

## 피부 섬유아세포에서 비타민 C, Silicon, 철분 처리가 콜라겐 합성 및 분해 관련 효소의 발현에 미치는 효과 비교\*

김정은 · 이진아 · 김현애 · 김정민 · 조윤희<sup>§</sup>

경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과

### Effect of Vitamin C, Silicon and Iron on Collagen Synthesis and Break-Down Enzyme Expression in the Human Dermal Fibroblast Cell (HS27)\*

Kim, Jeong Eun · Lee, Jinah · Kim, Hyunae · Kim, Jungmin · Cho, Yunhi<sup>§</sup>

Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea

#### ABSTRACT

Collagen is the major matrix protein in dermis and consists of proline and lysine, which are hydroxylated by prolyl hydroxylase (PH) and lysyl hydroxylase (LH) with cofactors such as vitamin C, oxygen, iron ( $Fe^{2+}$ ), ketoglutarate and silicon. The collagen degradation is regulated by matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), of which is the major collagen-degrading proteinase whereas tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1) bind to MMP-1 thereby inhibiting MMP-1 activity. In this study, we investigated the effects of vitamin C, silicon and iron on mRNA, protein expressions of PH, LH, MMP-1 and TIMP-1. The physiological concentrations of vitamin C (0–100  $\mu$ M), silicon (0–50  $\mu$ M) and iron ( $Fe^{2+}$ : 0–50  $\mu$ M) were treated to human dermal fibroblast cells (HS27 cells) for 3 or 5 days. The expression level of mRNA and protein was increased in not only PH but also LH when cells were incubated with vitamin C. A similar increase in LH mRNA or protein expression occurred when cells were incubated with silicon. Our results suggest that treatment of vitamin C and silicon increased mRNA and protein expression of PH and LH in human dermal fibroblast. (Korean J Nutr 2009; 42(6): 505~515)

KEY WORDS: vitamin C, silicon, iron, prolyl hydroxylase, lysyl hydroxylase.

#### 서 론

피부는 표피, 진피, 피하조직으로 구성되어 이 중 표피는 외부 자극으로부터 신체를 보호하고, 체온 조절, 보습 유지 작용을 한다. 진피는 섬유성분, 기질성분으로 구성되어 있으며 섬유성분으로 존재하는 콜라겐은 진피층의 90%를 차지하는 주요 단백질로써 피부 연결 조직을 유지하여, 피부에 강도와 장력을 준다. 진피층은 피부의 물리, 화학적 성질을 결정하고, 진피층의 모세혈관과 신경이 표피에 영양분을 보충해 주어 피부 건강과 노화에 밀접한 관련이 있

다. 일반적으로 피부노화는 나이의 증가와 외부 인자들이 주요 원인인 것으로 알려져 있으나, 나이가 증가하면 주로 섬유아세포의 작용과 세포수가 감소하여 섬유성분의 합성량이 줄어들어 피부 세포내 수분이 손실되며, 각질층의 구조가 변화된다. 또한, collagenase의 작용이 증가하여 콜라겐의 가교된 형태가 감소함으로써 매끄러움, 보습, 팽팽함이 감소된다.<sup>1,2)</sup> 이는 진피의 콜라겐 함량 및 합성 증가는 피부의 보습과 탄력의 증가를 의미한다.<sup>3)</sup>

콜라겐은 비타민 C, oxygen,  $Fe^{2+}$ ,  $\alpha$ -ketoglutarate, silicon이 조효소로 작용하여 proline과 lysine이 각각 hydroxylase의 작용으로 전구콜라겐 (procollagen)으로 합성된다. Hydroxylase는 2가 상태의 철분과 느슨하게 결합함으로써 활성화되고, 3가의 철분으로 산화가 되면 효소의 활성을 잃는다. 이 과정에서 비타민 C는 산화된 철분을 다시 환원시켜 효소를 활성화 시키며, silicon은 이들 hydroxylase 최대 활성 유지를 위해 필요하다.<sup>4-7)</sup> Hydroxyproline은 콜라

접수일: 2009년 7월 6일 / 수정일: 2009년 8월 26일  
채택일: 2009년 9월 4일

\*This research was supported by grants from Korea research foundation (2006-KRF-531-C00063).

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: choyunhi@khu.ac.kr

겐의 triple helix 구조에 많은 부분을 차지하며 그 구조를 안정화시키고,<sup>5)</sup> hydroxylysine은 hydroxyproline에 비해 양적으로 적으나 콜라겐 특유의 아미노산으로 콜라겐 합성의 최종단계인 cross-linking의 형성에 중요한 역할을 한다.<sup>8,9)</sup> 이와 같이 콜라겐의 posttranslational modification 과정은 비타민 C, silicon, 철분 등의 영양소와 주요 구성 아미노산인 proline과 lysine이 함께 사용된다.

또한, 생체 내에서의 콜라겐 합성과 분해는 콜라겐 분해에 관련된 기질 단백질 분해효소 (matrix metalloproteinase, MMP) 및 MMPs 작용을 저해하는 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs)에 의해 조절된다.<sup>10)</sup> 기질 단백질 분해효소는 여러 효소의 집합으로 구조와 기능적 특성에 따라 여러 개의 집단으로 나누어지는데,<sup>11)</sup> 이 중 피부의 대표적인 콜라겐인 콜라겐 Type 1은 MMP-1에 의해 분해되고 MMP-1의 작용은 세포의 항상성을 유지하기 위해 분비되는 2-marcroglobulin이나 TIMP-1과 같은 저해제에 의해 활성이 조절된다. 이러한 MMPs 및 TIMPs 등의 효소들은 섬유아세포를 포함한 대다수의 많은 세포들에서 분비된다.<sup>12,13)</sup>

피부 건강과 미용을 위해 콜라겐에 대한 관심이 증가되면서 콜라겐 함유 제품과 건강기능식품 및 화장품 등이 개발되고, 콜라겐 합성 과정에서의 비타민 C의 중요성은 여러 연구에서 입증되고 있다.<sup>7)</sup> 그러나, 콜라겐 합성 과정에서 조효소로 작용하는 silicon, 철분 등의 콜라겐 합성 및 콜라겐의 분해 효소에 미치는 영향에 관한 연구는 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 비타민 C, silicon, 철분을 HS27 피부 섬유아세포에 농도별로 처리하여 콜라겐의 합성에 관여하는 효소인 proline hydroxylase (PH), lysyl hydroxylase (LH)와 분해에 관여하는 효소인 MMP-1과 저해제인 TIMP-1의 mRNA와 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 연구에 사용한 HS27 피부 섬유아세포는 한국세포주은행에서 분양받아 본 연구실에서 계대 배양하여 사용하였다. 비타민 C (ascorbic acid: A4544), silicon (sodium silicate solution: 338443) 및 철분 (ferric citrate: F6129)은 Sigma (Sigma, USA)에서 구입하였다. 10% fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), trizol reagent는 Gibco사 (CA, USA)에서 구입하였고, M-MLV RT, RNase inhibitor는 Promega (CA, USA)에서, PCR-premix tube는 (주)바이오니아에서 구입

하였다. PH, LH, MMP-1 및 TIMP-1의 1차 항체는 CHEMICON International Co (Temecula, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### HS27 피부 섬유아세포 배양

HS27 피부 섬유아세포 (Human dermal fibroblast cell)는 Polystyrene 세포 배양접시에 부착시키고 10% FBS (Gibco, USA)를 첨가한 DMEM (Gibco, USA)을 사용하여 배양하였다. 배양시 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 5% CO<sub>2</sub>를 계속 공급하였다.<sup>14)</sup>

