜라겐의 합성을 촉진시키는 것으로 확인된다(Fig. 15).

또한, PYP에 의한 콜라겐 합성 증가가 TGF- β /Smad signal pathway의 활성화와 연관이 있는지 확인하기 위해 TGF β -RI의 inhibitor인 SB431542를 10 μ M 농도로 2시간 전처리 후 PYP를 24시간 처리하여 TGF- β /Smad signal pathway 관련 단백질 발현 변화와 콜라겐 발현 변화 그리고 콜라겐 합성 조절 효소 MMP-1, TIMP-1, 2의 단백질 및 mRNA의 발현 변화를 western blot과 real-time PCR을 통해 확인하였다.

먼저 PYP 처리로 증가되었던 세포 내 p-Smad2와 p-Smad3의 발현이

SB431542 처리로 인해 감소됨을 확인하였다(Fig. 16). 또한 콜라겐 합성 조절 효소들의 발현 변화를 확인한 결과, PYP 처리로 감소되었던 MMP-1의 단백질 발현은 SB431542에 의해 증가하였고(Fig. 17), 증가되었던 TIMP-1, 2의 mRNA의 발현은 감소되었으며(Fig. 18), PYP 처리로 증가하였던 COL1A1과 COL1A2의 mRNA 발현 또한 SB431542 처리에 의해 감소하였다(Fig. 19). 따라서 PYP를 처리한 Hs27 세포의 콜라겐 합성 촉진효과와 콜라겐 합성 조절 효소 MMP-1과 TIMP-1, 2의 발현은 TGF- β /Smad signal pathway의 영향에 의한 것으로 확인되었다.



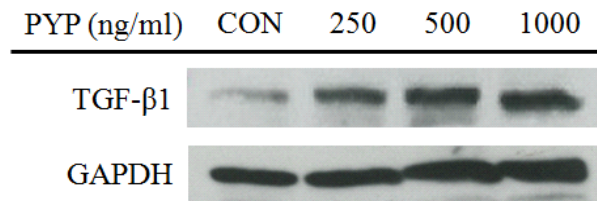


Fig. 11. Effect of PYP treatment on TGF- β 1 protein expression in Hs27 cells. Cells were treated with PYP for 24 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blot using anti-TGF- β 1 and anti-GAPDH antibodies.

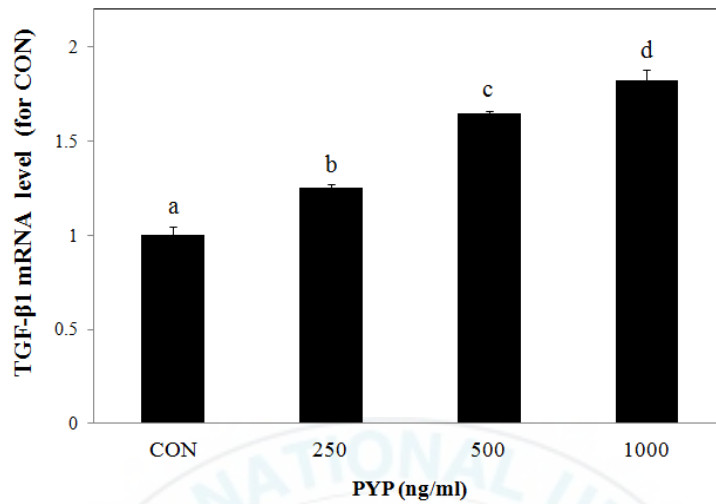


Fig. 12. Effect of PYP treatment on TGF-β1 mRNA expression in Hs27 cells. Cells were treated with PYP for 24 h. cDNA extracts were prepared and analyzed by real-time PCR using TGF-β1 and GAPDH primers.

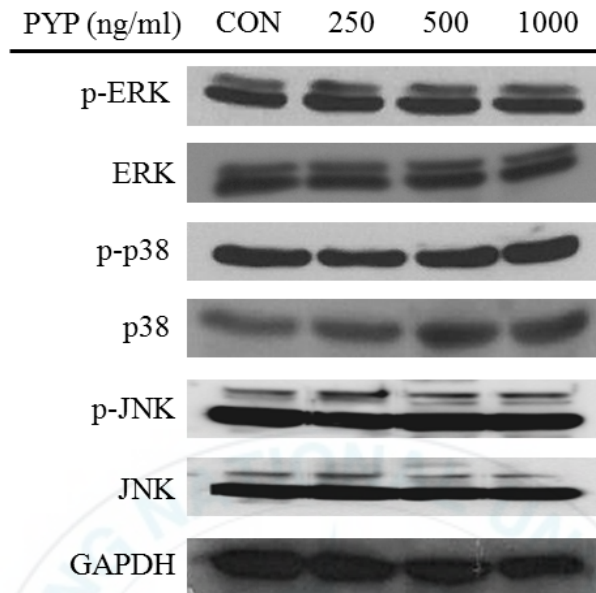


Fig. 13. Effect of PYP on MAPK signal pathway in Hs27 cells. Cells were treated with PYP for 24 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blot using anti-p-ERK, anti-ERK, anti-p-p38, anti-p38, anti-p-JNK, anti-JNK and anti-GAPDH antibodies.

