

콜라겐 펩타이드 섭취 무모생쥐에서 UVB 조사에 의한 피부 손상에 미치는 효과 규명

신현준¹, 박종일¹, 권창주², 김화영², 나오키 이노우에³, 고이즈미 세이코³, 황재성^{1*}

¹경희대학교 생명공학원 유전공학과

²주영엔에스(주)

³니타젤라틴

The Effect of Collagen Peptide Intake on UVB-induced Skin Damage in Hairless mice

Hyun-Jun Shin¹, Jong il Park¹, Chang-Ju Kwon², Hwa young Kim², Naoki Inoue³,
Koizumi Seiko³, Jae Sung Hwang^{1*}

¹Department of Genetic engineering, Collage of Life Sciences, Kyung Hee University

²Ju Yeong NS CO., LTD,

³Peptide Division, Nitta Gelatin Inc.,

요 약 본 연구에서는 Tilapia fish에서 얻은 콜라겐 펩타이드 (TFCP)의 섭취가 UVB를 조사한 무모생쥐에서 어떠한 효과를 나타내는지 확인하고자 하였다. 무모생쥐에 1주일에 3번 UVB를 조사하여 광노화를 유도하였고, TFCP 545, 1090 mg/kg 을 매일 총 12주간 경구투여 후, 주름생성, 피부 두께, 홍반, 피부 수분량, 하이드록시프롤린, MMPs 및 filaggrin의 발현량을 측정하였다. UVB만 조사 한 군과 비교하여 UVB를 조사하고 콜라겐 펩타이드를 섭취시킨 군에서 주름생성, 피부 두께 및 홍반이 감소하였고 피부 수분량은 증가하였다. 또한, 콜라겐 양과 하이드록시프롤린의 양도 TFCP를 섭취한 군에서 UVB 조사군에 비해 유의하게 회복되는 것을 확인하였다. TFCP를 섭취한 군에서 자외선에 의해 활성화되는 MMP-2, MMP-9 뿐만 아니라 MMP-3, MMP-13의 mRNA 발현량이 억제됨을 확인하였고, filaggrin의 단백질 발현량도 증가하였다. 이러한 결과들을 통하여 TFCP의 섭취는 자외선에 의한 주름 생성을 억제하고 피부 손상을 회복시킨다는 것을 확인하였다. 따라서, TFCP는 피부미용식품 소재로서 활용 가능성이 있음을 알 수 있다.

Abstract This study examined the effects of collagen peptide intake extracted from the tilapia fish (TFCP) on UVB-induced skin in hairless mice. To cause photoaging, the hairless mice were exposed to UVB irradiation three times a week and TFCP was administered with 545 and 1090 mg/kg once a day for 12 weeks. The level of wrinkle formation, thickness of the skin, acute erythema, skin hydration, amount of hydroxyproline, expression of MMPs and filaggrin were measured. Wrinkle formation, thickness of the skin, and acute erythema were significantly lower and skin hydration was higher in the TFCP intake group compared to the UVB-control mice group. In addition, the amount of the collagen and hydroxyproline of the collagen peptide intake group were much higher than the UVB-control group. Oral administration of TFCP inhibited the expression of the MMP-3 and MMP-13 mRNA level as well as activated MMP-2 and MMP-9 induced by UV irradiation, and increased the protein expression of filaggrin in hairless mice skin. In summary, the oral administration of TFCP can inhibit wrinkle formation and protect the skin from UV-damage. Therefore, this study suggests that TFCP is a potential candidate material for skin functional foods.

Keywords : Collagen, TFCP, Matrix metalloproteinase, Skin hydration, Wrinkle

*Corresponding Author : Jae Sung Hwang(Kyung Hee University)

Tel: +82-31-888-6179 email: jshwang@khu.ac.kr

Received January 8, 2016

Revised (1st January 29, 2016, 2nd February 26, 2016)

Accepted March 3, 2016

Published March 31, 2016

1. 서론

피부는 신체를 보호하고, 수분과 온도를 조절 및 보존하여 항상성을 유지하는 중요한 역할을 한다 [1]. 피부는 여러 가지 위험한 요인에 항상 노출되어 있는데, 외적인 요인으로는 자외선 (ultraviolet, UV), 환경오염 등이 있고 내적인 요인으로는 면역기능 억제, 표피항상성 불균형, 호르몬 변화, 연령 증가, 스트레스, 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS) 등이 있다. 이런 요인들은 주로 피부 손상을 일으켜 피부의 본래 기능을 감소시킨다 [2-4]. 피부 노화는 복잡한 생물학적 과정이 진행되는 현상으로 시간 흐름에 따라 발생하는 노화인 내인성 노화와 자외선 노출에 의해 발생하는 외인성 노화인 광노화 (photoaging)로 분류된다 [5-7]. 그 중 광노화에서 주름 생성, 색소 침착, 표피 두께 증가, 피부 탄력성 감소 및 피부 장벽 손상으로 인한 피부수분량을 감소 등이 발생된다 [8-10]. 또한, 피부의 장력과 강도를 유지하여 외부 자극으로부터 피부 보호 역할을 하는 단백질 콜라겐 (collagen) 양을 감소시킨다 [11-13].

Matrix metalloproteinase (MMP)는 아연에 의존하는 엔도 펩티다아제로서 콜라겐 분해 뿐만 아니라 세포 외 기질의 리모델링에 관여하며, 형태형성, 피부 궤양 및 종양의 침윤과 전이에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [14-16]. MMP는 자외선 노출에 의해 발생하는 활성산소종에 의해 발현 유도가 되고, 발현 후에 세포외 기질 (extracellular matrix, ECM)의 주요 성분인 콜라겐과 탄력섬유 (elastin)를 분해하여 세포외 기질의 구성성분을 변형시켜 주름을 형성한다. MMP는 총 다섯 종류로 구성되어 있는데 collagenase, gelatinase, stromelysin, membrane Type MMP, matrilysin이며, 구조 및 기질 특이성으로 구분 할 수 있다 [14, 17].

