

DHA 유도체를 이용한 항염, 항노화, 피부장벽 강화용 화장품 원료의 개발

이 미 영[†] · 이 길 용 · 서 진 영 · 이 경 민 · 이 우 정 · 조 희 원 · 이 종 재* · 서 정 우 · 최 헌 식

코오롱 인더스트리(주) 헬스케어연구소

*한국생명공학연구원

(2020년 12월 23일 접수, 2021년 2월 19일 수정, 2021년 3월 17일 채택)

Development of a Cosmetic Ingredient Containing DHA Derivatives for Anti-inflammation, Anti-wrinkle, and Improvement of Skin Barrier Function

Miyoung Lee[†], Gil-Yong Lee, Jinyoung Suh, Kyung min Lee, Woojung Lee,
Hee Won Cho, Jong-Jae Yi*, Jeong-Woo Seo*, and Heonsik Choi

Healthcare Technology Institute, Kolon Advanced Research Center, 110 Magokdong-ro, Seoul 07793, Korea

*Microbial Biotechnology Research Center

(Received December 23, 2020; Revised February 19, 2021; Accepted March 17, 2021)

요 약: 피부 염증은 흉터, 노화 뿐만 아니라 아토피와 같은 질환으로 발전할 수 있어 이를 조절하는 것이 매우 중요하다. 본 연구에서는 최근 인체에서 염증을 조절하는 것으로 알려진 specialized pro-resolving mediators (SPMs)의 *in vitro* 합성과 화장품 적용 가능성을 확인하였다. 대두의 lipoxygenase를 이용하여 mono 또는 di-hydroxy docosahexaenoic acid가 혼합된 시료 S-SPMs를 제작하였고 효능 평가에 이용하였다. 먼저, UVB로 염증을 유도한 세포에서 TNF- α 와 IL-6의 발현이 S-SPMs에 의해 감소하고, 미세먼지에 의해 유도된 nitric oxide (NO)의 생성 역시 감소하는 것을 확인하여 S-SPMs의 항염 효능을 확인하였다. 또한, S-SPMs을 처리한 조건에서 malondialdehyde (MDA) 생성이 감소하여 지질 과산화 억제능이 있음을 확인하였고 S-SPMs에 의한 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 발현 감소, procollagen type I의 함량 증가를 통해 collagen 분해를 억제하고 반대로 합성은 촉진함을 확인하였다. 끝으로 filaggrin과 loricrin의 발현이 S-SPMs에 의해 증가한 것을 확인하여 피부 장벽 강화 효능을 확인하였다. 위 결과를 토대로 S-SPMs은 피부의 염증 억제와 함께 손상 회복, 주름개선 및 장벽 강화를 위한 소재로 활용 가능성을 확인하였다.

Abstract: It is very important to control the inflammation of the skin because it can develop into diseases such as atopy as well as scarring and aging. In this work, we recently identified the *in vitro* synthesis of specialized pro-resolving mediators (SPMs) known to control inflammation in the human body and the applicability of cosmetics. Using recombinant protein of lipoxygenase from *Glycine max*, we succeeded to prepare mixtures of mono- or di-hydroxy DHA named as S-SPMs and used them for *in vitro* efficacy test. To investigate anti-inflammatory effect of S-SPMs, mRNA level of TNF- α and IL-6 were analyzed. Under UVB exposed condition, expression of both were decreased by S-SPMs treatment. And we observed reduced production of nitric oxide (NO) by S-SPMs application under the condition with diesel particulate matter (DPM). At the same experimental condition, malondialdehyde (MDA) production was decreased by S-SPMs, indicating the inhibitory effect of S-SPMs in lipid peroxidation. In addition, S-SPMs treatment resulted in reduction of matrix metalloproteinases-1 (MMP-1) expression and elevation of procollagen type I synthesis. Together with this, mRNA level of filaggrin and loricrin

[†] 주 저자 (e-mail: miyoung_lee@kolon.com)
call: 02-2199-1142

were increased by S-SPMs, indicating enhancement of skin barrier function. These results demonstrate that S-SPMs is a good candidate to develop as a cosmetic ingredient for anti-inflammation, anti-wrinkle, and improvement of skin barrier function.

Keywords: specialized pro-resolving mediators, lipoxygenase, anti-inflammation, anti-wrinkle, skin barrier

1. 서 론

염증이란 인체 조직이 병원균, 오염원 및 물리적 자극과 같은 다양한 외부 자극으로부터 손상된 조직을 회복하고 유해인자를 제거하기 위한 생체 방어 기전이다. 외부의 침입에 즉각적으로 반응하여 나타나는 급성 염증반응(acute inflammation)은 염증 유발 원인을 해결한 뒤에 빠른 속도로 해소(resolution)된 후 항상성(homeostasis)을 유지하는 방향으로 진행되어야 하는데 그렇지 못한 경우 심혈관질환, 골관절염, 천식 등 다양한 만성 염증(chronic inflammation) 질환으로 진전되게 된다[1,2]. 급성 염증 반응은 cytokine, prostaglandin, leukotrien 등과 같은 염증 물질들에 의해 시작되는 것으로 알려져 있으며 이를 억제하는 항염증 물질들이 개발되어왔다. 최근 염증종결인자(specialized pro-resolving mediators: SPMs)라고 하는 지질 매개체가 염증을 해소 과정에 관련되어 있음이 밝혀져 새로운 항염증 물질로의 관심이 높아지고 있다. SPMs은 ω -6 지방산인 arachidonic acid (AA)로부터 유래된 lipoxin, 그리고 ω -3 지방산인 eicosapentaenoic acid (EPA)와 docosahexaenoic acid (DHA)로부터 유래된 resolvin, protectin, maresin 등이 대표적이며 cyclooxygenase (COX), lipoxygenase (LOX), cytochrome P450

(CYP450)과 같은 효소에 의해 다양한 형태로 생성된다(Figure 1)[1,2].