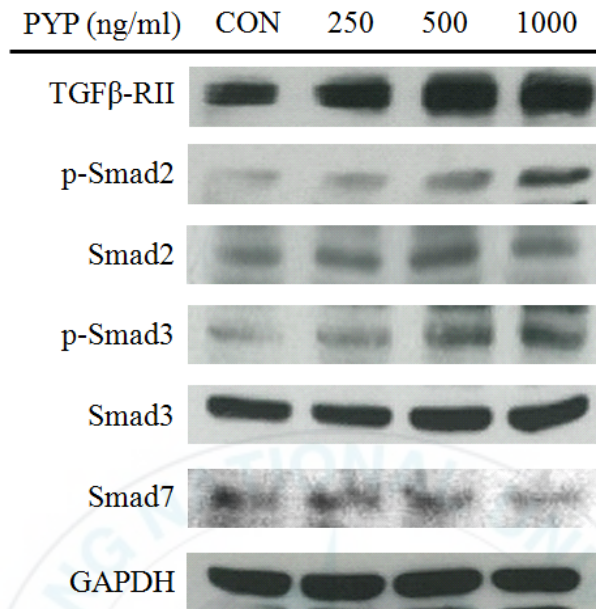


Fig. 14. Effect of PYP on TGF- β /Smad signal pathway in Hs27 cells. Cells were treated with PYP for 24 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blot using anti-TGF β -RII, anti-p-Smad2 anti-Smad2, anti-p-Smad3, anti-Smad3, anti-Smad7 and anti-GAPDH antibodies.

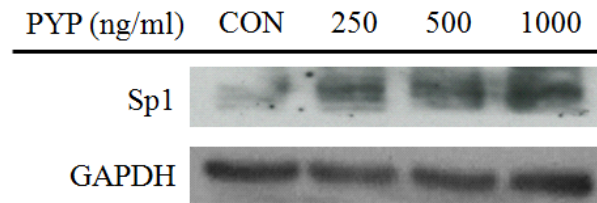
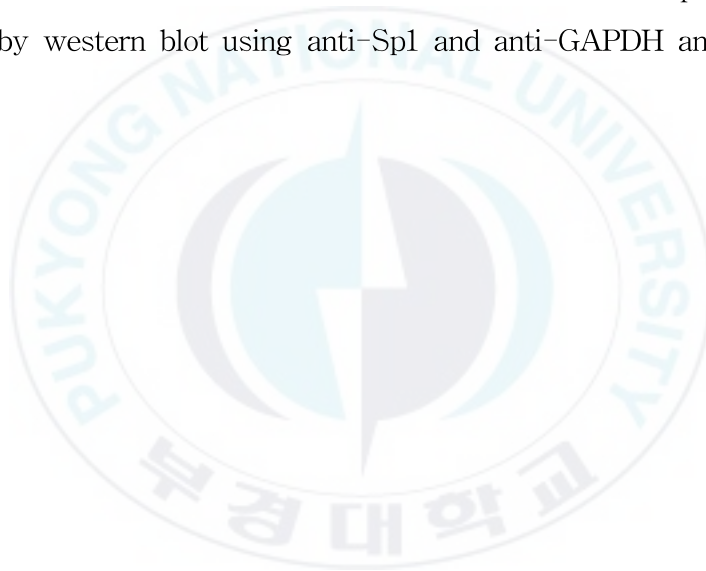


Fig. 15. PYP increases the expression of Sp1 in Hs27 cells. Cells were treated with PYP for 24 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blot using anti-Sp1 and anti-GAPDH antibodies.



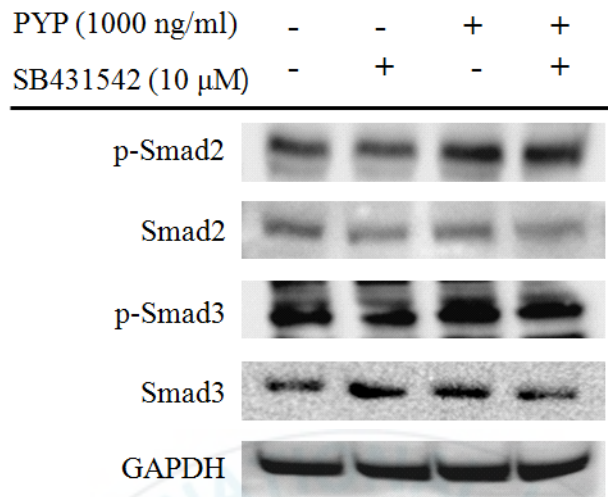


Fig. 16. Effects of SB431542 on PYP-induced TGF- β /Smad signal pathway in Hs27 cells. Cells were pretreated with SB431542 (10 μ M) for 2 h and treated with PYP for 24 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blot using anti-p-Smad2, anti-Smad2, anti-p-Smad3, anti-Smad3 and anti-GAPDH antibodies.

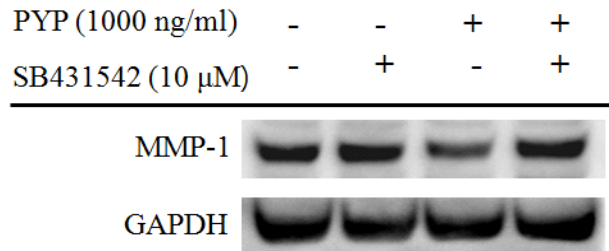


Fig. 17. Effects of SB431542 on PYP-induced MMP-1 protein expression in Hs27 cells. Cells were pretreated with SB431542 (10 μ M) for 2 h and treated with PYP for 24 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blot using anti-MMP-1 and anti-GAPDH antibodies.

