

발효 돈태반과 그 주요 다이펩타이드 섭취가 UVB 조사에 의한 무모 생쥐의 피부 주름생성에 미치는 효과

이지은¹, 박종일¹, 김종배², 정혜인², 황재성^{*}

¹경희대학교 생명공학원 유전공학과

²LG생활건강 기술연구원

The Effects of Orally Administered Fermented Porcine Placenta and Its Major Dipeptides on UVB-induced Wrinkle Formation in the Hairless Mice

JiEun Lee¹, Jongil Park¹, Jongbae Kim², Hyein Jeong², JaeSung Hwang^{*}

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

²LG household & Healthcare Research Park

요약 본 연구에서는 발효 돈태반 (fermented porcine placenta, FPP)과 그의 주요 다이펩타이드인 L-Leucyl-Glycine (Leu-Gly), Glycyl-L-Leucine (Gly-Leu)의 섭취가 UVB 조사에 의한 무모 쥐의 피부 주름 생성에 미치는 효능을 알아보았다. Human Primary Dermal fibroblasts-Neonatal (HDF-N) 세포에서 세포 독성을 나타내지 않는 농도를 설정하여 평가하였을 때, FPP, Leu-Gly, Gly-Leu 처리 시 procollagen의 증가 및 MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)의 감소를 확인하였다. 또한 무모 생쥐에 주 3회 UVB를 조사하여 광노화를 유도하였고, FPP 10, 100 mg/kg, Leu-Gly 10 mg/kg, Gly-Leu 10 mg/kg을 매일 총 8주간 경구투여 한 후, 주름생성, 홍반 및 MMPs의 발현량을 측정하였다. 8주간 진행된 동물 실험 결과 UVB만 조사한 군과 비교하여 UVB를 조사하고 FPP, Leu-Gly, Gly-Leu를 섭취시킨 군에서 주름생성과 홍반이 감소하였고 피부 수분함량과 콜라겐 생합성이 증가하였다. 뿐만 아니라 FPP, Leu-Gly, Gly-Leu 섭취군에서 콜라겐 분해효소인 MMP-3, MMP-13의 mRNA 발현량이 감소하였고, MMP-2와 MMP-9의 활성이 감소하였다. 결과를 종합하였을 때, FPP의 주요 다이펩타이드인 Leu-Gly 과 Gly-Leu은 자외선에 의한 주름 생성을 억제하고, 피부 손상을 회복시키는 효능을 갖는 피부미용식품 소재로서 활용 가능성이 클 것으로 사료된다.

Abstract The effects of orally administered fermented porcine placenta (FPP) and its major dipeptides, L-Leucyl-Glycine (Leu-Gly) and Glycyl-L-Leucine (Gly-Leu), on UVB-induced wrinkle formation of the skin in hairless mice was studied. Treatment with FPP, Leu-Gly or Gly-Leu increased type I procollagen synthesis and decreased MMP-1 (matrix metalloproteinase-1) in human dermal fibroblast cells (HDF-N). Hairless mice were also exposed UVB irradiation three times a week and fermented porcine placenta extract (FPP), Leu-Gly and Gly-Leu was administered once a day for eight weeks. Daily intake of FPP, Leu-Gly and Gly-Leu for eight weeks decreased wrinkles, erythema and thickness of the skin and increased skin hydration and synthesis of collagen relative to a UVB-control. Moreover, FPP, Leu-Gly or Gly-Leu intake decreased the expression of MMP-3 and MMP-13 mRNA levels and inhibited activation of MMP-2 and MMP-9 induced by UVB irradiation in hairless mice skin. These results suggest that major dipeptides of the placenta, Leu-Gly and Gly-Leu have the potential for use as a functional food ingredient with anti-wrinkling properties.

Keywords : Fermented porcine placenta extract, Gly-Leu, Leu-Gly, Matrix metalloproteinase, UVB, Wrinkle

*Corresponding Author : Jae Sung Hwang(KyungHee Univ.)

Tel: +82-10-3242-8148 email: jshwang@khu.ac.kr

Received December 11, 2017

Revised (1st January 3, 2018, 2nd January 10, 2018)

Accepted March 9, 2018

Published March 31, 2018

1. 서론

피부는 신체를 둘러싼 가장 큰 조직으로 외부 자극과 세균 침입으로부터 신체를 방어 하고 체온 조절, 감각기능 및 노폐물 배출 등을 통해 우리 몸을 보호하는 역할을 한다 [1]. 피부도 다른 신체 기관과 마찬가지로 노화가 진행되는데 피부의 노화는 나이를 먹음에 따라 인체 기능의 저하와 호르몬 등의 생리적 기능이 변화되어 나타나는 내인성 노화와 자외선을 비롯한 여러 환경적 요인에 지속적으로 노출이 됐을 때 나타나는 외인성 노화로 나뉜다. 그 중 자외선으로 인한 광노화는 가장 직접적인 외인성 노화의 원인이며, 피부 건조, 주름 발생, 피부 탄력 감소, 색소 침착 등이 대표적인 현상이다 [2-3].

자외선은 피부 내에서 콜라겐 분해효소인 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 증가시켜 콜라겐의 분해를 유도하고 피부 수분을 유지시키는 히알루론산 생합성을 억제 한다 [4]. 지속적으로 자외선에 노출된 피부는 이러한 피부 결합조직들의 생리학적 변화들을 통해 진피층의 탄력이 감소되어 결국 깊은 주름을 생성하게 된다 [5-6]. 따라서 광노화로 인한 피부 손상과 주름을 예방하고 개선하기 위해 MMPs의 합성을 억제하면서 콜라겐과 히알루론산 생합성을 유도하는 소재들이 개발되고 있다.

태반은 임신 중 모체의 자궁 내막과 태아를 감싸는 자막을 연결하는 기관으로 모체와 태아간의 산소와 탄산가스를 교환하는 역할을 하고 영양분 제공과 노폐물 배출 등 태아의 생존과 성장에 필수적인 역할을 하는 기관이다 [7-8]. 태반 추출물은 항산화, 항염증, 면역력 강화 등에 효과적인 것으로 알려져 있기 때문에 기능성 식품 및 약재로서의 그 쓰임이 광범위 하다 [9-11]. 이처럼 태반에 관한 연구가 다양하게 이루어지고 있으며, 식품의약품안전처 고시 ‘식품의 기준 및 규격’에서는 소, 돼지, 양, 말 등 가축 유래 태반만 식품원료로 사용이 가능하다. [12].

태반을 이용한 실험적 연구로는 태반 추출물을 처리로 인한 피부의 상처치유 개선효과와 [13], insulin-like growth factor-1 (IGF-1)의 단백질 발현 증가로 인한 쥐의 모발성장 증가 효과 [14], 손상된 간세포의 재생을 통한 간 섬유증 억제 효과 [15]등이 알려져 있다. 또한, 돈 태반 추출물의 마우스 경구투여를 통한 *in vivo* 실험 결과 진피층에서 MMP-2, 9 발현 감소와 MMPs의 억제제인 metalloproteinase-1 (TIMP-1)과 metalloproteinase-2

(TIMP-2)의 발현 증가로 인한 항주름 효과가 밝혀져 있다 [16]. 또한 발효 돈 태반 추출물과 그 주요 다이펩타이드인 Leu-Gly, Gly-Leu이 염증과 산화반응을 억제하여 항 피로 효능을 갖는 것으로 보고되어 있지만 [17-18], 발효 돈 태반과 두 가지 다이펩타이드의 피부 주름에 관한 보고는 밝혀진 바가 없다.

