

사람 섬유아세포에서 세리신잠 실샘가수분해물(*Sericinjam Gland Hydrolysate*)의 항산화 및 항노화 효과

천유리·황정욱·이희삼*·윤세영**·최용수·강상진†

차의과학대학교 바이오산업융합학과, *농촌진흥청 국립농업과학원 잠사양봉소재과,
**광주여자대학교 제약향장학과
(2012년 9월 7일 접수, 2012년 9월 17일 수정, 2012년 10월 30일 채택)

Anti-oxidant and Anti-aging Activities of *Sericinjam Gland Hydrolysate* Extract in Human Dermal Fibroblasts

Yuri Cheon, Jung Wook Hwang, Heui Sam Lee*, Seiyong Yun**, Yong-Soo Choi, and Sangjin Kang†

Department of Applied Bioscience, CHA university, Hanyang bldg, 605-21 yeoksam-dong,
Gangnam-gu, Seoul 135-081, Korea

*Sericultural & Apicultural Materials Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon

**Department of Pharmaceutical Cosmetics, Gwangju Women's University

(Received September 7, 2012; Revised September 17, 2012; Accepted October 30, 2012)

요약: 본 논문에서는 세리신잠 실샘 가수분해물(*Sericinjam Gland Hydrolysate*: SJGH)을 이용하여 진피 섬유아세포에서 항산화 및 항노화 연구를 진행하였다. SJGH는 사람 섬유아세포에서 고농도의 과산화수소에 의한 세포 사멸과 세포 내 산화 증가를 효과적으로 방어하였다. 또한 SJGH는 저농도의 과산화수소에 의한 섬유아세포의 SA- β -Gal 발현과 MMP-1의 발현 증가를 억제하였고, 반대로 프로콜라겐 I의 생합성은 증가시켰다. 이러한 결과를 통해 SJGH의 항산화 및 항노화 효과가 우수함을 확인하였으며, SJGH가 항노화 화장품의 우수한 소재가 될 수 있음을 보여준다.

Abstract: We studied the anti-oxidant and anti-aging activities of *Sericinjam Gland Hydrolysate* (SJGH) in the human dermal fibroblasts. SJGH effectively defended cell death and ROS generation under high H₂O₂ in human dermal fibroblasts. Moreover SJGH reduced the expression of SA- β -Gal and MMP-1 under low concentration of H₂O₂ whereas biosynthesis of procollagen- I was increased. This results demonstrate the anti-oxidant and anti-aging activities of SJGH. SJGH could be a good candidate for anti-aging cosmetics ingredient.

Keywords: *Sericinjam*, *procollagen I*, *MMP-1*, *fibroblast*, *oxidative damage*

1. 서 론

사람의 피부는 여러 가지 해로운 환경에 의해 노화가 촉진되는데, 이러한 환경 중 가장 해로운 것은 산화에 의해 피부가 손상되는 것으로, 그 결과 피부의

탄력성이 감소되고, 콜라겐합성 감소, 주름 형성 등의 피부 노화작용이 발생된다고 여겨진다[1,2].

진피(dermis)는 거대분자의 망상구조인 세포외기질(extracellular matrix)과 섬유아세포(fibroblast)로 이루어진다. 세포외기질은 피부 탄력성, 신진 대사 등에 관여하고 있으며, 콜라겐 I를 가장 많이 포함하고 있다 [2]. 콜라겐은 단단하게 엮여져 있는 3중 나선(triplehe-

† 주 저자 (e-mail: sjkang@cha.ac.kr)

lix)으로 구성된 단백질이다[3]. 콜라겐 I은 일차적으로 섬유아세포에서 수용성 프로콜라겐 I로 합성된 후, 세포 외로 분비된다. 그 후, 가수분해 과정을 통해 비수용성(insoluble) 콜라겐 섬유 형태로 전환된다[4,5]. 콜라겐 구조는 비 특이적인 단백질 분해공격에 강한 저항성을 갖게 해준다. 또한 세포외기질의 기능을 최적화시키기 위해 주기적인 turnover가 일어나게 되며[2], 이 과정에서 interstitial collagenase인 MMP-1 (matrix metalloprotease-1)에 의해 콜라겐의 분해가 일어나게 되고[6], 세포외기질 내에는 합성된 콜라겐과 분해된 콜라겐 조각들이 공존하게 된다. 대개 정상적인 피부에서는 콜라겐의 합성과 MMP-1의 활성이 균형을 이루고 있지만, 이러한 균형이 깨지는 경우 피부의 주름이 발생된다고 여겨진다. 광노화가 진행되는 피부에서는 콜라겐 I의 합성이 저해되고 MMP-1의 활성이 증가된다고 알려져 있다[7].

피부는 항상 산소와 접촉하고 자외선에 노출됨으로써 활성산소종(ROS: reactive oxidant species)에 의한 피부의 산화적 손상(oxidative damage)을 피하기 어렵다. 활성산소종의 종류에는 $^1\text{O}_2$ (singlet oxygen), $\cdot\text{OH}$ (hydroxyl radical), $\text{O}_2^{\cdot-}$ (superoxide anion radical), H_2O_2 (hydrogen peroxide), $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, ROOH , HOCl 이 존재하며[8], 이 중 $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 가 피부의 노화과정의 개시, 진행에 큰 역할을 한다고 한다[9]. 세포 내 ROS가 증가함에 따라 세포 내 산화 손상 촉진과 더불어 대사 활성의 감소가 일어나고, 피부 노화 촉진과 많은 만성적인 질환을 유도하게 된다. 특히, 세포 내 항산화제 파괴, 지질 과산화반응 촉진, DNA 산화 손상, 콜라겐과 히알루론산 사슬 절단, 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 등의 반응이 피부 노화를 가속화시킨다[9]. 또한 직접적인 과산화수소와 UV 등의 노출은 apoptosis를 유발시키고[10], ROS의 발현량을 더욱 증가시킨다고 한다[11].