피부는 인체의 최외각층을 둘러싸고 있는 기관으로 자외선, 화학물질, 미세먼지와 같은 오염물질 등 다양한 자극에 끊임없이 노출되어 있으며 이로부터 유발되는 염증 반응을 적절히 해소하는 것이 매우 중요하다. 피부에서의 염증반응은 그 자체로 끝나는 것이 아니라 염증 노화(inflammaging)라는 피부 노화를 초래한다는 연구 결과가 발표되고 있다. 자외선과 같은 자극원에 의한 산화적 스트레스는 지질의 과산화는 물론 세포를 죽이게 되어 염증반응을 유발하고 cytokine, 대식세포에 의해 촉진된 matrix metalloproteinases (MMPs)의 분비는 collagen과 extra cellular matrix (ECM)을 분해시켜 결국은 진피층을 손상시키면서 피부 노화를 가속화 시킨다[3]. 노화 뿐만 아니라 만성 염증 질환으로 잘 알려진 아토피성 피부염의 경우, 삶의 질을 크게 떨어뜨린다. 따라서 피부에서 염증반응을 조절할 수 있는 물질은 그 의미가 크다. 피부에서 SPMs에 대한 연구는 대표적인 피부 만성질환인 아토피에 대해 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) 로 유도한 쥐의 피부 병적(skin lesion)이 resolvin E1의 처리로 감소하며 이것이 IL-4 과 IFN- γ 의 발현 감소와 연결되어 있다는 연구가 있으나

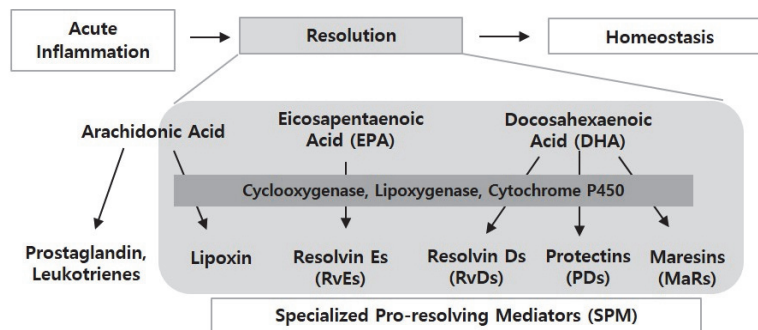


Figure 1. Control of inflammatory response and kinds of specialized pro-resolving mediators (SPMs). Inflammation includes acute inflammation, resolution and homeostasis. During the resolution stage, poly unsaturated fatty acids such as arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are used as precursors to produce SPMs by three different enzymes including cyclooxygenase, lipoxygenase, and cytochrome p450.

그 외의 연구는 미미한 실정이다[4].

본 연구에서는 인체 내에서 신호전달물질로 극미량으로만 합성되는 SPMs의 생산 및 피부 염증 반응 조절과 그 이후의 피부 재생, 피부 장벽 강화 등에 미치는 효과에 대해 조사하여 SPMs의 *in vitro*에서의 생산 가능성 및 화장품 소재로의 개발 가능성을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. DHA 유도체의 제조

2.1.1 유전자 서열 합성 및 클로닝

DHA 유도체 생산을 위한 lipoxygenase (LOX) 유전자는 대두(*Glycine max*) 유래의 유전자(Genbank accession number: AAA96817.1)이며 soybean에서 유래되었다는 의미에서 sLOX라 명명하여 사용하였다. 유전자의 서열은 대장균을 이용한 단백질 발현에 적합한 코돈으로 치환하여 합성하였고 (Bioneer, Korea), sLOX 유전자를 주형으로 중합 효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. 중합 효소는 Bioneer사의 Top DNA polymerase (Accupower PCR premix)를 사용하였으며 Table 1에 기술된 프라이머를 첨가하여 94 °C 5 min, [94 °C 30 s, 61 °C 30 s, 72 °C 2 min] X 20 회, 72 °C 5 min PCR을 수행하여 증폭하였다. 1.5% 아가로스 젤에 PCR 산물을 전기영동하여 확인하였으며, QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 증폭한 유전자를 정제하였다. 증폭된 유전자와 대장균 내 발현을 위한 플라스미드 pET-28a(+) (Novagen, USA)를 제한 효소 NdeI과 XhoI (New England Biolabs, USA)을 이용하여 절단하였으며, T4 DNA ligase (Takara, USA)를 이용

하여 접합하였다. 플라스미드에 삽입된 유전자 서열은 DNA sequencing 분석을 통해 서열에 오류가 없음을 확인하였다(Solgent, Korea).