콜라겐 펩타이드 (collagen peptide)는 생선 비늘, 돈피 및 우피에서 고분자 콜라겐을 추출, 가열하여 젤라틴으로 변환시킨 후 가수분해를 통해 얻은 물질이며, 체내에 들어가면 효소에 의해 아미노산으로 분해되지만 비타민C에 의해 콜라겐 펩타이드로 재합성 된다. 이전 연구에 의해 콜라겐 펩타이드가 피부 보습 및 탄력 개선과 주름을 예방하는 효능이 있다는 것이 보고되었고 피부 기능성 화장품에도 적용되고 있다 [18]. 또한, 최근 연구에서는 고분자 콜라겐 펩타이드의 문제점으로 분자량이 커서 복용시 위장 내에서 쉽게 분해되어 피부에 영향을

미치지 못하기 때문에 저분자 콜라겐 펩타이드를 개발하고 피부의 보습 및 주름 억제에 고분자 콜라겐 펩타이드보다 효능이 더욱 좋다는 것이 보고되었다 [16].

본 연구에서는 Tilapia fish에서 유래된 콜라겐 펩타이드 (TFCP)의 광노화 보호 효능을 알아보기 위해 무모 쥐 (hairless mouse) 동물 모델을 이용하여 연구를 진행하였다. 광노화를 유도하기 위해 자외선을 조사 후 TFCP를 경구투여로 섭취시키고 주름을 나타내는 지표, 피부 두께, 수분량 등을 평가하고, MMP 발현 및 콜라겐 구성성분인 하이드록시프롤린 (hydroxyproline)의 양 등을 확인하여 TFCP의 효능을 확인하였다.

2. 실험 방법

2.1 실험 재료

실험에 사용한 콜라겐 펩타이드 (KER-30DR, manufactured by Nitta Gelatin India Limited Co., Cochin, India)는 Tilapia fish (*Oreochromis mosambicus*)의 scale로부터 추출, 효소분해한 것으로 주영엔에스(주)로부터 공급받아 사용하였다.

2.2 실험동물 및 사육관리

생후 6 주령 20-25 g 정도의 특정병원체 부재 (Specific pathogen free, SPF) 암컷 hairless mice (SKH-1:HR-a)를 오리엔트 바이오 (Seongnam, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 검역과 일주일의 순화 기간을 거치고 11마리씩 4그룹으로 군을 분리 한 이후에 실험을 진행하였다. 실험동물 사육환경은 온도 ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), 습도 ($55 \pm 10\%$), 그리고 명암주기 12 시간을 유지 하였다. 사료는 마우스 전용사료 (Feed Lab Korea, Guri, Korea)를 급여하였고, 실험동물 사육관리는 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"를 기준으로 하였으며, 실험은 경기과학기술진흥원 Institutional Animal Care and Use Committees (IACUC) 승인 하에 진행되었다

2.3 실험군 및 실험물질 경구투여

Normal군, UVB군, UVB + 545 mg/kg군, UVB + 1090 mg/kg군으로 실험을 진행하였다 (Table 1). Normal군과 UVB군은 물, UVB + 545 mg/kg군과 UVB + 1090 mg/kg 군은 TFCP 545 mg/kg, 1090 mg/kg의

Table 1. Experimental group and dose design

Group	UVB	Test material	Amount of oral administration
Normal	X	water	
UVB	O	water	
UVB + 545 mg/kg	O	TFCP	545 mg/kg
UVB + 1090 mg/kg	O	TFCP	1090 mg/kg

농도로 마우스 1 회 경구 투여 적정량인 10 mL/kg 으로 설정해 하루에 한 번 경구투여로 섭취시켜준다.

2.4 UVB 조사

광노화에 의한 주름을 생성하기 위해 Normal군을 제외한 UVB군과 UVB + 545 mg/kg군, UVB + 1090 mg/kg군에 매주 주 3회 동일한 시간에 UVB를 조사하였다. 정확한 조사량을 위해 UV meter (Waldmann Lichttechnik GmbH, Germany)를 이용하여 1 MED (minimal erythemal dose, 약 75 mJ/cm²)의 값을 측정하고 UVB 램프 (Waldmann UB800, Germany) 6개를 부착하여 UVB 조사를 하였다. 첫째 주는 1 MED, 둘째 주는 2 MED, 셋째 주는 3 MED, 넷째 주부터 실험종료 시까지 3.3 MED를 조사하였으며, 피부 상태 및 적절한 주름이 형성되도록 조사량을 조절하였고 총 108 MED의 UVB를 조사하였다.

2.5 임상 증상 관찰 및 체중 측정

매일 동물의 임상 증상과 사망여부를 관찰하였고 실험에 사용한 모든 동물에 대해 주 1 회 체중 측정을 하였다.

2.6 피부의 육안 관찰 및 피부주형의 분석

동물의 등쪽을 디지털 카메라 (EOS 600D, Canon, Japan)로 근접 촬영하고, 주름 정도 분석 및 평가를 위해 실리콘폴리머 (SILFLO impression material, Flexico, England)를 이용하여 레플리카 (replica)을 얻었다. 피부 주형은 빛의 입사각을 20도로 고정하고, 주름 그림자 명암 영상을 Visioline 프로그램을 이용하여 사진을 찍어 이미지화 한 후, 컴퓨터 분석 시스템인 Skin Viosimeter SV600 software (Courage & Khazaka, Mathias-Brüggen, Germany)를 이용하여 주름의 면적, 수, 길이, 깊이 값을 측정하고 주름 평가를 하였다.

2.7 조직병리학적 분석

실험 종료 후 모든 동물의 등쪽 피부를 떼어내고 10% 포르말린에 넣은 후, 조직병리학적 변화를 확인 할 수 있는 hematoxylin and eosin (H&E), 진피 (Dermis)에 존재하는 콜라겐을 확인 할 수 있는 Masson's trichrome 염색을 하였다. 염색한 조직을 Nikon ECLIPSE Ti-E 전동드립형광현미경 (Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 사진을 찍어 이미지화 한 후, NIS-Elements BR 3.0 Software를 이용하여 분석하였다.

2.8 피부 홍반, 피부수분량 평가

피부 홍반 및 수분함량 측정은 동물의 등쪽을 색차계 (spectrophotometer, KONICA MINOLTA, Tokyo, Japan)와 Corneometer (CK Electronics GmbH, Cologne, Germany)을 이용하여 측정하였다.