본 연구는 발효 돈 태반 추출물과 이에 함유된 다이펩타이드인 L-Leucyl-Glycine (Leu-Gly), Glycyl-L-Leucine (Gly-Leu)의 광노화로 인한 주름개선 효능을 알아보고자 진행되었다. 이를 위해 Human Primary Dermal fibroblasts-Neonata (HDF-N) 세포를 이용하여 procollagen과 MMP-1의 발현을 ELISA로 확인하였고, 광노화를 유발한 무모 쥐 (hairless mouse) 동물 모델에 발효 돈 태반 추출물 (FPP), Leu-Gly, Gly-Leu을 경구투여 한 뒤 주름 생성, 피부 두께, MMPs 발현 및 콜라겐 합성 등을 측정하여 그 효능을 확인 하였다.

2. 실험 방법

2.1 실험 재료

실험에 사용한 발효돈태반 추출물 (Fermented Placenta Extract Powder A (K), HORUS Co., Ltd. Tokyo, Japan)은 HORUS Co., Ltd.로부터, Leu-Gly (G2495), Gly-Leu (M1460)은 Bachem AG (Bubendorf, Switzerland)로 부터 공급받아 사용하였다.

2.2 세포 배양

HDF-N 세포는 10% fetal bovine serum, 1% penicillin / streptomycin (WelGENE, Seoul, Korea)을 함유한 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (WelGENE, Seoul, Korea) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 세포 배양조건에서 배양하였다.

2.3 세포 독성 시험

HDF-N 세포를 96 well plate에 1x10⁴ cells/well로 분주한 다음 세포 배양조건에서 24시간 배양하였다. 배지를 제거하고 DPBS로 세척한 뒤 검액 및 새로운 배지를 넣고 배양하였다. 24시간 뒤 검액 및 배지를 제거하고 Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)로 세척한 후, 세포의 생존율을 측정하기 위해 EZ-Cytox (Daeil

Lab Service, Seoul, Korea)를 포함하는 배지를 처리 하여 1 시간 동안 반응시킨 후, 450nm에서 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

2.4 Procollagen 합성능 평가 시험

HDF-N 세포를 48 well plate에 1.2×10^4 cells/well로 분주하고 세포배양 조건에서 24시간 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고 세포의 기아상태를 24 시간 유지한 뒤 시험 물질을 세포 배양 배지에 희석하여 세포에 처리한 후 배양하였다. 24 시간 후에 배양된 세포의 배지를 수거한 뒤 procollagen type I c-peptide(PIP) EIA kit (MK101; Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 procollagen 양을 측정하였다. 바닥에 부착되어 있는 세포는 DPBS로 세척한 후 1 N NaOH로 lysis 시켜 BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)를 이용하여 총 단백질 양을 측정하였고 단백질 당 procollagen 합성 양을 보정하여 측정하였다.

2.5 MMP-1 저해 활성 평가 시험

HDF-N 세포를 48 well plate에 1.2×10^4 cells/well로 분주하고 세포배양 조건에서 24 시간 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고 세포의 기아상태를 24 시간 유지한 뒤 시험 물질을 세포 배양 배지에 희석하여 세포에 처리한 후 배양하였다. 24시간 후에 배양된 세포의 배지를 수거한 뒤 Human total MMP-1 kit (DY901; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) 를 사용하여 MMP-1 양을 측정하였다. 바닥에 부착되어 있는 세포는 DPBS로 세척한 후 1N NaOH로 lysis 시켜 BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)를 이용하여 총 단백질 양을 측정하였고 단백질 당 MMP-1 합성 양을 보정하여 측정하였다.

2.6 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 10 마리씩 6그룹으로 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. 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 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.

2.7 실험군 및 실험물질 경구투여

Reagan-Shaw et al (2008)의 논문을 참조하여 FPP의 일일 섭취량을 animal dose로 환산 하였고 [19], Nam et al (2006)의 실험 농도를 참고하여 FPP는 10, 100 mg/kg으로, Leu-Gly과 Gly-Leu은 10 mg/kg으로 결정하였다 [17]. 대조군, UVB군, UVB + FPP 10 mg/kg군, UVB + FPP 100 mg/kg군, UVB + Leu-Gly 10 mg/kg군, UVB + Gly-Leu 10 mg/kg군으로 실험을 진행하였다 (Table 1). 시료의 투여는 마우스 1 회 경구 투여 적정량인 10 mL/kg으로 하루에 한 번 경구투여 하였다.

Table 1. Experimental group and dose design

Group	UVB	Test material	Amount of oral administration
Con	X	water	
UVB	O	water	
UVB + FPP 10 mg/kg	O	FPP	10 mg/kg
UVB + FPP 100 mg/kg	O	FPP	100 mg/kg
UVB+ Leu-Gly 10 mg/kg	O	Leu-Gly	10 mg/kg
UVB+ Gly-Leu 10 mg/kg	O	Gly-Leu	10 mg/kg

2.8 UVB 조사

광노화에 의한 주름을 생성하기 위해 대조군을 제외한 나머지 군들은 매주 주 3회 동일한 시간에 UVB를 조사하였다. 정확한 조사량을 위해 UV meter (VARIOCNTRON, Waldmann ver 2.03, Villingen-Schwenningen, Germany)를 이용하여 1 MED (minimal erythral dose, 약 75 mJ/cm)의 값을 측정하고 UVB 램프 (TL 20W/12RS SLV, wave length 290 to 390 nm, peak emission 315 nm; Philips, Netherlands) 6개를 부착하여 UVB 조사를 하였다. 첫째 주는 1 MED, 둘째 주는 2 MED, 셋째 주는 3 MED, 넷째 주부터 실험종료 시 까지 3.3 MED를 조사하였으며, 피부 상태 및 적절한 주

름이 형성되도록 조사량을 조절하였다.

2.9 이상 반응 관찰 및 체중 측정

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

2.10 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 촬영하고 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.

2.11 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) 염색과 진피에 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 Software (Nikon, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

2.12 피부 홍반 평가

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

2.13 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 3 % agarose gel에 전기영동 후 Gel-doc (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여 분석하였다.

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'

2.14 Gelatin zymography 방법을 이용한 MMP-2, MMP-9 발현평가

피부 조직으로부터 단백질을 추출한 후에 10 X Blue Juice (Invitrogen, Carlsbad, USA)와 혼합하여 Novex® 10% Zymogram (Gelatin) Gel (Invitrogen)에 넣고 125 V의 일정한 전압으로 1.5 시간동안 전기영동을 하였다. 전기영동 후 겔을 Zymogram renaturing buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)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, Carlsbad, CA, USA)으로 2 시간 염색 후 distilled water로 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.

2.15 통계 분석

본 실험에서 얻은 결과는 Independent student's t-test를 이용하여 각 그룹 간 통계적 유의성을 검증하였다. 각 군의 유의성은 $p < 0.05$ 수준으로 검증하였다.

3. 결과

3.1 세포 독성 평가

FPP, Leu-Gly, Gly-Leu의 세포 독성을 확인하기 위해 HDF-N 세포에 각 시료가 함유된 배양액을 첨가하고 24시간 배양 후 세포 생존율을 평가하였다. 시험 결과, FPP와 Leu-Gly은 HDF-N 세포에서 100 µg/ml 농도까지, Gly-Leu은 10 µg/ml까지 세포 독성이 나타나지 않았다 (Fig1. a~c).