### 비타민 C, 철분, Silicon, proline, lysine 표준물질 준비

0~100 μM 농도의 비타민 C, 5~50 μM의 silicon (sodium silicate solution), 0~50 μM의 철분 (ferric citrate) 표준물질을 dimethylsulfoxide (DMSO, 최종농도 < 0.05%, v/v)에 녹여 사용하였다. 각 표준물질의 농도는 각 영양소의 혈청 및 피부 내 농도를 기준으로 하였다. 구체적으로 본 실험에 사용한 ascorbic acid 농도는 혈청 내 ascorbic acid 농도 45 μM<sup>7)</sup> 및 피부 내 농도인 7.6 μM을 기준으로 하여 0~100 μM 범위로 정하였다.<sup>9)</sup>

Silicon과 철분은 Silicon의 혈청 내 농도 5~20 μM<sup>15)</sup>과, 철분의 혈청 내 농도 6.27~32.23 μM<sup>16)</sup>를 기준으로 하여 0~50 μM을 처리 농도로 정하였다.

### Reverse transcriptase PCR을 이용한 효소의 mRNA 발현 측정

각 농도의 비타민 C, silicon, 철분을 3일 또는 5일간 처리한 세포에서 Trizol reagent를 이용하여 RNA를 분리하고 파장 260 nm에서 정량하였다. Total RNA 10 μL (0.5 μg/μL)를 65°C에서 10분간 가열하고 4°C에서 10분 동안 방치한 후 1 μL oligo (dT)15 primer (0.5 μg/μL), 1 μL M-MLV RT (10 unit/μL; promega, USA), 1 μL RNase inhibitor (20~40 unit/μL; promega, USA), 10 μL 5X RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 5 μL 2.5 mmol/L dNTP mixture, 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) 증류수를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 가열하여 cDNA를 합성하였다. Prolyl hydroxylase (PH), Lysyl hydroxylase (LH), MMP-1, TIMP-1의 mRNA 발현량을 측정하기 위하여 합성된 cDNA로 RT-PCR을 실시하였다. 사용된 GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), PH, LH, MMP-1, TIMP-1의 primer sequence는 Table 1과 같다. PH의 primer를 각각 1 μL (0.5 μg/μL)씩 가하고 합성된 cDNA에 0.1% DEPC-Water와 함께 PCR-premix tube ((주)바이오니아)

**Table 1.** Primer sequences used in RT-PCR

| Gene                                 | Primer sequence   |
|--------------------------------------|---|
| GAPDH                                | Sense: 5'-TTG TCA AGC TCA TTT CCT GGT ATG-3'<br>Anti-sense: 5'-GCC ATG TAG GCC ATG AGG TC-3           |
| Prolyl hydroxylase <sup>17,31)</sup> | Sense: 5'-CCA CAG CAG AGG AAT TAC AG-3'<br>Anti-sense: 3'-ACA CTA GCT CCA ACT TCA GG-5'               |
| Lysyl hydroxylase <sup>32)</sup>     | Sense: 5'-GGA ACC TGG CCT ATG ACA CCC T-3'<br>Anti-sense: 5'-TGC CAT GCT GTG CCA GGA ACT-3'           |
| MMP-1 <sup>30)</sup>                 | Sense: 5'-AAG GTT AGC TTA CTG TCA CAC GCT T-3'<br>Anti-sense: 3'-CGA CTC TAG AAA CAC AAG AGC AAG A-5' |
| TIMP-1 <sup>30)</sup>                | Sense: 5'-TGC TGG GTG GTA ACT CTT TAT TTC A-3'<br>Anti-sense: 3'-ATC CTG TTG TTG CTG TGG CTG ATA G-5' |

에 첨가하여 Denaturation은 95℃에서 30초, annealing은 72℃에서 30초, extension은 72℃에서 2분동안 30cycle로 진행하였다.<sup>17)</sup> LH는 denaturation 94℃ 30초, annealing 52℃에서 45초, extention 72℃ 30초간 총 40cycle로 진행하였다.<sup>18)</sup> MMP-1, TIMP-1는 denaturation 94℃ 30초, annealing 50℃에서 30초, extention 72℃ 1분동안 28cycle로 진행하였다.<sup>19)</sup>

PCR 생성물은 2% agarose gel에서 non-specific PCR product나 primer dimer 등이 없는지를 확인하였고, 생성물의 양을 imaging densitometer [Labworks ver.4.6. (image acquisition and analysis software), UVP, CA]를 사용하여 측정하였다.

**Western blotting을 이용한 호소의 단백질 발현 측정**

PH, LH, MMP-1, TIMP-1의 단백질 발현을 western blotting으로 측정하였다. 각 농도의 비타민 C, 철분, silicon을 3일 또는 5일간 처리한 세포를 RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM NaPO, 10% glycerol, 100 μM NaVO, 100 μM ammonium molybdate, 1% NP-40, 0.1% SDS)에 4℃ 상태로 풀어놓고 원심 분리하여 상층액을 단백질 추출액으로 준비하였다. 단백질 양은 bovine serum albumin을 표준으로 하여 Bradford assay (Bio Rad)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

준비된 단백질을 4x sample buffer에 혼합하고 95℃에서 5분간 가열한 다음 10% SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)에서 전기 영동시킨 후 Hybond ECL nitrocellulose membrane에 흡착시켰다. PH, LH, MMP-1 및 TIMP-1의 1차 항체는 5% skim milk, 0.1% Tween-20을 함유한 PBS에 희석시켜서 4℃에서 16시간 동안 반응시킨 후, 0.1% Tween-20을 함유한 PBS로 15분씩 3차례 세척하였다. Blocking solution으로 1 : 5,000배로 희석시킨 peroxidase-conjugated anti-IgG 2차 항체와 실

온에서 1시간 동안 반응시킨 후 0.1% Tween-20을 함유한 PBS로 3차례 세척하고 발색은 ECL hyperfilm으로 확인하였다. 각 Band의 intensity는 imaging densitometer (model GS-700, BIO-RAD, USA)를 사용하여 정량화하였다.

**통계분석**

실험 결과는 SPSS ver.13 (SPSS Inc, Illinois, USA) 통계 프로그램을 이용하여 분석하였으며 그 결과는 평균 ± 표준 오차 (mean ± SEM) 로 표시하였다. 대조군과 처리군 간의 평균에 대한 유의성은 general linear model (GLM)의 Duncan's multiple range test를 이용하여 p < 0.05에서 검증하였다.