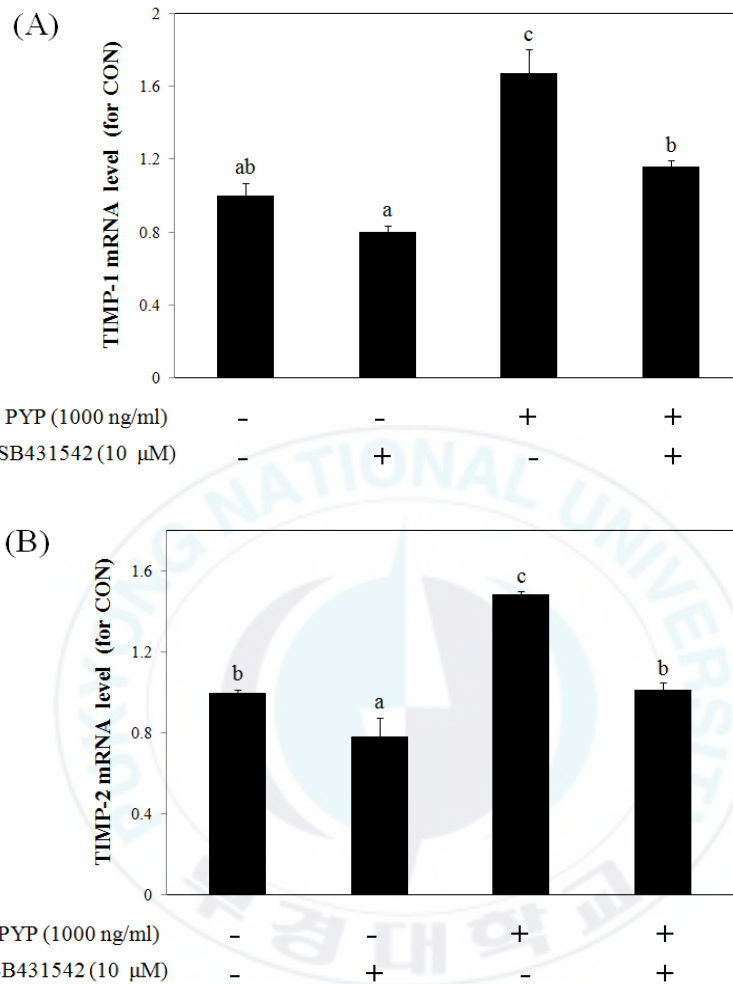


Fig. 18. Effects of SB431542 on PYP-induced TIMP-1, 2 mRNA expressions in Hs27 cells. Cells were pretreated with SB431542 (10 μ M) for 2 h and treated with PYP for 24 h. cDNA extracts were prepared and analyzed by real-time PCR using (A) TIMP-1, (B) TIMP-2 and GAPDH primers.

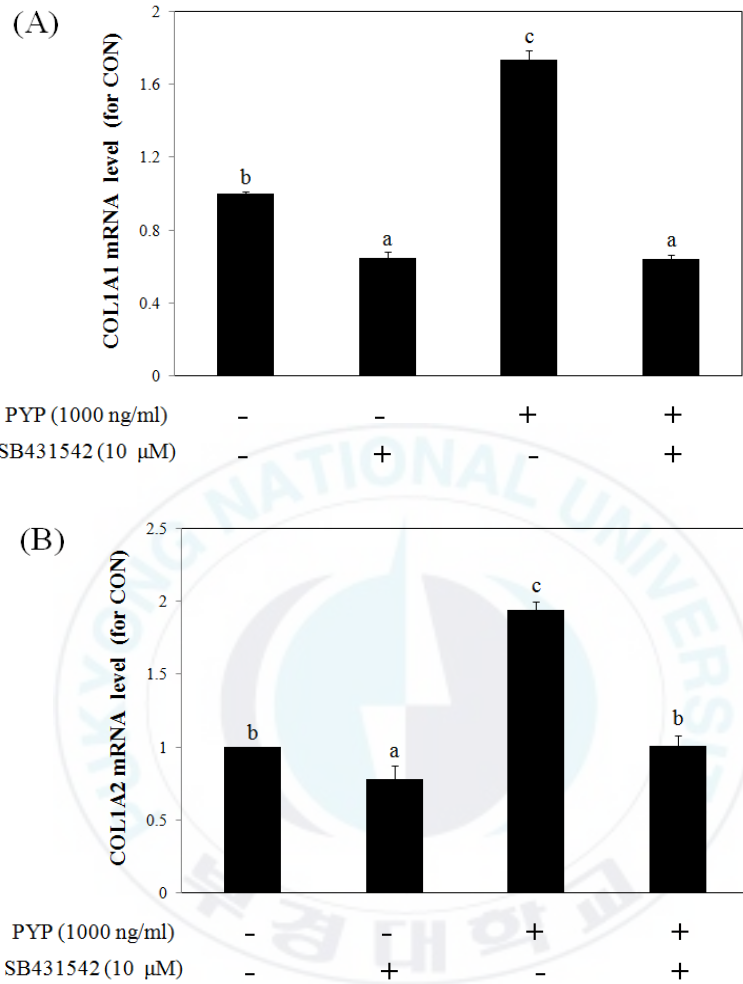


Fig. 19. Effects of SB431542 on PYP-induced COL1A1 and COL1A2 mRNA expressions in Hs27 cells. Cells were pretreated with SB431542 (10 μ M) for 2 h and treated with PYP for 24 h. cDNA extracts were prepared and analyzed by real-time PCR using (A) COL1A1, (B) COL1A2 and GAPDH primers.