2.1.2. LOX 단백질 발현 및 정제

sLOX 유전자 서열이 삽입된 pET-28a(+)를 이용하여 단백질 발현용 숙주인 대장균 BL21 (DE3) (Novagen, USA)를 열 충격 법을 통해 형질 전환하였다. 형질 전환체는 kanamycin이 포함되어있는 3 mL의 Luria-Bertani (LB) 배지에서 흡광도(O.D. 600 nm) 값이 2.0에 도달할 때까지 37 °C에서 배양한 후 500 mL의 LB 배지에 계대 하였다. 배양액의 흡광도 값이 약 0.6이 되었을 때 isopropyl-1-thiol-β-D-galactopyranoside (IPTG)를 1 mM이 되도록 첨가하고 20 °C로 낮춘 배양 조건에서 단백질의 과발현을 유도하였으며, 흡광도 값이 2.5 - 3.0에 도달할 때까지 연속 배양하였다. 단백질의 발현이 완료된 형질 전환 세포는 4,000 rpm으로 10 min 간 원심 분리하여 배양액으로부터 분리되었으며, 세포의 흡광도 값이 10.0이 되도록 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충액을 첨가하여 현탁 하였다. 초음파 분산기(Sonics 700W, Sonics, USA)를 이용해 세포를 파쇄한 후 13,000 rpm으로 30 min 간 원심분리하여 세포 잔해물을 제거하였다. 완충액에 용해 되어있는 단백질은 SDS-PAGE 분석을 통해 확인 하였으며, sLOX 효소의 예상 분자량 약 96.9 kDa의 위치에서 뚜렷한 발현 양상을 확인 하였다. 발현 된 효소는 Ni-NTA 컬럼(HisTrap, GE Healthcare, USA)을 이용한 흡착 크로마토그래피를 통해 분리 및 정제되었으며 효소 반응을 위해 사용되었다.

2.1.3. DHA 유도체의 제조 및 분리

50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 100 μM DHA와 정제 효소 sLOX (10 KU/mL)를 첨가하여 실온에서 30 min 동안 반응 하였다. 최종 농도가 20 mM이 되도록 1 M의 수소화붕소나트륨(sodium borohydride)을 반응액에 첨가하여 반응 산물을 15 min 동안 환원시킨 뒤, 5 μL/mL의 아세트산을 첨가하여 반응을 종료시켰다. 고체상 카트리지 (SPE, C18 500 mg)를 이용하여 반응 산물을 정제한 뒤, 순상 high performance liquid chromatography (HPLC) 를 이용하여 상기 반응 생성물 내의 화합물의 종류를 분석하였다. 상기 순상 HPLC 분석은 supelcosil LC-Diol 컬럼(Supelco, 25 cm X 3 mm, 5 μm)에, 95% n-헵탄, 5% 이소프로판올, 0.1% 아세트산, 0.1% 2,2-디메톡시프로판으로 구성된 이동

Table 1. Primers and Their Sequence Used in This Study

Primer	Sequence (5'to 3')
sLOX-F	CATATGATGTTTGGCATCTTCGACAAGG
sLOX-R	CTCGAGTTAGATAGATACTGTTCGGGATCCCC
TNFα-F	CATTCTGGGAGGGGTCTTCC
TNFα-R	GGTTGAGGGTGTCTGAAGGA
IL-6-F	ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC
IL-6-R	GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG
Filaggrin-F	AGTGCACTCAGGGGGCTCACA
Filaggrin-R	CCGGCTTGGCCGTAATGTGT
Loricrin-F	CACTGGGGTGGGAGGTAGT
Loricrin-R	GCTCTCATGATGCTACCCGA

상을 유량 0.5 mL/min의 속도로, 40 min 동안 20 mL 전개 하였으며, diode array detector (DAD)를 이용하여 237 nm, 242 nm, 270 nm 에서 반응 산물 내의 화합물을 최종적으로 검출하는 방법으로 수행되었다.

2.2. 세포 배양 및 효능 확인

2.2.1. 시료 제조

각 시료는 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 이용하여 용해 시킨 뒤 사용 농도 별로 제조하여 각 세포에 처리하여 진행하였다. 미세먼지(diesel particulate matter)는 미국국립표준기술연구소(national institute of standards and technology, NIST; Gaithersburg, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2.2. 항염증 실험

세포 독성 실험을 위하여 인간 각질형성세포(human keratinocytes; HaCaT cells)를 48 well plate 4 X 10⁴ 개/well로 분주하고 5% CO₂, 37 °C에서 24 h 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 DMEM serum free media로 기아 상태를 24 h 동안 유지하였다. 그 후 S-SPMs을 serum이 포함된 배지에 각각 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5 및 10 ppm의 농도로 처리하여 세포의 생존율(cell viability)을 확인하였다. 세포 독성 평가 결과는 항염증 효능 확인을 위해 적정농도를 설정하는데 참고하였다. 항염증 실험을 위해 각질형성세포를 세포 독성 실험과 같은 조건에서 배양한 후 DMEM serum free media로 기아 상태를 24 h 동안 유지하였다. Tumor necrosis factor (TNF)-α 또는 IL (interleukin)-6 발현 확인을 위해 배지를 250 μL의 DPBS (Gibco, USA)로 교환하고 20 mJ/cm²의 UVB를 조사 후 S-SPMs을 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 그 후 수득한 세포는 RNA를 추출하여 Table 1에 기술된 primer를 이용하여 RT-PCR을 진행하였다. 증폭된 유전자는 gel documentation system (Gel Doc EZ system, Bio-Rad, USA)을 이용하여 분석하였다. 아무 것도 처리하지 않은 경우를 음성 대조군으로, 그리고 10 μM hydrocortisone을 처리한 경우를 양성 대조군으로 하여 S-SPMs의 효과를 확인하였다.

2.2.3. Nitric Oxide 생성량 확인

인간 각질형성세포(HaCaT cells)를 24 well plate에 8 X 10⁴ 개/well로 배양 한 후 200 μg/mL 농도로 미세먼지를 처리하고 S-SPMs을 각각 0.1, 1, 2, 5 ppm의 농도로 처리한 다음 24 h 동안 배양하였다. 이후 세포 배양 상등액

100 μL 와 griess reagent system (Invitrogen, G-7921, USA)을 사용하여 10 min 동안 상온에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포로부터 생성된 nitric oxide (NO)의 양을 sodium nitrite (NaNO₂)의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다. 이때, 아무 것도 처리하지 않은 경우를 음성 대조군으로, 그리고 10 μM hydrocortisone과 500 ppm의 vitamin C를 처리한 경우를 양성 대조군으로 하여 S-SPMs의 효과를 확인하였다.