**결 과**

**HS27 피부 섬유아세포에서 비타민 C, silicon 및 철분이 prolyl hydroxylase와 lysyl hydroxylase의 mRNA 발현에 미치는 효과**

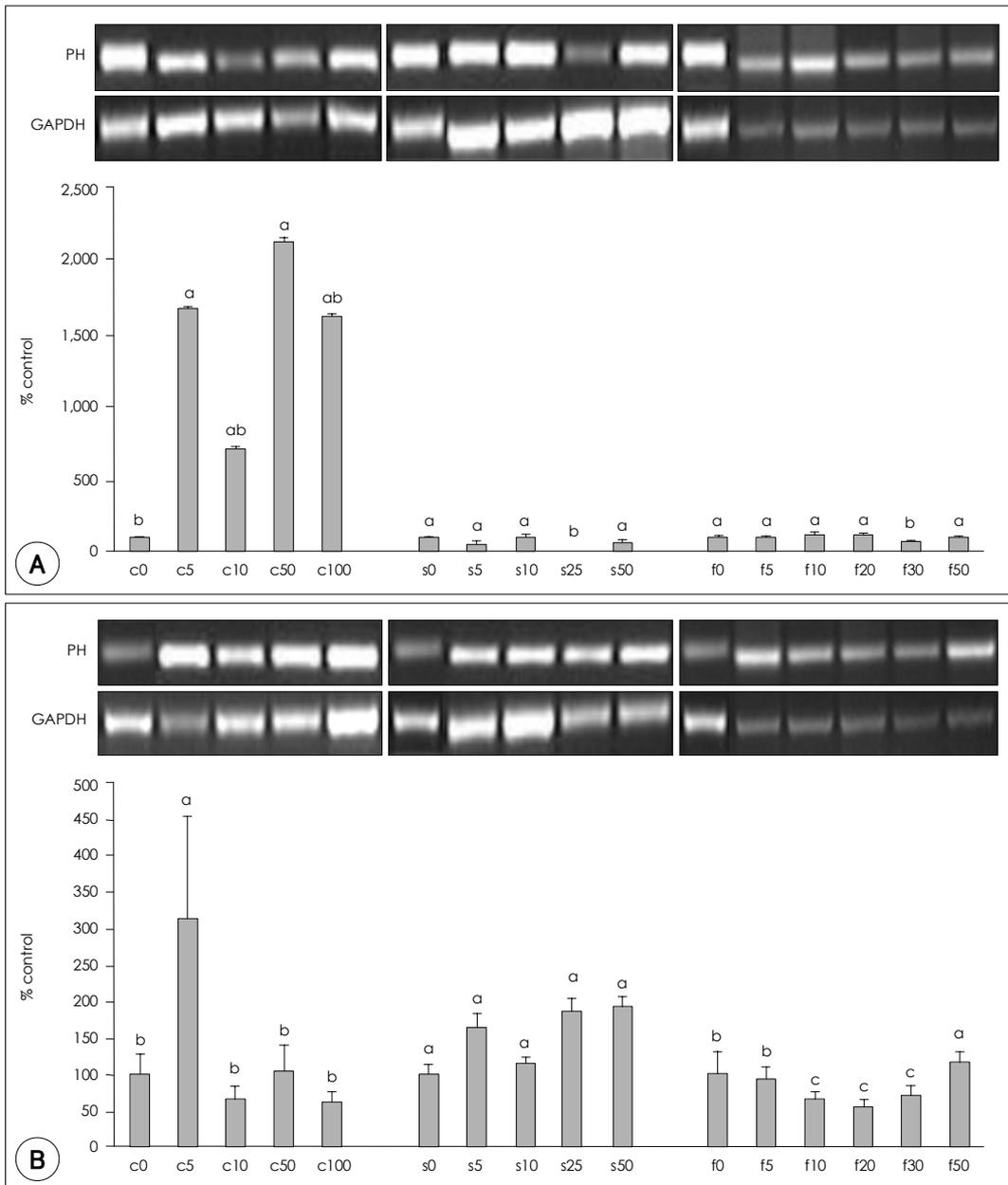
HS27 섬유아세포에서 비타민 C, silicon, 철분을 혈청 및 피부 내 농도 범위로 3일 또는 5일 처리 후 RT-PCR로 살펴본 prolyl hydroxylase (PH)의 mRNA 발현을 house keeping gene 인 GAPDH 및 대조군의 발현을 기준으로 수치화 한 결과 (Fig. 1), 3일간의 5~100 μM 비타민 C 처리는 PH의 mRNA 발현을 현저히 증가시켰는데, 특히 5 μM 및 50 μM의 비타민 C 처리군에서 PH mRNA의 발현이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다 (p = 0.026). 반면 silicon 및 철분의 3일간의 처리군에서는 농도와 무관하게 PH mRNA 발현에 변화가 없었다. 5 μM 비타민 C의 5일간의 처리군에서 300%까지 PH의 mRNA 발현이 현저히 증가하였으나, 그 증가 정도는 3일간의 처리에 비해서 낮았다. Silicon 및 철분의 5일간의 처리는 농도와 무관하게 PH mRNA 발현에 영향을 미치지 않거나 또는 역

제시했다.

각 영양소의 3일 또는 5일간의 처리 후 Lysyl hydroxylase (LH)의 mRNA 발현을 수치화한 결과 (Fig. 2), 3일간의 5~50  $\mu\text{M}$  silicon 처리군에서 LH의 mRNA 발현이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다 ( $p = 0.012$ ). 20~50  $\mu\text{M}$ 의 철분 처리군에서도 LH의 mRNA 발현이 증가하였으나, 비타민 C의 3일간의 처리는 농도와 무관하게 발현에 영향을 미치지 않거나 또는 억제시켰다. 10  $\mu\text{M}$  silicon

의 5일간 처리는 LH의 mRNA 발현을 400%까지 증가시켰으나 ( $p = 0.038$ ), 비타민 C 및 철분의 5일간의 처리군에서 농도와 무관하게 LH mRNA 발현에 변화가 없었다.

즉, PH mRNA의 발현은 3일간의 5~100  $\mu\text{M}$  비타민 C에 의해 가장 현저히 증가한 반면 LH mRNA의 발현은 3일간의 5~50  $\mu\text{M}$  silicon 처리에 의해 증가하였다. 5일간의 비타민 C 처리는 PH mRNA 발현을 증가시켰고 5일간의 silicon 처리는 LH mRNA 발현을 다소 증가시켰으나,



