

과산화수소에 노출된 인간 각질형성세포에서 길이가 다른 시스테인 함유 펩타이드의 항산화 효과

하재원¹·최준용²·부용출^{3,†}

^{1,2}경북대학교 의과대학, BK21 플러스 KNU 의생명융복합 창의인재양성 사업단,
분자의학교실 세포기질연구소, 박사과정생

³경북대학교 의과대학, BK21 플러스 KNU 의생명융복합 창의인재양성 사업단,
분자의학교실 세포기질연구소, 교수

(2023년 5월 30일 접수, 2023년 6월 29일 수정, 2023년 8월 24일 채택)

Antioxidant Effects of Cysteine-containing Peptides of Different Lengths in Human HaCaT Keratinocytes Exposed to Hydrogen Peroxide

Jae Won Ha, Joon Yong Choi, and Yong Chool Boo[†]

BK21 PLUS KNU Biomedical Convergence Program for Creative Talent, Department of Molecular Medicine,
Cell and Matrix Research Institute, School of Medicine, Kyungpook National University,
680 Gukchaebosang-ro, Jung-gu, Daegu 41944, Republic of Korea

(Received May 30, 2023; Revised June 29, 2023; Accepted August 24, 2023)

요약: H₂O₂는 세포에서 산화 스트레스를 유발하여 세포 성장, 증식, 노화 및 사멸에 영향을 미치는 일종의 활성산소종(ROS)이다. 본 연구의 목적은 H₂O₂의 세포 독성을 완화시키는 활성 펩타이드를 찾는 것이다. 잠재적인 활성 펩타이드의 서열을 예측하기 위해서 위치 스캐닝 합성 테트라펩타이드 조합 라이브러리를 탐색하였다. H₂O₂로 유도된 인간 각질형성세포(HaCaT 세포)의 사멸에 대한 펩타이드 풀들의 완화 효과를 비교한 결과, 다양한 활성 펩타이드의 시퀀스가 예측되었다. 특히 시스테인(C) 잔기를 함유한 펩타이드가 활성이 있을 것으로 예측되었다. 후속 실험에서 C-NH₂, CC-NH₂, CCC-NH₂, CCCC-NH₂ 등의 길이가 다른 시스테인 함유 펩타이드들의 세포 독성과 활성을 조사하였다. C-NH₂ 및 CC-NH₂는 1.0 mM 이하에서 유의한 세포 독성이 없었지만 CCC-NH₂ 및 CCCC-NH₂는 상대적으로 강한 세포 독성을 보였다. C-NH₂와 CC-NH₂는 H₂O₂로 유도된 세포 독성을 완화시켰다. CC-NH₂는 C-NH₂, C, N-아세틸 시스테인(NAC) 및 글루타티온(GSH)보다 세포 보호 효과가 높았다. 유세포 분석법으로 세포 내 ROS를 측정하였을 때, H₂O₂는 ROS의 생성을 증가시켰다. H₂O₂ 노출 조건에서 CC-NH₂는 C-NH₂보다는 더 효과적으로 ROS 생성을 억제하였고, C, NAC, GSH 만큼 효과적이었다. 본 연구의 결과는 다양한 시스테인 함유 펩타이드 중 특히 CC-NH₂가 H₂O₂로 유도된 세포 독성과 ROS 생성을 안전하고 효과적으로 완화시키는 항산화 특성이 있음을 시사한다.

Abstract: Hydrogen peroxide (H₂O₂) is a type of active oxygen species (ROS) that causes oxidative stress in cells and affects cell growth, proliferation, senescence, and death. The purpose of this study is to find active peptides that attenuate cytotoxicity of H₂O₂. A positional scanning synthetic tetrapeptide combinatorial library was screened to predict the sequence of potentially active peptides. As a result of comparing the effect of peptide pools on H₂O₂-induced death of human keratinocytes (HaCaT cells), various active peptide sequences were predicted. Especially, peptides containing cysteine (C) residue were predicted to be active. In follow-up experiments, the cytotoxicity and activity of cysteine-containing peptides

