

제니스테인에 의한 노화된 피부세포 활성화와 콜라겐 생성 효과

양은순¹ · 홍란희² · 강상모^{1,3*}

¹건국대학교 대학원 생물공학과, ²중앙대학교 의과대학 예방의학교실, ³건국대학교 미생물공학과

The Effects of Genistein on the Proliferation and Type I pN Collagen Synthesis in Aged Normal Human Fibroblasts. Yang, Eun-Soon¹, Ran-Hi Hong², and Sang-Mo Kang^{1,3}. ¹Department of Bioengineering, graduate School at KonKuk University, ²Department of Preventive Medicine, College of Medicine, ChungAng University, ³Department of Microbial Engineering, KonKuk University – We studied the effects of genistein obtained from glycolysis of genistin, a kind of phytoestrogen present in soybeans, on cell proliferation and type I pN collagen synthesis in normal human dermal fibroblasts(NHDF). Cell proliferation was increased significantly with genistein treatment at 54-year aged NHDF. Genistein increased cell proliferation more strongly in cells form old doner than young doner. The senescence-associated β -galactosidase activity was decreased in NHDF from 77-year old doner with genistein treatment. Type I pN collagen synthesis was increased with genistein treatment in UVA treated and non-treated NHDF. The increasement of collagen synthesis was more effective in aged cells than young cells. Type I pN collagen synthesis was also increased with genistein treatment in collagen matrix culture with NHDF from sun-exposed and non-exposed skin from 54-year old doner. Genistein treatment inhibited MMP-1 synthesis in old NHDF but not in young NHDF. In conclusion, genistein may be a useful agent for preventing intrinsic aging as well as photoaging.

Key words: Genistein, collagen, aging, photoaging, fibroblast

서 론

피부의 노화는 자연노화와 광노화로 나눈다. 피부가 노화가 됨에 따라 여러 가지 대사 활성이 저하되며 세포 활성도 떨어진다. 콜라겐 합성과 콜라겐의 전사 이후에 일어나는 과정도 자연노화로 감소한다[24]. Transforming growth factor- β (TGF- β), epidermal growth factor, fibroblast growth factor와 같은 성장호르몬도 노화에 의해 감소된다[4]. 피부는 노화됨에 따라 얇고, 건조해지며 주름지게 된다. 노화된 피부에서는 정상적인 표피 분화는 일어나지만, 각질형성세포의 분열감소로 얇아지게 된다. 진피 또한 결합조직의 감소로 얇아지게 된다. 피부의 결합조직은 주로 콜라겐과 엘라스틴 등에 의해 이루어진다. 진피 섬유아세포는 matrix안에 들어있다. 콜라겐과 엘라스틴은 피부에 탄성과 힘을 주며 이들이 노화로 약해지면 피부는 쉽게 손상되고 늙는다. 반복적인 자외선 노출로 피부의 matrix metalloproteinases(MMPs)가 증가하며, 증가된 MMPs는 피부의 콜라겐을 분해하게 된다. 이런 현상의 반복은 피부 주름을 형성시키게 된다[9].

여성의 경우, 폐경기 이후에 가속화되는 피부의 자연노화

는 에스트로젠과 같은 호르몬의 결핍이 주요한 인자이다. 에스트로겐의 결핍은 자연노화뿐 아니라, 자외선 등 환경에 의한 피부 노화도 가속화시킨다. 에스트로겐은 콜라겐 합성을 촉진하며, 피부 두께를 유지시키고, 피부 보습력을 증가시키는 등 여러 작용으로 피부를 개선시킨다. 따라서 호르몬 보충요법(hormone replacement therapy)를 받는 여성은 그렇지 않은 여성에 비해 피부 탄력이 증가하고, 주름이 개선되었다는 보고[27]도 있다.

한편, 광노화는 조금 다른 과정을 거친다. 광노화의 주요한 원인은 자외선이며 자외선에 의해 생성되는 tumor necrosis factor- α , tumor necrosis factor(TNF)- γ , nitric oxide, 인터루킨 등은 피부에서 콜라겐의 합성을 억제하며, 콜라겐을 분해하는 효소들의 발현을 증가시킨다. 이러한 특징적인 변화들은 광노화를 유도하며 피부홍반, 거칠기, 주름 및 흑화를 만들게 된다[10].

피부의 주요한 구성 성분은 콜라겐이다. 콜라겐은 진피 건조중량의 70-80%를 차지한다. 사람의 진피 중 type I, III 콜라겐이 주요한 성분이며 type I은 총 콜라겐의 80%를, type III는 15%를 차지한다. 피부의 주름은 콜라겐의 합성과 분해의 불균형에 기인한다. 보통 피부에서 type I 콜라겐의 합성과 그 분해 효소인 MMP-1이 균형을 이루고 있다. 그러나 광노화된 피부에서는 type I, III 콜라겐의 합성이 저하되고, MMP-1의 활성이 증가되어 있다[32].

식물에서 유래되고 비스테로이드성이며 약한 에스트로젠

*Corresponding author

Tel: 82-2-450-3524, Fax: 82-2-3437-8360

E-mail: kangsm@konkuk.ac.kr

성 활성을 지닌 물질을 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)이라 부른다. 자연계에는 많은 식물성 에스트로겐이 발견되는데 주로 향신료, 콩류, 곡류, 과일, 야채, 허브 등에 풍부하다. 화학적으로 식물성 에스트로겐은 이소플라본(isoflavone), 쿠메스탄(coumestan), 리그난(lignan)으로 구분된다[16]. 식물성 에스트로겐은 구조적으로는 여성 호르몬인 에스트로겐과 비슷하여 에스트로겐 수용체와 결합하며, 에스트로겐에 대하여 작용제(agonist) 혹은 길항제(antagonist)로서 작용한다[29].

이소플라본은 대두에서 많이 발견되는 식물성 에스트로겐으로 대두의 종류 및 대두 가공품에 따라 차이는 있지만 건조 무게(g)당 0.2-1.6 mg 이소플라본이 함유되어 있다. 대두의 이소플라본은 당이 붙어 있는 배당체(glycoside; genistin, daidzin, glycitin), acetylglucoside 및 malonylglucoside의 형태이며, 가공 정도에 따라 당이 떨어져 나간 비배당체(alglycone) 형태로 바뀔 수도 있다. 대두 제품 섭취 후 당 결합 형태인 이소플라본은 장내의 β -glucosidase에 의해 가수분해되어 활성형의 비배당체 형태 이소플라본으로 흡수된다[30]. 이러한 비배당체로는 주로 제니스테인(genistein), 다이드제인(daidzein), 글리시테인(glycitein) 등이 있으며, 갱년기 장애를 위한 기능성 식품으로는 시판되고 있는 이소플라본은 배당체와 비배당체 모두 사용되고 있다. 또한 이들 이소플라본은 피부 두께 증가 효과[28] 및 히알루론산 합성 증가 효과[20]가 있어 화장품에 첨가하여 사용하고 있다.