2.9 하이드록시프로린 측정

2 mm x 2 mm 크기의 피부 조직을 분쇄 한 후에 Screw Cap Vial (Agilent technologies, USA)에 D.W 100 µl, 6 N HCL 100 µl와 같이 넣고 120°C에 3 시간 동안 가수분해 하였다. Hydroxyproline assay kit (BioVision, USA)에서 제공한 방법을 이용하여 하이드록시프로린 양을 측정하였다.

2.10 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse

Transcription-polymerase chain reaction)

피부 조직에 RNAiso Plus (TAKARA BIO, Seta3-4-1, Otsu, Shiga 520-2193, Japan) 넣고 RNA를 추출한 후 cDNA로 합성하고, PCR premix (ELPIS, Daejeon, Korea)와 primer를 사용해 진행하였다(Table 2). MMP-3 증폭은 95°C, 30 초; 56°C, 1 분; 72°C 1 분, 35 Cycle로 진행하였고, MMP-13와 β-actin 은 95°C, 30 초; 56°C, 1 분; 72°C 1 분, 45 Cycle로 진행하였다. 증폭된 cDNA는 1.5% agarose gel에 전기영동 후 Gel-doc (Bio-Rad, USA)를 이용하여 분석하였다.

2.11 Gelatin zymography 방법을 이용한

MMP-2, MMP-9 발현평가

피부 조직으로부터 단백질을 추출한 후에 10XBlue Juice (Invitrogen, Carlsbad, USA)와 혼합하여 10% Zymogram 전용 겔 (Invitrogen)에 넣고 125 V의 일정

Table 2. The nucleotide sequences of forward and reverse primer sets for mouse genes

Gene	Primer	Sequence
β-actin	Forward	5'-CCA GCC AGC CAC CAT CGC TC-3'
	Reverse	5'-TGA CCT TGG CCA GGG GTG CA-3'
MMP-3	Forward	5'-TAG CAG GTT ATC CTA AAA GCA-3'
	Reverse	5'-CCA GCT ATT GCT CTT CAA T-3'
MMP-13	Forward	5'-CAT CCA TCC CGT GAC CTT AT-3'
	Reverse	5'-GCA TGA CTC TCA CAA TGC GA-3'

한 전압으로 1.5 시간동안 전기영동을 하였다. 전기영동 후 겔을 Zymogram renaturing buffer (Invitrogen)에 넣어 30 분간 실온에 교반 후 버리고 Zymogram Developing buffer (Invitrogen)으로 교체 후 30 분간 실온에서 교반하였다. 이후 새로운 Zymogram developing buffer로 교체 해주고 37°C에서 36 시간 동안 두었다. 36 시간 후에 겔을 Simply Blue™ Safe Stain (Invitrogen)으로 2 시간 염색 후 D.W로 1 시간 단위로 2 번 탈색 시키고 활성화 된 MMP-2, MMP-9을 확인하였다. 활성화 된 MMP-2, MMP-9은 62 kDa, 86 kDa에서 확인하였다.

2.12 Western blotting 방법을 이용한 filaggrin 발현평가

피부 조직으로부터 추출한 단백질을 10% 겔에 넣고 35 분동안 전기영동을 하고 membrane에 transfer 하였다. Primary antibody로 β-actin (1: 20000, Sigma), filaggrin (1:1000, Abcam, UK)을 사용하였고, secondary antibody는 anti-mouse (1:20000, Bio-Rad), anti-rabbit (1:5000, Bethyl, USA)을 사용하였다. 단백질 발현 량은 Chemi Doc XRS (Bio-Rad, USA)를 이용하여 측정하였다.

2.13 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 Independent t-test를 이용하여서 각 그룹간 통계적 유의성을 검정하였다. 각 군의 유의성은 $p < 0.05$ 수준으로 검정하였다.

3. 결과

3.1 체중변화 및 증상 관찰

TFCP 섭취 시 특이 증상 혹은 생명에 영향을 미치는

지 확인하기 위해 매일 관찰하고 체중을 주 1회 측정하였다. 실험 기간 동안 모든 동물들의 체중은 증가한 것을 확인하였고 특이 증상 및 사망한 동물은 보이지 않았다. 체중 증가에 대한 유의한 변화는 보이지 않았다 (Fig. 1). 모든 동물 희생 후, 장기에 특이한 이상은 보이지 않았다.

3.2 TFCP가 광노화로 인한 주름 형성 억제에 미치는 영향

TFCP가 자외선 조사로 인한 주름 형성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해, 무모취 동물모델을 이용하여 UVB를 조사하고 동물의 등쪽 부분 사진 촬영을 하여 주름을 관찰하였다 (Fig. 2). 레플리카를 이용하여 주름의 면적, 수, 길이, 깊이 등을 분석하였다 (Fig. 3A-E). 주름 지표인 주름 면적, 수, 길이, 깊이를 비교 분석시, UVB군이 Normal군에 비해 모든 주름 지표가 증가된 것을 확인하였고 TFCP 545 mg/kg 및 1090 mg/kg

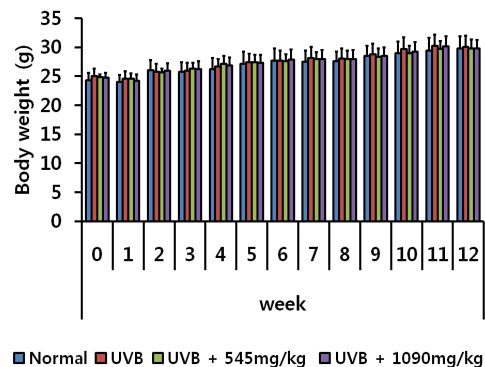


Fig. 1. Body weight changes in hairless mice. Data are indicated as mean±SD of eleven mice in each group.

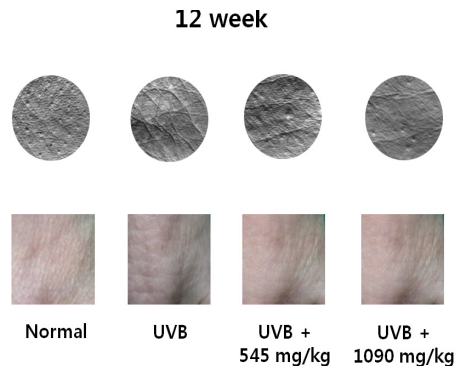


Fig. 2. Effects of TFCP intake on wrinkle formation in UVB-irradiated hairless mice.