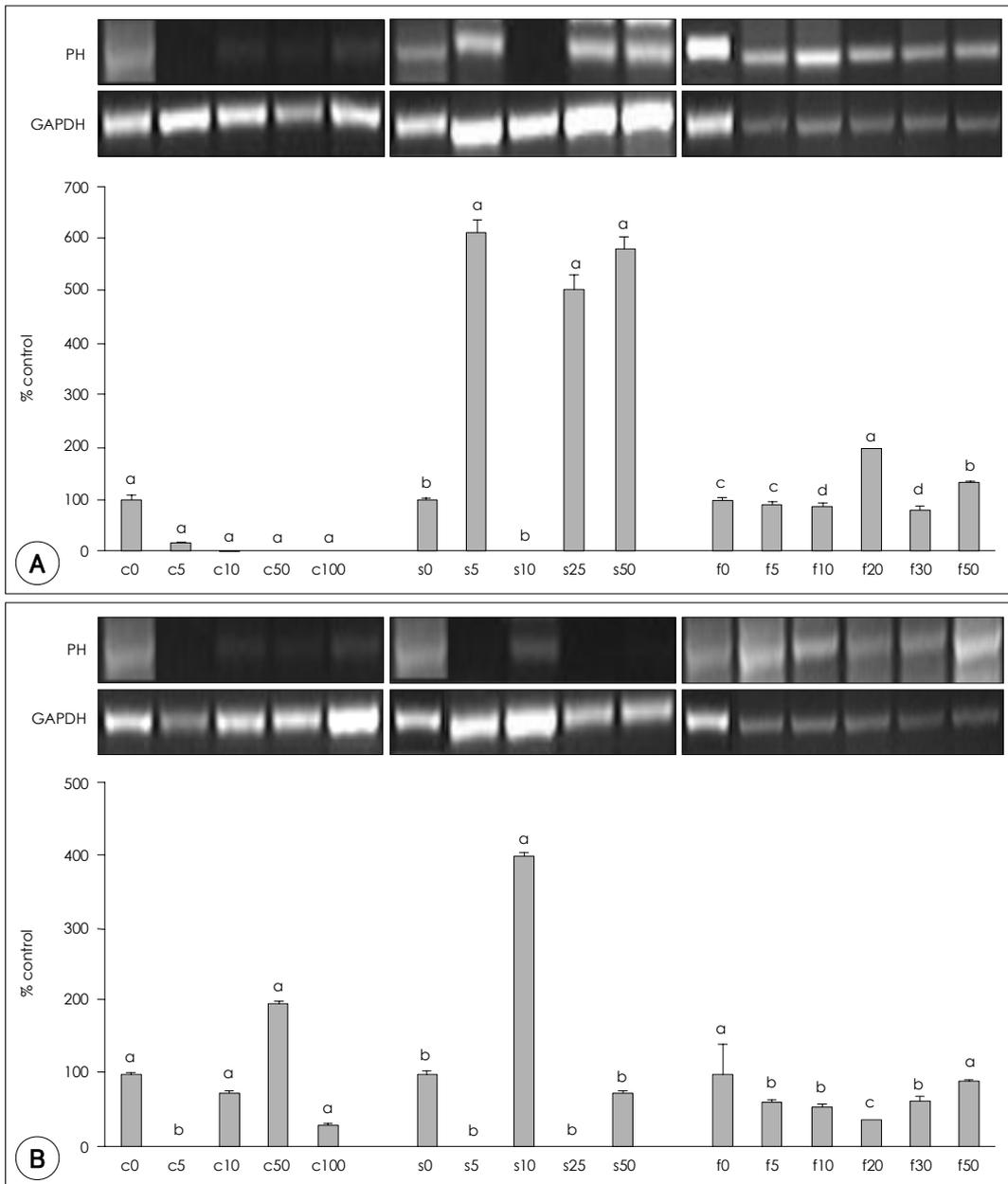
**Fig. 1.** Effects of ascorbic acid, silicon and iron on prolyl hydroxylase (PH) mRNA expressions of cultured human dermal fibroblasts. Human dermal fibroblast cultures were treated with ascorbic acid (0, 5, 10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ), silicon (0, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{M}$ ) and Fe (0, 5, 10, 20, 30, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) for 3 days (A) and 5 days (B). The expression levels of PH mRNA was analyzed by RT-PCR. The signal intensity were quantified the integrated area were percentized to the signal observed in control cells (% control). Results shown are means  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) ( $p < 0.05$ ).

그 증가 정도는 3일간의 처리에 비해 낮았다. 그 이외의 영양소를 처리한 군에서는 PH 및 LH의 mRNA 발현에 변화가 없었다.

**HS27 피부 섬유아세포에서 비타민 C, silicon, 철분이 prolyl hydroxylase (PH) 및 lysyl hydroxylase (LH)의 단백질 발현에 미치는 효과**

PH 및 LH 단백질의 발현 변화를 비타민 C, silicon 및 철

분의 3일 및 5일 처리 후 western blotting으로 살펴보았다 (Fig. 3, 4). PH 단백질의 발현을 단백질 loading control인  $\beta$ -actin 및 대조군을 기준으로 수치화한 결과 (Fig. 3), 비타민 C 처리에 의한 PH mRNA의 현저한 발현 증가에도 불구하고 (Fig. 1), 3일 동안의 비타민 C는 처리 농도 및 처리 기간과 무관하게 PH 단백질의 발현에 영향을 미치지 않았으나 5  $\mu$ M 비타민 C의 5일 처리군에서 PH 단백질의 발현이 유의적으로 증가하였다 ( $p = 0.037$ ). Silicon 및 철



**Fig. 2.** Effects of ascorbic acid, silicon and iron on lysyl hydroxylase (LH) mRNA expressions of cultured human dermal fibroblasts. Human dermal fibroblast cultures were treated with ascorbic acid (0, 5, 10, 50, 100  $\mu$ M), silicon (0, 5, 10, 25, 50  $\mu$ M) and Fe (0, 5, 10, 20, 30, 50, 100  $\mu$ M) for 3 days (A) and 5 days (B). The expression levels of LH mRNA was analyzed by RT-PCR. The signal intensity were quantified the integrated area were percentized to the signal observed in control cells (% control). Results shown are means  $\pm$  SEM (n = 3) ( $p < 0.05$ ).

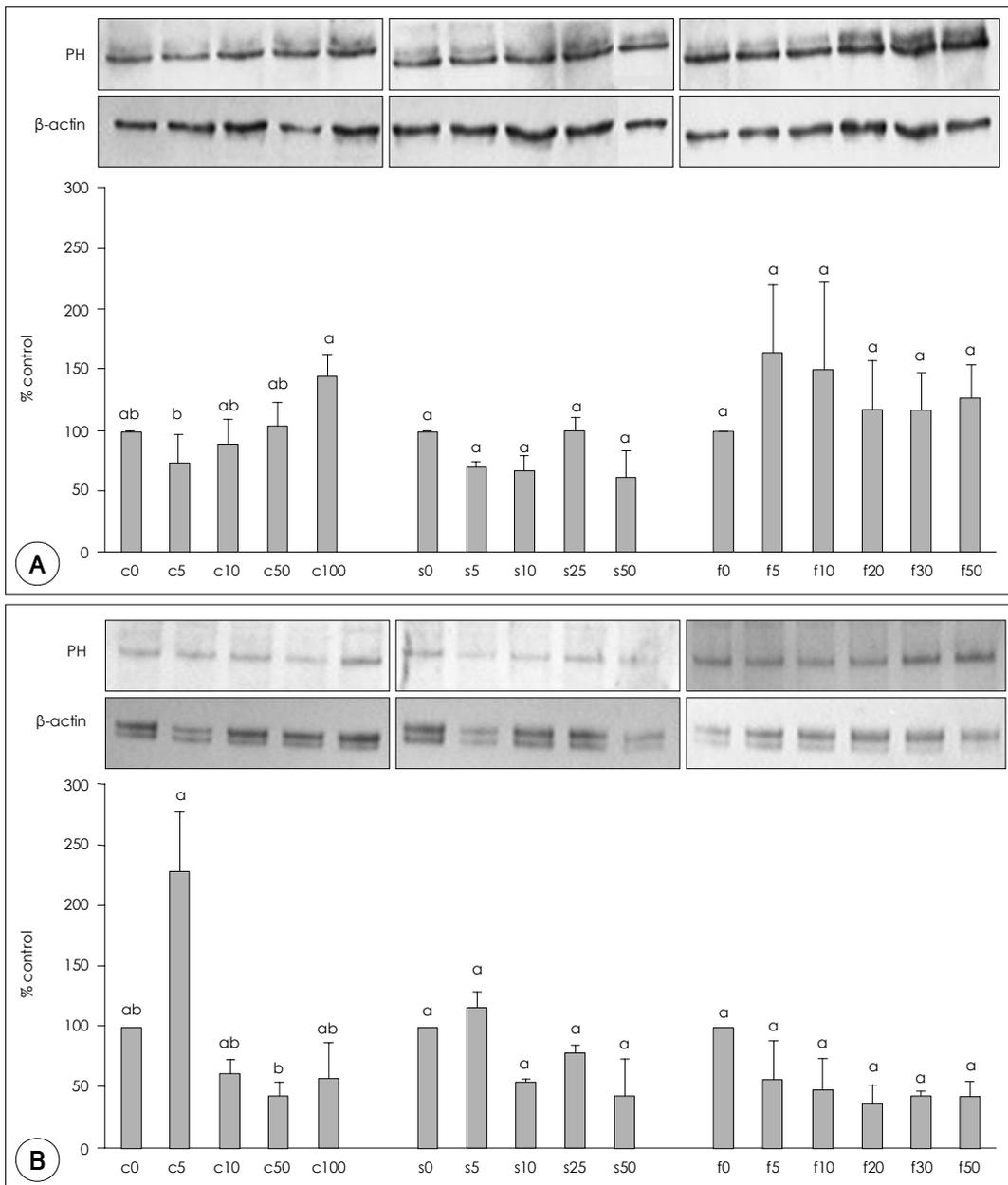
분 또한 처리 농도 및 처리 기간과 무관하게 PH 단백질의 발현에 변화가 없었다.