일반적으로 누에고치는 피브린과 세리신으로 구성되어지며, 세리신(sericin)은 누에고치의 중량의 20 ~ 30%를 구성하고 있고 분자량이 24 ~ 400 KDa인 단백질로서, 세린(serine), 글리신(glycine), 리신(lysine) 등의 친수성 아미노산을 많이 함유하고 있다[12]. 세리신은 박테리아 억제능, 항산화력[13], UV 저항성[14], 미백 작용(anti-tyrosinase activity)[15] 등이 보고되었고, 인체 조직 적합성[16]이 뛰어나서 이미 화장품, 의학

분야에서 응용되고 있다[12].

그러나 표피와 진피 내에서 과산화수소와 같은 산화스트레스를 얼마나 억제시키고, 보호시킬 수 있는가에 대한 자세한 자료가 부족하다. 또한 기존의 세리신은 가공 후 분자의 결정화로 인해 용해성이 낮아 모발 관리용이나 보습화장품 원료로 이용되어졌고, 노화 억제 방지 부분에 있어서는 크게 활용되지 못하였다.

최근에 농촌진흥청에서 개발한 세리신잠은 다른 처리 없이 순수한 세리신을 얻을 수 있도록 교잡하여 육종시킨 품종이며, 일반누에와 비교 시 세리신이 누에고치에 풍부하게 존재하는 특징을 지닌다[17].

저자들은 최근 세리신잠의 실샘으로부터 세리신을 다량 함유한 수용성 추출물을 분리하여 특성을 규명하였으며, 우수한 자유라디칼 소거 활성 능력이 있음을 발견하였다. 본 논문에서는 세리신잠 실샘 가수분해물(Sericinjam Gland Hydrolysate : SJGH)의 여러 활성 효과 중 항산화, 항노화 효과에 대한 실험을 진행하였다.

2. 실험 재료 및 실험 방법

2.1. 세포 배양

사람 섬유아세포(Neonatal Human Demal Fibroblast : NHDF)는 Lonza에서 구입하였고, 실험실에서 분열 증식하여 4 ~ 10계대의 세포를 사용하였다. 섬유아세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Hyclone-Low glucose, USA)에, 1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco, USA), 10% Fetal Bovine Serum (FBS : PAA Laboratories, USA)를 첨가한 후 37 °C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

2.2. 세리신잠 실샘 유래 수용성 가수분해물의 제조

5령 9일 세리신잠을 동결 건조하여 실샘만 분리한 후 급속 냉각 분쇄법을 이용하여 실샘 분말을 제조하였다. SJGH의 제조는 실샘 분말 26 g을 증류수 200 mL에 혼합하여 상온에서 30분 동안 교반 후 4 °C에서 13,000 rpm으로 30 min 원심 분리하여 상등액만 회수하였다. 회수한 상등액에 1 M NaOH를 가하여 상온에서 30 min 가수분해하였다. 가수분해된 상등액에 인산을 첨가하여 중화시킨 뒤 셀룰로오스 투석막(MWCO = 3,000, Spectrum, USA)을 이용하여 3일 동안 증류수

로 투석하였다. 투석 과정 중 발생한 침전물을 제거하기 위하여 4 °C에서 13,000 rpm으로 30 min 원심 분리하여 세리신잠 실샘 가수분해 용액을 제조하였다. 이렇게 제조된 세리신잠 가수분해 용액을 영하 20 °C에서 냉동시킨 후 동결 건조하여 분말 상태로 제조하였다.

2.3. 세포 증식 평가

세포 증식은 Ez-cytox Enhanced Cell Viability Assay Kit (Daeil Lab, Korea)를 사용하여 측정하였고, 제조사의 지시에 따라 실험을 진행하였다. 섬유아세포(NHDF)를 48 well plate에 well당 5000 cell씩 분주하고, FBS를 첨가하지 않은 DMEM (low glucose)에서 37 °C 하루 배양하였다. SJGH를 0, 20, 50, 100, 200 µg/mL로 처리하여 48 h 배양한 후, 각 well에 ez-cytox 20 µL를 첨가하여 2 h 배양한 뒤, microplate reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선 그래프를 이용하여 세포 수로 환산하고 평균을 계산하였다(n = 5).

2.4. 산화손상에 대한 보호 효과

48 well plate에 섬유아세포를 1 × 10⁴ cells /well씩 분주하고 10% FBS를 포함한 배지에서 하루 동안 배양한 후, SJGH를 10, 25, 50 µg/mL로 24 h 처리하였다. 과산화수소 500 µM을 포함하는 무혈청 배지로 2 h 처리한 후, 다시 새로운 배지로 교환하여 하룻밤 배양하였다. 세포의 수는 위에서 언급한 방법대로 ez-cytox로 측정하였고, 표준곡선 그래프를 이용하여 값을 환산하여 세포의 수를 계산한 후, 세포 생존률(%)로 표시하였다.