2) IGF-1 signal pathway에 미치는 영향

IGF-1은 생체 내에서 세포의 대사, 분화, 성장, 생존에 관여하며 진피 섬유아세포에서 콜라겐과 같은 세포외 기질 생성물의 합성을 조절하며, disulfide bonds로 결합되어 있는 내부분자를 가진 한 개의 사슬로 이루어진 polypeptide이다(Yu and Rohan, 2000). IGF-1은 성장 호르몬에 의해 생산이 조절되며 주로 간세포에서 합성된다고 알려졌지만 이후 체내 대부분의 조직에서 발견되는 것으로 밝혀졌다. IGF-1의 세포 내 작용은 IGF-1R에 의해 매개되어 반응이 제시된다. IGF-1R은 각각 2개의 extracellular domain α -단위소체와 세포막에 존재하는 β -단위소체를 포함하는 $\alpha_2\beta_2$ 형의 heterotetramer 단백질 복합체이다(Ullrich et al., 1986). IGF-1이 IGF-1R의 α -단위소체에 결합하면 β -단위소체의 자동인산화가 발생하며 IGF-1R의 tyrosine kinase의 활성을 촉진하여 하위 신호전달 경로를 활성화시키게 된다(LeRoith et al., 1995). 위의 경로를 통해 insulin-receptor substrate 1 (IRS1)의 N-terminus에 존재하는 pleckstrin homology (PH) domain과 PTB domain이 IGF-1R에 결합하여 인산화가 유도되어진다. 인산화된 IRS1은 PI3K의 p85 regulatory subunit과 결합하여 하위 신호전달자인 Akt와 mTOR가 차례대로 활성화되고 이로 인해 PI3K/Akt/mTOR 경로가 상향조절 되어 세포 내 여러 반응을 촉진 시킨다(Vanhaesebroeck et al., 1997).

앞에서 IGF-1이 콜라겐의 합성을 조절한다고 기술하였는데, 이러한 IGF-1의 콜라겐 합성능은 IGF-1 signal pathway와 그 하위경로인 PI3K/Akt/mTOR/p70S6K signal pathway 활성화에 의해 나타난다. Bujor et al. (2008)에 의하면 인체 피부 섬유아세포에서 Akt가 blockade 시키면 콜라겐의 생성을 감소시키며 MMP-1의 발현을 증가시켜 Akt가 콜라겐 합성에 있어서 중요한 인자로 작용한다고 하였다.

따라서 PYP 처리에 의해 콜라겐 합성이 증가된 Hs27 세포 내 IGF-1

signal pathway의 변화를 확인해 본 결과, PYP 처리에 의해 Hs27 세포 내 IGF-1의 단백질 발현이 증가하는 것을 확인하였고(Fig. 20), IGF-1R과 IRS1의 인산화 정도가 증가되었음을 확인하였다(Fig. 21). 또한 하위 신호전달자 PI3K/Akt/mTOR/p70S6K signal pathway의 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 22). 이러한 결과는 Hs27 세포에 PYP 처리 시 세포 내 IGF-1 signal pathway가 활성화되고 콜라겐 합성을 조절하는 것으로 확인된다.



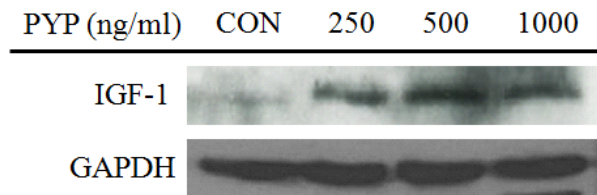


Fig. 20. PYP up-regulates IGF-1 protein expression in Hs27 cells. Cells were treated with PYP for 24 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blot using anti-IGF-1 and anti-GAPDH antibodies.

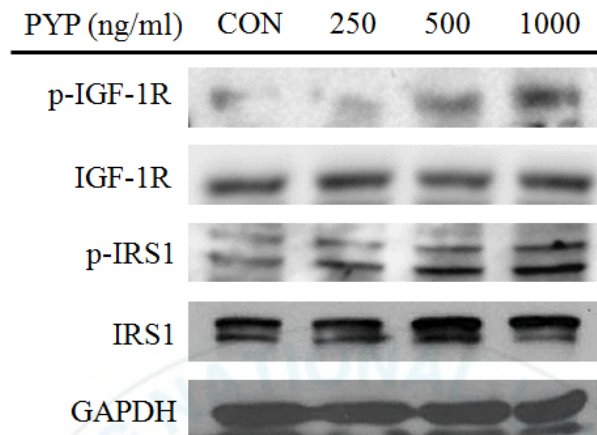


Fig. 21. PYP activates IGF-1R signal pathway in Hs27 cells. Cells were treated with PYP for 24 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blot using anti-p-IGF-1R, anti-IGF-1R, anti-p-IRS1, anti-IRS1 and anti-GAPDH antibodies.