2.2.4. 지질과산화물 생성량 확인

인간 각질형성세포(HaCaT cells)를 배양한 다음 미세먼지를 처리하고 S-SPMs을 각각 0.1, 1, 2, 5 ppm의 농도로 처리한 다음 24 h 동안 배양하였다. 지질과산화물(malondialdehyde, MDA) 측정을 위해 1X butylated hydroxyanisole (BHT)가 포함된 phosphate-buffered saline (PBS)에 세포를 모으고 sonication/homogenization으로 cell을 파쇄한 다음, 원심분리하여 상층액을 확보하였다. 상층액과 thiobarbituric acid (TBA)를 반응시켜 만들어진 MDA-TBA adduct에 대한 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. 세포로부터 생성된 MDA의 양을 농도별 표준곡선을 이용하여 비교/확인하였다 (DoGenbio, DG-TBA200, Korea).

2.2.5. MMP-1 발현량 확인

인간 섬유아세포(human dermal fibroblast)를 48 well plate에 4 x 10⁴ 개/well로 배양한 후 24 h 동안 배양하였다. 배지를 제거 후 세포를 기아 상태로 24 h 유지한 뒤 250 μL/well의 DPBS (WelGENE, Korea)로 교환하고 100 mJ/cm²의 UVB를 조사하였다. S-SPMs의 효과 확인을 위해 DMEM (2% FBS)을 이용하여 적정 농도로 희석된 S-SPMs을 처리하여 48 h 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 수거한 뒤 human total MMP-1 ELISA kit (R&D systems, USA)를 사용하여 matrix metalloproteinases-1 (MMP-1) 양을 측정하였다. 이때, 아무 것도 처리하지 않은 경우를 음성 대조군으로, 20 μM의 retinoic acid을 처리한 경우를 양성 대조군으로 사용하였다.

2.2.6. Procollagen Type I 합성능 평가

Procollagen type I 합성능을 평가하기 위해 사용된 세포주는 인간 섬유아세포 이며 media 106 배양 배지를 이용하여 48 well plate에 4 X 10⁴ 개/well로 배양한 후 24 h 동안 배양하였다. 그 후, 세포를 기아 상태로 24 h 유지한 뒤,

S-SPMs을 각각 0.01, 0.1 및 1 ppm의 농도 별로 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 수거하여 procollagen type I c-peptide (PIP) EIA kit (Takara, Japan)를 사용하여 procollagen type I 양을 측정하였다. 이때, 아무 것도 처리하지 않은 경우를 음성 대조군으로, 50 μ M retinyl palmitate을 처리한 경우를 양성 대조군으로 사용하였다.

2.2.7. 피부장벽개선능

피부 장벽 개선능과 관련된 유전자 발현 확인을 위해 인간 각질형성세포를 2.2.2에 기술된 것과 같이 배양하였다. DMEM (FBS 2%)을 이용하여 희석된 S-SPMs을 배지가 제거된 인간 각질형성세포에 1 h 동안 처리 후 배양한 뒤 RNA를 추출하여 Table 1에 기술된 primer를 이용하여 RT-PCR을 진행하였다. 증폭된 유전자는 gel documentation system을 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 재조합 Lipoygenase의 발현 및 S-SPMs의 합성

인간의 몸에서 합성되는 DHA 유도체의 합성을 위해서 인간(*Homo sapiens*)의 lipoxyganase (LOX) 3 종(accession number: AAA36183.1, AAA51533.1, AAA36182.1)과 cyclooxygenase (COX) 1종(accession number: AAA35803.1), 그리고 대두(*G. max*)의 LOX 9 종(Accession number: AAA33986.1, AAA33987.1, CAA30016.1, CAA39604.1, BAA03101.1, AAA96817.1, AAC49159.1, ABS32275.1, ABS32276.1)을 각각 대장균 발현용 벡터에 클로닝 하여 단백질 발현을 확인하였다. 대두의 LOX는

DHA 유도체 합성을 위해 성공적으로 사용된 선행 문헌을 바탕으로 선택되었다[5,6]. 인간에서 유래된 4 종의 유전자는 대장균에서의 발현이 되지 않았다. 그러나 대두 9 종의 LOX 효소 활성을 확인한 결과 CAA39604.1이 가장 좋은 효소 활성을 보이는 것을 확인하여 sLOX라 명명하고 그 이후의 실험에 사용하였다. IPTG의 처리로 유도한 sLOX 단백질이 대장균의 가용성 부분에서 96.8 kDa의 예상된 크기로 발현이 되는 것을 확인하였고 파쇄한 대장균의 가용성 부분은 흡착 크로마토 그래피를 통해 sLOX 단백질의 분리와 정제를 진행 후 효소 반응에 사용하였다(Figure 2A). SPMs의 생성을 위해 전구물질인 100 μ M DHA를 분리된 sLOX와 반응시킨 후 분리 정제 하였을 때 3 종류의 mono 또는 di-hydroxy DHA인 17S-hydroxyDHA, 7S, 17S-dihydroxyDHA (Resolvin D5) 및 10S, 17S-dihydroxy DHA (Protectin DX)의 혼합물을 확인할 수 있었으며 함량은 각각 1.03 mg, 2.43 mg, 0.66 mg으로 이 비율의 SPMs 혼합물(S-SPMs)을 추후 실험에 사용하였다(Figure 2B).