2.5. SA-β-galactosidase 발현 평가

노화에 의해 증가되는 SA-β-galactosidase (Senescence-associated β-galactosidase, SA-β-GAL) 활성은 Senescent Cell Staining Kit (Cell Signaling Technology, USA)를 사용하여 평가하였다. 6 well plate에 섬유아세포를 각 7 × 10⁴ cells/well로 분주한 후, 하루 배양하였다. SJGH를 10, 30, 50 µg/mL을 포함하는 무혈청 배지에 24 h 배양한 후, 과산화수소 100 µM을 하에서 24 h 배양하였다. PBS (phosphate buffered saline)로 한 번 세척 한 후, 1x 고정 용액을 각 well 당 1 mL씩 투입하고 5 ~ 10 min 고정시켰다. PBS로 두 번 세척 후, 각

well당 염색 용액을 1 mL씩 넣고 37 °C에서 24 h 배양 (no CO₂)하였다. SA-β-GAL 염색 용액은 1 mg/mL x-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-d-galactopyranoside powder), 1x staining solution (400 mM citric acid/sodium phosphate- pH 6.0, 1.5 M NaCl/MgCl₂ 20mM), 100x staining solution supplement A (500 nM potassium ferrocyanide), 100x staining solution supplement B (500 nM potassium ferricyanide)를 혼합시킨 것이다.

2.6. 세포 내 산화수준 평가

과산화수소에 의한 세포 내 산화 상태를 측정하기 위해 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)를 사용하였다. DCFDA는 세포 내 유입시 ROS에 의해 산화되어 2,7-dichlorofluorescein로 탈 에스테르화되어 형광을 띄는 특징을 가지고 있다.

24 well plate에 섬유아세포를 2 × 10⁴ cells/well로 분주한 후, 10% FBS 존재 하에서 하룻밤 배양하였다. 이후에 각 물질을 농도별로 24 h 처리한 후, 10 µM DCFDA와 500 µM H₂O₂을 동시 처리하여 30 min 간 37 °C에서 배양하였다. PBS로 세척한 뒤 1N NaOH로 용해하였고, 96 black well plate에 180 µL씩 분주하였다. 최종적으로 형광분석기로 495 nm excitation, 527 nm emission에서 형광을 측정 후, 각 단백질 정량 값으로 normalize하였다.

2.7. 콜라겐 생합성 평가

콜라겐 발현량은 PICP ELASA Kit (Takara, Japan)에 의해 평가하였다. 세포를 6 well plate에 분주하여 하룻밤 배양한 뒤, SJGH를 10, 25, 50 µg/mL로 처리하고 다시 24 h 배양하였다. 다음 날 과산화수소 200 µM 농도로 6 h 처리 후, 새 배지로 교체하고 하룻밤 배양한 다음 배지를 수거하여 농축하였다. PICP 농도 측정은 제작자의 지시에 따라 진행하였다. 간단히 설명하면, monoclonal PICP antibody가 코팅되어있는 96 well plate에 100 µL의 antibody-POD-conjugate 용액과 20 µL 시료를 넣어 3 h 동안 37 °C에서 반응시킨다. 이 후에 PBS로 4번 세척 후, 100 µL의 기질 용액을 첨가하고 실온에서 15 min 동안 반응시킨 후, stop solution 100 µL을 투입한다. ELISA reader로 450 nm의 흡광도를 측정, 분석하였다.

2.8. Western Blot Analysis

배양한 세포를 트립신-EDTA를 사용하여 수거한 뒤, 원심분리기로 세포를 침전시켜 pellet 상태로 만든다. Pellet 상태의 세포를 protease inhibitors가 포함되어있는 PRO-PREPTM solution (Intron Biotechnology, Korea) 으로 10 ~ 20 min 동안 용해한 후, 5분간 원심 분리 (13,000 rpm, 4)하고 상층액을 획득하였다. 단백질의 농도는 Bradford (Bio-Rad Laboratories, USA) 방법으로 측정하였다. 단백질을 6%, 10% SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리한 후, PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane (Millipore, USA)로 transfer 시켰다. 1 h 동안 blocking 후 1차 항체와 4 °C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응 후, 0.1% tween 20이 포함된 TBS-T 용액으로 10분씩 3번 세척하고, 1 h 동안 상온에서 IgG - HRP (Santacruz, USA)와 반응시켰다. TBS-T로 5 번 membrane을 세척한 후, ECL Detection Kit (Millipore, USA)로 반응시켜 X-ray film으로 검출하였다.

3. 결 과

3.1. SJGH의 세포 증식에 대한 영향

SJGH의 독성을 알아보기 위해 섬유아세포에 각 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 48 h 처리하였다. 실험농도에서 세포에 대한 독성은 보이지 않았으며, 세포의 수가 대조군(비처리군)에 비해 농도별(20, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 9%, 11%, 14%, 18%로 증가하면서 세포 증식 효과를 나타내었다(Figure 1).

3.2. 산화 손상에 대한 보호 효과

섬유아세포를 다양한 농도의 SJGH로 전처리 후, 과산화수소(500 μM)에 노출하여 산화손상에 대한 보호 효과를 검토하였다. SJGH는 과산화수소 처리군 대비 농도(10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 증가에 따라 77%, 103%, 125%의 보호 효과를 보였다(Figure 2).