대두 배당체로부터 얻을 수 있는 제니스테인, 다이드제인과 글리시테인은 많은 연구들이 되어 있다. 다이드제인은 약한 에스트로겐 효과[19], 섬유아세포 증식 효과[33], 히알루론산 생성 촉진 효과[20]가 보고되어 있으며, 글리시테인도 약한 에스트로겐 효과[31]와 항산화 효과[13]가 보고되어 있다. 그러나 이들 2가지 식물성 에스트로겐은 여러 가지 면에서 기능적으로 제니스테인 만큼 효과적이지 못한 것으로 보인다. 제니스테인은 주로 콩, Ginkgo biloba extract, Greek oregano 그리고 Greek sage 등에도 많이 존재하는데 피부에서 항산화와 항암 효과를 지니고 있는 것으로 보고된 바 있으며[1], 인체 각질형성세포주인 NCTC 2544에 제니스테인을 처리하였을 때 자외선에 의해 유도되는 activator protein-1(AP-1)의 결합을 억제하여 지질과산화물을 억제하고 활성산소 생성을 차단하였다[18]. 또한 제니스테인은 쥐와 사람에서 자외선에 의한 피부암과 광손상을 억제하는 것으로 나타났다[36, 37].

피부에서 MMPs의 합성을 억제하고 콜라겐의 합성을 촉진하여 피부 광노화를 개선하거나 억제하는 것으로 알려진 비타민 A는 자연 노화된 피부에서도 동일한 효과를 지니며 이는 노화가 많이 진행된 경우 더욱 효과적이었다[34]. Greenwel 등[11]은 사람의 정상 섬유아세포에서 제니스테인이 tyrosine kinase와 상호 작용하여 콜라겐 합성을 촉진함을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 화장품에 첨가하여 피부미용제로 사용하고 있는 이소플라본 중 특히 효과가 가장 크다고 생각되는 제니스테인에 대하여 피부미용 효과 특히 비타민 A와 같은 효과가 있는지 확인해 보고자하였다. 따라서 지금까지 보고되지 않은 나이에 따른 피부세포 특히 노화된 피부세포 및 이에 자외선을 조사하여 제니스테인이 세포의 활성, type I pN 콜라겐의 합성에 어떤 영향을 미치는가와 MMP-1의 합성에 미치는 영향에 대해서 조사하여 비타민 A와 같이 자연노화를 억제할 수 있는지에 대해 알아보았다.

재료 및 방법

세포 배양

0세, 22세, 39세, 54세 및 77세 된 여성의 주로 엉덩이 피부에서 섬유아세포를 얻었다(모든 피험자에게는 문서화된 동의를 얻었다). 얻어진 피부에서 지방층을 제거한 후 2-4 mm × 2-4 mm 크기의 절편으로 조각 낸 뒤, type I collagenase(0.1% W/V in phosphate buffered saline, Gibco BRL, USA)용액을 가하여 37°C에서 12시간 정치하였다. 이후 type I collagenase 용액을 제거한 뒤, 표피를 제거한 후 진피를 수술용 칼로 잘게 조각낸 후 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco BRL, USA)배지를 넣고, 75 cm² 티슈 플라스크에 정치하였다. 그리고 조각난 티슈에서 세포가 피부 조직 밖으로 배출되어 플라스크 안에서 자라면 이를 회수하여 실험에 사용하였다. 세포는 DMEM 배지에, 0.48 mg/mL glutamine, 100 IU/mL penicillin, 50 ug/mL streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclon, USA)를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 실험은 4에서 10계대의 섬유아세포를 사용하였다. 단층배양과 콜라겐 매트릭스에서 배양한 세포를 이용하여 세포 성장과 콜라겐 및 MMP-1의 합성량을 측정하였다[5].

세포의 β -galactosidase 염색

노화로 증가되는 β -galactosidase(Senescence-associated β -galactosidase, SA- β -Gal) 활성은 senescent cell staining kit(Sigma, USA)를 사용하여 염색하였다. 35 mm culture dishes에 섬유아세포를 1×10^5 cells를 seeding한 후 2주간 제니스테인을 10^{-7} M 농도로 넣은 DMEM 배지로 키웠다. 2주 뒤에 phosphate buffered saline(PBS)으로 wash한 후, 0.2% glutaraldehyde와 2% formaldehyde로 7분간 고정시킨 후, 40 mM citric acid/phosphate(pH 6.0), 5 mM K₃FeCN₆, 5 mM K₄FeCN₆, 150 mM NaCl과 2 mM MgCl₂에 1 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside 이 되도록 녹인 용액을 CO₂가 없는 37°C에서 24시간 둔 후, 파란색으로 염색된 세포들을 광학현미경으로 관찰하고 사진 촬영을 하였다.

자외선 조사

실험에 사용된 자외선은 UVA로서 15 J/cm²의 자외선을 CUBE 401 lamp(UVATEC, USA)를 사용하여 조사하였다. 자외선을 조사하기 전에 international light radiometer(IL 1700, Newburyport, MA, USA, calibrated against a spectroradiometer and standard lamp)를 이용하여 자외선 양을 측정하였다. 자외선 조사 전 섬유아세포의 양은 배양 플레이트에 80-90%로 차도록 키웠으며, DMEM 배지를 제거 후 PBS로 2회 씻어주었다[35].

세포 증식률

세포 증식은 Mosmann의 방법[22]을 사용하였다. 섬유아세포를 96-well plate에 well당 6×10^3 개로 깔고 5% FBS를 첨가한 DMEM 배지에 37°C에서 18시간 동안 정치하였다. 세포가 붙은 이후, 제니스테인(Sigma, USA)을 10⁻⁷ M의 농도로 처리하고, 72시간 배양한 후에 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, U.S.A.)용액을 각 well에 50 µL씩 첨가한 후(2 mg/mL) 4시간 동안 정치하였다. 이후 원심 분리하여 상층액을 제거하고, 150 µL의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가한 후, 10분간 shaking하여 생성된 formazan을 녹였다. 이후 DMSO에 녹은 formazan을 multi-microplate reader(Bio-TEK EL310, Burlington, VT, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Type I pN 콜라겐 합성량 측정

Type I pN 콜라겐의 합성량 측정은 ELISA kit(Takara, Japan)를 사용하여 측정하였다. 섬유아세포를 24-well multi plate에 well당 5×10^4 개 깔고, 10% FBS를 첨가한 DMEM 배지에 24시간 정치하였다(pH 7.4). 이후 FBS를 첨가하지 않은 DMEM배지에 제니스테인을 10⁻⁷ M 농도로 첨가하여 48시간 동안 배양하고 상층액을 회수하였다. 그 후 회수된 상층액을 이용하여 kit에서 제공된 96-well plate에 coating하고, 4°C에서 overnight방치한 후, TPBS(0.1% Tween 20 in PBS)로 3회 세척하고, 3% bovine serum albumin(BSA in TBPS)를 넣고 2시간 blocking하였다. Primary antibody인 anti-collagen antibody를 37°C에서 90분간 처리한 후, TPBS로 3회 세척하였다. Secondary antibody인 anti-mouse IgG(whole mouse, alkaline phosphatase conjugated)를 90분간 반응시킨 후 TPBS로 3회 세척하였다. Alkaline phosphatase substrate solution(1 mg/mL *p*-nitrophenyl phosphate in diethanolamine buffer)을 상온에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다[5].