반면에  $\beta$ -actin 및 대조군을 기준으로 수치화한 LH 단백질의 발현 결과 (Fig. 4), 3일간의 5~50  $\mu$ M silicon 처리군에서 LH의 단백질 발현은 농도 의존적으로 현저히 증가하였다 ( $p = 0.011$ ). 3일간의 50  $\mu$ M 비타민 C 처리가 LH 단백질의 발현을 증가시킨 반면 그 이외 농도의 비타민 C 및 철분은 LH 단백질의 발현에 변화를 초래하지 않았

다. 5일간의 비타민 C, silicon 및 철분의 처리는 농도와 무관하게 LH 단백질의 발현에 변화가 없었다.

**HS27 피부 섬유아세포에서 비타민 C, silicon, 철분이 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)과 tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1)의 mRNA 발현에 미치는 효과**

비타민 C, silicon, 철분의 각 농도별 처리가 콜라겐을

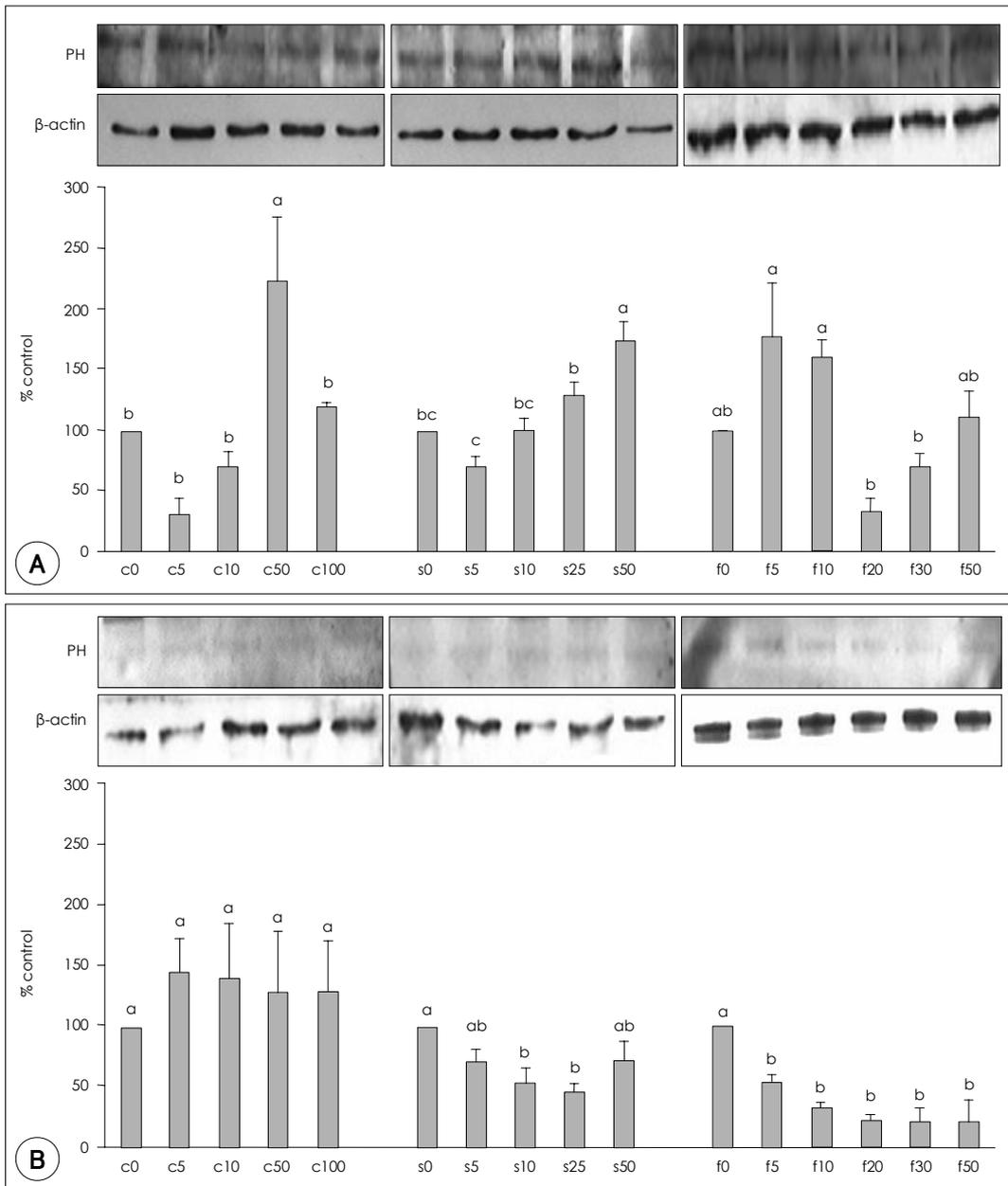


**Fig. 3.** Effects of ascorbic acid, silicon and iron on prolyl hydroxylase (PH) protein expressions of cultured human dermal fibroblasts. Human dermal fibroblast cultures were treated with ascorbic acid (0, 5, 10, 50, 100  $\mu$ M), silicon (0, 5, 10, 25, 50  $\mu$ M) and Fe (0, 5, 10, 20, 30, 50, 100  $\mu$ M) for 3 days (A) and 5 days (B). The expression levels of PH proteins was analyzed by western blotting. The signal intensity were quantified the integrated area were percentized to the signal observed in control cells (% control). Results shown are means  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) ( $p < 0.05$ ).