3.3. 과산화수소에 의한 ROS 생성 억제 효과

섬유아세포에서 과산화수소에 의한 산화손상을 얼마나 억제할 수 있는지 DCFDA를 사용하여 ROS 생성량을 측정하였다. 먼저, 과산화수소의 농도를 결정하기 위해 300, 400, 500 μM 의 과산화수소를 섬유아세포에 처리하였고, 농도 의존적으로 ROS 생성이 증가

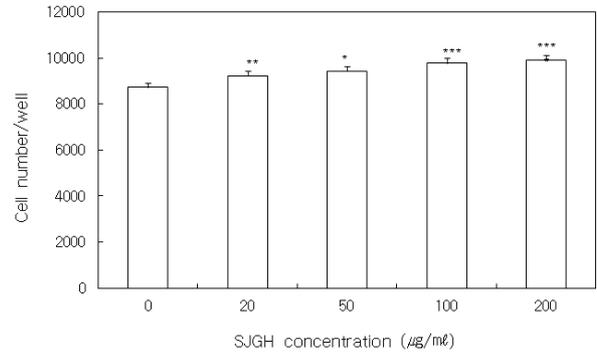


Figure 1. The effect of the SJGH on the proliferation of NHDF. NHDF was treated with 20, 50, 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each extract for 48 h (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$).

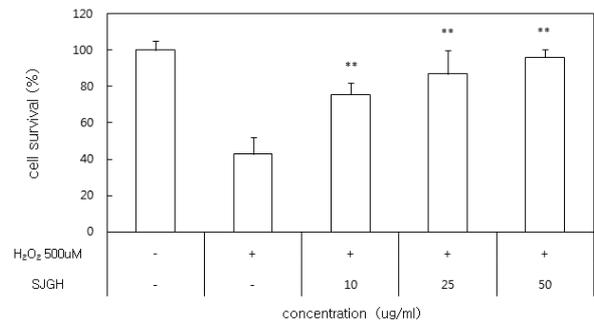


Figure 2. The protective effects of SJGH on H₂O₂-induced cell death of NHDF (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

됨을 확인하였다(Figure 3a). 이후 500 μM 의 과산화수소 하에서 SJGH의 영향을 검토하였다.

과산화수소 처리군과 비 처리군에서 SJGH에 의한 ROS 생성 억제효과를 비교하였다. 과산화수소가 없는 조건하에서, SJGH 전처리군은 대조군(비처리군)과 비교하여 ROS 생성량의 차이를 보이지 않았다(data not shown). 그러나 과산화수소 처리군의 경우, 과산화수소 처리에 의해 ROS 생성량이 약 1.8배 증가하였고, SJGH 처리군은 농도별(10, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 약 7%, 16%, 24%의 ROS 생성 억제 효과를 보였다(Figure 3b).

3.4. 과산화수소에 의한 SA- β -GAL 발현 억제 효과

세포 노화와 관련된 생화학적인 지표로서 사용되는 SA- β -GAL은 단당체에서 β -galactoside의 가수분해를 촉매시키는 효소이다. 절단된 galactoside는 무색의 x-gal과 반응하여 세포에서 청색이 관찰된다. SA- β -GAL Staining Kit를 이용해 염색한 결과, 과산화수소 처리

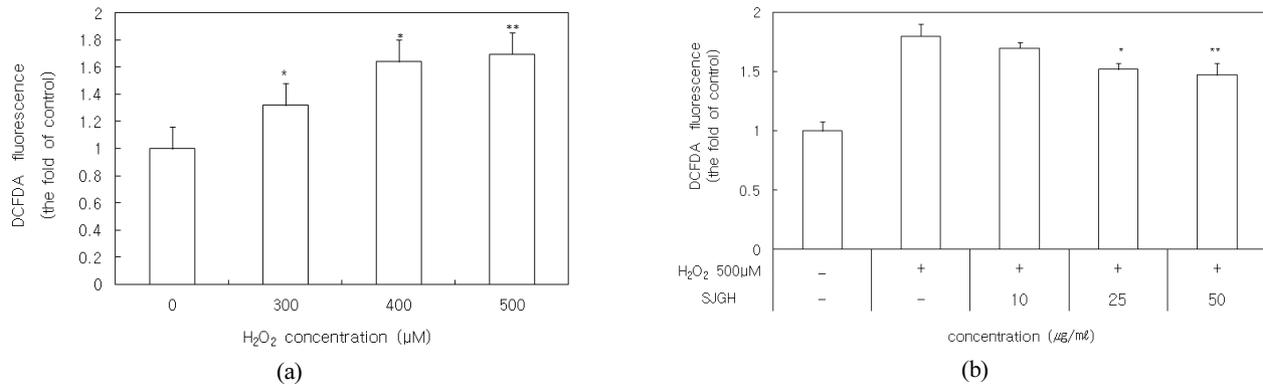


Figure 3. Effects of SJGH on H₂O₂-induced ROS generation in the NHDF. (a) ROS generation by H₂O₂ (b) protective effect of SJGH on ROS generation (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