콜라겐 매트릭스 내에서 type I pN 콜라겐 합성량 측정

콜라겐 매트릭스는 Coulomb B의 방법을 변형하여 제작하였다[8]. 열배로 농축된 DMEM 배지와 Ham's nutrient

mixture F12배지를 3:1로 혼합한 type I 콜라겐 gel을 re-constitution buffer와 함께 섞어서 콜라겐 기질을 만든 후 배양한 섬유아세포를 1×10^6 cell/well의 수만큼 콜라겐 기질과 혼합하여 24-well plate에 0.3 mL씩 넣어 배양기 안에 넣고 24시간 방치하여, 섬유아세포에 의해 콜라겐이 충분히 응축되도록 하였다. 이후 10% FBS가 첨가된 DMEM배양액을 각 well당 0.5 mL씩 추가하여 매트릭스를 유지하였다. 제작된 콜라겐 매트릭스에 제니스테인을 10⁻⁵ M 농도로 72시간 처리한 후, 배양액을 회수하여 단층배양과 동일한 방법으로 Takara kit을 사용하여 콜라겐 합성량을 측정하였다.

MMP-I 측정

MMP-I의 합성은 배양된 세포의 배양액을 채취하여 ELISA kit(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 사용하여 측정하였다. 섬유아세포를 24-well multi plate에 well 당 5×10^4 개 넣고, 10% FBS를 첨가한 DMEM배지에 24시간 배양하였다(pH 7.4). 이후 FBS를 첨가하지 않은 DMEM배지에 제니스테인을 10⁻⁷ M 농도로 첨가하여 48시간 동안 배양하고 상층액을 회수하였다. 그 후 회수된 상층액을 이용하여 kit에서 제공된 96-well plate에 coating하고, 4°C에서 12시간 정치한 후, TPBS로 3회 세척하고, 3% BSA를 넣고 2시간 blocking하였다. 이후 primary antibody 제조부터는 전술의 type I pN 콜라겐 합성 측정법과 동일하게 하였다[5].

통계 처리

모든 자료는 mean ± S.E.로 나타내었고 One-way ANOVA를 사용하여 통계 처리하여 p<0.05 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

제니스테인의 노화된 피부세포 활성화

제니스테인은 간암세포주인 HepG2 간암세포에서 apoptosis를 유도하거나[3], 신장암 세포의 성장을 억제하는 등 여러 암세포의 성장을 억제하는 것으로 보고된 바[26] 있으나 정상 인체 피부 섬유아세포의 성장에 미치는 영향에 대해서는 보고된 바 없다.

제니스테인에 의한 노화된 피부 섬유아세포의 증식 효과는 Fig. 1에 나타내었고, 세포의 노화를 측정할 수 있는 지표인 SA-β-Gal 활성도를 SA-β-Gal 측정 kit로 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 1에서 대조군으로서 여러 연령층에서 분리된 섬유아세포의 세포 성장을 알아보기 위해, 제니스테인을 처리하지 않고 세포 분열정도를 측정하였다. 나이가 증가됨에 따라서 0세를 100%로 하였을 때, 22세는 81%, 39세는 75%, 54세는 51%로 세포 증식이 유의적으로 감소하였다(p<0.05). 이들 세포에 제니스테인을 처리하였을

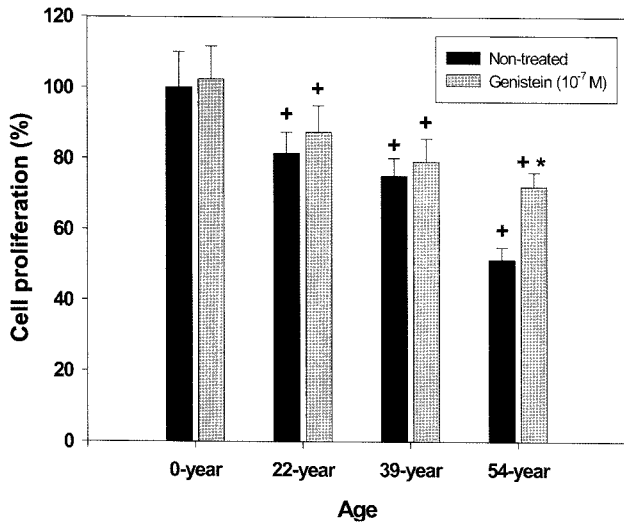


Fig. 1. The effect of genistein on cell proliferation in normal human dermal fibroblasts with age.

때, 각각 나이의 비처리군과 비교하여 0세에서는 102%, 22세에서는 107%, 39세에서 105%로 세포 증식이 큰 차이가 없었다. 그러나 54세의 경우 비처리군과 비교하여 제니스테인 처리군이 140%로 유의적 증가를 보였다($p < 0.05$).

한편, 제니스테인이 노화에 의해 증가되는 SA-β-Gal에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위하여 77세 된 피부의 섬유아세포를 배양 후 제니스테인을 10⁻⁷ M로 2주간 처리하였다. 이후 SA-β-Gal을 염색하여 세포 변화를 측정하였다. 제니스테인을 처리하지 않은 경우는 Fig. 2의 (A)에서 파란색으로 염색되는 노화된 세포의 수가 매우 많음을 알 수 있었다. 반면 제니스테인을 처리한 Fig. 2의 (B)에서는 파란색으로 염색된 세포가 비처리군에 비해 현저하게 줄어 노화된 세포가 Fig. 2의 (A)에 비해 적음을 알 수 있었다.