■ Normal ■ UVB ■ UVB+C.P 545mg/kg ■ UVB+C.P 1090mg/kg

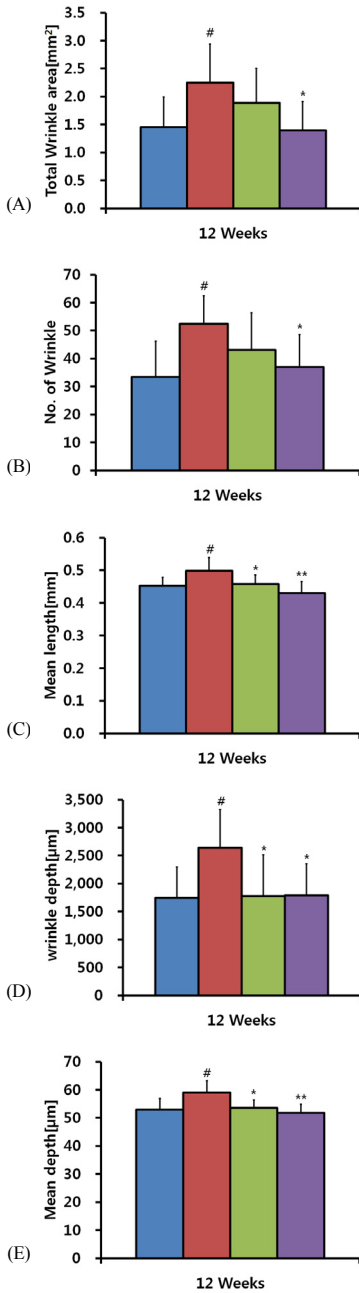


Fig 3. Effects of TFCP intake on wrinkle value of analyzed replica in UVB-irradiated hairless mice. (A) total wrinkle area (B) number of wrinkles (C) mean length (D) wrinkle depth (E) mean depth. Data are indicated as mean±SD of eleven mice in each group. ###p<0.001, ##p<0.01, #p<0.05 compared with non-UVB irradiated mice; **p<0.01, *P<0.05 compared with UVB-irradiated mice.

■ Normal ■ UVB ■ UVB+C.P 545mg/kg ■ UVB+C.P 1090mg/kg

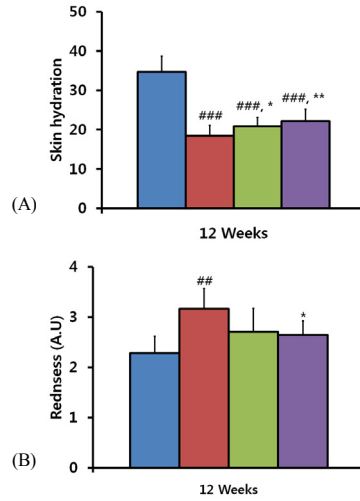
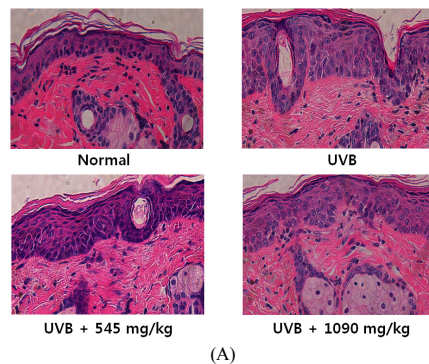


Fig. 4. Effect of TFCP intake on skin hydration and redness in UVB-irradiated hairless mice. (A) skin hydration (B) redness. ###p<0.001, ##p<0.01, #p<0.05 compared with non-UVB irradiated mice; **p<0.01, *P<0.05 compared with UVB-irradiated mice.

군은 UVB군에 비해 유의한 감소를 보였다. 이를 통하여 TFCP 섭취 시 UVB에 의한 주름 생성에 대한 억제 효과가 있다는 것을 확인하였다.

3.3 TFCP가 자외선조사로 홍반 생성 및 피부 수분량에 미치는 영향

피부가 자외선을 받게 되면 투과장벽 (permeability barrier)이 손상되어 피부 수분량이 감소될 뿐만 아니라 급성적으로 홍반이 유발된다 [19]. 피부 수분량은 Normal군에 비해 UVB군에서 크게 감소하였고, UVB군과 비교하여 TFCP 545 mg/kg 및 1090 mg/kg군에서 유



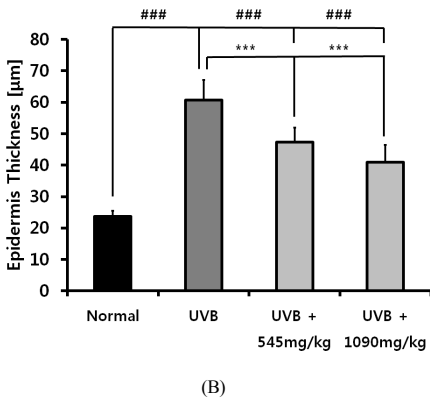
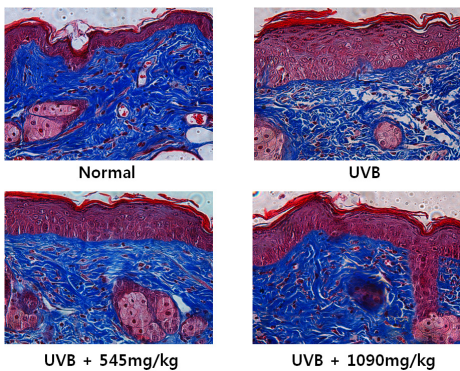


Fig. 5. Effect of TFCP intake on skin thickness in UVB-irradiated hairless mice. (A) H&E staining (B) epidermis thickness. Data are indicated as mean±SD of eleven mice in each group. ###p<0.001 compared with non-UVB irradiated mice; ***p<0.001 compared with UVB-irradiated mice.

의하게 증가되었다 (Fig. 4A). 또한 UVB군에서 홍반이 유발되었고, TFCP 1090 mg/kg군에서 UVB군에 비해 유의하게 감소하였다 (Fig. 4B).