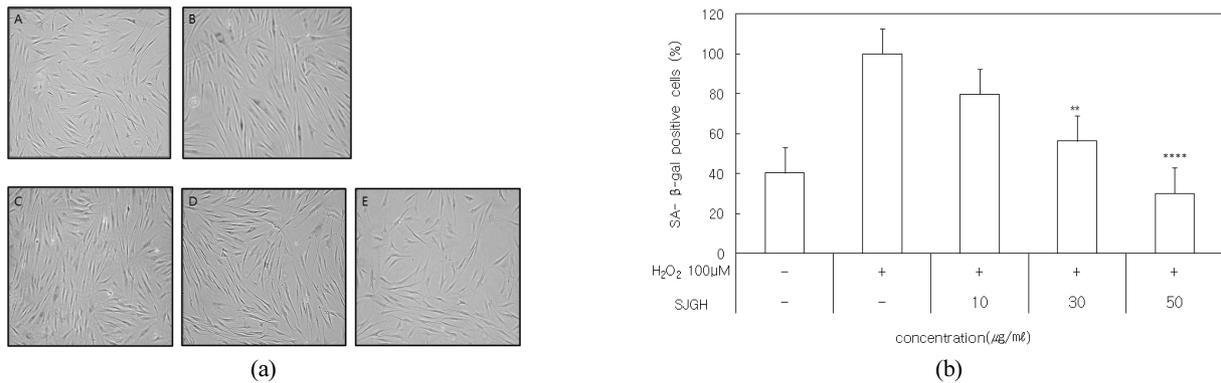


Figure 4. Effect of SJGH on SA-β-GAL expression in the NHDF. (a) SA-β-GAL expression in NHDF, A: Normal NHDF, B: 100 μM H₂O₂, C, D, E: Pre-treatment of SJGH 10, 30, 50 μg/mL before 100 μM H₂O₂ treatment. (b) Quantitative data of SA-β-GAL on positive cell (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$).

군에서 SA-β-GAL 발현이 증가된 것을 볼 수 있었고, SJGH에 의해 그 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것이 확인되었다(Figure 4a). SA-β-GAL로 염색된 세포의 수를 비교한 결과, 농도별(10, 30, 50 μg/mL)로 20%, 44%, 70%의 발현 억제를 보여주었다(Figure 4b).

3.5. Procollagen-I 합성 증진 효과

섬유아세포는 콜라겐의 전구체인 프로콜라겐 I을 합성하며, 세포 외로 분비한다. 과산화수소에 의해 섬유아세포의 프로콜라겐 I의 합성이 현저히 감소하였지만, SJGH 전처리군은 농도 증가에 따라 프로콜라겐 I의 합성이 회복됨을 보였다(Figure 5a). Western blot 결과를 정량하면, SJGH 처리군은 낮은 농도에서는 영향이 없었으며, 10, 25, 50 μg/mL에서는 세포질에서 각각 57%, 83%, 18% 증가되었고, 배양액에서는 116%, 142%, 80% 합성이 증가하였다(Figure 5b).

SJGH의 영향을 재확인하기 위하여 행한 PICP assay에서는 SJGH 처리군이 과산화수소 처리군 대비하여 농도별로(10, 25, 50 μg/mL) 53%, 119%, 149%의 합성 증진 효과를 보였다(Figure 5c).

3.6. MMP-I 발현에 대한 억제 효과

섬유아세포를 24 h 동안 SJGH (10, 25, 50 μg/mL)로 전처리 하고, 6 h 동안 200 μM의 과산화수소에 노출 시킨 뒤, 세포 내 MMP-1의 발현을 보았다. Western blot의 결과, 비처리군은 MMP-1 발현이 약하게 일어나지만, 과산화수소 처리군은 MMP-1이 강하게 발현되었다. 반면에 SJGH 처리군은 과산화수소에 의한 MMP-I의 증가를 농도 의존적으로 억제하는 양상을 보여주었다(Figure 6a). Western blot 결과를 정량하면, SJGH 처리군은 농도별(10, 25, 50 μg/mL)로 과산화수소처리군 대비 3%, 27%, 50%의 억제 효과를 보였다