3.2. 항염 및 세포 손상 억제 효과

S-SPMs의 효능 실험을 진행하기에 앞서 세포 독성을 확인하기 위하여 인간 각질형성세포와 섬유아세포에 대한 세포 독성 테스트를 진행하였다. S-SPMs은 농도 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 5 ppm으로 준비하여 처리하였고 실험한 모든 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 나타내어 이 농도 구간에서 효능 실험을 진행하였다. 더 높은 농도의 S-SPMs의 세포 독성을 확인하기 위해 인간각질형성세포에 10 ppm의 S-SPMs을 처리하였을 때 95.1%의 세포 생존율을 확인하여 10 ppm까지는 세포 독성이 없음을 확인하였다

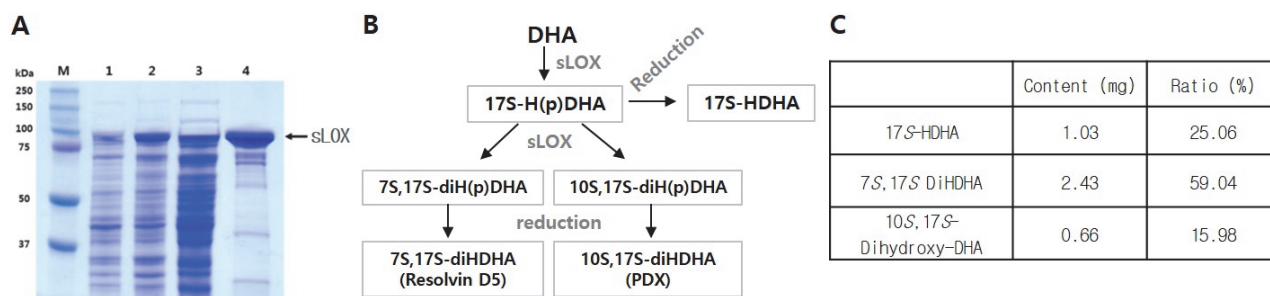
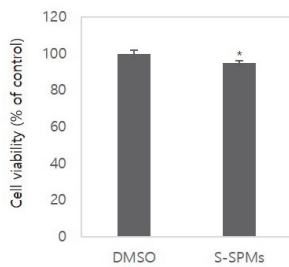


Figure 2. *In vitro* production of SPMs from docosahexaenoic acid (DHA). (A) Expression of recombinant lipoygenase (LOX) in *E. coli* system. LOX sequence of *Glycine max* (sLOX) was used in this study. (B) Predicted schematic diagram of SPMs produced by recombinant sLOX. DHA was supplied as a substrate. (C) Constituent and ratio of SPMs prepared *in vitro* enzyme reaction. Three kinds of SPMs constituents including 17S-HDHA, 7S,17S-diHDHA, and 10S,17S-diHDHA were produced. Content and ratio of these components were indicated in (C). M: Molecular size marker, 1: After induction, 2: Soluble fraction, 3: Insoluble fraction, 4: Purified sLOX.

(Supplementary Figure 1).

항염 효능을 확인하기 위하여 피부 염증을 유발하는 대표적 자극 인자인 자외선을 자극원으로 하여 염증성 cytokine인 TNF- α 과 IL-6의 발현을 확인하였다[7,8]. S-SPMs의 효능을 확인하기 위해 먼저 세포에 자외선을 조사하여 TNF- α 의 발현을 유도하였다. 자외선 처리와 함께 S-SPMs을 처리하지 않은 TNF- α 의 발현 수치를 대조군으로 하고 양성대조군으로 사용한 10 μ M hydrocortisone을 처리한 샘플에서 TNF- α 의 발현이 대조군 수치 대비 59.8%가 감소하는 것을 확인하였다. S-SPMs을 0.1 - 5 ppm 농도로 처리한 실험군에서의 발현은 대조군 수치에 비해 27.2 - 42.8%가 감소한 것을 확인할 수 있었다(Figure 3A). 같은 조건에서 IL-6의 발현을 확인한 결과 자외선 조사에 의해 IL-6의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이렇게 증가된 IL-6의 발현은 양성대조군으로 사용한 10 μ M



Supplementary Figure 1. Cell viability of human keratinocyte treated with 10 ppm of S-SPMs. Human keratinocyte (HaCaT) was incubated with dimethyl sulfoxide (DMSO) as vehicle or 10 ppm of S-SPMs for 24 h, and harvested for the analysis of cell viability. Error bars represent \pm SD. * $p < 0.05$, compared to DMSO.

hydrocortisone을 처리한 샘플에서 대조군 수치 대비 57.2% 만큼 감소하는 것을 확인하였고 0.1 - 5 ppm의 S-SPMs 처리에 의해 대조군 수치에 비해 28.8 - 38.0%가 감소하는 것을 확인하였다(Figure 3B). S-SPMs의 추가 항염 효능을 확인하기 위해 활성산소이자 염증반응을 가속화시키는 것으로 알려진 NO의 생성량에 영향을 주는지 확인하고자 하였다[9]. 또다른 염증 유발인자인 미세먼지를 인간 각질형성세포에 처리하고 양성대조군 또는 S-SPMs를 농도별로 처리한 샘플에서 NO의 생성량을 측정하였다. 그 결과, 양성대조군인 10 μ M hydrocortisone 과 500 ppm vitamin C를 처리한 샘플에서 NO 생성량이 대조군 수치 대비 각각 24.5, 40.7%만큼 감소하였고 S-SPMs를 0.1 - 5 ppm을 처리한 샘플에서는 17.7 - 30.0% 만큼 감소하는 것을 확인하여(Figure 4A), S-SPMs이 다양한 항염 기전에 효과가 있음을 확인하였다.