항산화제에 의한 세포복제 노화(replicative senescence) 억제에 대해, 최근 Han 등[12]은 항산화 효소의 하나인 peroxiredoxin II(Prx II)가 쥐의 배아 섬유아세포에서 세포 노화를 억제한다는 것을 보고하였다. Prx II가 결핍된 세포에서는 SA-β-Gal 염색법으로 염색되는 세포가 정상에 비해

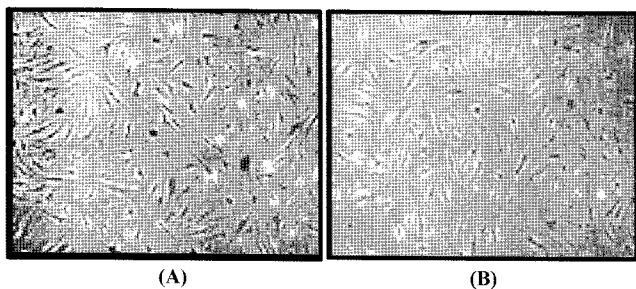


Fig. 2. Photographs of the effect of genistein on SA-β-galactosidase activity in 77 year aged normal human dermal fibroblasts.

30% 많았으며, 항산화제인 N-acetyl-cystein 처리에 의해 SA-β-Gal 염색이 감소하였다고 하였다. 그리고 Kruk 등[15]은 제니스테인이 라디칼 생성을 억제하는 것을 보고하였다.

이와 같이 세포가 노화되면서 SA-β-Gal 활성도가 높아지나 Han 등[12]의 보고와 같이, 항산화제가 세포노화를 어느 정도 억제할 수 있는 것으로 생각된다. 따라서 77세의 노화된 섬유아세포에 항산화제인 제니스테인 처리로 세포노화가 어느 정도 억제되어 SA-β-Gal 활성도가 억제된 것으로 생각되었다.

한편 Fig. 1에 관한 얘기로, Varani 등의 연구[34]에 의하면 나이에 따라 진피에 존재하는 섬유아세포의 수가 줄어들었으며, 이들 진피를 배양하였을 때, 18-29세의 경우 76%, 80세 이후 피부의 경우 38%로 배양되어 나오는 섬유아세포의 수가 크게 줄었다. 또한 80세 이후의 피검자에게 1% 비타민 A를 7일간 피부에 도포 후 생검하여 섬유아세포 수를 측정하였을 때, 세포증식이 3배 이상 유의적으로 증가되었다. Ashcroft 등의 연구[2]에 의하면, 여성이 노화되면서 피부의 상처치유 속도는 감소하며 이런 노화에 의한 변화는 호르몬 보충요법에 의해 회복된다. 또한, 자궁을 적출한 어린 설치류에서 상처 치유가 매우 늦어지며 이것은 에스트로겐 국소도포로 개선된다고 하였다. 이러한 현상들은 에스트로겐에 의해 섬유아세포에서 분비되는 TGF-β에 기인하는 것으로 보고하였다.

본 실험에서 제니스테인 처리로 54세의 섬유아세포에서 제니스테인 비처리에 비해 세포 증식이 유의적으로 증가된 것을 볼 때, 제니스테인이 비타민 A와 유사하게 자연노화된 섬유아세포의 증식을 증가시킴을 알 수 있었으며 이런 경향은 젊은 피부에서 추출된 세포에서보다 노화가 진행된 세포에서 명확하게 나타남을 알 수 있었다. 이와 같이 제니스테인이 노화된 세포에서 더욱 세포를 증식시키는 것은 Ashcroft 등의 연구[2]에서와 같이 에스트로겐 유사체로서 성장호르몬 TGF-β분비를 촉진하여 나타난 것으로 보인다. 또한 노화에 의해 생체 내에서 ROS 증가와 COX-2 증가[6], 노화로 혈중에 malondialdehyde 같은 과산화물 축적[25] 그리고 활성산소제거제인 SOD가 감소되는 것[17]을 볼 때, 제니스테인의 항산화활성이나 COX-2 억제에 의한 염증 억제작용이 노화된 피부 섬유아세포의 대사에서 발생하는 이들 세포 증식 저해인자들을 억제함으로써 세포증식을 촉진할 수 있었을 것으로 생각되었다.

제니스테인의 type I pN 콜라겐 합성(monolayer culture) 증진 효과

제니스테인이 섬유아세포의 콜라겐 합성에 미치는 영향을 알아보았다. 제니스테인에 의한 영등이 피부 섬유아세포의 type I pN 콜라겐 합성 정도는 Fig. 3과 같다. 대조군으로서 나이별로 배양된 세포의 콜라겐 합성을 측정할 결과, 나이가 증가함에 따라서 콜라겐의 합성량은 감소하였으며, 22세, 39

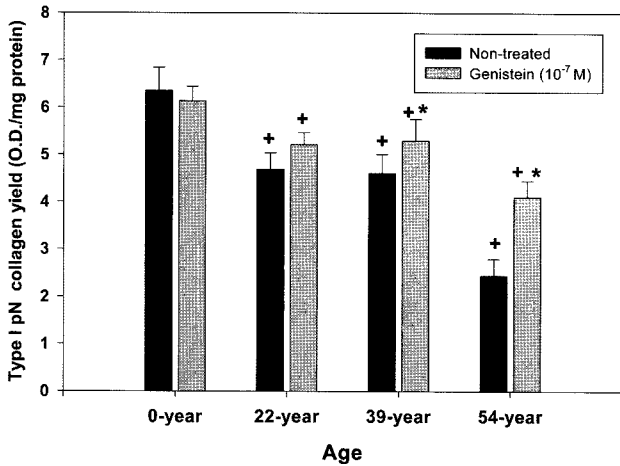


Fig. 3. The effect of genistein on type I pN collagen synthesis in normal human dermal fibroblasts with age.

세, 54세의 세포에서 0세와 비교하였을 때 각각 26%, 27%, 62%의 유의적 감소를 보였다. 나이에 따른 제니스테인의 콜라겐 합성능을 측정하기 위해, 제니스테인을 10⁻⁷ M로 처리하고 type I pN 콜라겐량을 측정하였다. 각 나이별 세포에 제니스테인을 처리하였을 때, 각각의 비처리군과 비교하여 0세, 22세에서는 약간 증가되는 경향이 있었으나 통계적인 유의차는 없었다. 그러나 39세, 54세에서는 type I pN 콜라겐이 각각의 비처리군에 비하여, 15%, 68%의 유의적 증가를 보였다.