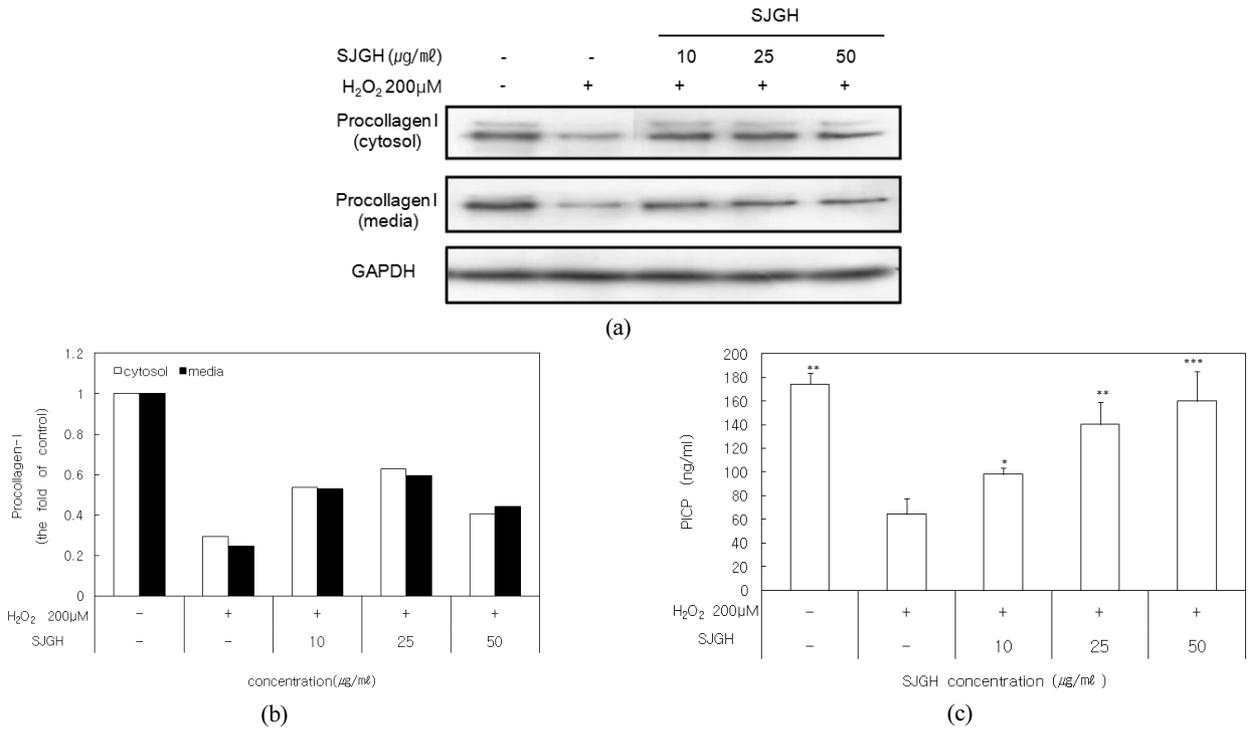


Figure 5. Effect of SJGH on procollagen I synthesis (a) Intracellular and extracellular synthesis of procollagen I in NHDF. (b) Quantitative data of procollagen I bands in (a). (c) Concentration of procollagen type I C terminal-peptide (PICP) in the medium (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$).

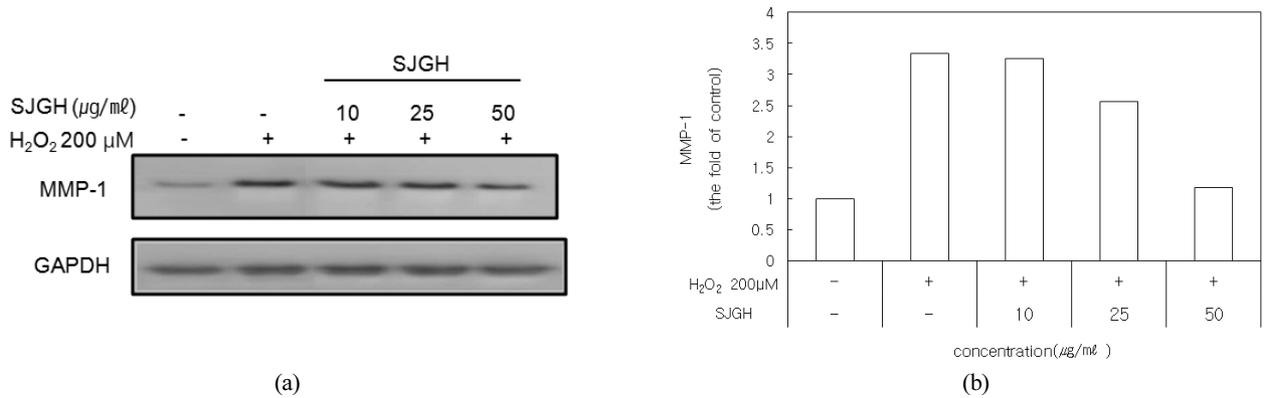


Figure 6. Effect of SJGH on MMP-I expression in NHDF. (a) MMP-I protein levels were assessed by Western blot analysis. (b) quantitative data of MMP-I bands in (a).

(Figure 6b).

4. 고찰

노화에 의해 피부 두꺼워짐, 주름 형성, 발암, 염증 등의 증상이 나타나게 되고[18], 대표적인 산화 촉진

제인 UV와 과산화수소는 피부에서 활성 산소 종의 연쇄 반응을 통해 피부의 노화를 촉진하고 피부질환을 야기한다[19]. 이러한 산화스트레스에 의한 피부 노화를 완화시키기 위해 항산화 효과가 뛰어난 소재를 화장품에 이용하게 된다. 누에고치에서 뽑아낸 세리신 성분은 화장품 원료나 의료용으로써 여러 분야에 이

용 되고 있다[16, 12]. 또한 세리신 성분이 항산화 효과[13]가 있다는 연구결과가 제시되었고, 다양한 누에 고치 종류를 이용하여 어떠한 종류가 더 효과적인지 비교하는 실험들이 보고되었다[15]. 그러나 세리신은 기존의 정제 방법에 따라 추출량의 차이가 발생하였고, 용해성이 좋지 않아 화장품에 사용 시 적합한 항산화 효과를 기대하기 곤란하였다. 따라서 세리신은 모발 보습 관리용 또는 피부 보습 화장품으로 주로 이용되어졌고, 항노화 연구 분야에서는 깊이 있는 연구가 진행되지 못하였다. 최근에 저자들은 세리신잠 실샘에서 수용성 세리신을 효율적으로 추출해내는 정제 방법을 개발하였으며, 본 논문에서는 추출한 SJGH를 이용하여 항산화 효과와 노화 억제에 어느 정도의 효능을 가지고 있는지 조사하였다.

SJGH의 세포 독성을 알아본 결과, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 독성을 보이지 않았다. 오히려 SJGH 처리 농도별로 세포의 수가 증가됨을 볼 때, SJGH가 섬유아세포의 증식에 도움을 준다는 것을 확인할 수 있었다.

섬유아세포에 산화스트레스를 유도하기 위해 과산화수소를 각 50 ~ 500 μM 로 6 h 처리 후, 광학 현미경으로 관찰한 결과, 300 μM 부터 약간의 사멸 세포가 보이기 시작하였고, 400 μM 이상에서는 80% 이상의 세포사멸이 관찰되었다. 이후 세포 사멸을 유도하지 않는 농도와 강한 세포 독성을 보이는 농도로 200 μM 과 500 μM 의 과산화수소 하에서 SJGH의 영향을 검토하였다.