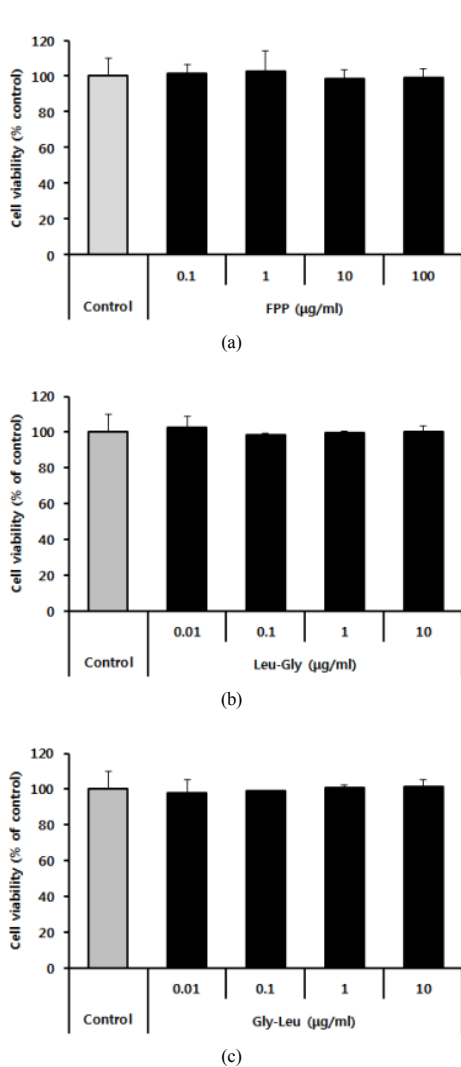


Fig. 1. Effect of FPP, Leu-Gly and Gly-Leu on cell viability in HDF-N.

Cell viability of FPP-treated (a), Leu-Gly-treated (b), Gly-Leu-treated (c) cells was measured using EZ-Cytox assay kit. The experiment was repeated three times. Data are indicated as mean±SD.

3.2 FPP, Leu-Gly, Gly-Leu이 Procollagen 합성에 미치는 영향

FPP와 Leu-Gly, Gly-Leu의 procollagen 합성 효능을 평가하기 위해 HDF-N 세포에 세 가지 시료를 처리하였고, 피부 콜라겐 중 대부분을 차지하는 type 1 procollagen의 발현을 ELISA로 확인하였다. 실험 결과, FPP, Leu-Gly, Gly-Leu 처리 시 유의한 type 1 procollagen 합성 증가를 확인하였다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) (Fig2. a~c).

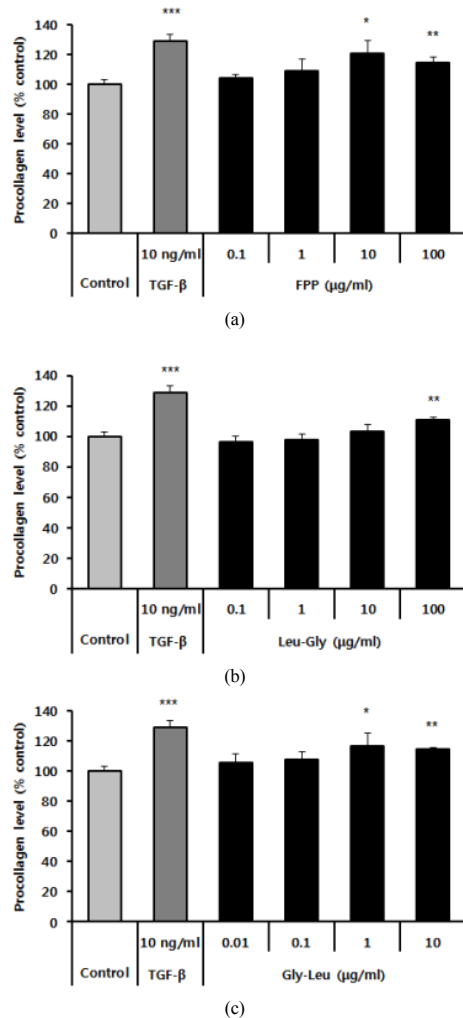


Fig. 2. Effects of FPP, Leu-Gly and Gly-Leu on procollagen synthesis in HDF-N.

Type-I procollagen synthesis of FPP-treated (a), Leu-Gly-treated (b) and Gly-Leu-treated (c) cells was quantified using a Procollagen Type I C-Peptide (PIP) EIA kit. All experiments were performed in triplicate. Data are indicated as mean±SD. Data were analyzed using the Student's t test for independent samples.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus untreated control.

3.3 FPP, Leu-Gly, Gly-Leu이 MMP-1 저해 활성에 미치는 영향

세 가지 시료의 MMP-1 저해 효능을 평가한 결과, FPP 0.1µg/ml 처리 시 18%, 1µg/ml 처리 시 20%, 10µg/ml 처리 시 6% 감소하였다. 또한 Leu-Gly 100µg/ml 처리 시 13%, Gly-Leu 10 µg/ml 처리 시 17% 감소하여 유의한 수준으로 MMP-1 저해 효능을 보였다 ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) (Fig3. a~c).

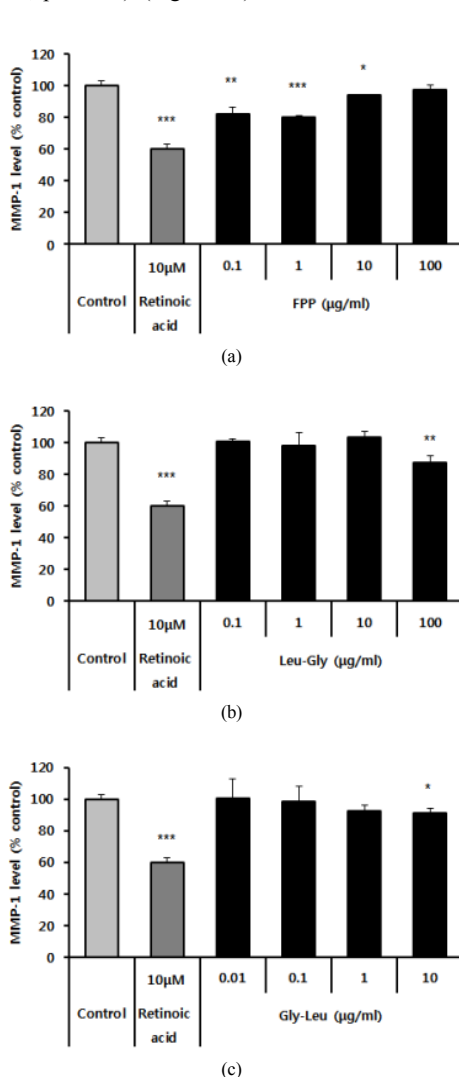


Fig. 3. Effects of FPP, Leu-Gly and Gly-Leu on inhibition of MMP1 in HDF-N.

MMP-1 synthesis of FPP-treated (a), Leu-Gly-treated (b) and Gly-Leu-treated (c) cells was quantified with a Human Total MMP-1 DuoSet ELISA assay kit. All experiments were performed in triplicate. Data are indicated as mean±SD. Data were analyzed using the Student's t test for independent samples.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus untreated control.

3.4 체중변화 및 증상 관찰

시료 섭취 시 이상 반응이 나타나는지 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. 4). 모든 동물 희생 후, 장기에 특이한 이상은 보이지 않았다.

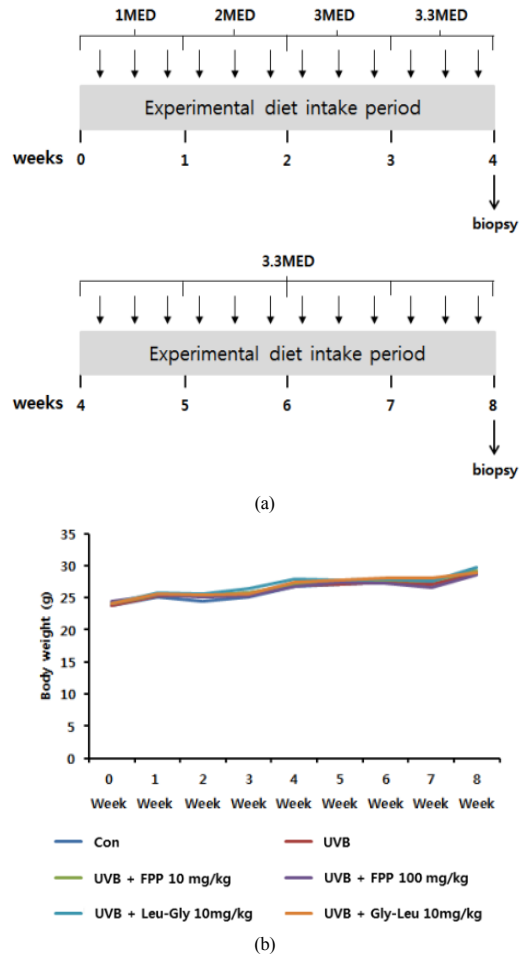


Fig. 4. Experimental design (a). Mice were subjected to UVB-irradiation and provided with FPP, Leu-Gly and Gly-Leu for 8 weeks. At the 4 weeks and 8 weeks skin biopsies were obtained and analyzed. Body weight changes in hairless mice (b). Data are indicated as mean±SD of ten mice in each group.