3.4 TFCP 섭취가 광노화로 인한 피부 두께 변화 및 콜라겐 생성에 미치는 영향

자외선 조사에 의해 피부 노화가 진행되면 피부 두께가 두꺼워지고, 콜라겐 분해 효소가 활성화 되어 진피층의 콜라겐 분해 촉진에 일어난다[20, 21]. 따라서, TFCP가 UVB 조사된 피부 두께 및 콜라겐에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 H&E 염색 및 Masson's trichrome 염색을 하여 분석하였다. H&E 염색 결과, UVB군이



(A)

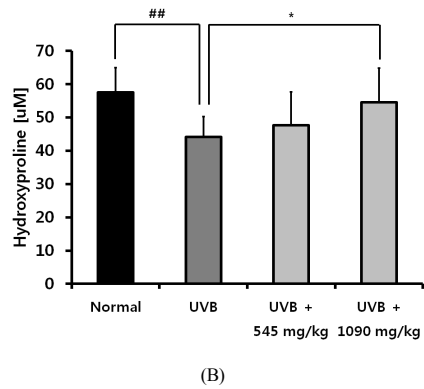
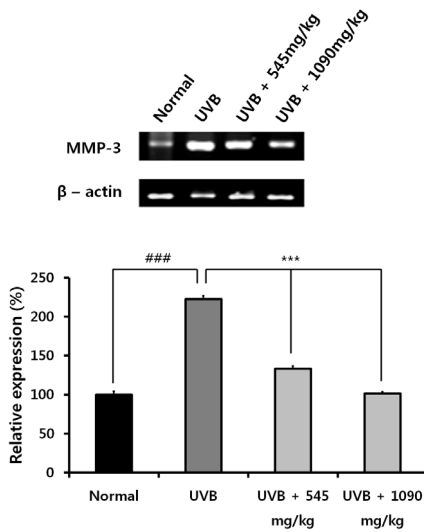


Fig. 6. Effect of TFCP intake on collagen of dermal layer and hydroxyproline in UVB-irradiated hairless mice. (A) Masson's trichrome staining (B) amount of hydroxyproline. Data are indicated as mean±SD of eleven mice in each group. ###p<0.001, ##p<0.01, #p<0.05 compared with non-UVB irradiated mice; **p<0.01, *p<0.05 compared with UVB-irradiated mice.

Normal군에 비해 표피의 두께가 증가 하였고, TFCP 545 mg/kg 및 1090 mg/kg군은 UVB군에 비해 유의하게 감소하였다 (Fig. 5A). NIS-Elements BR 3.0 Software를 이용하여 피부 두께를 측정된 결과 TFCP 545 mg/kg 및 1090 mg/kg군이 UVB군과 비교하여 유의하게 감소하였다 (Fig. 5B). 피부 조직의 Masson's trichrome 염색 결과에서도 UVB군은 Normal군에 비하여 콜라겐이 현저하게 감소된 것을 관찰할 수 있지만, TFCP 545 mg/kg



(A)

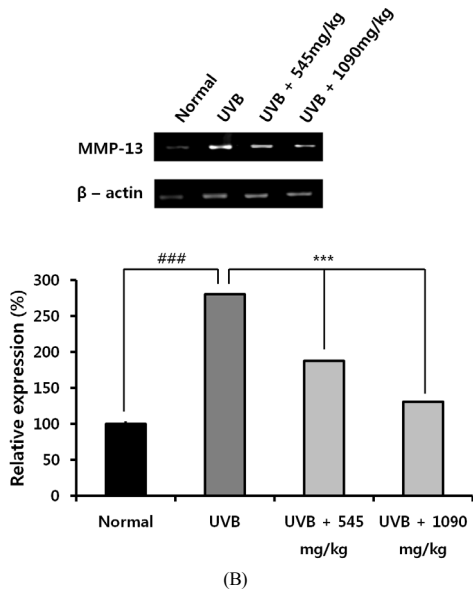


Fig. 7. Effect of TFCP intake on MMP-3, MMP-13 mRNA expression level in UVB-irradiated hairless mice. (A) MMP-3 mRNA expression (B) MMP-13 mRNA expression. Data are indicated as mean±SD of eleven mice in each group. ###p<0.001, ##p<0.01, #p<0.05 compared with non-UVB irradiated mice; **p<0.01, *p<0.05 compared with UVB-irradiated mice.

및 1090 mg/kg군에서 콜라겐 양이 UVB군보다 증가 된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6A). 또한 콜라겐 필수구성 성분인 하이드록시프롤린도 TFCP 1090 mg/kg 군에서 UVB군보다 유의하게 증가되었다(Fig. 6B).

3.5 UVB 조사로 유도된 MMP-3 및 MMP-13에 대한 TFCP의 효과

앞의 결과에서 TFCP가 UVB 노출에 의해 감소되는 콜라겐의 유지에 도움을 준다는 것을 확인하였고, 이로부터 TFCP가 콜라겐 분해 효소에 영향을 미칠 수 있다는 것을 추측할 수 있다. 따라서, TFCP가 콜라겐 분해효소인 MMP에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 type IV콜라겐을 분해하는 MMP-3 및 type I 콜라겐을 분해하는 MMP-13의 mRNA 발현량을 RT-PCR을 이용하여 측정하였다 [23,24]. MMP-3 및 MMP-13 mRNA 발현이 Normal군에 비해 UVB군에서 증가된 것을 확인할 수 있는 반면 TFCP 섭취군은 UVB군에 비해 MMP-3 및 MMP-13의 mRNA 발현이 유의하게 감소되었다 (Fig. 7A,B).