자외선이나 미세먼지와 같은 다양한 피부 자극은 염증 외에도 활성 산소를 발생시켜 세포의 지질과산화물을 유발하게 된다. 지질과산화는 세포 손상 메커니즘 중의 하나로 노화나 질병의 원인이 되며 지질과산화의 반응 산물인 malondialdehyde (MDA)를 측정하여 세포 손상 정도를 확인할 수 있다[10]. S-SPMs이 지질과산화 억제를 통한 세포 손상 억제 효능을 갖는지 확인하기 위하여 인간각질형성 세포를 미세먼지로 자극하고 MDA의 생성량을 측정하였다. 양성대조군인 10 μ M hydrocortisone과 500 ppm vitamin C를 처리한 샘플에서는 MDA 생성량이 대조군 수치에 비하여 각각 53.3, 58.8%가 감소한 것을 확인하였다. S-SPMs을 0.1 - 5 ppm 처리한 세포에서 MDA의 생성이 대조군 수치 대비 19.0 - 62.7% 만큼 감소한 것을 확인하였다

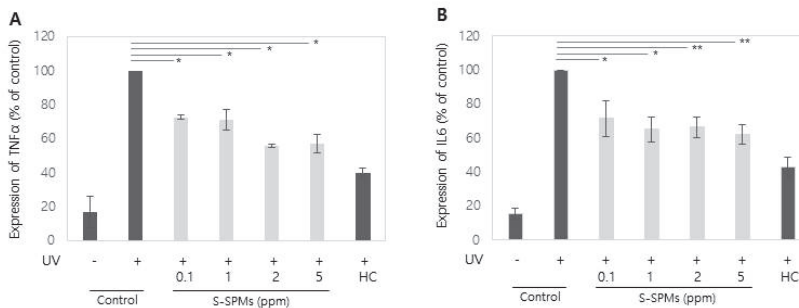


Figure 3. Effects of S-SPMs on the mRNA expression level of TNF- α (A) or IL-6(B) in human keratinocyte. Human keratinocyte (HaCaT) treated with different concentrations of S-SPMs were exposed to UVB for 10 min to induce cell damage. After 1 day recovery, total RNA was extracted and used for RT-PCR. 10 μ M of hydrocortisone (HC) was included as a positive control. Data are expressed as percentages compared to the control value. Error bars represent \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ compared to control (+).

(Figure 4B). 이 결과를 토대로 S-SPMs이 소량으로도 항염 증 및 세포 손상 억제 효과가 있음을 확인하였다.

3.3. 콜라겐 분해효소 억제 및 프로콜라겐 합성 촉진 효과

염증 시작 단계에 분비되는 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)은 MMPs의 발현을 촉진하여 피부노화를 유발시키는 것으로 알려져 있다[11]. MMPs는 단백질 분해 활성을 갖는 효소로, 세포외기질을 구성하는 단백질들을 분해하여 세포외기질을 구성하는 단백질과 세포의 결합에 중요한 영향을 미치게 된다. MMPs는 28 개의 타입으로 존재하는데 collagen 분해에 관여하는 MMP-1의 발현

을 확인해 S-SPMs의 collagen 분해 억제 효능을 평가하고자 하였다. 인간 섬유아세포에 자외선을 처리하였을 때 MMP-1의 단백질 발현이 증가한 것을 확인하였고 이 값을 대조군으로 하여 양성대조군 및 S-SPMs 처리시의 MMP-1의 발현을 비교하였다. 먼저, 자외선을 처리한 인간 섬유아세포에 양성대조군인 20 μ M retinoic acid를 처리하였을 때 MMP-1의 발현이 대조군 수치에 비하여 68.5%가 감소하는 것을 확인하였고 S-SPMs를 0.01 - 1 ppm 처리한 샘플에서는 MMP-1의 발현이 대조군 수치 대비 21.4 - 63.3%만큼 감소하는 것을 확인하였다(Figure 5A).

염증반응은 조직의 파괴를 수반하게 되고 이를 재생하

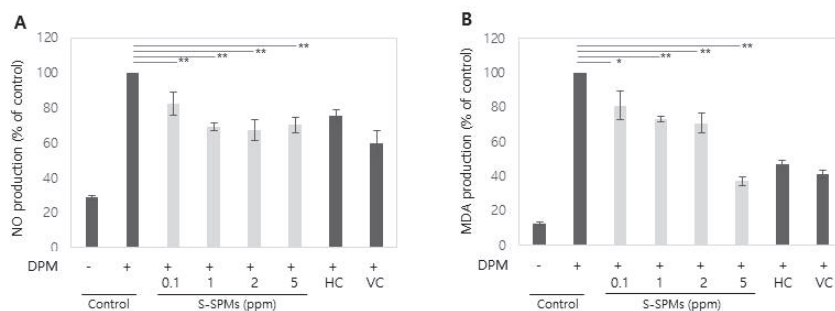


Figure 4. Reduced production of nitric oxide (NO) and maldondialdehyde (MDA) in human keratinocyte. Human keratinocyte (HaCaT) treated with various concentration of S-SPMs were exposed to diesel particulate matter (DPM) to induce cell damage. After 24 h incubation, medium was used for the analysis of nitric oxide concentration, and cells were used for the analysis of MDA, respectively. 10 μ M of hydrocortisone (HC) and 500 ppm of vitamin C (VC) were used as positive controls. Error bars represent \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ compared to control(+).