† 주 저자 (e-mail: ycboo@knu.ac.kr)
call: 053-420-4946

of different lengths, such as C-NH₂, CC-NH₂, CCC-NH₂, and CCCC-NH₂ were examined. C-NH₂ and CC-NH₂ showed no significant cytotoxicity up to 1.0 mM, but CCC-NH₂, and CCCC-NH₂ showed relatively strong cytotoxicity. C-NH₂ and CC-NH₂ alleviated H₂O₂-induced cytotoxicity. CC-NH₂ was more cytoprotective compared to C-NH₂, C, N-acetyl cysteine (NAC), and glutathione (GSH). When intracellular ROS was measured by flow cytometry, H₂O₂ increased ROS production, and CC-NH₂ suppressed ROS production more effectively than C-NH₂, and it was as effective as C, NAC, and GSH. This study suggests that CC-NH₂ of the cysteine-containing peptides of different lengths has an antioxidant property that safely and effectively alleviates H₂O₂-induced cytotoxicity and ROS production.

Keywords: hydrogen peroxide, oxidative stress, cysteine-containing peptides, reactive oxygen species, keratinocytes

1. 서 론

피부는 자외선 노출, 흡연, 오염 물질과 같은 외부 스트레스와 독소, 산화, 당화와 같은 내부 스트레스를 포함하여 많은 유해한 자극에 지속적으로 노출되기 쉬운 기관이다[1-3]. 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 산화 스트레스의 가장 중요한 매개체이며, 정상적인 생리적 조건에서 ROS는 세포 내 신호 분자로서 적절하게 기능하지만 pro-oxidant와 항산화 시스템 사이의 불균형으로 인한 산화 스트레스는 다양한 질병(암, 당뇨, 심장질환, 뇌질환, 골질환 등)의 발달과 관련이 있다[4-6]. 세포는 ROS로 인한 산화 스트레스를 방지하기 위해 다양한 항산화 방어 체계를 가지고 있지만 방어 능력을 초과하여 생성되는 ROS는 직접적으로 염색체, 단백질 및 세포막의 변화를 유도하여 노화 및 각종 질병의 원인이 된다[7,8]. 피부에서도 ROS의 과잉 생성은 각질세포 구조의 온전성을 손상시켜 세포 기능의 상실 또는 세포 사멸로 이어진다[7].

H₂O₂는 다양한 수용체를 통한 세포 신호 전달 과정에서 생성된다. H₂O₂는 표적 단백질의 가역적 산화 환원을 통해 신호 전달을 매개할 것으로 예상되며, 단백질에서 반응성이 높은 티올 그룹에 작용한다[9,10]. 다양한 단백질의 시스테인이 H₂O₂에 의해 산화될 때 첫 번째 생성물인 시스테인 설펜산은 다른 티올 단백질, 글루타티온 및 시스테인과 같은 작은 티올 분자와 빠르게 이황화 결합을 생성한다. 이황화 결합은 세포 외 단백질을 안정화하고 단백질 복합체와의 결합을 안정화하여 전사 활성을 조절할 수 있다[11,12].

본 연구의 목적은 H₂O₂로 인한 세포 독성과 산화 스트레스를 효과적으로 완화시키는 활성 펩타이드를 발굴하는 것이다. 활성 펩타이드의 탐색에서 위치 스캐닝 합성 펩타이드 조합 라이브러리(positional scanning synthetic peptide

combinatorial library, PS-SCL)는 최소한의 스크리닝으로 활성 펩타이드 서열을 찾기에 유용한 도구이다. 이전 연구에서 PS-SCL은 단백질 분해 효소의 기질 특이성을 연구하는데 사용되었다[13]. 그리고 혈액 응고 경로에 관여하는 두 개의 트립신 유사 효소인 플라스민과 트롬빈의 확장된 기질 특이성을 연구를 위해 사용되었다[14]. 일반적인 펩타이드 조합 라이브러리에서는 테트라펩타이드의 경우 160,000 (20 × 20 × 20 × 20)개의 개별 펩타이드를 탐색해야 한다. 반면 PS-SCL 형식에서 동일한 다양성을 탐색하기 위해서는 80 (20 + 20 + 20 + 20)개의 펩타이드 풀만이 필요하다. PS-SCL의 각 펩타이드 풀은 4 개의 위치 하위 라이브러리(OXXX, XOXX, XXOX 및 XXXO)로 구성되고 각각은 20가지 유형의 펩타이드 풀로 구성된다. 각 하위 라이브러리의 O 위치의 아미노산 잔기는 단독으로 정의되고 X 위치는 모든 20 개 아미노산의 등물 혼합물이 되도록 합성된다. 이전 연구에서 우리 연구팀은 PS-SCL을 사용하여 알파-멜라닌세포 자극호르몬(α-melanocyte stimulating hormone, α-MSH)으로 자극된 세포의 멜라닌 합성을 효과적으로 억제하는 펩타이드를 발견하였다[15].