3.6 UVB 조사로 활성화 된 MMP-2 및 MMP-9에 대한 TFCP의 효과

기존 연구에 의하면 MMP-2 및 MMP-9 은 UVB 조사에 의해서 활성화되고 type IV 및 type VII 콜라겐을 분해하여 주름을 형성하는 것으로 알려져 있다 [14]. Gelatin zymography 방법을 이용하여 UVB조사에 활성화된 MMP-2 및 MMP-9 에 대하여 TFCP가 억제 효과를 지니고 있는지 확인하였다 (Fig. 8A). UVB군에서는 MMP-9 (86 kDa)의 발현이 증가한 반면, TFCP 섭취군은 발현이 감소되었다 (Fig. 8B). MMP-2 (62 kDa)의 발현도 UVB군에서 발현이 증가하였고 TFCP 1090 mg/kg

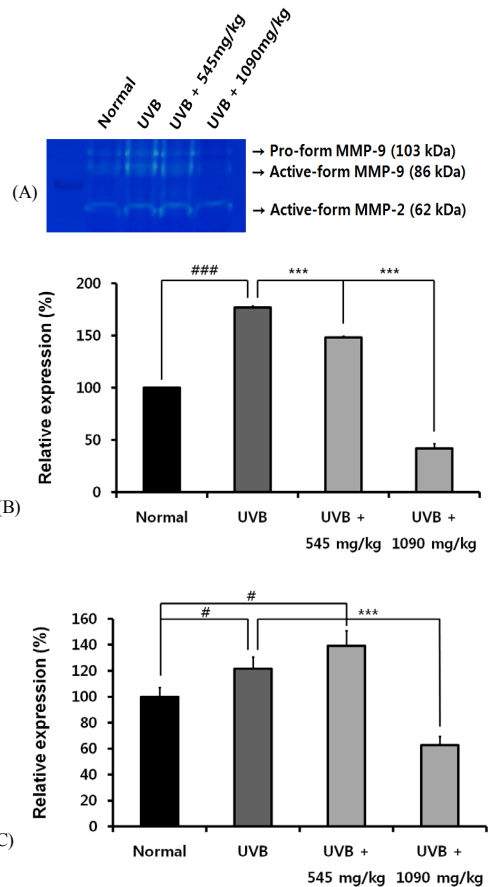


Fig 8. Effect of TFCP intake on MMP-2 and MMP-9 expression in UVB-irradiated hairless mice. (A) gelatin zymography picture (B) MMP-9 expression level (C) MMP-2 expression level. Data are indicated as mean±SD of eleven mice in each group. ###p<0.001, ##p<0.01, #p<0.05 compared with non-UVB irradiated mice; ***p<0.001 compared with UVB-irradiated mice.

섭취군에서 유의하게 감소하였다. 따라서, TFCP 섭취 시 콜라겐 분해효소인 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 감소시키는 것을 확인 할 수 있다.

3.7 filaggrin 발현에 대한 TFCP의 효과

Filaggrin은 keratin-binding 단백질로서 각질층에 존재하고 피부를 보호하는데 중요한 역할을 한다 [24]. 따라서 TFCP가 UVB 조사에 의해 손상된 filaggrin을 다시 회복시키는지 확인하기 위해 western blotting 방법을 이용하여 확인하였다(Fig. 9). UVB군에서는 filaggrin의 발현이 현저하게 감소되었고, TFCP 섭취군에서는 filaggrin의 발현량이 UVB군에 비해 증가되었다. 따라서, TFCP 섭취시 UVB에 의해 손상된 filaggrin이 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

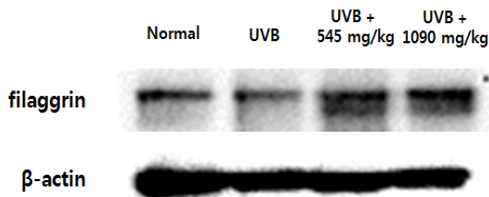


Fig. 9. Effect of TFCP intake on filaggrin expression in UVB-irradiated hairless mice.

4. 결론 및 논의

최근 식품 미용 소재로서 콜라겐 펩타이드는 중요한 소재로 평가 받고 있다. 이전에는 우피나 돈피 등 동물에서 추출한 콜라겐을 이용하였지만 과정이 복잡하고 추출되는 양이 적을 뿐만 아니라 위생 문제도 있어서 복잡한 추출 과정이 문제점으로 지적되었다 [11]. 이러한 문제점을 해결하기 위해 다른 원료 소재를 탐색하고 있다. 이 중 어류 가공 부산물에서 나오는 껍질이나 뼈에는 콜라겐이 다량 함유되어 있어 많은 양의 콜라겐을 얻을 수 있고 과정도 간단하기 때문에 동물 유래 콜라겐을 대체할 수 있는 소재로 각광받고 있다 [25]. 최근 연구에서는 sutchi catfish 유래 펩타이드 섭취가 자외선에 의한 콜라겐 펩타이드 분해 효소의 발현을 억제하여 주름 생성을 억제한다고 보고되었다 [16].

본 연구에서는 무모쥐 동물모델을 이용하여 광노화에

의해 유발되는 피부 주름 생성 및 손상에 Tilapia fish에서 유래된 콜라겐 펩타이드(TFCP) 섭취가 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. TFCP의 주성분은 glycine, proline, alanin 및 hydroxyproline으로 구성된 펩타이드로서 기존의 보고와 같이 자외선에 의한 피부 손상을 억제 할 가능성이 있으나, 현재까지 연구된 바는 없다.

Table 3. Summary of TFCP intake on UVB-irradiated hairless mouse skin.

	Normal	UVB	UVB + 545 mg/kg	UVB + 1090 mg/kg
Total Wrinkle area [mm ²]	1.45 ± 1) ¹⁾	2.25 ± 0.55	1.89 ± 0.61	1.40 ± 0.51
significance		# ²⁾	NS ⁴⁾	* ³⁾
Number of Wrinkles	33.43 ± 12.71	52.40 ± 10.14	43.11 ± 13.25	37.00 ± 11.54
significance		#	NS	*
Mean Length [mm]	0.45 ± 0.02	0.50 ± 0.04	0.46 ± 0.03	0.43 ± 0.04
significance		#	*	**
Wrinkle Depth [μm]	1742.64 ± 553.85	2637.33 ± 683.35	1776.67 ± 739.05	1786.18 ± 567.91
significance		#	*	*
Mean Depth [μm]	52.85 ± 4.08	59.00 ± 4.26	53.56 ± 2.80	51.85 ± 3.09
significance		#	*	**
Skin Hydration	34.70 ± 3.96	18.46 ± 2.63	20.82 ± 2.30	22.18 ± 3.00
significance		###	###, *	###, *
Redness	2.28 ± 0.34	3.16 ± 0.41	2.71 ± 0.46	2.64 ± 0.27
significance		##	NS	*
Epidermis Thickness	23.63 ± 1.79	60.73 ± 6.37	47.28 ± 4.61	40.88 ± 5.54
significance		###	###, ***	###, ***
Hydroxy-proline	57.49 ± 7.49	44.15 ± 6.09	47.68 ± 9.92	54.50 ± 10.26
significance		##	NS	*
MMP-3 (%)	100.00 ± 4.05	222.55 ± 4.03	133.47 ± 3.12	101.06 ± 2.54
significance		###	***	***
MMP-13(%)	100.00 ± 2.53	279.99 ± 0.55	187.67 ± 0.21	131.03 ± 0.13
significance		###	***	***
MMP-9 (%)	100.00 ± 0.55	176.62 ± 1.63	147.96 ± 1.23	42.08 ± 3.90
significance		###	***	***
MMP-2 (%)	100.00 ± 6.88	121.54 ± 9.12	139.07 ± 11.46	62.67 ± 6.63
significance		#	#	***