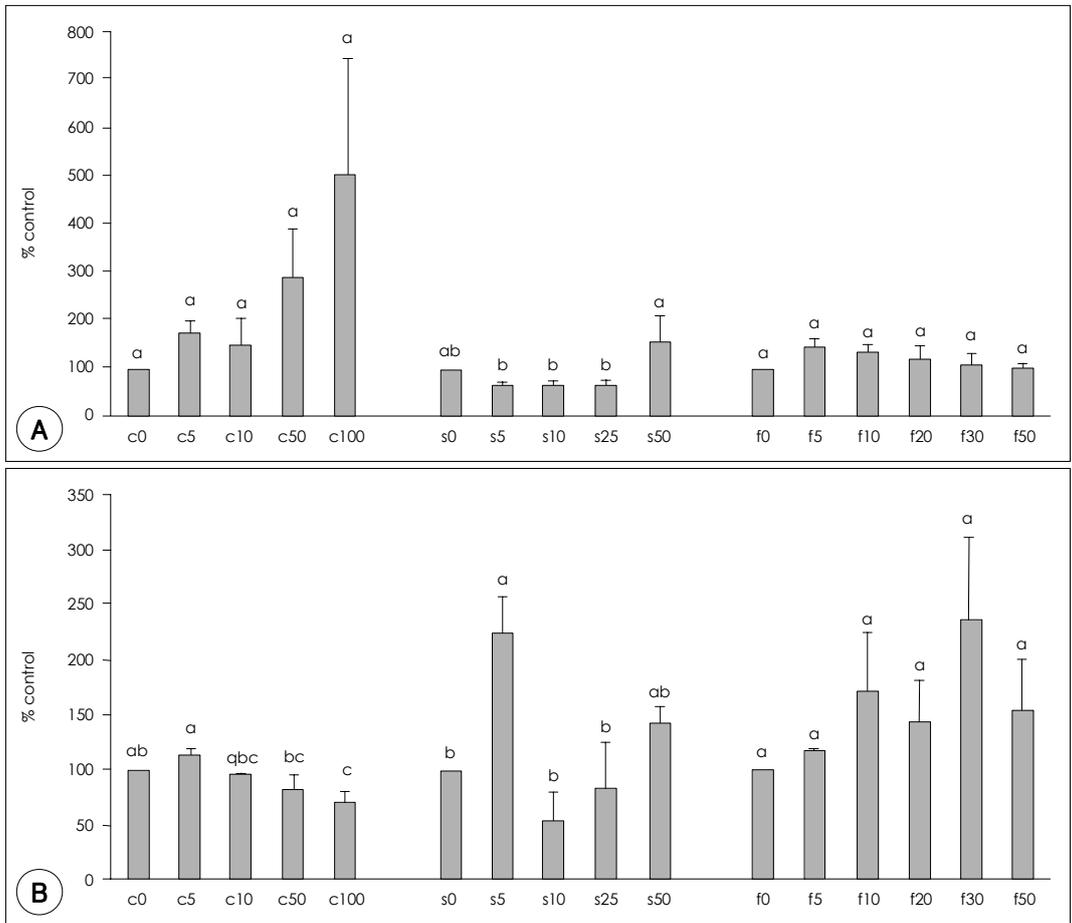
분해하는 대표적인 효소로 알려져 있는 MMP-1과 MMP-1의 저해제인 TIMP-1의 mRNA 발현에 미치는 영향에 대해 알아보았다. HS27 섬유아세포에서 비타민 C, silicon, 철분을 혈청 및 피부 내 농도 범위로 3일 또는 5일 처리 후 RT-PCR로 살펴본 MMP-1의 mRNA 발현을 house keeping gene 인 GAPDH 및 대조군의 발현을 기준으로 수치화한 결과, 3일간의 50  $\mu$ M 비타민 C를 처리한 군에서 대조군에 비해 MMP-1의 mRNA 발현이 200% 증가한 반면

( $p = 0.037$ ), TIMP-1의 mRNA 발현은 농도와는 상관없이 대조군 보다 낮은 발현량을 나타내었다. 3일, 5일간의 silicon 및 철분 처리군 및 5일간의 비타민 C 처리군에서 MMP-1 및 TIMP-1의 mRNA 발현은 대조군과 차이가 없었다.

이 결과, 각 영양소의 3일 또는 5일 처리 후 MMP-1 및 TIMP-1의 mRNA 발현은 3일간의 비타민 C를 50  $\mu$ M 처리한 군에서 MMP-1의 mRNA 발현이 대조군에 비해 증가한 반면 silicon, 철분의 처리 및 각 군의 5일간의 처리에



**Fig. 4.** Effects of ascorbic acid, silicon and iron on Lysyl hydroxylase (LH) protein expressions of cultured human dermal fibroblasts. Human dermal fibroblast cultures were treated with ascorbic acid (0, 5, 10, 50, 100  $\mu$ M), silicon (0, 5, 10, 25, 50  $\mu$ M) and Fe (0, 5, 10, 20, 30, 50, 100  $\mu$ M) for 3 days (A) and 5 days (B). The expression levels of LH proteins was analyzed by western blotting. The signal intensity were quantified the integrated area were percentized to the signal observed in control cells (% control). Results shown are means  $\pm$  SEM (n = 3) ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 5.** Effects of ascorbic acid, silicon and iron on MMP-1 and TIMP-1 expressions of cultured human dermal fibroblasts. Human dermal fibroblast cultures were treated with ascorbic acid (0, 5, 10, 50, 100  $\mu$ M), silicon (0, 5, 10, 25, 50  $\mu$ M) and Fe (0, 5, 10, 20, 30, 50  $\mu$ M) for 3 days. A: The expressions of MMP-1 protein was analysis by western blotting. B: The expressions of TIMP-1 was analyzed by western blotting. Results shown are means  $\pm$  SEM.

서는 MMP-1 및 TIMP-1의 mRNA 발현은 대조군과 차이가 없었다. (data not shown)

리한 결과 각 군에서의 유의적인 차이는 없었다 (data not shown).

**HS27 피부 섬유아세포에서 비타민 C, silicon, 철분이 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)과 tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1)의 단백질 발현에 미치는 효과**

MMP-1, TIMP-1 단백질의 발현 변화는 비타민 C, silicon 및 철분의 3가지 관련 영양소의 3일 및 5일 처리 후 western blotting을 이용하여 알아보았다. MMP-1 단백질의 발현을 단백질 loading control인  $\beta$ -actin 및 대조군을 기준으로 수치화한 결과 (Fig. 5), 비타민 C 처리군에서 농도 및 기간과 무관하게 MMP-1 및 TIMP-1의 단백질 발현에 변화가 없었다. 반면, 50  $\mu$ M, 5  $\mu$ M의 silicon 처리군에서 각각 MMP-1 및 TIMP-1의 단백질 발현이 대조군에 비해 200% 증가하였다 (p = 0.011). 철분 처리군에서 MMP-1, TIMP-1의 단백질 변화는 없었다. 각 영양소를 5일 동안 처

**고 찰**

콜라겐은 피부의 진피에 존재하는 섬유아세포에서 세포자극을 통해 합성된다. 콜라겐의 전구체인 프로콜라겐은 주요 구성 아미노산인 proline과 lysine이 prolyl hydroxylase (PH)와 lysyl hydroxylase (LH)의 영향을 받아 hydroxylation 되면서 합성된다.<sup>20)</sup> 이 PH와 LH의 활성화에 비타민 C와 silicon 및 철분이 co-factor로 작용한다.