본 연구에서는 먼저 H₂O₂에 노출된 인간 각질형성세포의 생존력에 대한 위치 스캐닝 합성 테트라펩타이드 조합 라이브러리의 여러 펩타이드 풀들의 효과를 비교하였다. 그 결과, 다양한 활성 펩타이드의 시퀀스들이 예측되었으며, 특히 시스테인(cysteine, C) 함유 펩타이드가 활성이 높을 것으로 예측되었다. 따라서 후속 실험에서 C-NH₂, CC-NH₂, CCC-NH₂, CCCC-NH₂ 등의 길이가 다른 시스테인 함유 펩타이드들의 세포 독성과 활성을 조사하였다. 본 연구의 결과는 다양한 시스테인 함유 펩타이드 중 특히 CC-NH₂가 H₂O₂로 유도된 세포 독성과 ROS 생성을 안전하고 효과적으로 완화시키는 항산화 특성이 있음을 보여주었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

H_2O_2 , L-cysteine (C), N-acetyl cysteine (NAC) 및 glutathione (GSH)는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였고 L-cysteinamide (C-NH₂)는 Watanabe Chemical Industries, Ltd. (Japan)에서 구입하였다. 본 연구에 사용된 PS-SCL은 C-말단이 아미드화된 테트라펩타이드로 구성되었으며 Pepton Co. (Korea)에서 구입하였다. PS-SCL의 4 개의 하위 라이브러리(OXXX-NH₂, XOXN-NH₂, XXOX-NH₂, XXXO-NH₂)는 각각 20 가지 유형의 펩타이드 풀로 구성되는데 O 위치는 20 개의 아미노산 중 하나이며, X 위치는 20 개 아미노산의 등물 혼합물이다. 서열이 정의된 개별 펩타이드는 Pepton Co. (Korea)에서 구입하였다.

2.2. 세포 배양

불멸화 인간 각질형성세포 HaCaT 세포주(CLS Cell Lines Service GmbH, Germany)를 5% CO₂와 95% 공기의 37 °C에서 배양하였다. 성장 배지는 10% fetal bovine serum, 항생제(100 U/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신, 0.25 µg/mL 암포테리신 B)가 첨가된 DMEM/F-12 배지(GIBCO-BRL, Grand Island, USA)이다.

2.3. 세포 생존율 분석

세포 생존율은 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석으로 측정하였다[16]. 대사 활성 세포에 의해 MTT가 보라색 포르마잔 결정으로 환원되는 것을 기반으로 한다. 처리 후, 세포를 1.0 mg/mL MTT (Amresco, Solon, USA)가 포함된 배양 배지에서 2 h 동안 배양하였다. 배양액은 버리고 세포 내부에 형성된 formazan 염료를 dimethyl sulfoxide로 추출한 후 SPECTROstar Nano microplate reader (BMG Labtech GmbH, Germany)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. 유세포 분석

세포 내 ROS 생성은 유세포 분석법으로 측정하였다[17]. 시험 물질 처리 1 h 후 부착 세포를 trypsin-EDTA 용액을 사용하여 배양 플레이트로부터 분리하였다. 세포를 Combi 408 원심분리기(Hanil, Korea, 316×g, 3 min)로 침전시키고 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척한 후, 10 µM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)로 30 min

동안 표지한 후 유세포 분석을 위해 PBS에 부유시켰다. 세포 현탁액에 대한 유세포 분석은 BD FACSCalibur를 사용하여 수행하였고, 데이터는 BD CellQuest (BD Biosciences, San Jose, USA)를 사용하여 분석하였다. 데이터는 세포 내 ROS 생성으로 인해 높은 DCFH-DA 형광을 갖는 세포의 전체 게이트 세포에 대한 비율(%)로 표시하였다.