1) Mean±S.D, 2) ### p<0.001, ## p<0.01, # p<0.05 compared with non-UVB irradiated mice, 3) *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05 compared with UVB-irradiated mice, 4) NS: not significance

그 결과, TFCP는 UVB에 의해 생성되는 주름의 크기, 깊이, 길이, 주름의 수 및 홍반 생성을 감소시켰고, 피부 수분량은 증가되었다. 조직병리학적으로 관찰하였을 때, TFCP는 자외선에 의한 표피 두께의 증가를 억제하고 콜라겐 손상을 막는 것을 알 수 있었다. 또한, 콜라겐 구성에 필수요소인 하이드록시프롤린의 양도 TFCP 섭취 시 증가한 것을 확인할 수 있었다. TFCP의 작용기전을 알아보기 위해 콜라겐 분해 효소인 MMP-3 및 MMP-13 mRNA 발현량과 MMP-2 및 MMP-9 발현량을 확인한 결과, TFCP가 자외선에 의해 증가되는 MMP들의 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (Table 3). 또한, TFCP는 자외선에 의해 감소한 filaggrin의 단백질 발현을 회복시킴을 확인할 수 있었다. 모든 결과를 종합해보면 TFCP 섭취가 자외선으로부터 피부를 보호하여 콜라겐 분해 효소 활성을 억제하여 최종적으로 주름 생성을 억제하고, 피부 손상을 보호하는 효능을 가지고 있다는 것을 알 수 있었다. 따라서, Tilapia fish 유래의 콜라겐 펩타이드는 향후 광노화를 보호하는 식품 미용 소재로서의 가능성이 높음을 알 수 있다.

References

- [1] J. H. Lee, B. S. Lee, B. S. Byun, W. G. Kim, S. J. Lee, Y. C. Sim, B. H. Kim. Effect of APB-01 on the Ultraviolet-Induced Photoaging and Wrinkle Formation in the Hairless Mice. *J. Toxicol. Pub. Health.* 19: pp.303-310, 2003
- [2] J. K. Kim, J. H. Lee, M. S. Yang, D. B. Seo, S. J. Lee. Beneficial Effect of Collagen Peptide Supplement on Anti-aging Against Photodamage. *Korean J. Food Sci. Technol.* 41: pp.441-445, 2009
- [3] M. Tanaka, Y. Koyama, Y. Nomura. Effects of collagen peptide ingestion on UV-B-induced skin damage. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 73: pp.930-932, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.80649>
- [4] K. Scharffetter-Kochanek, P. Brenneisen, J. Wenk, G. Herrmann, W. Ma, L. Kuhr, C. Meewes, M. Wlaschek. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Experimental gerontology.* 35: pp.307-316, 2000. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00098-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00098-X)
- [5] K. J. Park, S. H. Park, J. K. Kim. Anti-wrinkle Activity of *Acanthopanax senticosus* Extract in Ultraviolet B (UVB)-induced Photoaging. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 39: pp.42-46, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2010.39.1.042>
- [6] J. J. Li, Z. Dong, M. I. Dawson, N. H. Colburn. Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that transrepress AP-1 without transactivating retinoic acid response element. *Cancer research.* 56: pp.483-489, 1996.
- [7] C. Huang, W. Y. Ma, M. I. Dawson, M. Rincon, R. A. Flavell, Z. Dong. Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *PNAS.* 94: pp.5826-5830, 1997. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.11.5826>
- [8] F. Takashi, O. Takahiro, Y. Naomi, W. Masanori, I. Takao, I. Katsumi. Effects of amla extract and collagen peptide on UVB-induced photoaging in hairless mice. *Journal of functional foods.* 5: pp.451-459, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.11.018>
- [9] M. Sumiyoshi, T. Hayashi, Y. Kimura. Effects of the nonsugar fraction of brown sugar on chronic ultraviolet B irradiation-induced photoaging in melanin-possessing hairless mice. *Journal of natural medicines.* 63: pp.130-136, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11418-008-0301-9>
- [10] M. Adam, P. Spacek, H. Hulejova, A. Galianova, J. Blahos. [Postmenopausal osteoporosis Treatment with calcitonin and a diet rich in cartilage proteins]. *Casopislekaruceskych.* 135: pp.74-78, 1996.
- [11] M. C. Kwon, Syed Abdul Qadir, H. S. Kim, J. H. Ahn, N. H. Cho, H. Y. Lee. UV Protection and Whitening Effects of Collagen Isolated from Outer Layer of the Squid *Todarodes pacificus*. *J. Kor. Fish. Soc.* 41: pp.7-12, 2008.
- [12] J. H. Chung, J. Y. Seo, H. R. Choi, M. K. Lee, C. S. Youn, G. Rhie, K. H. Cho, K. H. Kim, K. C. Park, H. C. Eun. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo. *J Invest Dermatol.* 117: pp.1218-1224, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01544.x>
- [13] S. E. Fligel, J. Varani, S. C. Datta, S. Kang, G. J. Fisher, J. J. Voorhees. Collagen degradation in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 in vitro. *J Invest Dermatol.* 120: pp.842-848, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12148.x>
- [14] S. Inomata, Y. Matsunaga, S. Amano, K. Takada, K. Kobayashi, M. Tsunenaga, T. Nishiyama, Y. Kohno, M. Fukuda. Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse. *J Invest Dermatol.* 120: pp.128-134, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12021.x>
- [15] H. Birkedal-Hansen. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Current opinion in cell biology.* 7: pp.728-735, 1995. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80116-2](http://dx.doi.org/10.1016/0955-0674(95)80116-2)
- [16] H. B. Pyun, M. Kim, J. Park, Y. Sakai, N. Numata, J. Y. Shin, H. J. Shin, D. U. Kim, J. K. Hwang. Effects of Collagen Tripeptide Supplement on Photoaging and Epidermal Skin Barrier in UVB-exposed Hairless Mice. *Prev Nutr Food Sci.* 17: pp.245-253, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.3746/pnf.2012.17.4.245>
- [17] C. H. Park, M. J. Lee, J. Ahn, S. Kim, H. H. Kim, K. H. Kim, H. C. Eun, J. H. Chung. Heat shock-induced matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 are mediated through ERK and JNK activation and via an