고농도의 과산화수소 하에서 SJGH의 세포 내 산화손상에 대한 보호 효과를 검토한 결과, 과산화수소 처리군의 세포 생존율이 비 처리군 대비 40%까지 감소하였고, SJGH 전처리 군에서는 농도 의존적으로 과산화수소의 영향에 반하여 세포의 수가 다시 증가함을 볼 수 있었다. 이와 같은 실험결과로 SJGH가 산화손상을 효과적으로 보호함을 확인하였고, 이를 통해 세포 내 활성산소종의 생성량에서도 이와 비슷한 양상을 보일 것이라 유추되었다. DCFDA 실험 결과, 과산화수소가 없을 때는 SJGH가 ROS 생성량에는 영향을 주지 않았다. 이는 자연적인 환경에서는 SJGH가 ROS 생성에 영향을 주지 않는 것을 의미한다. 반면에 과산화수소 처리 하에서는 ROS가 크게 증가하였고, SJGH의 전처리 군에서는 세포 내 ROS 생성 증가가 억제되는 경향을 확인하였다. 아마도 본 실험에서 사용한 추

출물의 농도(10 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)보다 높은 농도에서는 더 강한 보호 효과가 있을 것으로 예상된다. 앞의 실험들은 고농도의 과산화수소에서 산화손상에 의한 SJGH의 보호효과가 있음을 확인하였고, 다음 실험으로는 세포의 사멸에 크게 영향을 주지 않는 저 농도(100 ~ 200 μM)의 과산화수소 처리 하에서 SJGH가 진피 노화에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 조사하였다.

노화 세포의 중요한 특징으로 세포 분열 정지와 세포의 형태가 넓고 평평해지는 형태 변화와 함께, 노화 세포에 특이적인 SA- β -GAL의 발현을 들 수 있다[20]. SA- β -GAL 활성은 주로 세포 노화의 지표로써 사용된다[21]. 섬유아세포 내에 SA- β -GAL의 활성이 증가되면 세포 내 단당체 구조에 포함된 β -galactoside가 가수 분해되어 절단된 상태로 존재하게 된다, 염색을 통해 절단된 β -galactoside 부분은 청색으로 발현되어진다. 본 실험 결과 과산화수소 처리에 의해 섬유아세포의 SA- β -GAL 발현이 증가하였다. 이는 세포가 낮은 수준의 산화스트레스를 지속적으로 받을 경우에도 노화와 관련된 반응이 촉진될 수 있음을 보여주는 결과로 보인다. 또한 SJGH 전처리 시 과산화수소에 의한 SA- β -GAL의 증가를 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였고, 이를 통해 SJGH는 산화 손상에 의한 세포 노화 방지 효과가 있음을 확인하였다.

사람의 진피 조직의 성질은 섬유아세포의 활성에 의존적이며, 콜라겐 I은 피부의 장력과 탄력성을 유지하는데 중요한 역할을 한다[22]. 진피 내에서의 콜라겐 I의 감소와 분해는 광노화와 일반 노화의 두드러진 특징이며[23], 이러한 특징은 상처 치유를 지연시키고 진피 내 탄력성의 상실을 가져오게 된다. 그러므로 콜라겐 I의 전구체인 프로콜라겐 I의 발현이 증가하면 피부의 처짐과 주름 형성과 같은 피부의 노화를 지연시키는데 도움을 줄 수 있을 것이다[24]. 세포에 과산화수소를 처리한 경우, 프로콜라겐의 합성량이 현저히 감소하였지만, SJGH 전처리 군에서는 프로콜라겐의 합성량이 농도 의존적으로 회복됨을 PICP assay와 western blot을 통해 확인하였다. 이와 같은 결과는 진피 세포의 산화스트레스로 인하여 새로운 콜라겐 합성이 감소하는 것을 SJGH가 효과적으로 보호함을 알 수 있었고, 이는 SJGH가 진피 노화를 개선할 수 있는 가능성을 보여준다.

진피 내 섬유아세포가 광노화 등의 산화 손상에 노

출되면 활성산소종이 과잉 생성된다. 생성된 활성산소종은 MAP (Mitogen-Activated Protein) Kinase signal의 활성을 유도하며, MAP kinase 신호전달 통해 AP-1 (Activation Protein-1)이 활성화되어, 콜라겐 분해 효소인 MMP-1의 발현을 촉진시키게 된다[18]. MMPs은 염증, 피부노화와 관련하여 다양한 파괴 과정에 관여하는 기질분해 효소이다. MMPs에는 20가지 이상의 다른 종류가 존재하는데, 이중 MMP-1은 섬유아세포에서 분비되는 효소이다. 진피 내 섬유아세포에서 MMP-1은 산화스트레스를 통해 콜라겐의 분해를 촉진시키게 된다[23,25]. 본 실험에서 과산화수소 처리에 의해 MMP-1이 증가하였고, SJGH 전처리 시 산화손상에 의한 MMP-1의 발현 증가를 농도 의존적으로 억제하는 양상을 확인하였다. 즉, SJGH는 세포 기질의 분해를 막아 노화를 억제시킬 수 있을 것으로 기대된다. 이와 같이 SJGH의 진피에서 콜라겐의 합성 증가와 더불어 MMP-1의 발현을 억제시키는 작용을 통해 피부의 주름 생성을 억제하는 효과가 있을 것으로 기대된다.

이상의 결과에 의해 SJGH가 과산화수소에 의한 산화 손상으로부터 진피 섬유아세포를 보호하고, 노화에 수반되는 반응들을 억제하는 효과가 우수함을 확인하였다. 결과를 종합하여 보면 SJGH는 노화현상을 개선하는 우수한 화장품 소재로써 활용될 수 있음을 보여준다.