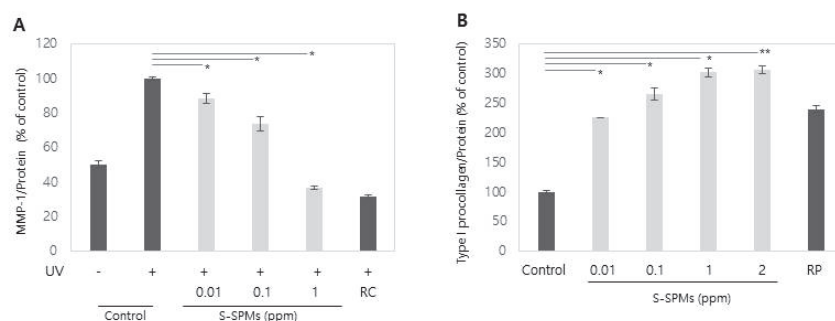


Figure 5. Effects of S-SPMs on collagen degradation and synthesis. Expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-I, A) or content of procollagen type I (B) were analyzed in human dermal fibroblast. To investigate the protein expression level of MMP-I, cells exposed to UVB were treated with S-SPMs. After 48 h incubation, medium were harvested for further analysis. For the analysis of procollagen, human dermal fibroblast treated with various concentrations of S-SPMs was incubated for 24 h, and harvested cell to measure amount of procollagen type I by ELISA. 20 μ M of retinoic acid (RC) and 50 μ M of retinyl palmitate (RP) were used as positive controls, respectively. Error bars represent \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ compared to control (+).

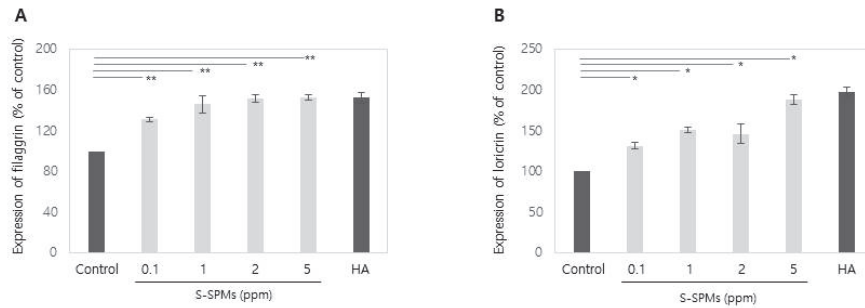


Figure 6. Enhanced expression level of filaggrin (A) and lorincrin (B) in human keratinocyte treated with S-SPMs. Human keratinocyte (HaCat) was incubated with various concentrations of S-SPMs for 24 h, and harvested for the analysis of mRNA level of target genes by RT-PCR. 50 ppm of hyaluronic acid (HA) was included as a positive control. Error bars represent \pm SD. * p < 0.05, ** p < 0.001 compared to control.

는 과정에 다양한 기질 단백질의 합성이 수반되어야 한다. 세포 외 기질의 주요 구성성분인 collagen은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질단백질로 세포 내에서 procollagen으로 합성된 후 세포 외로 분비되어 collagen 섬유로 중합하게 되는데 이러한 procollagen의 양을 측정함으로써 세포 내에서의 collagen 생합성 정도를 파악할 수 있다[12]. collagen은 피부 탄력과 보습을 높이는 작용으로 잘 알려져 있기에 S-SPMs의 피부 재생 및 주름개선 효과를 확인하기 위해 인간 섬유아세포에 S-SPMs을 처리한 후 procollagen type I의 합성량을 확인하였다. 양성대조군으로 사용한 50 μ M retinyl palmitate에서 procollagen type I의 합성이 대조군 대비 2.4 배 증가한 반면 S-SPMs를 0.01 - 2 ppm 처리한 경우에는 대조군 대비 2.25 - 3.07 배 증가함을 확인하였다(Figure 5B). 이 결과를 토대로 S-SPMs이 collagen의 분해 억제 및 생성 촉진에 영향을 끼치는 것을 확인하였으며 특히 항염증 실험에 사용된 농도보다 약 10 배 낮은 농도에서도 유의미한 콜라겐 분해 억제 및 합성 효능을 확인하여 저농도의 S-SPMs에서도 우수한 주름 개선효과가 있을 것으로 예상된다.

3.4. 피부 장벽 강화 효능

Filaggrin은 각질세포막의 중요한 구성성분으로 피부 장벽을 구성하는 핵심 단백질로 알려져 있으며 표피 과립세포의 pro-filaggrin이 분해됨으로써 생성되며 추후 다시 아미노산으로 분해되어 자연 보습인자로서의 기능을 한다. 뿐만 아니라 filaggrin은 keratin 뿐만 아니라 각질세포막의 또다른 중요한 구성단백질인 lorincrin과 involucrin을 결합시키는 역할도 담당하여 피부장벽 유지에 중요한 단백질이

다[13]. S-SPMs의 피부장벽 강화 효능을 확인하기 위하여 인간 각질형성세포에 S-SPMs를 처리한 후 filaggrin 및 lorincrin의 mRNA 발현 변화를 확인하였다. 그 결과, 양성대조군인 hyaluronic acid을 50 ppm 처리 시 filaggrin과 lorincrin의 발현이 대조군 대비 각각 1.52, 1.97 배 증가하였다. S-SPMs를 0.1 - 5 ppm 처리한 경우에 filaggrin은 1.31 - 1.52배, lorincrin은 1.31 - 1.88배 증가하는 것을 확인하였다(Figure 6A,B). 이러한 S-SPMs의 filaggrin과 lorincrin 발현 촉진 효과로 미루어 피부 장벽 개선 효능이 있을 것으로 예상된다.