2.5. 통계 분석

데이터는 3 회 이상의 독립적인 실험의 평균 ± 표준 편차(SD)로 표현된다. 실험 결과는 SigmaStat v.3.11 소프트웨어(Systat Software Inc., San Jose, USA)를 사용하여 통계적으로 분석되었다. 유의하게 다른 그룹 평균의 존재는 $p < 0.05$ 수준에서 일원 분산 분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 사용하여 결정되었다. 그런 다음 Dunnett의 테스트를 사용하여 각 실험 그룹을 대조군과 비교하였다. 또는 Duncan의 다중 범위 테스트를 사용하여 모든 그룹을 서로 비교하였다.

3. 결과

3.1. 인간 각질형성세포에서 H_2O_2 에 의한 세포 독성 및 ROS 생성 유도

H_2O_2 가 세포 생존력에 미치는 영향을 확인하기 위해 인간 각질형성세포를 다양한 농도의 H_2O_2 에 48 h 동안 노출시켰다. 0.1 mM H_2O_2 에 의해 세포 생존율이 약 21% 감소하였으며 0.2 mM H_2O_2 에서는 약 66%, 0.3 mM H_2O_2 에서는 약 82% 감소하였다(Figure 1A). 이 결과는 H_2O_2 가 시험된 농도 범위에서 농도 의존적으로 세포의 사멸을 유도하였음을 보여준다.

다음 실험에서는 H_2O_2 가 ROS 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 세포를 산화환원 민감 프로브인 DCFH-DA로 표지하였고, ROS 생성으로 형광이 증가한 세포 집단을 유세포 분석기로 분석하였다. 세포를 여러 농도의 H_2O_2 에 1 h 노출한 결과 0.1 mM에서는 유의한 영향이 없었지만 0.2 mM에서는 형광을 나타내는 세포를 약 8% 증가시켰고 0.3 mM에서는 약 61% 증가시켰다(Figure 1B). 이 결과는 H_2O_2 가 0.2 mM 이상의 농도에서 세포의 산화 스트레스를 유도하였음을 보여준다.