Varani 등의 보고에 의하면[34], 18-29세와 80세 이후의 피부의 type I pN 콜라겐 합성량을 비교했을 때 80세 이후에서 합성량이 52% 줄었다. 진피와 표피 사이에 많이 염색되는 procollagen의 양도 80세 이후에서는 매우 감소되었다. 80세 이후의 피험자에 비타민 A를 7일간 도포한 결과 대조군에 비하여 type I pN 콜라겐 합성량이 65% 증가하였다. 그리고 제니스테인은 섬유아세포에서 kinase와 상호 작용을 하여 type I pN 콜라겐의 전사 활성을 증가시키는 것으로 보고된 바 있다[35]. 이 보고에 의하면, 콜라겐 프로모터에는 강력한 TGF-β1-responsive element가 존재하며, 여기에 TGF-β가 붙어 콜라겐의 전사를 활성화한다. Tyrosine kinase 저해제인 제니스테인은 TGF-β 결합을 촉진하여 콜라겐 합성을 유도하며, 반면 sodium orthovanadate와 같은 phosphatase 저해제는 결합을 억제하며 콜라겐 합성을 억제한다. 한편, 제니스테인은 AP-1을 구성하는 단백질인 cJUN의 발현을 억제하며 이를 통해 MMP-1의 합성을 억제할 가능성도 있다[14].

따라서, Fig. 3은 동일 단백질 농도기준이므로 세포수가 같다고 볼 수 있으므로, 지금까지 보고되지 않은 나이에 따른 제니스테인의 효과를 잘 설명해주고 있다. 제니스테인의 콜라겐 합성 촉진 작용은 TGF-β를 통한 직접적인 작용일 수도 있으며, 혹은 콜라겐의 분해효소인 MMP-1의 합성을

억제하여 콜라겐의 분해를 막는 간접적인 효과일 수도 있고 또한 이들의 복합작용일 수도 있다. 그리고 전술과 같이, 제니스테인의 항산화 활성이나 COX-2 억제에 의한 염증 억제 작용이 콜라겐 합성을 촉진할 수 있었을 것으로 생각되었다.

자외선에 의한 광손상과 hydrogen peroxide에 의한 피부암 발생 신호전달을 제니스테인이 막는 것으로 보고된 바 있다[18, 36]. 섬유아세포에 UVA의 조사로 인해 콜라겐 합성이 감소되는 것을 제니스테인이 얼마나 방어하는지 알아보았다. 결과는 Fig. 4와 같다. UVA를 15 J/cm² 조사하였을 때, type I pN 콜라겐 합성이 조사하지 않은 군에 비해 매우 감소하였다. 즉, Fig. 3과 Fig. 4의 0세의 대조군들의 콜라겐 합성량을 비교해 보면 흡광도가 각각 6.4 ± 0.49/mg protein 및 0.75 ± 0.08/mg protein으로 Fig. 4의 UVA를 조사한 군에서 약 1/9로 감소되었고 다른 군도 같은 형태를 보였다. UVA를 조사하지 않은 경우, Fig. 3에서 보면, 0세에 비하여 22세, 39세, 54세의 세포 모두가 type I pN 콜라겐의 합성이 유의하게 감소하였다. UVA를 조사한 경우의 Fig. 4를 보면, 0세와 비교하여 22세에는 통계적 유의차가 없었으나, 39세에서는 33%, 54세에서는 62%로 콜라겐 합성이 유의하게 감소하였다(p<0.05). UVA를 조사한 후 제니스테인을 처리하였을 때인 Fig. 4를 보면, 모든 세포에서 콜라겐 합성이 증가하는 경향을 보였으나 비처리군과 비교하여 0세, 22세, 39세에서는 유의차가 없었다. 그러나 54세의 세포에서 제니스테인 처리에 의해 type I pN 콜라겐 합성이 45%나 유의적으로 증가하였다(p<0.05).

피부에서 자외선에 의해 직접 혹은 ROS 등에 의해 간접적으로 DNA가 손상되면 cyclobutane-type thymine dimer와 같은 pyrimidine dimer가 생성되는데[38], Moore 등[21]

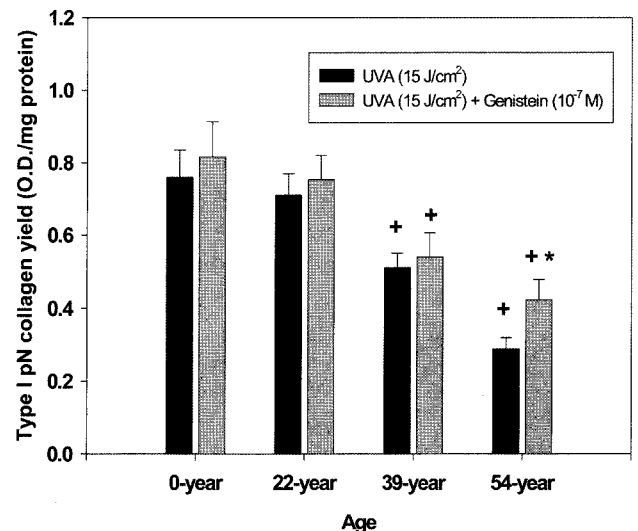


Fig. 4. The effect of genistein on type I pN collagen synthesis in normal human dermal fibroblasts with UVA irradiation and age (n=8, *p<0.05 vs. 0-year-age, *p<0.05 vs. UVA treated group).

은 제니스테인이 피부에서 자외선에 의해 유도되는 pyrimidine dimer의 생성을 억제하며 이를 통해 피부암을 예방할 수 있다고 보고하였다.

Wang 등[35]은 제니스테인이 성장인자 수용체 자리에서 kinase를 특이적으로 저해함으로써 UVB에 의해 유도되는 전사인자인 AP-1 활성화 신호전달 과정을 차단한다는 보고를 하였다. 이는 제니스테인이 tyrosine kinase를 저해함으로써 콜라겐 합성을 유도할 수 있는 가능성이 있음을 나타낸 것이다.

이상의 결과에서 보고된 바와 같이, 제니스테인이 섬유아세포에서 type I pN 콜라겐의 합성을 촉진하는 것을 알 수 있었다. 또한 UVA에 의해 콜라겐 합성이 매우 억제된 상황에서도 합성 증가 효과가 있었으며, 자연노화가 많이 진행된 세포에서 더욱 효과적임을 알 수 있었다. 이것은 제니스테인의 tyrosine kinase의 저해 효과도 있겠으나 무엇보다 자외선으로 생성되는 pyrimidine dimer의 생성을 광보호 효과로 방지하였기 때문으로 생각되었다.