비타민 C는 레몬, 브로콜리 등의 과일과 야채에 다량 함유되어 있는 영양소로 식이섭취 또는 국소 부위 처리시 피부의 항산화 능력을 향상시키는 것으로 알려져 있다.<sup>21)</sup> 또한, 비타민 C의 처리가 콜라겐 합성에 관여하는 효소의 연구에 따르면 비타민 C의 처리가 PH와 LH의 활성을 증가

시킨다고 알려져 있다.<sup>20,22)</sup> Murad, Sivarajah 등<sup>20)</sup>의 연구 결과와 비교하여, 250  $\mu$ M의 비타민 C를 처리하여 효소의 활성화를 나타냄에 있어서는 다소 차이가 있으나 본 연구 결과에서는 3일 동안의 5  $\mu$ M 비타민 C의 처리에 있어서 PH의 mRNA의 현저한 증가에도 불구하고 단백질 발현에는 대조군과 차이가 없었다. 그러나, 5일 동안의 비타민 C 처리에서는 다른 실험군보다 PH 단백질 발현이 유의적으로 증가하여 콜라겐 합성 과정에서 비타민 C가 콜라겐의 합성효소인 PH에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 또한, 본 연구 결과에서 비타민 C의 50  $\mu$ M 농도 처리에서 LH의 발현이 현저하게 증가하는 것으로 보아, 이는 4일 동안 비타민 C를 1 mM, 100  $\mu$ M 농도 처리하여 콜라겐의 합성을 알아본 Boyera, Galey 등<sup>23)</sup>의 연구와 비교하여, 본 연구에서 비타민 C의 혈청과 피부 내의 농도범위인 5~50  $\mu$ M 농도를 처리한 군에서 콜라겐 합성효소인 PH 및 LH의 단백질 발현을 증가시켰으므로써 비타민 C의 적은 농도로 fibroblast의 자극을 통해 콜라겐의 합성 효소의 발현을 증가시킬 것으로 여겨진다. 이와 병행하여 3~5일 사이의 비타민 C의 농도별 처리 기간은, 5일 이상 비타민 C를 처리는 세포배양액 내의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 증가시켜 세포의 독성을 유발한다는 Duarte, Almeida 등<sup>24)</sup>의 연구와 비교하여, 세포 독성 및 비타민 C의 안정성에 영향을 미치지 않는 기간으로 향후 콜라겐 관련 연구에 적정 수준임을 제안한다.

이와는 대조적으로 비타민 C의 처리는 MMP-1, TIMP-1의 발현에는 영향을 미치지 않았다. 이 결과는 비타민 C와 철분을 fibroblast에 처리하였을 때 MMP-1이 증가하였다는 Campo, Avenoso 등<sup>25)</sup>의 보고와는 상이한 결과이나, MMP-1이 콜라겐을 분해하는 효소인 만큼 비타민 C가 콜라겐의 효소적인 분해 작용 보다는 콜라겐의 합성에 관여하는 것으로 여겨진다.

Silicon은 곡류와 근채류에 함유된 미량 원소로 인체의 피부, 혈관 등에 존재하며, 노화가 진행될수록 체내 silicon의 함량이 감소하게 된다. 선행연구에서 Seaborn, Nielsen<sup>9)</sup>과 Barel 등<sup>26)</sup>은 silicon이 PH의 활성을 증가시킨다고 보고하였으나, 본 실험의 결과에서는 모든 silicon 처리군에서 PH의 단백질 발현을 증가시키지 못했다. Silicon이 LH의 발현 또는 활성에 영향을 미치는 연구는 거의 없었으나 본 연구에서는 5~50  $\mu$ M silicon을 처리한 군에서 LH의 mRNA 및 단백질 발현을 현저히 증가시키는 것으로 나타났다. 이 결과는 silicon을 처리한 군에서의 LH mRNA 발현 증가 결과와 병행하여, 혈청 내 농도의 silicon이 피부 콜라겐의 posttranslational modification 관련 효소 중 lysyl

hydroxylase mRNA의 발현 증가를 초래하여 궁극적으로 LH 단백질의 발현을 증가시키고 동시에 LH의 최대 활성을 유지시켜 콜라겐의 cross-link 구조를 유지하는 것이라 여겨진다.

또한, 본 연구에서 silicon의 5  $\mu$ M를 처리한 군에서 TIMP-1의 단백질 발현이 현저히 증가하였고, 50  $\mu$ M의 처리군에서는 MMP-1의 단백질 발현이 대조군에 비해 증가하였다. 이는 Ma, Sun 등<sup>27)</sup>의 연구에서 silicon이 사람 폐의 fibroblast에서 MMP-1, TIMP-1의 발현이 증가한다는 보고와 일치하는 결과로 silicon의 처리가 콜라겐 분해효소에 영향을 미치는 것을 의미한다. 그러나 콜라겐의 분해효소 저해제인 TIMP-1의 단백질 발현이 증가한 5  $\mu$ M의 silicon 처리시 MMP-1의 단백질 발현에는 변화가 없었음에도 불구하고, TIMP-1의 발현이 증가함에 따라 silicon의 저농도 처리는 콜라겐의 효소적인 분해를 저해하는 효과를 나타내었음을 의미한다.

철분은 고기 등의 육류 및 내장류 등에 함유된 미량 무기질이다. 철분은 콜라겐 합성과정에서 Fe<sup>2+</sup>의 형태로 PH와 LH와 결합하여 효소의 활성에 관여한다고 보고되어 있고,<sup>28)</sup> 또한 Switzer, Summer 등<sup>29)</sup>의 보고에서 0.25  $\mu$ M의 철분이 비타민 C와 작용하여 proline hydroxylation을 증가시킨다고 하였으나, 본 실험의 결과에서 PH와 LH의 단백질 발현에 영향을 미치지 않았다. 이는 합성 효소와 결합한 Fe<sup>2+</sup>의 형태인 철분의 산화와 비타민 C의 환원 작용이 동시에 일어남으로써 효소의 활성이 이루어지는 것이나, 본 실험에서의 철분의 단독 처리만으로는 효소의 활성이 지속되지 않은 것으로 여겨진다. 또한 본 실험에서 사용된 철분의 농도는 사전 연구의 농도에 반해 높은 수준으로 처리되어 추후의 연구에서는 보다 낮은 농도를 이용한 연구가 진행되어야 할 것이다. 이와 병행하여 MMP-1과 TIMP-1의 발현에도 변화가 없었다. 이는 철분이 비타민 C와 같이 처리되었을 때 MMP-1의 발현이 증가한다는 Campo, Avenoso 등<sup>25)</sup>의 보고와는 상이한 결과이나, 본 연구에서 철분이 콜라겐의 합성 효소와 결합하여 효소의 활성을 나타내는 조효소인 만큼 분해 효소에는 영향을 미치지 않았다.

이와 같은 5~50  $\mu$ M의 비타민 C 및 silicon의 처리에 의한 피부 섬유아세포에서의 콜라겐 합성을 유도하는 효소에 미치는 긍정적인 변화가 최종적으로 콜라겐 합성량에 관여하는지 *in vitro*에서의 연구가 이루어져야 할 것이며, 콜라겐 합성 효소 및 콜라겐 합성에 긍정적인 효과가 있는 농도를 찾아내어 추후 동물실험을 통한 연구가 진행되어야 할 것이나, 본 연구에서 제시된 비타민 C 및 silicon의 처리 후 콜라겐 합성 효소의 발현 증가는 피부 탄력 증진을

위한 건강 기능식품 소재로의 개발 가능성을 제안한다.

## 요 약

본 연구에서는 비타민 C, silicon, 철분을 농도별로 피부 섬유아 세포에 처리 후 콜라겐 합성 효소인 PH, LH의 mRNA와 protein 발현 및 분해 효소인 MMP-1와 저해제인 TIMP-1의 mRNA, protein 발현의 변화를 대조군과 비교·분석하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 피부 섬유아세포에서 비타민 C의 처리는 콜라겐 합성 효소인 PH의 mRNA 발현을 대조군에 비해 현저하게 증가시켰고 이와 병행하여, PH의 protein 발현도 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. 그러나 다른 콜라겐 합성 효소인 LH의 mRNA 발현에는 영향을 미치지 않았으나 protein의 발현을 증가시켰다. 또한, 콜라겐 분해 효소인 MMP-1의 mRNA 발현은 대조군에 비해 유의적으로 증가시켰으나 protein 발현에서는 대조군과 차이가 없었다.