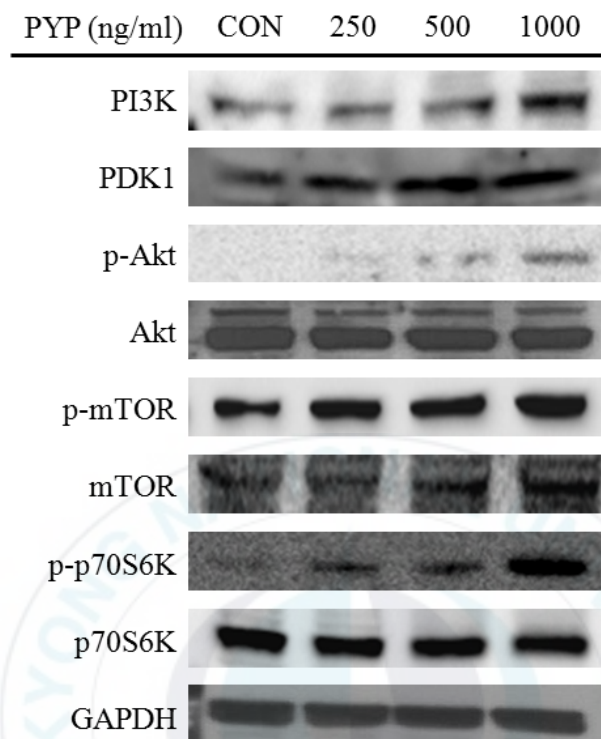


Fig. 22. PYP activates PI3K/Akt/mTOR/p70S6K signal pathway in Hs27 cells. Cells were treated with PYP for 24 h. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blot using anti-PI3K, anti-PDK1, anti-p-Akt, anti-Akt, anti-p-mTOR, anti-mTOR, anti-p-p70S6K, anti-p70S6K and anti-GAPDH antibodies.

IV. 결론 및 요약

최근 생활수준의 향상으로 인해 사람들의 피부미용에 대한 관심이 급증하였다. 이로 인해 피부의 주름개선과 같은 항노화 효과를 가지는 기능성 화장품 및 식품에 대한 연구가 증가하고 있는 추세이다.

김은 해조류 중 홍조류에 속하며 항암효과, 항염증효과 및 콜레스테롤 저하작용 등의 다양한 효능이 알려져 있어 김으로부터 추출한 당단백질, 단백질 혹은 다당류를 대상으로 많은 연구가 이루어지고 있다(Yamamoto et al., 1987; Matsuo et al., 1993; Kim et al., 2005). 김을 비롯한 해조류로부터 위와 같은 생리활성기능이 밝혀졌으며, 더 나아가 항노화 기능에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(Munro et al., 1987; Wijesinghe and Jeon, 2011; Samarakoon and Jeon, 2012). 본 연구에서는 김에서 단백질을 추출하고 분리하여 구조를 밝힌 후, peptide를 제작하여 실험에 사용하였다.

김(*P. yezoensis*) peptide (PYP)를 인체 피부 섬유아세포주인 Hs27 세포에 처리하였을 때, 세포의 증식에는 영향을 미치지 않았으나 콜라겐 합성을 촉진하는 것을 확인하였다. 이는 세포의 증식으로 인한 전체 콜라겐의 증가가 아닌 세포 내 단백질 수준에서 콜라겐의 함량이 증가하는 것으로 간주되며, 이후 PYP에 의해 증가된 콜라겐의 함량이 어떠한 작용 메커니즘의 활성화로 인하여 항노화 기능에 관여하는지 TGF- β /Smad signal pathway와 IGF-1 signal pathway를 통해 확인해 보았다. 일반적으로, TGF- β 와 IGF-1은 세포의 성장과 분화 등 여러 생리활성기능을 조절하는 성장인자이며, 피부세포 내에서 콜라겐과 같은 세포외 기질 성분의 합성을 유도하는 것으로 알려져 있다(Verrecchia and Mauviel, 2007; Baserga et al., 1997).

피부 속 콜라겐은 MMPs 효소에 의해 분해가 촉진되고, MMPs의 작용은 TIMPs 효소에 의해 억제된다(Murphy, 2011). PYP에 의해 MMP-1

의 발현은 감소하였고, TIMP-1과 TIMP-2의 발현은 증가하였다. 이는 TIMP-1과 TIMP-2의 활성이 증가하여 MMP-1의 작용을 감소시켜 콜라겐 합성을 촉진시키는 것으로 간주된다.

콜라겐 합성에 관여하는 다양한 성장인자 중 TGF- β 1과 IGF-1의 증가를 확인하였으며 TGF- β 에 의해 유도되는 하위 경로 MAPK signal pathway와 TGF- β /Smad signal pathway를 살펴본 결과, PYP 처리 후 MAPK signal pathway에는 변화가 없었고 TGF- β /Smad signal pathway는 상향조절되었다. 또한 Smad2/3/4 복합체에 의해 활성화되어 콜라겐 합성을 유도하는 전사인자인 Sp1 단백질의 발현 증가를 확인하였다. 이와 같은 결과를 통해 PYP는 MAPK signal pathway에는 영향을 미치지 않고 TGF- β /Smad signal pathway를 활성화시켜 콜라겐 합성을 유도하는 것으로 확인된다.