3.5 FPP, Leu-Gly, Gly-Leu이 UVB 조사로 인한 주름 형성에 미치는 영향

FPP, Leu-Gly, Gly-Leu의 섭취 후 주름 지표인 주름의 면적, 수, 길이, 깊이 등을 분석한 결과, UVB군이 대조군에 비해 모든 주름의 지표가 증가한 것을 확인하였고 FPP 및 Leu-Gly, Gly-Leu군은 UVB군에 비해 유의한 감소를 보였다 ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$) (Fig. 5, 6a-d).

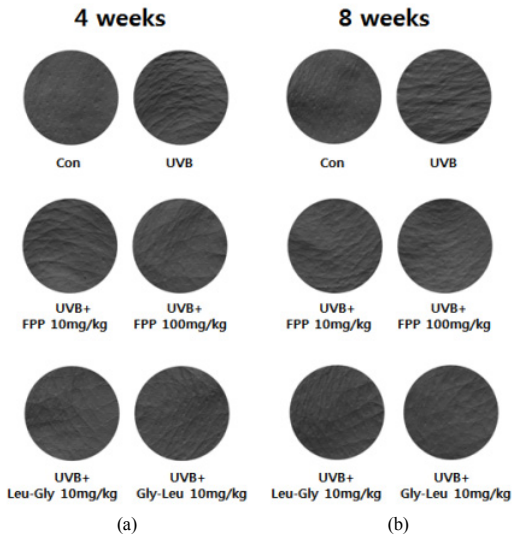


Fig. 5. Effects of FPP, Leu-Gly or Gly-Leu intake on UVB-induced wrinkle formation after 4 weeks (a) and 8 weeks (b).

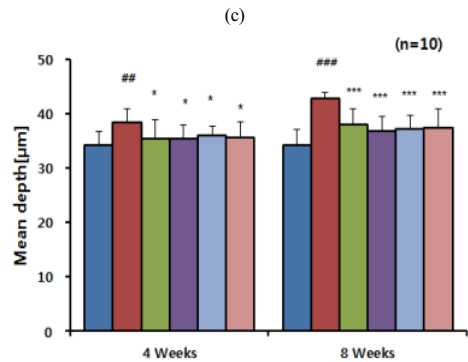
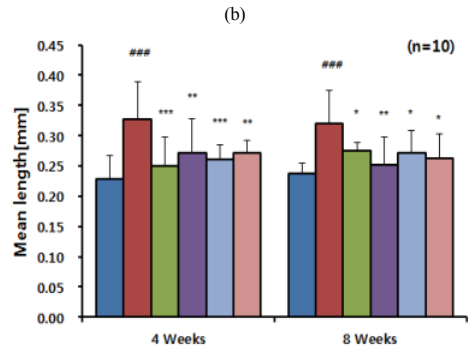
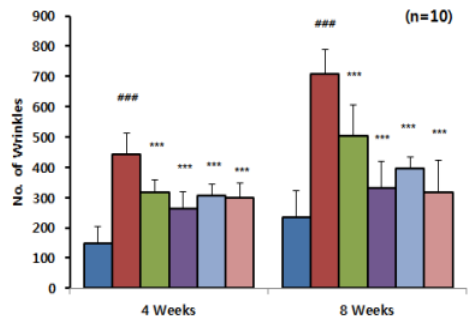
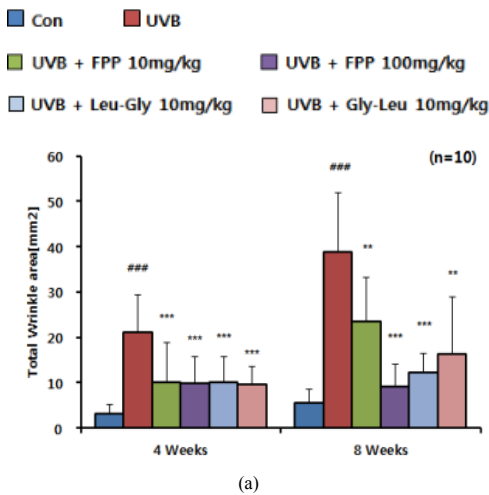


Fig. 6. Effects of FPP, Leu-Gly or Gly-Leu intake on wrinkle value of analyzed replica in UVB-irradiated hairless mice. Total wrinkle area (a) number of wrinkles (b) mean length (c) mean depth (d). Data are indicated as mean±SD of ten mice in each group. Data were analyzed using the Student's t test for independent samples. ### $p<0.001$, ## $p<0.01$, * $p<0.05$ compared with non-UVB irradiated mice; *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$ compared with UVB-irradiated mice.

3.6 FPP, Leu-Gly, Gly-Leu이 UVB조사로 인한 흉반 생성에 미치는 영향

다음으로 자외선에 의한 피부 흉반 반응에 FPP,

Leu-Gly, Gly-Leu의 섭취가 미치는 영향을 확인하였다. UVB를 조사한 군에서 홍반이 유발되었고 FPP, Leu-Gly, Gly-Leu 섭취군의 경우 UVB군에 비해 유의한 수준으로 홍반이 감소한 것을 확인 할 수 있었다 ($p < 0.001$) (Fig. 7).

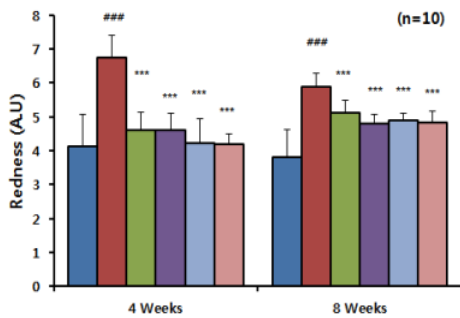


Fig. 7. Effects of FPP, Leu-Gly or Gly-Leu intake on skin redness in UVB-irradiated hairless mice. Data are indicated as mean±SD of ten mice in each group. Data were analyzed using the Student's t test for independent samples. ### $p < 0.001$ compared with non-UVB irradiated mice; * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with UVB-irradiated mice.

3.7 FPP, Leu-Gly, Gly-Leu의 섭취가 광노화로 인한 피부 두께 변화와 콜라겐 감소에 미치는 영향

FPP, Leu-Gly, Gly-Leu의 섭취가 UVB가 조사된 피부의 두께와 콜라겐 형성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 조직염색을 실시하였다. Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색 결과, UVB군이 대조군에 비해 표피의 두께가 증가하였고, FPP, Leu-Gly, Gly-Leu 섭취군은 UVB군에 비해 표피 두께가 감소하였다 (Fig. 7a). NIS-Elements BR 3.0 Software를 이용하여 피부 두께를 측정된 결과 세 가지 시료를 섭취 시 UVB 조사에 의해 증가된 피부 두께가 유의하게 감소하는 것을 확인하였다 ($p < 0.01$, $p < 0.001$) (Fig. 7b). Masson's trichrome 염색 결과, 대조군과 비교하여 UVB군의 콜라겐 형성이 현저하게 감소하였지만 FPP, Leu-Gly, Gly-Leu 섭취 시 UVB 조사에 의해 감소되었던 콜라겐 발현이 회복된 것을 확인하였다 (Fig. 8).