4. 결 론

인간의 염증반응을 조절하는 것으로 알려진 SPMs은 혈관, 심근경색, 골관절염 등 만성염증 질환 및 암, 당뇨와 같은 다양한 질환의 치료 효능에 대한 연구가 활발하게 진행 중이다. SPMs은 신호 전달 물질로 작용하는 특성 상 인체에서 미량 생성되는 것으로 알려져 있다. 그러나 지속적인 n-3 지방산, SPMs 전구물질의 섭취가 혈장 내의 SPMs 농도를 증가시키고 특별한 부작용 없이 다양한 염증 질환 해결에 도움이 된다는 연구 결과는 SPMs의 외부 공급에 의한 안전성이슈는 크지 않을 것으로 예상된다[14,15]. 현재 SPMs은 건강기능식품으로도 판매하고 있는데 이들은 추출이나 합성을 통해 생산하기 어려워 충분한 양의 확보를 위한 생산법의 개발이 필요한 실정이다.

본 연구에서는 이러한 SPMs을 재조합 LOX를 통해 *in vitro*에서의 생산 가능성을 확인하였고 화장품 소재로 개발하기 위해 필요한 다양한 효능을 가지는 것도 확인하였다.

대두(*G. max*)의 LOX를 분리 정제한 재조합 단백질과 DHA를 전구물질로 사용하여 17S-HDHA, resolvin D5 및 protectin DX를 포함하는 S-SPMs 복합 조성물을 합성하였고 이 복합 조성물은 TNF- α , IL-6, NO를 효과적으로 억제함으로써 항염 활성이 있음을 확인하였다. S-SPMs의 procollagen 합성 촉진과 MMP-1 발현 억제 작용은 염증 반응에 의한 콜라겐 및 진피 층의 손상 회복에 효과를 보일 것으로 판단되며 자극원이 없는 상황에서도 S-SPMs 처리에 의한 procollagen 합성이 촉진되는 것으로 보아 정상피부에서의 주름 개선 효과를 기대할 수 있는 소재로 판단된다. 항염 효능과 더불어 피부 장벽 구성 단백질의 발현을 촉진하는 결과는 만성 염증으로 피부장벽이 약화 되어있는 아토피 피부염 완화 효능이 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgement

본 연구 논문은 “한국생명공학연구원의 주요사업”에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 지원에 감사드립니다.

References

1. Q. Qu, W. Xuan, and G. H. Fan, Roles of resolvins in the resolution of acute inflammation, *Cell Biol. Int.*, **39**(1), 3 (2015).
2. M. Spite, J. Claria, and C. N. Serhan, Resolvins, specialized pro-resolving lipid mediators, and their potential roles in metabolic diseases, *Cell Metab*, **19**(1), 21 (2014).
3. Y. Zhuang and J. Lyga, Inflammaging in skin and other tissues - The roles of complement system and macrophage, *Inflamm. Allergy Drug Targets*, **13**(3), 153 (2014).
4. T. H. Kim, G. D. Kim, Y. H. Jin, Y. S. Park, and C. S. Park, Omega-3 fatty acid-derived mediator, Resolvin E1, ameliorates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice, *Int. Immunopharmacol.*, **14**(4), 384 (2012).
5. E. P. Dobson, C. J. Barrow, J. A. Kralovec, and J. L. Adcock, Controlled formation of mono- and dihydroxy-resolvins from EPA and DHA using soybean 15-lipoxygenase, *J. Lipid Res.*, **54**(5), 1439 (2013).
6. I. A. Butovich, A one-step method of 10,17-dihydro(peroxy)docosahexa-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-enoic acid synthesis by soybean lipoxygenase, *J. Lipid Res.*, **47**(4), 854 (2006).
7. S. Pillai, C. Oresajo, and J. Hayward, Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review, *Int. J. Cosmet. Sci.* **27**(1), 17 (2005).
8. D. Fagot, D. Asselineau, and F. Bernerd, Matrix metalloproteinase-1 production observed after solar-simulated radiation exposure is assumed by dermal fibroblasts but involves a paracrine activation through epidermal keratinocytes, *Photochem. Photobiol.*, **79**(6), 499 (2004).
9. J. N. Shama, A. Al-Omran, and S. S. Parvathy, Role of nitric oxide in inflammatory diseases, *Inflammopharmacology*, **15**(6), 252 (2007).
10. A. Ayala, M. F. Muñoz, and S. Arguelles, Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxid Med Cell Longev.*, **2014**, 1 (2014).
11. P. Pittayapruek, J. Meephanan, O. Prapapan, M. Komine, and M. Ohtsuki, Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis, *Int J Mol Sci*, **17**(6), 868 (2016).
12. K. M. Pawelec, S. M. Best, and R. E. Cameron, Collagen: a network for regenerative medicine, *J Mater Chem B Mater Biol Med*, **4**(40), 6484 (2016).
13. S. Kezic and I. Jakasa, Filaggrin and skin barrier function, *Curr Probl Dermatol*, **49**, 1 (2016).
14. A. E. Barden, E. Mas, and T. A. Mori, n-3 Fatty acid supplementation and proresolving mediators of inflammation, *Curr Opin Lipidol.*, **27**(1), 26 (2016).
15. L. V. Norling, L. Ly, and J. Dalli, Resolving inflammation by using nutrition therapy: Roles for specialized pro-resolving mediators, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **20**(2), 145 (2017).