Type I pN 콜라겐 합성(collagen matrix culture) 증진 효과

콜라겐 매트릭스를 이용한 3차원 배양은 진피와 유사한 상태를 *in vitro* system으로 만든 것으로 단층배양에서 간과될 수 있는 효능을 재검증하고, 인체와의 상관성을 높이게 된다. 제니스테인의 콜라겐 합성 효과를 단층배양을 통해 알아보았으나(Fig. 3, 4), 좀 더 *in vivo*와 유사한 상황에서 알아보기 위해[5], 콜라겐 매트릭스를 활용하여 3차원 배양조건에서 콜라겐 합성을 측정하였고 결과는 Fig. 5와 같다. 0세와 54세의 여성에게서 얻은 얼굴(광노출 부위)과 엉덩이(비노출 부위)의 피부 섬유아세포를 사용하여 콜라겐 매트릭스를 제작하였다. 대조군으로서 54세에서 얻은 세포와 0세

에서 얻은 세포의 콜라겐 합성을 비교해보면 54세의 세포는 0세에 비해 기본적으로 type I pN 콜라겐의 합성이 유의하게 적었다. 즉, 54세의 엉덩이에서 얻은 세포는 0세에 비해 type I pN 콜라겐 합성량이 25%, 54세의 얼굴에서 얻은 세포는 0세에 비해 39% 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 54세의 얼굴과 엉덩이 두 부위를 비교하면, 얼굴 부위의 세포를 사용한 매트릭스에서 엉덩이의 세포를 사용한 매트릭스에 비해 기본적인 type I pN 콜라겐의 합성량이 18% 적어 유의적인 차이를 보였다. 제니스테인을 10^{-5} M로 72시간 처리하였을 때, 엉덩이 세포는 비처리군에 비해서 type I pN 콜라겐의 합성이 21%, 얼굴 세포는 비처리군에 비해 14%의 유의적 증가를 보였다($p < 0.05$). 그리고 얼굴에서 얻은 세포의 type I pN 콜라겐 합성량이 엉덩이에서 얻은 세포에 비해 31%로 유의적으로 적었다. 그러나 0세에서 얻은 세포에서는 제니스테인 처리에 의해 type I pN 콜라겐의 합성이 변화되지 않았다. 그리고 Fig. 5에서 보면 제니스테인은 콜라겐 매트릭스를 이용한 3차원 배양에서도 Fig. 4의 단층배양과 같이 콜라겐 합성을 증진시켰다.

Chung 등[7]은 매트릭스 배양에서 섬유아세포의 기본적인 콜라겐 합성량이 광노화된 피부와 자연노화된 피부에서 차이가 나는 반면, 단층배양에서는 동일함을 보고하였다. 이 결과는 매트릭스 배양이 단층배양보다는 더욱 정밀하게 인체와 유사한 상태의 결과를 반영한다고 볼 수 있다.

본 결과에서 태양을 거의 받지 않은 엉덩이 피부가 얼굴 피부보다 type I 콜라겐 합성량이 많은 것은 평소 햇볕에 의한 활성산소 생성[6]과 pyrimidine dimer[21] 생성이 적어 세포 DNA의 변이가 적었기 때문으로 생각되었다. 그리고 54세의 광노출 부위인 얼굴과 비노출 부위인 엉덩이 피부에서 얻은 모두의 세포에서 콜라겐 생성이 대조군들보다 증가된 것은 제니스테인이 광노화 및 자연노화에 모두 효과적인 것으로 추측할 수 있으며, Fig. 4에서와 같이 나이에 따라 더욱 효과적인 것으로 생각되었다.

제니스테인이 MMP-1 합성에 미치는 영향

제니스테인은 전사인자인 cJUN의 발현을 억제하여, 콜라겐 분해효소인 MMP-1의 합성을 억제하는 것으로 알려져 있다[14].

본 실험에서는 연령별로 제니스테인이 MMP-1의 합성에 어떤 영향을 미치는지 알아보려고 하였으며 그 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 0세, 22세, 39세 및 54세의 여성 엉덩이 피부 섬유아세포에서 MMP-1의 합성량을 비교하여 보면, 0세와 22세의 세포에서 MMP-1의 합성은 39세, 54세에 비해 매우 낮은 수준이었다. 22세는 0세에 비해 약 40%정도 증가되었으나 통계적인 유의차는 없었다. 반면, 39세는 0세에 비해 약 6배, 54세에서는 약 8배 이상 증가되어 노화됨에 따라 MMP-1의 합성량이 매우 증가됨을 알 수 있었다($p < 0.05$). 그리고 본 섬유아세포들에 제니스테인을 처리하였을 때 0

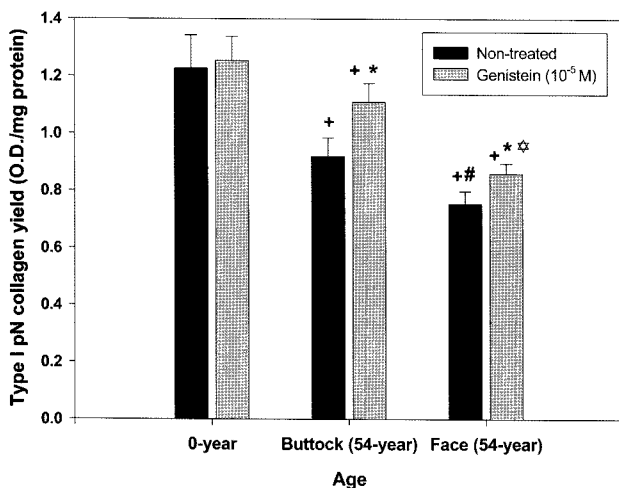


Fig. 5. The effect of genistein on type I pN collagen synthesis in collagen gel with sun-protected and sun-exposed skin derived normal human dermal fibroblasts.

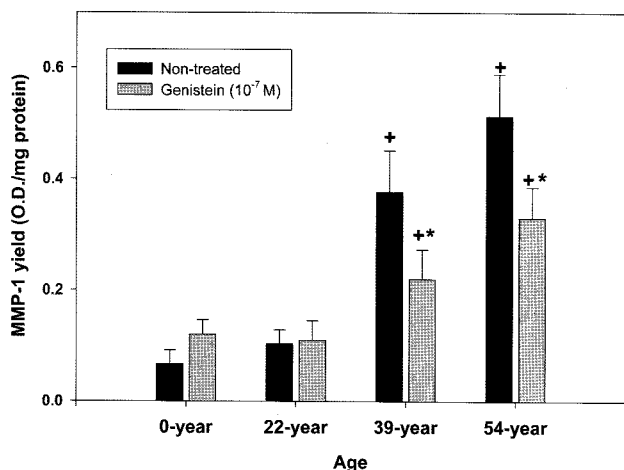


Fig. 6. The effect of genistein on MMP-1 synthesis in normal human dermal fibroblasts with age.

세, 22세에서는 MMP-1의 합성량에 차이가 거의 없었으나 39세와 54세의 세포에서는 MMP-1이 비처리군에 비해 각 42%, 36%로 유의적으로 감소되었다($p < 0.05$).