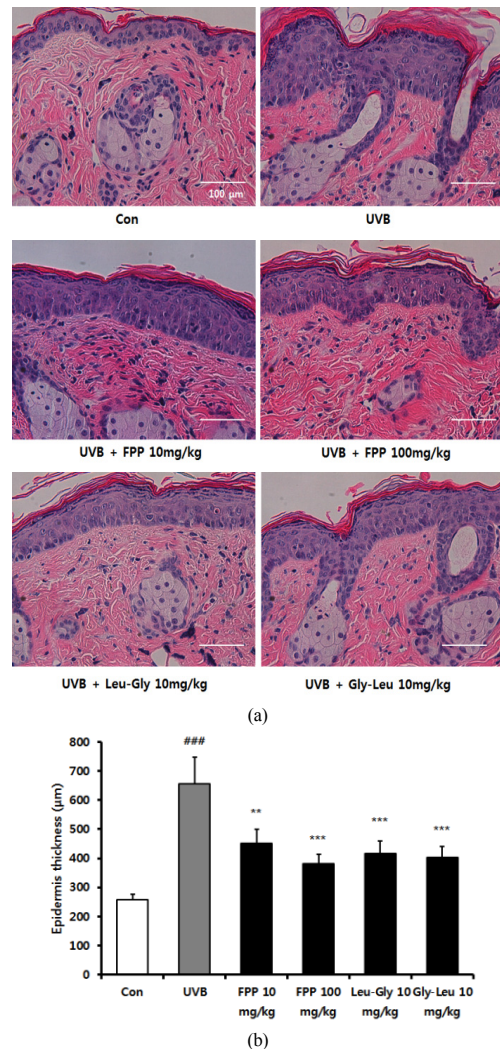


Fig. 8. Hematoxylin and Eosin (H&E) staining from the dorsum of the hairless mice skin. Magnification $\times 400$. Scale bars = 100 μm . Data are indicated as mean±SD of ten mice in each group. Data were analyzed using the Student's t test for independent samples. ### $p < 0.001$ compared with non-UVB irradiated mice; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ compared with UVB-irradiated mice.

3.8 UVB 조사로 유도된 MMP-3 및 MMP-13의 발현 억제에 대한 FPP, Leu-Gly, Gly-Leu의 효과

FPP, Leu-Gly, Gly-Leu 섭취에 따른 MMP-13과 MMP-3의 mRNA 발현을 RT-PCR을 이용하여 측정하

였다. 실험 결과, 대조군에 비하여 UVB군에서 MMP-13 과 MMP-3의 mRNA 발현이 증가하였고, FPP 100 mg/kg, Leu-Gly과 Gly-Leu 10 mg/kg 섭취 시 UVB 조사에 의해 증가했던 MMP-13 과 MMP-3의 발현이 유의한 수준으로 감소하였다 ($p<0.001$) (Fig. 9a-c).

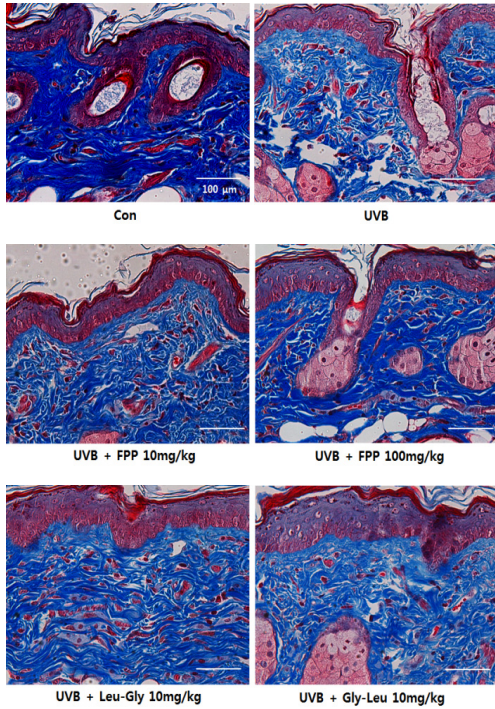


Fig. 9. Masson's trichrome staining of collagen fibers from the dorsum of the hairless mice skin. Masson trichrome staining of the skin tissue showed tissue morphology. Magnification $\times 400$. Scale bars = 100 μ m.

3.9 UVB 조사로 인해 증가된 MMP-2 및 MMP-9의 활성 억제에 대한 FPP, Leu-Gly, Gly-Leu의 효과

Gelatin zymography로 FPP, Leu-Gy, Gly-Leu의 섭취가 UVB 조사에 의해 활성화된 MMP-2, MMP-9에 대하여 억제 효과를 갖는지 확인하였다. 실험 결과, FPP, Leu-Gy, Gly-Leu 섭취 시 UVB 조사에 의해 증가된 MMP-9 (86kDa)과 MMP-2 (62 kDa)의 발현이 감소하였다 ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$) (Fig. 10a-b). 따라서, FPP, Leu-Gy, Gly-Leu의 섭취가 콜라겐 분해효소인 MMP-2 및 MMP-9의 활성을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

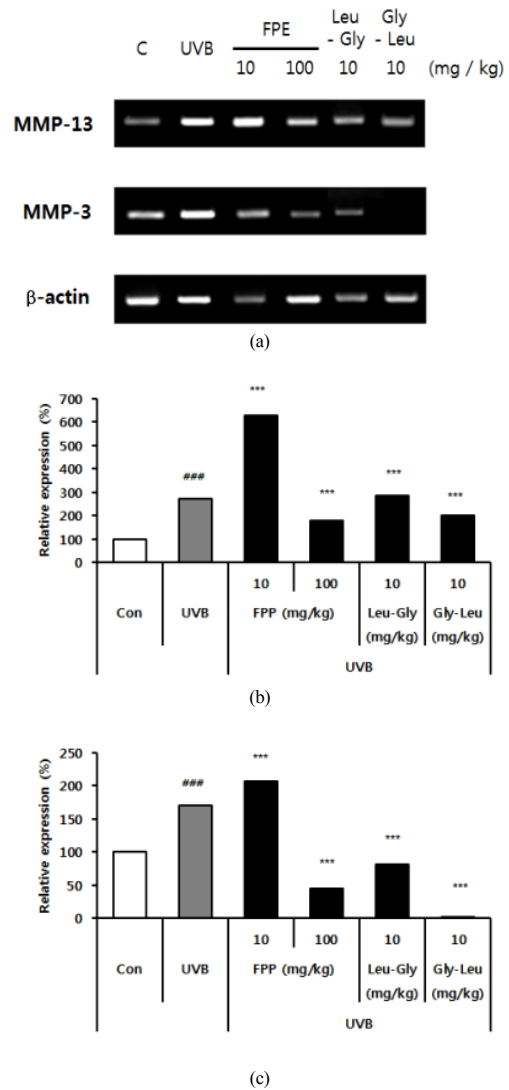


Fig. 10. Effects of FPP, Leu-Gly or Gly-Leu intake on MMP-3 and MMP-13 mRNA expression level in UVB-irradiated hairless mice. RT-PCR analysis (a) and percentage of MMP-13 (b) and MMP-3 (c) mRNA expression. Data are indicated as mean \pm SD of ten mice in each group. Data were analyzed using the Student's t test for independent samples. ### $p<0.001$ compared with non-UVB irradiated mice; *** $p<0.001$ compared with UVB-irradiated mice.