앞의 결과를 뒷받침하기 위하여 TGF β -RI inhibitor인 SB431542를 10 μ M 농도로 2시간 전처리하고 PYP를 농도별로 24시간 처리한 뒤 콜라겐과 콜라겐 합성 조절 효소들의 발현 변화를 확인한 결과, PYP 처리에 의해 감소되었던 MMP-1의 발현이 SB431542 처리에 의해 증가하였으며 활성이 유도되었던 TIMP-1과 TIMP-2의 발현이 감소되었다. 또한 활성화된 TGF- β /Smad signal pathway의 영향으로 인해 증가되었던 COL1A1과 COL1A2 유전자의 발현이 감소되었다. 이상의 결과들로부터 PYP 처리에 의해 TGF- β /Smad signal pathway가 활성화되고 이로 인해 콜라겐 합성이 유도되는 것으로 확인된다(Fig. 23).

다음으로 IGF-1 signal pathway의 변화를 확인하였다. PYP 처리에 의해 IGF-1R의 인산화의 증가와 함께 IGF-1R에 결합하는 IRS1의 인산화가 유도되었고, 이들의 하위 경로인 PI3K/Akt/mTOR/p70S6K signal pathway도 활성이 증가하는 것이 확인되었다(Fig. 24).

위의 결과를 종합하여 보면, PYP의 처리 후 Hs27 세포의 증식은 없었지만 TIMP-1과 TIMP-2의 활성증가로 인한 MMP-1의 작용 저해, 그리

고 TGF- β /Smad signal pathway와 IGF-1 signal pathway의 활성화로 인해 콜라겐 합성이 촉진되는 것으로 확인되었다. 따라서 PYP는 인체 피부 섬유아세포 내 콜라겐 합성을 촉진시키는 효과를 나타내므로 기능성 화장품 및 식품 소재로서 활용이 가능할 것으로 사료된다.



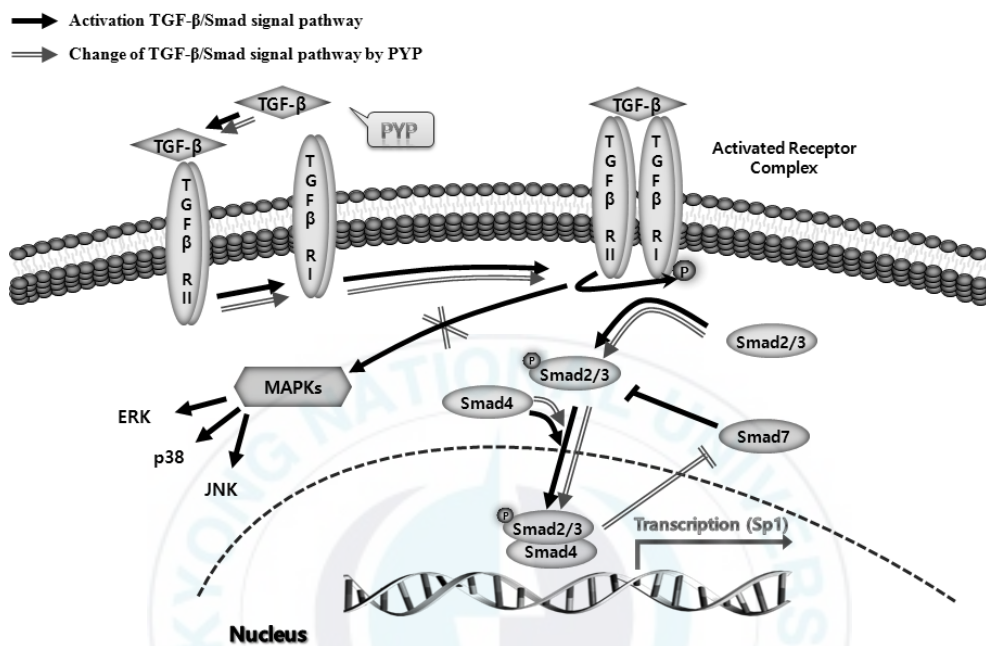


Fig. 23. Activation of TGF- β /Smad signaling pathway in Hs27 cells by PYP.