Varani 등[34]에 의하면, 80세 이상의 그룹에서 MMPs의 합성량을 측정된 결과 MMP-1 뿐만 아니라, MMP-2 및 MMP-9의 양도 나이에 따라 유의하게 증가되었다. 18-29세에 비하여 80세 이상에서는 MMP-1은 40%, MMP-2는 82%, MMP-9는 52% 증가되었다. 80세 이후 피험자에게 1%의 비타민 A를 7일간 도포하였을 때, 증가된 MMP-1 및 MMP-9가 다시 18-29세의 수준으로 40% 정도 감소되었다. Kang 등[14]에 의하면 피부에 2 minimal erythema dose의 자외선을 조사하였을 때, 10분 뒤에는 2배, 20분 뒤에는 3배의 H₂O₂가 발생하였다. 또한 MMP-1의 mRNA양도 7배 이상 증가하였다. 제니스테인 1%를 미리 발라준 후, 자외선을 조사하였을 때 자외선에 의해 유도되는 MMP-1 mRNA의 양이 50% 이상 감소되었다고 보고하였다.

본 실험에서는 섬유아세포에서 MMP-1의 합성이 연령별로 증가되며, 0세와 비교할 때 39세, 54세에서 매우 큰 차이로 유의적 증가를 보였다.

따라서 지금까지 나이에 따른 제니스테인의 MMP-1 증가 억제 효과는 보고되지 않았으며 Fig. 6은 그의 효과를 잘 설명해주고 있다. MMP-1은 SOD 유도능[23]이 노화되면서 급격히 떨어지는 것과 반대로 급격히 증가되는 모양을 보이는데 이 포물선 모양의 증가를 볼 때 나이에 따른 MMP-1 증가도 SOD 유도능과 같이 노화와 깊은 관계가 있는 것으로 생각되었다. 그런데 이러한 나이에 따른 MMP-1의 증가도 제니스테인의 처리에 의해 39세와 54세에서와 같이 유의적으로 감소하였으며 그 감소 정도는 *in vivo*에서 실험된 비타민 A와 유사한 30-40% 수준[34]이었다. 이상의 결과에서 제니스테인은 젊은 피부에서 MMP-1의 합성에는 큰 영향이 없으나, 노화된 피부에서 매우 증가되는 MMP-1의 합성을 억

제하여 피부 노화를 방지할 가능성이 있음을 알 수 있었다.

그러므로 제니스테인의 처리가 노화에 의해 유도되는 MMP-1의 합성을 억제하는 것(Fig. 6)과 또한 제니스테인이 자외선에 의한 pyrimidine dimer의 생성을 억제한다는 보고 [21]를 볼 때, 제니스테인은 사람의 피부 세포 증식(Fig. 1)과 콜라겐 합성 촉진 효과(Fig. 3, 5)뿐만 아니라 피부의 광노화 억제(Fig. 4)에도 매우 효과적인 물질이라고 생각되었다.

요 약

콩류에 다량 존재하는 제니스테인으로부터 얻을 수 있는 제니스테인이 노화된 피부 섬유아세포의 활성화와 피부의 주성분인 콜라겐의 합성 및 이의 주요한 분해 효소인 MMP-1의 합성에 어떤 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. 제니스테인은 54세의 섬유아세포 증식을 유의하게 증가시켰으며, 이러한 세포 증식 효과는 비타민 A와 유사하게 자연노화가 많이 진행된 세포에서 뚜렷하였다. 아울러 77세의 섬유아세포에서 제니스테인 처리에 의해 세포노화의 지표인 SA-β-Gal 염색이 감소된 것을 확인하였다. 그리고 제니스테인은 섬유아세포에서 type I pN 콜라겐의 합성을 촉진하였고, UVA에 의해 콜라겐 합성이 매우 억제된 상황에서도 합성 증가 효과를 보였는데 이러한 현상은 자연노화가 많이 진행된 세포에서 더욱 효과적이었다. 콜라겐 매트릭스를 이용한 콜라겐 생합성 결과에서 제니스테인은 광노출부나 비노출 부위에서 얻은 모두의 세포에서 콜라겐 합성을 증가시킬 수 있었으며, 이를 통해 제니스테인이 광노화 및 자연노화에 모두 효과적인 것으로 추측할 수 있다. 제니스테인은 젊은 피부의 세포에서 MMP-1의 합성에는 큰 영향을 미치지 않았으나, 노화된 피부의 세포에서 매우 증가되어 있는 MMP-1의 합성을 억제하였다. 이상의 결과에서 제니스테인은 광노화 뿐 아니라, 자연 노화에 의한 피부 주름을 예방하는데 유용한 물질이 될 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Afaq, F. and H. Mukhtar. 2006. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. *Exp. Dermatol.* **15**: 678-684.
- Ashcroft, G. S., J. Dodsworth, E. van Boxtel, R. W. Tarnuzzer, M. A. Horan, G. S. Schultz, and M. W. Ferguson. 1997. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. *Nat. Med.* **11**: 1209-1215.
- Chodon, D., N. Ramamurty, and D. Sakthisekaran. 2007. Preliminary studies on induction of apoptosis by genistein on HepG2 cell line. *Toxicol. In Vitro.* **21**: 887-891.
- Choi, S. W. 1998. Signal transduction in aged skin cells. *Korean J. Invest. Dermatol.* **5**: 16-20.