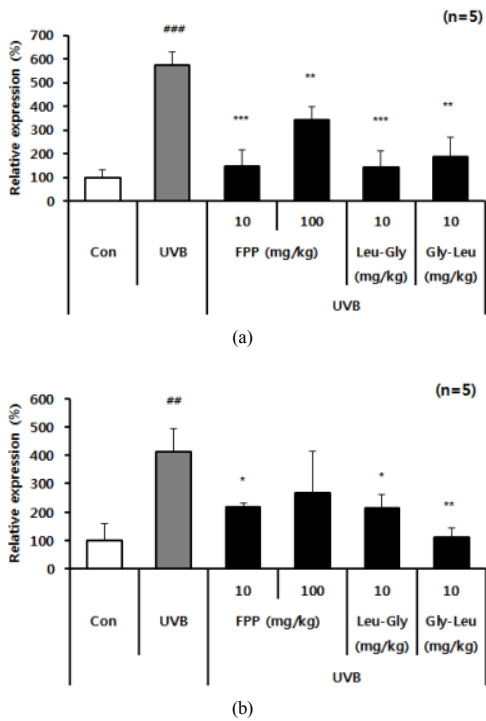


Fig. 11. Effect of FPP, Leu-Gly or Gly-Leu intake on MMP-2 and MMP-9 activity in UVB-irradiated hairless mice. MMP-2 (a) and MMP-9 (b) expression level. Data are indicated as mean±SD of eleven mice in each group. ###p<0.001, ##p<0.01, #p<0.05 compared with non-UVB irradiated mice; ***p<0.001 compared with UVB-irradiated mice.

4. 결론 및 논의

현대인들의 외모에 대한 관심이 증가하면서 피부노화에 대한 관심 또한 높아지고 있다. 광노화로 인한 주름생성은 피부 노화의 지표로 사용되는 만큼 변화가 뚜렷하고 화장으로도 잘 가려지지 않기 때문에 이미 생성된 주름을 없애거나 생성을 미리 예방할 수 있는 식품들이 각광받고 있다.

자외선은 피부 내 활성산소종 (Reactive Oxygen Species; ROS) 생성을 유발하고 생성된 ROS는 피부 세포의 산화를 일으키며 MMPs의 활성을 증가시켜 콜라겐 분해를 유도한다. Park et al. (2015)의 연구에 따르면, 돈 태반 추출물이 Human keratinocytes (HaCaT) 세포에서 UVB 조사에 의해 증가된 세포내 ROS 생성을 억제

시키고, MMP-2의 mRNA 발현을 감소시킨다 [21].

따라서 이와 같은 돈 태반 추출물을 이용한 기존의 연구들을 바탕으로 FPP의 광노화로 인해 유발되는 피부주름 개선 소재로서의 가능성을 예측하였고 [16,21], FPP와 그의 주요 다이펩타이드인 Leu-Gly과 Gly-Leu의 효능을 알아보기 위해 본 연구를 진행하게 되었다.

먼저 FPP, Leu-Gly, Gly-Leu의 작용기전을 알아보기 위한 세포 실험 결과, 세 가지 시료는 HDF-N 세포에서 procollagen의 합성을 증가시켰다. 체내외 MMP family 중 MMP-1은 주로 콜라겐을 분해하는 효소로 자외선에 노출된 피부는 MMP-1의 발현이 증가하여 콜라겐 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다 [22]. 따라서 MMP-1 활성 억제 평가를 진행 한 결과, 세 가지 시료 모두 UVB에 의해 증가된 세포 내 MMP-1의 활성을 억제시키는 효능을 보였다. FPP, Leu-Gly, Gly-Leu의 섭취 시 그 효능을 알아보기 위한 동물 실험 결과, FPP, Leu-Gly, Gly-Leu의 섭취는 UVB에 의해 생성된 무모 쥐 피부의 주름의 면적, 수, 길이, 깊이 및 흉반 생성을 감소시켰고, 피부 수분량을 증가시켰다. 자외선 조사는 표피의 두께를 증가시키고 콜라겐 분해 효소를 활성화 시켜 진피층의 콜라겐 섬유를 파괴한다. 따라서 FPP, Leu-Gly, Gly-Leu의 섭취가 UVB가 조사된 피부의 두께와 콜라겐 형성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 조직 염색을 실시한 결과, 자외선에 의해 증가된 표피 두께를 감소시켰고 콜라겐 생합성 감소를 막는 것을 확인하였다. MMP family 중 MMP-13은 특이적인 type II 콜라겐 분해 작용을 하고 MMP-3는 type IV 콜라겐을 분해하면서 pro-MMP-9을 활성화 시키고 proteoglycan, fibronectin과 같은 여러 가지 기질단백질들을 분해시킨다 [23-24]. MMP-2와 MMP-9은 UVB 조사에 의해서 활성화되고 type IV와 type V 콜라겐, fibronectin 및 엘라스틴 섬유를 분해하는 활성을 갖는다 [25]. FPP, Leu-Gly, Gly-Leu 섭취 시 광노화로 인한 콜라겐 감소를 회복시킬 수 있다는 것을 확인하였기 때문에 FPP, Leu-Gly, Gly-Leu이 콜라겐 분해효소인 MMPs 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 실험 결과, FPP, Leu-Gly, Gly-Leu의 섭취가 자외선에 의해 증가되는 MMP-13과 MMP-3의 mRNA 발현을 감소시키고 MMP-2와 MMP-9의 활성을 억제 나타내었다. 또한 Leu-Gly과 Gly-Leu 다이펩타이드가 FPP와 비슷한 수준의 효능을 보이는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 3. Comparison of total wrinkle, number of wrinkle, mean length, mean depth and redness in the hairless mice skin at 4 weeks after FPP, Leu-Gly and Gly-Leu intake.

(a)				
	Con	UVB	UVB + FPP 10 mg/kg	UVB + FPP 100 mg/kg
Total Wrinkle area [mm ²]	3.18 ± 1) ¹⁾	21.02 ± 2.06	10.08 ± 8.40	9.82 ± 05.84
significance		### ²⁾	*** ³⁾	***
Number of Wrinkles	146.40 ± 56.68	441.00 ± 72.65	317.10 ± 41.83	261.30 ± 57.97
significance		###	***	***
Mean Length [mm]	0.23 ± 0.04	0.33 ± 0.06	0.25 ± 0.05	0.27 ± 0.06
significance		###	***	**
Mean Depth [μm]	34.12 ± 2.56	38.41 ± 2.45	35.26 ± 3.54	35.25 ± 2.53
significance		##	*	*
Redness	4.13 ± 0.95	6.73 ± 0.68	4.61 ± 0.53	4.59 ± 0.51
significance		###	***	***
(b)				
	UVB + Leu-Gly 10 mg/kg	UVB + Gly-Leu 10 mg/kg		
Total Wrinkle area [mm ²]	10.22 ± 5.43	9.59 ± 3.93		
significance	***	***		
Number of Wrinkles	306.00 ± 37.24	300.00 ± 38.67		
significance	***	***		
Mean Length [mm]	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.02		
significance	***	**		
Mean Depth [μm]	35.90 ± 1.82	35.52 ± 2.88		
significance	*	*		
Redness	4.22 ± 0.72	4.20 ± 0.30		
significance	***	***		
significance		###		

¹⁾ Mean±SD, ²⁾ ##p<0.01, ###p<0.001 compared with non-UVB irradiated mice, ³⁾ *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared with UVB-irradiated mice

Table 4. Comparison of total wrinkle, number of wrinkle, mean length, mean depth, redness in the hairless mice skin at 8 weeks after FPP, Leu-Gly and Gly-Leu intake.