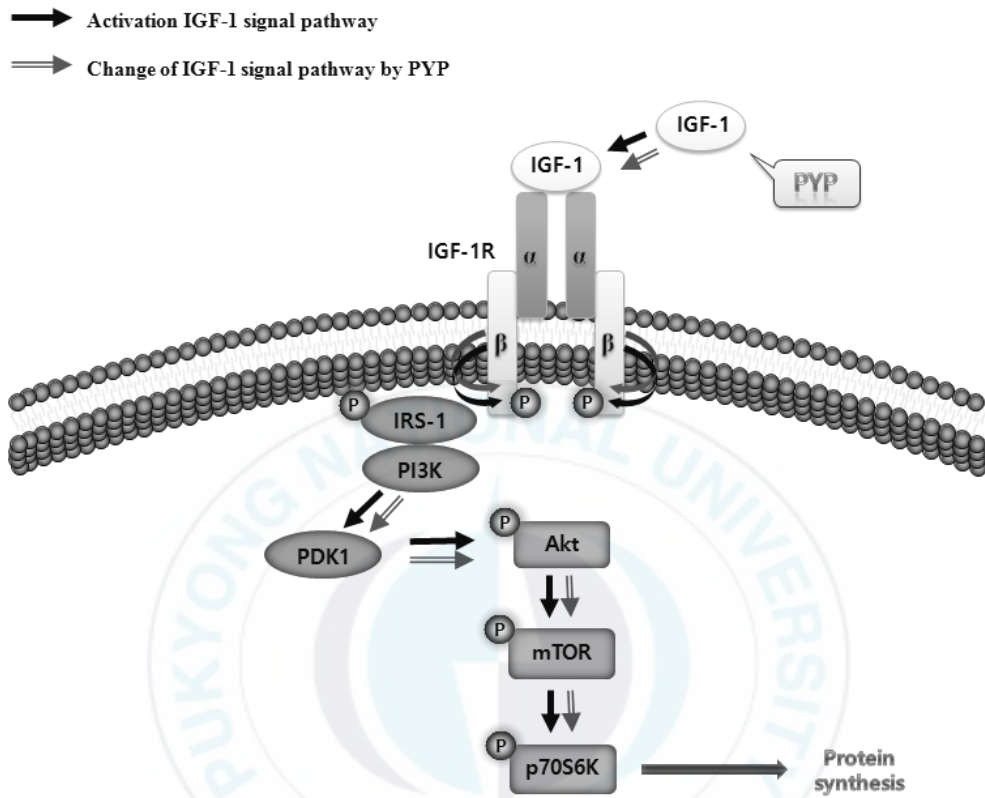


Fig. 24. Activation of IGF-1 signaling pathway in Hs27 cells by PYP.

V. 참고 문헌

- Baserga, R., Hongo, A., Rubini, M., Prisco, M., and Valentinis, B. (1997). The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 1332(3): F105-F126.
- Bujor, A. M., Pannu, J., Bu, S., Smith, E. A., Muise-Helmericks, R. C., and Trojanowska, M. (2008). Akt blockade downregulates collagen and upregulates MMP1 in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 128(8): 1906-1914.
- Costin, G. E., and Hearing, V. J. (2007). Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J*. 21(4): 976-994.
- Debelle, L., and Tamburro, A. M. (1999). Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell B*. 31(2): 261-272.
- Dennler, S., Goumans, M. J., and Ten Dijke, P. (2002). Transforming growth factor β signal transduction. *J Leukocyte Biol*. 71(5): 731-740.
- Edmondson, S. R., Thumiger, S. P., Werther, G. A., and Wraight, C. J. (2003). Epidermal homeostasis: the role of the growth hormone and insulin-like growth factor systems. *Endocr Rev*. 24(6): 737-764.
- Kähäri, V. M., and Saarialho Kere, U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol*. 6(5): 199-213.
- Kammeyer, A., and Luiten, R. M. (2015). Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev*. 21: 16-29.
- Kim, E. J., Kim, M. K., Jin, X. J., Oh, J. H., Kim, J. E., and Chung, J. H. (2010). Skin aging and photoaging alter fatty acids

- composition, including 11, 14, 17-eicosatrienoic acid, in the epidermis of human skin. *J Korean Med Sci.* 25(6): 980-983.
- Kim, H. J., Song, S. B., Choi, J. M., Kim, K. M., Cho, B. K., Cho, D. H., and Park, H. J. (2010). IL-18 downregulates collagen production in human dermal fibroblasts via the ERK pathway. *J Invest Dermatol.* 130(3): 706-715.
- Kim, S. H., Yong, H. J., Shin, C., and Ko, S. G. (2008). Research of traditional herbal medicines for anti-aging, inhibition effect of wrinkle and whitening effect in the skin. *Kor J Ori Physiol Pathol.* 22(22): 691-698.
- Kim, S., Kim, J., Woo, M. K., Kwak, C. S., and Lee, M. S. (2005). Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 34(4): 451-459.
- Kitano, Y., Murazumi, K., Duan, J., Kurose, K., Kobayashi, S., Sugawara, T., and Hirata, T. (2012). Effect of dietary porphyrin from the red alga, *Porphyra yezoensis*, on glucose metabolism in diabetic KK-Ay mice. *J Nutr Sci Vitaminol.* 58(1): 14-19.
- Kwon, M. J., and Nam, T. J. (2006). Porphyrin induces apoptosis related signal pathway in AGS gastric cancer cell lines. *Life sciences.* 79(20): 1956-1962.
- Leask, A., and Abraham, D. J. (2004). TGF- β signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 18(7): 816-827.
- Lee, J., Jung, E., Yu, H., Kim, Y., Ha, J., Kim, Y. S., and Park, D. (2008). Mechanisms of carvacrol-induced expression of type I collagen gene. *J Dermatol Sci.* 52(3): 160-169.
- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., and ROBERTS JR, A.