2) 피부 섬유아세포에서 silicon의 혈중 내 농도 처리는 LH의 mRNA 발현의 현저한 증가와 더불어 protein 발현에도 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 콜라겐 분해 효소인 MMP-1과 저해제인 TIMP-1의 단백질 발현을 대조군에 비해 증가시켰다.

3) 피부 섬유아세포에서 철분의 혈중 내 농도 처리는 콜라겐 합성 및 분해 관련 효소의 mRNA 및 protein 발현에 영향을 미치지 않았다.

결론적으로, 피부 섬유아세포에서 비타민 C 및 silicon의 처리는 콜라겐의 posttranslational modification 관련 효소의 mRNA의 발현 및 단백질의 발현을 증가시켜 궁극적으로 콜라겐 합성에 긍정적인 영향을 나타내었다.

## Literature cited

- 1) Kim NM, Koo BS, Lee SK, Hwang EI, So SH, Do JH. Effect of Korean red ginseng on collagen biosynthesis and MMP- I activity in human dermal fibroblast. *J Ginseng Res* 2007; 31 (2) : 86-92
- 2) Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 195: 298-308
- 3) Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Bprrjees JJ. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 2002; 138: 1462-1470
- 4) Elsner P, Wilhelm D, Maibach HI. Mechanical properties of human forearm and vulvar skin. *Br J Dermatol* 1990; 122: 607-614
- 5) Prockop DJ, Berg RA, Kivirikko KI, Uitto J. Intracellular steps

- in the biosynthesis of collagen, *Biochemistry of Collagen*. In: Ramachandran GN, Reddi AH, editor. Plenum Press, New York; 1976. p.163-273
- 6) Jemec G, Jemec B, Jemec BIE. The effect of superficial hydration the mechanical properties of human skin in vivo. *Plast Reconstr Surg* 1990; 85: 100-103
- 7) Pinnell SR, Murad S, Darr D. Induction of collagen synthesis by ascorbic acid. A possible Mechanism. *Arch Dermatol* 1987; 123: 1684-1686
- 8) Passoja K, Rautavuoma K, Ala-Kokko L, Kosonen T, Kivirikko KI. Cloning and characterization of a third human lysyl hydroxylase isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(18) : 10482-10486
- 9) Seaborn CD, Nielsen FH. Silicon deprivation decreases collagen formation in wounds and bone, and ornithine transaminase enzyme activity in liver. *Biol Trace Elem* 2002; 89(3) : 251-261
- 10) Wlaschek M, Tantcheva-Poór I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schüller J, Scharffetter-Kochanek K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobio* 2001; 63(1-3) : 41-51
- 11) Fisher GJ, Kang SW, Voorhees JJ. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occur subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *J Clin Invest* 1998; 101(6) : 1432-1440
- 12) Enjoi M, Kotoh K, Iwamoto H, Nakamuta M, Nawata H. Self-regulation of Type I collagen degradation by collagen-induced production of matrix metalloproteinase-1 on cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma cells. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 2000; 36: 71-73
- 13) Fisher GJ, Voorhees JJ. Molecular mechanism of photoaging in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid. *Photochem Photobiol* 1999; 69(2) : 154-157
- 14) Tajima S, Pinnel SR. Ascorbic acid preferentially enhances type I and III collagen gene transcription in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 1996; 11: 250-253
- 15) Carlisle EM. Silicon: a requirement in bone formation independent of vitamin D. *Calcif Tissue Int* 1981; 33: 27-34
- 16) Che P, Xu J, Shi H, Ma Y. Quantitative determination of serum iron in human blood by high-performance capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1995; 669: 45-51
- 17) Föhling M, Perlewitz A, Doller A, Thiele BJ. Thiele. Regulation of collagen prolyl 4-hydroxylase and matrix metalloproteinases in fibrosarcoma cells by hypoxia. *Comp Biochem Physiol Part C* 2004; 139: 119-126
- 18) Uzawa K, Grzesik WJ, Nishiura T, Kuznetsov SA, Robey PG, Brenner DA, Yamauchi M. Differential expression of human lysyl hydroxylase genes, lysine hydroxylation, and cross-linking of type I collagen during osteoblastic differentiation in vitro. *J Bone Miner Res* 1999; 14(8) : 1272-1280
- 19) Sim GS, Kim JH, Lee DH, Park SM, Pyo HB, Zhang YH, Lee BC. Effects of the Spatholobi Caulis extract on Antioxidation and inhibition of Matrix Metalloproteinase in Human Skin Fibroblasts. *Korean J Biochnol Bioeng* 2005; 20(1) : 40-45
- 20) Murad S, Sivarajah A, Pinnell SR. Prolyl and lysyl hydroxylase activities of human skin fibroblast: effect of donor age and ascorbate. *J Invest Dermatol* 1980; 75: 404-407

- 21) Ronni C. Micronutrient requirements in older women. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 1240-1245
- 22) Murad S, Tajima S, Johnson GR, Sivarajah S, Pinnell SR. Collagen synthesis in cultured human skin fibroblasts: Effect of ascorbic acid and its analogs. *J Invest Dermatol* 1983; 81: 158-162
- 23) Boyera N, Galey I, Bernard BA. Effect of vitamin C and its derivatives on collagen synthesis and cross-linking by normal human fibroblasts. *Int J Cosmet Sci* 1998; 20: 151-158
- 24) Duarte TL, Almeida GM, Jones GD. Investigation of the role of extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and transition metal ions in the genotoxic action of ascorbic acid in cell culture models. *Toxicol Lett* 2007; 170(1): 57-65
- 25) Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Ferlazzo AM, Samà D, Calatroni A. Purified human chondroitin-4-sulfate reduced MMP/TIMP imbalance induced by iron plus ascorbate in human fibroblast cultures. *Cell Biol Int* 2006; 30(1): 21-30
- 26) Barel A, Calomme M, Timchenko A, De Paepe K, Demeester N, Rogiers V, Clarys P, Vanden Berghe D. Effect of oral intake of choline-stabilized orthosilicic acid on skin, nails and hair in women with photodamaged skin. *Arch Dermatol Res* 2005; 297(4): 147-53
- 27) Ma XB, Sun SX, Yang F. Effect of human silicotic alveolar macrophages on the expression of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in human lung fibroblasts. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 2004; 22(5): 358-360
- 28) Tuderman L, Myllo R, Kivirikko KI. Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction. I. Role of co-substrates. *Eur J Biochem* 1977; 80: 341-348
- 29) Switzer BR, Summer GK. Collagen synthesis in human skin fibroblasts: effects of ascorbate, -ketoglutarate and ferrous ion on proline hydroxylation. *J Nutr* 1972; 102(6): 721-728
- 30) Oono T, Shirafuji Y, H WK, Akiyama H, Iwatsuki K. Effects of human neutrophil peptide-1 on the expression of interstitial collagenase and type I collagen in human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 2002; 294: 185-189
- 31) Kao WW, Flaks JG, Prockop DJ. Primary and secondary effects of ascorbate on procollagen synthesis and protein synthesis by primary cultures of tendon fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 1976; 173: 638-648
- 32) Uzawa K, Yeowell HN, Yamamoto K, Mochida Y, Tanzawa H, Yamauchi M. Lysine hydroxylation of collagen in a fibroblast cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305: 484-487