(a)				
	Con	UVB	UVB + FPP 10 mg/kg	UVB + FPP 100 mg/kg
Total Wrinkle area [mm ²]	5.64 ± 1) ¹⁾	3.03 38.79± 13.12	23.62 ± 9.55	9.22 ± 4.80
significance		### ²⁾	** ³⁾	***
Number of Wrinkles	232.60 ± 90.12	707.60 ± 81.12	503.60 ± 100.88	332.20 ± 88.12
significance		###	***	***

Mean Length [mm]	0.24 ± 0.02	0.32 ± 0.05	0.28 ± 0.01	0.25 ± 0.05
significance		###	*	**
Mean Depth [μm]	34.17 ± 2.86	42.68 ± 1.24	38.00 ± 2.82	35.65 ± 2.75
significance		###	***	***
Redness	3.81 ± 0.82	5.89 ± 0.40	5.13 ± 0.35	4.78 ± 0.28
significance		###	***	***
Epidermis Thickness	258.99 ± 16.81	654.99 ± 91.16	452.38 ± 46.70	382.82 ± 29.63
significance		###	**	***
MMP-13(%)	100.00 ± 0.00	271.22 ± 0.03	626.89 ± 0.06	179.90 ± 0.01
significance		###	***	***
MMP-3 (%)	100.00 ± 0.05	169.49 ± 0.03	206.13 ± 0.02	44.38 ± 0.01
significance		###	***	***
MMP-2 (%)	100.00 ± 29.62	575.19 ± 52.65	145.86 ± 69.26	340.76 ± 55.05
significance		###	***	**
MMP-9 (%)	100.00 ± 58.91	411.46 ± 81.63	215.69 ± 145.44	266.53 ± 145.44
significance		##	*	NS

(b)

	UVB + Leu-Gly 10 mg/kg	UVB + Gly-Leu 10 mg/kg
Total Wrinkle area [mm ²]	12.23 ± 4.24	16.23 ± 12.78
significance	***	**
Number of Wrinkles	394.40 ± 37.68	315.30 ± 106.52
significance	***	***
Mean Length [mm]	0.27 ± 0.04	0.26 ± 0.04
significance	*	*
Mean Depth [μm]	37.16 ± 2.41	37.25 ± 3.64
significance	***	***
Redness	4.88 ± 0.21	4.82 ± 0.34
significance	***	***
Epidermis Thickness	416.55 ± 42.31	402.58 ± 38.58
significance	***	***
MMP-13(%)	283.63 ± 0.04	200.00 ± 0.02
significance	***	***
MMP-3 (%)	80.63 ± 0.04	0.98 ± 0.00
significance	***	***
MMP-2 (%)	143.06 ± 67.76	187.84 ± 79.62
significance	***	**
MMP-9 (%)	213.14 ± 47.54	109.07 ± 34.63
significance	*	**

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

Glycine, leucine 및 proline은 type I collagen을 구성하는 주요 아미노산으로 이 중 glycine은 콜라겐 합성과 피부장력을 증가시켜 상처 치유 효능이 있는 것으로 알려져 있다 [26-27]. 홍어류 껍질을 가수분해 하여 MMP-1 저해 활성을 보인 펩타이드를 분리 정제한 연구를 통해 이러한 펩타이드들이 소수성 아미노산인 leucine과 valine으로 구성되어 있으며 소수성 아미노산 잔기가 MMP-1의 p1' 효소 활성 부위에 특이적으로 결합하여 저해 활성을 갖는 것을 확인 하였다 [28]. 또한 Park et al (2017)의 연구에서 돈 태반의 Leu-Gly, Gly-Leu 다이펩타이드가 엘라스틴 분해효소인 elastase 활성 감소를 나타냈다 [29]. Elastase의 효소작용은 엘라스틴뿐만 아니라 type 1 collagen을 분해하기 때문에 피부 탄력을 저하시켜 피부 처짐과 주름 형성에 중요한 요인이 된다. 본 연구에서 Leu-Gly과 Gly-Leu 다이펩타이드의 주름 개선 효능은 glycine과 leucine의 이러한 기능들을 토대로 효능을 보인 것으로 생각 된다.

Park et al. (2010)의 연구에서 UVB가 조사된 무모 생쥐에 가시오가피(A. senticosus, AS) 추출물을 경구투여 한 결과 자외선에 의한 주름 생성과 콜라겐 분해가 감소되는 효과가 보고된 바 있다 [30]. 또한 Tilapia fish에서 얻은 콜라겐 펩타이드의 섭취가 UVB 조사에 의해 증가된 MMPs의 발현을 감소시켰고, 손상된 콜라겐과 filaggrin 단백질을 회복시켜 주름 생성을 억제하고 피부 손상을 보호하는 효과를 나타내었다 [31]. 위의 결과들과 본 연구의 식이 섭취량을 비교하였을 때, FPP (10, 100 mg/kg), Leu-Gly (10 mg/kg), Gly-Leu (10 mg/kg)의 효과가 가시오가피 추출물 (400 mg/kg)과 Tilapia fish 추출물 (545 mg/kg, 1010 mg/kg)의 효과와 비슷한 유의성을 보였다.

따라서 발효 돈 태반 추출물과 그의 주요 다이펩타이드인 Leu-Gly, Gly-Leu이 향후 광노화로 인한 피부 주름을 개선할 수 있는 미용 기능 식품 소재로서의 활용 가능성이 높음을 알 수 있다.

References

- [1] M. Sand, T. Gambichler, D. Sand, M. Skrygan, P. Altmeyer and F.G. Bechara, "MicroRNAs and the skin: tiny players in the body's largest organ", *J. Dermatol. Sci.*, vol. 53, no. 3, pp. 169-175, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2008.10.004>
- [2] M. El Domyati, S. Attia, F. Saleh, D. Brown, D.E. Birk, F. Gasparro, H. Ahmad and J. Uitto, "Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin", *Exp. Dermatol.*, vol. 11, no. 5, pp. 398-405, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0625.2002.110502.x>
- [3] J.Y. Lee, Y.K. Kim, J.Y. Seo, C.W. Choi, J.S. Hwang, B.G. Lee, I.S. Chang and J.H. Chung, "Loss of elastic fibers causes skin wrinkles in sun-damaged human skin", *J. Dermatol. Sci.*, vol. 50, no. 2, pp. 99-107, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2007.11.010>
- [4] K.K. Dong, N. Damaghi, S.D. Picart, N.G. Markova, K. Obayashi, Y. Okano, H. Masaki, S. Grether Beck, J. Krutmann and K.A. Smiles, "UV induced DNA damage initiates release of MMP 1 in human skin", *Exp. Dermatol.*, vol. 17, no. 12, pp. 1037-1044, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00747.x>
- [5] C.E. Griffiths, T.S. Wang, T.A. Hamilton, J.J. Voorhees and C.N. Ellis, "A photometric scale for the assessment of cutaneous photodamage", *Arch. Dermatol.*, vol. 128, no. 3, pp. 347-351, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1001/archderm.128.3.347>
- [6] G.L. Grove, M.J. Grove and J.J. Leyden, "Optical profilometry: an objective method for quantification of facial wrinkles", *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 21, no. 3, pp. 631-637, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(89\)70230-9](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(89)70230-9)
- [7] S. Togashi, N. Takahashi, M. Iwama, S. Watanabe, K. Tamagawa and T. Fukui, "Antioxidative collagen-derived peptides in human-placenta extract", *Placenta*, vol. 23, no. 6, pp. 497-502, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1053/plac.2002.0833>
- [8] M. Yeom, H. Lee, G. Kim, I. Shim, H. Lee and D. Hahn, "Therapeutic effects of Hominis placenta injection into an acupuncture point on the inflammatory responses in subchondral bone region of adjuvant-induced polyarthritic rat", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 26, no. 10, pp. 1472-1477, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.26.1472>
- [9] T.K. Biswas, B. Auddy, N.P. Bhattacharya, S. Bhattacharya and B. Mukherjee, "Wound healing activity of human placental extracts in rats.", *Acta Pharmacol.Sin.*, vol. 22, no. 12, pp. 1113-1116, 2001.
- [10] M. Kawakatsu, Y. Urata, S. Goto, Y. Ono and T. Li, "Placental extract protects bone marrow-derived stem/progenitor cells against radiation injury through anti-inflammatory activity", *J. Radiat.Res.*, vol. 54, no. 2, pp. 268-276, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/jrr/rrs105>
- [11] S. Togashi, N. Takahashi, Y. Kubo, A. Shigihara, K. Higashiyama, S. Watanabe and T. Fukui, "Purification and identification of antioxidant substances in human-placenta extracts", *J. Health Sci.*, vol. 46, no. 2, pp. 117-125, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1248/jhs.46.117>
- [12] MFDS. Food Code. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea 2016.
- [13] J.W. Hong, W.J. Lee, S.B. Hahn, B.J. Kim and D.H. Lew, "The effect of human placenta extract in a wound healing model", *Ann. Plast. Surg.*, vol. 65, no. 1, pp. 96-100, 2010.