- T. (1995). Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev.* 16(2): 143–163.
- Matsuo, M., Takano, R., Kamei-Hayashi, K., and Hara, S. (1993). A novel regioselective desulfation of polysaccharide sulfates: Specific 6-O-desulfation with N, O-bis (trimethylsilyl) acetamide. *Carbohydr Res.* 241: 209–215.
- McCawley, L. J., and Matrisian, L. M. (2000). Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today.* 6(4): 149–156.
- Munro, M. H., Luibrand, R. T., and Blunt, J. W. (1987). The search for antiviral and anticancer compounds from marine organisms. *Bioorganic marine chemistry. Springer Berlin Heidelberg.* 93–176
- Mukherjee, P. K., Maity, N., Nema, N. K., and Sarkar, B. K. (2011). Bioactive compounds from natural resources against skin aging. *Phytomedicine.* 19(1): 64–73.
- Murphy, G. (2011). Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol.* 12(11): 233.
- Nakayama, R., Tamura, Y., Kikuzaki, H., and Nakatani, N. (1999). Antioxidant effect of the constituents of Susabinori (*Porphyra yezoensis*). *J Am Oil Chem Soc.* 76(5): 649–653.
- Naylor, E. C., Watson, R. E., and Sherratt, M. J. (2011). Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas.* 69(3): 249–256.
- Park, J. H., Kim, S. R., An, H. J., Kim, W. J., Choe, M., and Han, J. A. (2012). Esculetin promotes type I procollagen expression in human dermal fibroblasts through MAPK and PI3K/Akt pathways. *Mol Cell Biochem.* 368(1–2): 61–67.

- Peng, W. J., Yan, J. W., Wan, Y. N., Wang, B. X., Tao, J. H., Yang, G. J., Pan. H. F., and Wang, J. (2012). Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in systemic sclerosis. *J Clin Immunol.* 32(6): 1409–1414.
- Qian, L., Zhou, Y., and Ma, J. X. (2014). Hypolipidemic effect of the polysaccharides from *Porphyra yezoensis*. *Int J Biol Macromol.* 68: 48–49.
- Ries, C. (2014). Cytokine functions of TIMP-1. *Cell Mol Life Sci.* 71(4): 659–672.
- Rossert, J., Terraz, C., and Dupont, S. (1999). Regulation of type I collagen genes expression. *Nephrol Dial Transpl.* 15: 66–68.
- Ryhanen, L., and Uitto, J. (1983). Elastic fibers of the connective tissue. *Biochemistry and Physiology of the Skin New York, Oxford University Press Inc.* 1: 433–447.
- Ryu, J., Park, S. J., Kim, I. H., Choi, Y. H., and Nam, T. J. (2014). Protective effect of porphyra-334 on UVA-induced photoaging in human skin fibroblasts. *Int J Mol Med.* 34(3): 796–803.
- Samarakoon, K., and Jeon, Y. J. (2012). Bio-functionalities of proteins derived from marine algae—A review. *Food Res Int.* 48(2): 948–960.
- Sephel, G. C., and Davidson, J. M. (1986). Elastin production in human skin fibroblast cultures and its decline with age. *J Invest Dermatol.* 86(3): 279–285.
- Shin, E. S., Hwang, H. J., Kim, I. H., and Nam, T. J. (2011). A glycoprotein from *Porphyra yezoensis* produces anti-inflammatory effects in liposaccharide-stimulated macrophages via the TLR4 signaling pathway. *Int J Mol Med.*

28(5): 809–815.

- Tai, Y. T., Podar, K., Catley, L., Tseng, Y. H., Akiyama, M., Shringarpure, Burger, R., Hideshima, T., Chauhan, D., Mitsiades, N., Richardson, P., Munshi, N. C., Kahn, C. R., Mitsiades, C., and Anderson, K. C. (2003). Insulin-like growth factor-1 induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of $\beta 1$ -integrin and phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling. *Cancer Res.* 63(18): 5850–5858.
- Tingting, G. J. Z. L. G., and Peimin, H. (2007). Study on Anti-fatigue Bioactivity of Polysaccharide from *Porphyra yezoensis* [J]. *Biotechnol Bull.* 4: 030.
- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A. W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Bon, T. L., Kathuria, S., and Chen, E. (1986). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *Embo J.* 5(10): 2503.
- Vanhaesebroeck, B., Leervers, S. J., Panayotou, G., and Waterfield, M. D. (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci.* 22(7): 267–272.
- Verrecchia, F., and Mauviel, A. (2007). Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol.* 13(22): 3056–62.
- Wierstra, I. (2008). Sp1: emerging roles—beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Bioph Res Co.* 372(1): 1–13.
- Wijesinghe, W. A. J. P., and Jeon, Y. J. (2011). Biological activities

- and potential cosmeceutical applications of bioactive components from brown seaweeds: a review. *Phytochem Rev.* 10(3): 431-443.
- Yamamoto, I., Maruyama, H., and Moriguchi, M. (1987). The effect of dietary seaweeds on 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Lett.* 35(2): 109-118.
- Yoon, J. H., Kim, J. Y., Lee, H. J., Kim, S. Y., Jang, H. H., Ryu, S. H., Kim, B. J., and Lee, T. G. (2012). Laminin peptide YIGSR induces collagen synthesis in Hs27 human dermal fibroblasts. *Biochem Bioph Res Co.* 428(3): 416-421.
- Yu, H., and Rohan, T. (2000). Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer I.* 92(18): 1472-1489.
- Zhang, W., Ou, J., Inagaki, Y., Greenwel, P., and Ramirez, F. (2000). Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates transforming growth factor β 1 stimulation of α 2 (I)-collagen (COL1A2) transcription. *J Biol Chem.* 275(50): 39237-39245.
- Zhao, D., Shi, Y., Dang, Y., Zhai, Y., and Ye, X. (2015). Daidzein stimulates collagen synthesis by activating the TGF- β /smad signal pathway. *Australas J Dermatol.* 56(1): e7-e14.