autocrine interleukin-6 loop. *J Invest Dermatol.* 123: pp.1012-1019, 2004.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23487.x>

- [18] C. Oba, H. Ohara, M. Morifuji, K. Ito, S. Ichikawa, K. Kawahata, J. Koga. Collagen hydrolysate intake improves the loss of epidermal barrier function and skin elasticity induced by UVB irradiation in hairless mice. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine.* 29: pp.204-211, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/phpp.12051>
- [19] Biniek K, Levi K, Dauskardt RH. Solar UV radiation reduces the barrier function of human skin. *PNAS.* 109: pp.17111-17116, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1206851109>
- [20] H. H. Kim, M. J. Lee, S. R. Lee, K. H. Kim, K. H. Cho, H. C. Eun, J. H. Chung. Augmentation of UV-induced skin wrinkling by infrared irradiation in hairless mice. *Mechanisms of ageing and development.* 126: pp.1170-1177, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2005.06.003>
- [21] M. Brennan, H. Bhatti, K. C. Nerusu, N. Bhagavathula, S. Kang, G. J. Fisher, J. Varani, J. J. Voorhees. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochemistry and photobiology.* 78: pp.43-48, 2003.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0780043MMITMC2.0.CO2](http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0780043MMITMC2.0.CO2)
- [22] C. Cheng, D. Tempel, R. van Haperen, L. van Damme, M. Algur, R. Krams, R. de Crom. Activation of MMP8 and MMP13 by angiotensin II correlates to severe intra-plaque hemorrhages and collagen breakdown in atherosclerotic lesions with a vulnerable phenotype. *Atherosclerosis.* 204: pp.26-33, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.01.025>
- [23] S. R. Kim, Y. R. Jung, H. J. An, D. H. Kim, E. J. Jang, Y. J. Choi, K. M. Moon, M. H. Park, C. H. Park, K. W. Chung, H. R. Bae, Y. W. Choi, N. D. Kim, H. Y. Chung. Anti-wrinkle and anti-inflammatory effects of active garlic components and the inhibition of MMPs via NF-kappaB signaling. *PloS one.* 8:e73877, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0073877>
- [24] B. Rechart. Function of filaggrin and caspase-14 information and maintenance of the epithelial barrier. *Dermatol Sinica.* 27: pp.1-14, 2009.
- [25] S. J. Yang, J. H. Hong. Extraction and Physicochemical Properties of Collagen from Squid (*Todarodes pacificus*) skin and Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Korean J. Food Cookery Sci.* 28: pp.711-719, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.9724/kfcs.2012.28.6.711>

신 현 준(Hyun-Jun Shin)

[준회원]



- 2007년 3월 ~ 2014년 8월 : 한국 산업기술대학교 생명화학공학과 (학사)
- 2014년 9월 ~ 현재 : 경희대학교 생명공학원 석사과정

<관심분야>

피부노화, 피부미백

박 종 일(Jong il Park)

[준회원]



- 2006년 3월 ~ 2012년 2월 : 경희대학교 유전공학과(학사)
- 2012년 3월 ~ 2014년 2월 : 경희대학교 생명공학원(이학석사)
- 2014년 3월 ~ 현재 : 경희대학교 생명공학원 박사과정

<관심분야>

피부노화, 피부미백

권 창 주(Chang-Ju Kwon)

[정회원]



- 1997년 2월 : 강원대학교 자연과학 대학원 미생물학(석사)
- 1997년 3월 ~ 2007년 2월 : 삼천당 제약 중앙연구소 과장
- 2011년 8월 ~ 2013년 2월 : 한국화학연구원 선임연구원
- 2013년 3월 ~ 현재 : 주영엔스 기업부설연구소장

<관심분야>

일반식품, 건강기능식품

김 화 영(Hwa young Kim)

[정회원]



- 2002년 2월 : 숙명여자대학교 대학원 식품영양학과(이학석사)
- 2010년 10월 : ㈜이룸 생명과학연구원 선임연구원
- 2010년 11월 ~ 현재 : 주영엔에스(주) 책임연구원

<관심분야>

건강기능식품, 생명과학

황 재 성(Jae Sung Hwang)

[정회원]



- 1994년 2월 : 서울대학교 대학원 (석사)
- 2003년 8월 : 아주대학교 의과대학 피부과학 (의학 박사)
- 1994년 3월 ~ 2009년 2월 : 아모레퍼시픽 기술연구원 수석 연구원
- 2009년 3월 ~ 현재 : 경희대학교 유전공학과 교수

<관심분야>

피부 노화, 피부 미백,

나오키 이노우에(Naoki Inoue)

[정회원]



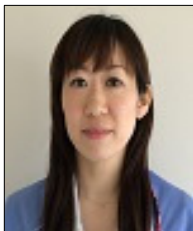
- 2005년 3월 : 오사카부립대학교농학 대학원 (농학석사)
- 2005년 4월 ~ 현재 : Nitta Gelatin Inc(일본, 오사카) 연구원

<관심분야>

식품과학, 생화학, 생명과학

고이즈미 세이코(Koizumi Seiko)

[정회원]



- 2003년 3월 : 후쿠이현립대학교 해양생명과학대 (이학사)
- 2003년 4월 ~ 현재 : Nitta Gelatin Inc(일본, 오사카) 연구원

<관심분야>

식품과학, 기능성 식품