- DOI: <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e3181b0bb67>
- [14] D. Zhang, G. Lijuan, L. Jingjie, L. Zheng, C. Wang, Z. Wang, L. Liu, L. Mira and C. Sung, "Cow placenta extract promotes murine hair growth through enhancing the insulin-like growth factor-1", *Indian J. Dermatol.*, vol. 56, no. 1, pp. 14, 2011.
DOI: <https://doi.org/10.4103/0019-5154.77544>
- [15] J. Jung, H. Lee, J.M. Lee, K. Na, S. Hwang and G.J. Kim, "Placenta extract promote liver regeneration in CCl₄-injured liver rat model", *Int. Immunopharmacol.*, vol. 11, no. 8, pp. 976-984, 2011.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.02.012>
- [16] K. Hong, Y. Park, J.H. Kim, J.M. Kim and H.J. Suh, "Effects of porcine placenta extract ingestion on ultraviolet B-induced skin damage in hairless mice", *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, vol. 35, no. 3, pp. 413, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.3.413>
- [17] S. Nam, H. Kim and H. Jeong, "Anti-fatigue effect by active dipeptides of fermented porcine placenta through inhibiting the inflammatory and oxidative reactions", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 84, pp. 51-59, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.012>
- [18] S. Nam, J. Go, M. Lee, J. Kim, H. Jeong and W.K. Lee, "Anti-fatigue effect of fermented porcine placenta through the regulation of fatigue-associated inflammatory cytokines", *Tang*, vol. 6, no. 2, pp. 13.7, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5667/tang.2016.0011>
- [19] S. Reagan-Shaw, M. Nihal and N. Ahmad, "Dose translation from animal to human studies revisited", *The FASEB journal*, vol. 22, no. 3, pp. 659-661, 2008.
DOI: <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>
- [20] B.A. Booth, K.L. Polak and J. Uitto, "Collagen biosynthesis by human skin fibroblasts. I. Optimization of the culture conditions for synthesis of type I and type III procollagens", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, vol. 607, no. 1, pp. 145-160, 1980.
- [21] Y. Park, B.K. Han, H. Choi, Y.H. Hong, E.Y. Jung and H.J. Suh, "Effect of porcine placenta extract from subcritical water extraction on photodamage in human keratinocytes", *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, vol. 35, no. 2, pp. 164, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.2.164>
- [22] H. Nagase and J.F. Woessner Jr, "Matrix metalloproteinases", *J Biol Chem* 274 (31): 21491 - 21494", Find this article online, 1999.
- [23] M. Brennan, H. Bhatti, K.C. Nerusu, N. Bhagavathula, S. Kang, G.J. Fisher, J. Varani and J.J. Voorhees, "Matrix metalloproteinase 1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV irradiated human skin", *Photochem. Photobiol.*, vol. 78, no. 1, pp. 43-48, 2003.
DOI: [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0780043MMITMC2.0.CO2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0780043MMITMC2.0.CO2)
- [24] W.D. Shingleton, A.J. Ellis, A.D. Rowan and T.E. Cawston, "Retinoic acid combines with interleukin 1 to promote the degradation of collagen from bovine nasal cartilage: Matrix metalloproteinases 1 and 13 are involved in cartilage collagen breakdown", *J. Cell. Biochem.*, vol. 79, no. 4, pp. 519-531, 2000.
DOI: [https://doi.org/10.1002/1097-4644\(20001215\)79:4<519::AID-JCB10>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1097-4644(20001215)79:4<519::AID-JCB10>3.0.CO;2-U)
- [25] K. Scharffetter - Kochanek, P. Brenneisen, J. Wenk, G. Herrmann, W. Ma, L. Kuhr, C. Meewes and M. Wlaschek, "Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms", *Exp. Gerontol.*, vol. 35, no. 3, pp. 307-316, 2000.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00098-X)
- [26] J. Chyun and P. Griminger, "Improvement of nitrogen retention by arginine and glycine supplementation and its relation to collagen synthesis in traumatized mature and aged rats", *J. Nutr.*, vol. 114, no. 9, pp. 1697-1704, 1984.
DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/114.9.1697>
- [27] A.M.M. Jais, R. McCulloch and K. Croft, "Fatty acid and amino acid composition in haruan as a potential role in wound healing", *General Pharmacology: The Vascular System*, vol. 25, no. 5, pp. 947-950, 1994.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(94\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0306-3623(94)90101-5)
- [28] S. Park, J. Lee, J. Jeon and H. Byun, "Characterization of a collagenase-1 inhibitory peptide purified from skate dipturus chilensis skin", *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 44, no. 5, pp. 456-463, 2011.
DOI: <https://doi.org/10.5657/KFAS.2011.0456>
- [29] J.I. Park, J.E. Lee, H.J. Shin, S. Song, W.K. Lee and J.S. Hwang, "Oral Administration of Glycine and Leucine Dipeptides Improves Skin Hydration and Elasticity in UVB-Irradiated Hairless Mice", *Biomolecules & therapeutics*, vol. 25, no. 5, pp. 528, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.089>
- [30] K.J. Park, S.H. Park and J.K. Kim, "Anti-wrinkle Activity of Acanthopanax senticosus Extract in Ultraviolet B (UVB)-induced Photoaging", *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, vol. 39, no. 1, pp. 42-46, 2010.
DOI: <https://doi.org/10.3746/jkfn.2010.39.1.042>
- [31] H. Shin, J. il Park, C. Kwon, H. young Kim, N. Inoue, K. Seiko and J.S. Hwang, "The Effect of Collagen Peptide Intake on UVB-induced Skin Damage in Hairless mice", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, vol. 17, no. 3, pp. 611-621, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2016.17.3.611>

이 지 은(Ji Eun Lee)

[준회원]



- 2008년 3월 ~ 2013년 2월 : 경희대학교 유전공학과 (학사)
- 2013년 3월 ~ 2015년 2월 : 경희대학교 생명공학원(이학석사)
- 2015년 3월 ~ 현재 : 경희대학교 생명공학원 박사과정

<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

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

김 종 배(Jong bae Kim)

[정회원]



- 2008년 2월 : 한양대학교 식품영양학과(이학사)
- 2013년 2월 : 한양대학교 식품영양학과(이학석사)
- 2012년 12월 ~ 현재 : LG생활건강 기술연구원

<관심분야>
건강기능식품, 기능성소재개발

정 혜 인(Hye in Jeong)

[정회원]



- 2009년 3월 ~ 2013년 2월 : 서울대학교 농업생명과학대학 식품생명공학과(농학사)
- 2013년 3월 ~ 2015년 2월 : 서울대학교 농업생명과학대학 바이오모듈레이션 전공 (농학석사)
- 2015년 1월 ~ 현재 : LG생활건강 기술연구원

<관심분야>
피부노화, 피부미백