5. Cho, Y. K., Y. H. Byeon, B. K. Sun, J. S. Hwang, B. S. Lee, and J. I. Kim. 1996. 3-Amino Propane Phosphoric Acid (3-APPA) : A Novel Anti-Aging Substance. *Proceedings of the SCSK Conference*. **55**: 52-67.
6. Chung, H. Y., H. J. Kim, K. H. Shim, and K. W. Kim. 1999. Dietary modulation of prostanoid synthesis in the aging process: role of cyclooxygenase-2. *Mech. Aging Dev.* **111**: 97-106.
7. Chung, J. H., S. H. Youn, O. S. Kwon, K. H. Cho, J. I. Youn, H. C. Eun. 1997. Regulations of collagen synthesis by ascorbic acid, transforming growth factor-beta and interferon-gamma in human dermal fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel are photoaging- and aging-independent. *J. Dermatol. Sci.* **15**: 188-200.
8. Coulomb, B., L. Dubertet, C. Merrill, R. Touraine, E. Bell. 1984. The collagen lattice: a model for studying the physiology, biosynthetic function and pharmacology of the skin. *Br. J. Dermatol. Suppl* **27**: 83-87.
9. Fisher, G. J., S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, and J. J. Voorhees. 2002. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch. Dermatol.* **138**: 1462-1470.
10. Fisher, G. J., Z. Q. Wang, S. C. Datta, J. Varani, S. Kang, and J. J. Voorhees, 1997. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.* **337**: 1419-1428.
11. Greenwel, P., W. Hu, R. A. Kohanski, and F. Ramirez. 1995. Tyrosine dephosphorylation of nuclear proteins mimics transforming growth factor beta 1 stimulation of alpha 2(I) collagen gene expression. *Mol. Cell Biol.* **15**: 6813-6819.
12. Han, Y. H., H. S. Kim, J. M. Kim, S. K. Kim, D. Y. Yu, and E. Y. Moon. 2005. Inhibitory role of peroxiredoxin II (Prx II) on cellular senescence. *FEBS Lett.* **579**: 4897-4902.
13. Kang, K. A., R. Zhang, M. J. Piao, K. H. Lee, B. J. Kim, S. Y. Kim, H. S. Kim, D. H. Kim, H. J. You, and J. W. Hyun. 2007. Inhibitory effects of glycitein on hydrogen peroxide induced cell damage by scavenging reactive oxygen species and inhibiting c-Jun N-terminal kinase. *Free Radic. Res.* **41**: 720-729.
14. Kang, S., J. H. Chung, J. H. Lee, G. J. Fisher, Y. S. Wan, E. A. Duell, and J. J. Voorhees. 2003. Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.* **120**: 835-841.
15. Kruk, I., H. Y. Aboul-Enein, T. Michalska, K. Lichszteid, A. Kladna. 2005. Scavenging of reactive oxygen species by the plant phenols genistein and oleuropein. *Luminescence.* **20**: 81-89.
16. Kurzer, M. S. and X. Xu. 1997. Dietary phytoestrogens. *Annu. Rev. Nutr.* **17**: 353-381.
17. Lopez-Torres, M., R. Perez-Campo, and G. Barja de Quiroga. 1991. Effect of natural aeing and antioxidant inhibition on liver antioxidant enzymes, glutathione system, peroxidation, and oxygen consumption in *Rana perezi*. *J. Comp. Physiol. [B]*. **160**: 655-661.
18. Mazire, C., F. Dantin, F. Dubois, R. Santus, and J. Mazire. 2006. Biphasic effect of UVA radiation on STAT1 activity and tyrosine phosphorylation in cultured human keratinocytes. *Free. Radic Biol. Med.* **28**: 1430-1437.
19. Miyazaki, K. 2004. Novel approach for evaluation of estrogenic and anti-estrogenic activities of genistein and daidzein using B16 melanoma cells and dendricity assay. *Pigment. Cell Res.* **17**: 407-412.
20. Miyazaki, K., T. Hanamizu, R. Iizuka, and K. Chiba. 2002. Genistein and daidzein stimulate hyaluronic acid production in transformed human keratinocyte culture and hairless mouse skin. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **15**: 175-183.
21. Moore, J. O., Y. Wang, W. G. Stebbins, D. Gao, X. Zhou, R. Phelps, M. Lebowohl, and H. Wei. 2006. Photoprotective effect of isoflavone genistein on ultraviolet B-induced pyrimidine dimer formation and PCNA expression in human reconstituted skin and its implications in dermatology and prevention of cutaneous carcinogenesis. *Carcinogenesis.* **27**: 1627-1635.
22. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**: 5563.
23. Niwa, Y., K. Ishimoto, and T. Kanoh. 1990. Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: Correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood,* **76**: 836-841.
24. Parrado, J., M. Bougria, A. Ayala, A. Castano, and A. Machado. 1999. Effects of aging on the various steps of protein synthesis: fragmentation of elongation factors 2. *Free Radical Biology & Medicine* **26**: 362-370.
25. Rodriguez-Martinez, M. A., E.C. Garcia-Cohen, A. Briones, A. B. Baena, E. Marin. 1999. Salaices M, Marin J. Changes in plasma oxidative state with age and their influence on contractions elicited by noradrenaline in the rat tail artery. *Life Sci.* **65**: 915-924.
26. Sasamura, H., A. Takahashi, J. Yuan, H. Kitamura, N. Masumori, N. Miyao, N. Itoh, and T. Tsukamoto. 2004. Antiproliferative and antiangiogenic activities of genistein in human renal cell carcinoma. *Urology.* **64**: 389-393.
27. Sator, P. G., J. B. Schmidt, T. Rabe, and C. C. Zouboulis. 2004. Skin aging and sex hormones in women-clinical perspectives for intervention by hormone replacement therapy. *Exp. Dermatol.* **13**: Suppl. 4. 36-40.
28. Schmid, D. and F. Zulli. 2002. Topically applied soy isoflavones increase skin thickness. *Cosmet. Toil. Mag.* **117**: 45-50.
29. Setchell, K. D. 1998. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**: 333S-346S.
30. Setchell, K. D. 2000. Absorption and metabolism of soy isoflavones-from food to dietary supplements and adults to infants. *J. Nutr.* **130**: 654S-655S.
31. Song, T. T., S. Hendrich, and P. A. Murphy. 2002. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. *J. Agric. Food*

- Chem.* **50**: 2470.
32. Talwar, J. S., C. E. M. Griffiths, G. J. Fisher, T. A. Hamilton, and J. J. Voorhees. 1995. Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin. *J. Invest. Dermatol.* **105**: 285-290.
33. Tomaszewski, J., A. Adamiak, P. Skorupski, W. Rzeski, and T. Rechberger. 2003. Effect of 17 beta-estradiol and phytoestrogen daidzein on the proliferation of pubocervical fascia and skin fibroblasts derived from women suffering from stress urinary incontinence. *Ginekol Pol.* **74**: 1410-1414.
34. Varani, J., R. L. Warner, M. Gharaee-Kermani, S. H. Phan, S. Kang, J. H. Chung, Z. Q. Wang, S. C. Datta, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees. 2000. Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J. Invest. Dermatol.* **114**: 480-486.
35. Wang, Y., X. Zhang, M. Lebwohl, V. DeLeo, and H. Wei. 1998. Inhibition of ultraviolet B (UVB)-induced *c-fos* and *c-jun* expression in vivo by a tyrosine kinase inhibitor genistein. *Carcinogenesis.* **19**: 649-654.
36. Wei, H., L. Wei, K. Frenkel, R. Bowen, and S. Barnes. 1993. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein. *Nutr. Cancer.* **20**: 1-12.
37. Wei, H., X. Zhang, Y. Wang, and M. Lebwohl. 2002. Inhibition of ultraviolet light-induced oxidative events in the skin and internal organs of hairless mice by isoflavone genistein. *Cancer Lett.* **185**: 21-29.
38. Yamada, M., M. U. Udono, M. Hori, R. Hirose, S. Sato, T. Mori, and O. Nikaido. 2006. Aged human skin removes UVB-induced pyrimidine dimers from the epidermis more slowly than younger adult skin in vivo. *Arch. Dermatol. Res.* **297**: 294-302.

(Received Sep. 29, 2007/Accepted Nov. 6, 2007)