감사의 글

본 과제는 경기도 기술 개발 사업의 사업비 지원(과제번호: C10112410)에 의해 수행되었습니다.

참고 문헌

1. M. D. West, The cellular and molecular biology of skin aging, *Arch Dermatol.*, **130**(1), 87 (1994).
2. S. Mukherjee, A. Date, V. Patravale, H. C. Korting, A. Roeder, and G. Weindl, Retinoids in the treatment of skin aging: An overview of clinical efficacy and safety, *Clin Interv Aging*, **1**(4), 327 (2006).
3. S. Saffarian, I. E. Collier, B. L. Marmer, E. L. Elson, and G. Goldberg, Interstitial collagenase is a brownian ratchet driven by proteolysis of collagen, *Science*, **306**(5693), 108 (2004).
4. L. Rittie and G. J. Fisher, UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Ageing Res Rev.*, **1**(4), 705 (2002).
5. H. Fujimori, M. Hisama, H. S. hibayama, and M. Iwaki, Protecting effect of phytoncide solution, on normal human dermal fibroblasts against reactive oxygen species, *J. Oleo. Sci.*, **58**(8), 429 (2009).
6. T. Polte and R. M. Tyrrell, Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression, *Free Radic Biol. Med.*, **36**(12), 1566 (2004).
7. H. S. Talwar, C. E. Griffiths, G. J. Fisher, T. A. Hamilton, and J. J. Voorhees, Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin, *J. Invest. Dermatol.*, **105**(2), 285 (1995).
8. J. C. Fantone and P. A. Ward, Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions, *Am. J. Pathol.*, **107**(3), 395 (1982).
9. D. Harman, Aging : A theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol.*, **11**(3), 298 (1956).
10. C. I. Nobel, M. Kimland, B. Lind, S. Orrenius, and A. F. Slater, Dithiocarbamates induce apoptosis in thymocytes by raising the intracellular level of redox-active copper, *J. Biol. Chem.*, **270**(44), 26202 (1995).
11. K. Schindowski, S. Leutner, S. Kressmann, A. Eckert, and W. E. Muller, Age-related increase of oxidative stress-induced apoptosis in mice prevention by ginkgo biloba extract (EGb761), *J. Neural. Transm.*, **108**(8-9), 969 (2001).
12. X. Zhang, M. Tsukada, H. Morikawa, K. Aojima, G. Zhang, and M. Miura, Production of silk sericin/silk fibroin blend nanofibers. *Nanoscale Res. Lett.*, **6**, 510 (2011).
13. R. Dash, C. Acharya C, P. C. Bindu, and S. C. Kundu, Antioxidant potential of Silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced stress in skin fibroblast. *BMB Rep.*, **41**(3), 236 (2008).

14. Y. Q. Zhang, Applications of natural silk protein sericin in biomaterials, *Biotechnol. Adv.*, **20**(2), 91 (2002).
15. A. Manosroi, K. Boonpisuttinant, S. Winitchai, W. Manosroi, and J. Manosroi, Free radical scavenging and tyrosinase inhibition activity of oils and sericin extracted from thai native silkworms (*bombyx mori*), *Pharm. Biol.*, **48**(8), 855 (2010).
16. S. Nayak, S. Talukdar, and S. C. Kundu, Potential of 2D cross linked sericin membranes with improved bio stability for skin tissue engineering, *Cell Tissue Res.*, **347**(3), 783 (2012).
17. P. D. Kang, B. H. Sohn, S. U. Lee, M. J. Kim, I. Y. Jung, Y. S. Kim, Y. D. Kim, and H. S. Lee, Breeding of a New Silkworm Variety, Kumhwangjam, with a Sex-Limited Cocoon Color for Spring Rearing Season, *Int. J. Indust. Entomol.*, **9**(1), 89 (2004).
18. H. J. lim and D. Y. Yoo, Effect of danchisoyo-san on UVB-induced cell damage and gene expression in dermal fibroblast, *J. Orient Cynecol.*, **24**(2), 013 (2011).
19. K. A. Kang, S. w. Chae, and R. Zhang, Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation, *J. Cell Biochem.*, **97**, 609 (2006).
20. I. P. Trougakos, A. Saridak, G. Panayotou, and E. S. Gonos, Identificaton of differentially expressed proteins in senescent human embryonic fibro-blast, *Mech Ageing Dev.*, **127**(1), 88 (2006).
21. Y. Park, J. S. Park, K. A. Cho, D. I. Kim, Y. G. Ko, and J. S. Seo, up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in senescent cells, *J. Biol. Chem.*, **275**(27), 20847 (2000).
22. G. P. Dimri, X. Lee, X. Basile, M. Acosta, G. Scott, and G. A. Roskelley, A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**(20), 9363 (1995).
23. G. J. Fisher, T. Quan, T. Purohit, Y. Shao, M. K. Cho, J. Varani, S. Kang, and J. J. Voorhees, Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. *Am. J. Pathol.*, **174**(1), 101 (2009).
24. T. Naoko, T. N. Kentaro, I. Seiko, T. Azusa, and A. Mitsugu, Cinnamon Extract Promotes Type I Collagen Biosynthesis via Activation of IGF-I Signaling in Human Dermal Fibroblasts, *J. Agric. Food Chem.*, **60**(5), 1193 (2012).
25. H. J. Shin, S. N. Kim, J. K. Kim, B. G. Lee, and I. S. Chang, Effect of green tea catechins on the expression and activity of mmps and type 1 procollagen synthesis in human dermal fibroblasts, *Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**(2), 117 (2006).