3.2. 위치 스캐닝 합성 테트라펩타이드 조합 라이브러리 스크리닝

H_2O_2 의 세포 독성을 완화하는 활성 펩타이드의 시퀀스

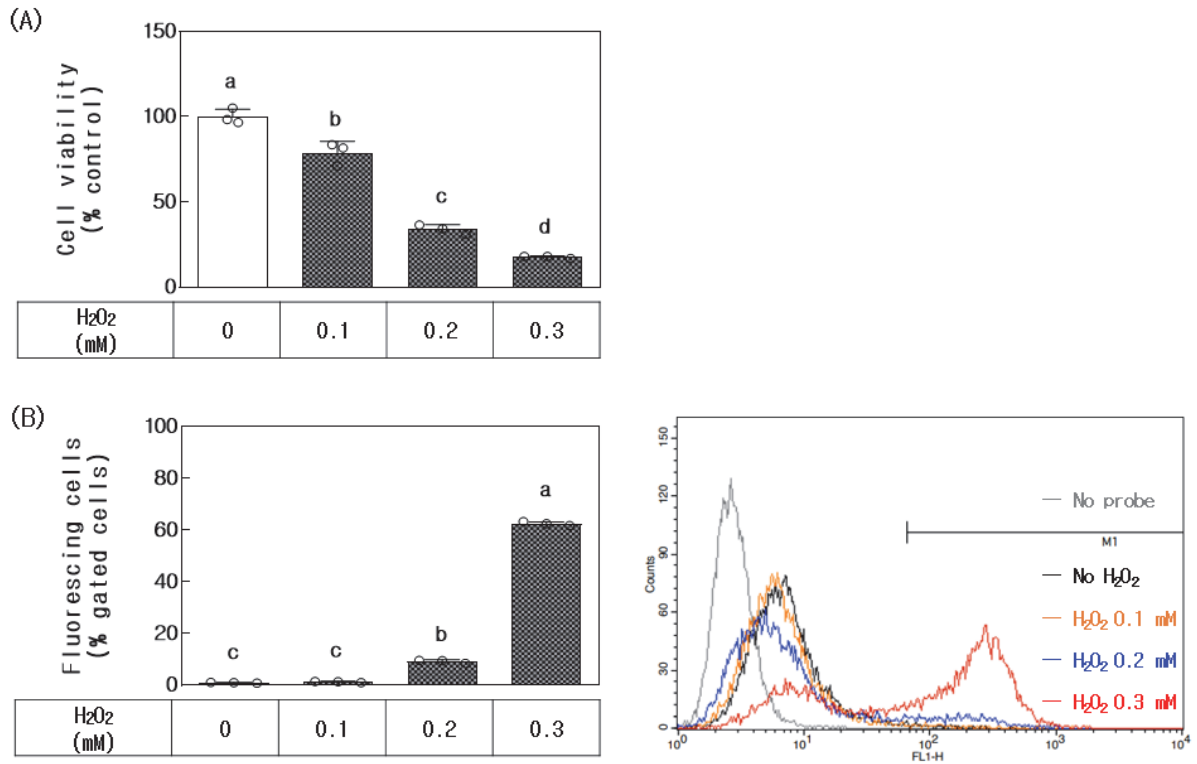


Figure 1. Effects of H₂O₂ on the viability, reactive oxygen species (ROS) production of human HaCaT keratinocytes. In (A), cells were treated with varying concentrations of H₂O₂ for 48 h for the viability assay. In (B), flow cytometry for the ROS production in human HaCaT keratinocytes exposed to H₂O₂. The cells treated with vehicle, and exposed to H₂O₂ for 60 min or not. Cells were washed, detached, centrifuged down, labeled with 2',7'-dichlorodihydrofluoresceindiacetate (DCFH-DA) 30 min and suspended in phosphate-buffed saline (PBS) for flow cytometry. The ratios (%) of fluorescing cells to the total gated cells are presented. Data are presented as mean ± standard deviation (SD) (N = 3). Duncan's multiple range test was performed to compare all group means to each other. Groups that share the same letters (a-d) do not have significantly different means at the *p* < 0.05 level.

를 예측하기 위하여 위치 스캐닝 합성 테트라펩타이드 조합 라이브러리를 대상으로 탐색 실험을 수행하였다. 인간 각질형성세포에 각 펩타이드 풀을 1.0 mM 농도로 처리하고 0.2 mM H₂O₂ 유무 조건에서 48 h 배양하였다. H₂O₂ 없는 조건에서 4 번 위치에 lysine (K) 잔기를 함유한 펩타이드 풀은 세포 생존율을 약 20% 감소시켰고, 다른 펩타이드 풀들은 유의한 영향이 없었다. 0.2 mM H₂O₂가 있는 조건에서는 1 번 위치에 C 또는 glutamine (Q)이 포함된 펩타이드 풀은 세포 생존율을 각각 약 42%, 약 34% 증가시켰다(Figure 2A). 2 번 위치에 C, methionine (M), asparagine (N), proline (P), Q, serine (S), threonine (T), valine (V), tryptophan (W) 및 tyrosine (Y)를 함유한 펩타이드 풀이 세포 생존율을 각각 약 27%, 약 27%, 약 27%, 약 37%, 약 38%, 약 24%, 약 33%, 약 34%, 약 30%, 약 24% 증가시

켰다(Figure 2B). 3번 위치에 C, glutamic acid (E) 및 phenylalanine (F)를 함유한 펩타이드 풀이 세포 생존율을 각각 약 47%, 약 34%, 약 37% 증가시켰다(Figure 2C). 4번 위치에 alanine (A), C, aspartic acid (D), E, F, glycine (G), histidine (H), isoleucine (I), leucine (L), N, P, Q, S, T, V, W 및 Y를 함유한 펩타이드 풀이 세포 생존율을 각각 약 19%, 약 39%, 약 20%, 약 16%, 약 10%, 약 21%, 약 20%, 약 22%, 약 19%, 약 28%, 약 33%, 약 33%, 약 27%, 약 17%, 약 31%, 약 39%, 약 29% 증가시켰다(Figure 2D). 그 외의 펩타이드 풀들은 유의한 영향이 없었다. 이 결과는 H₂O₂의 세포 독성을 완화하는 다양한 펩타이드의 존재를 시사하였으며 특히 시스테인 잔기를 함유하는 펩타이드가 활성이 높을 것으로 시사하였다.

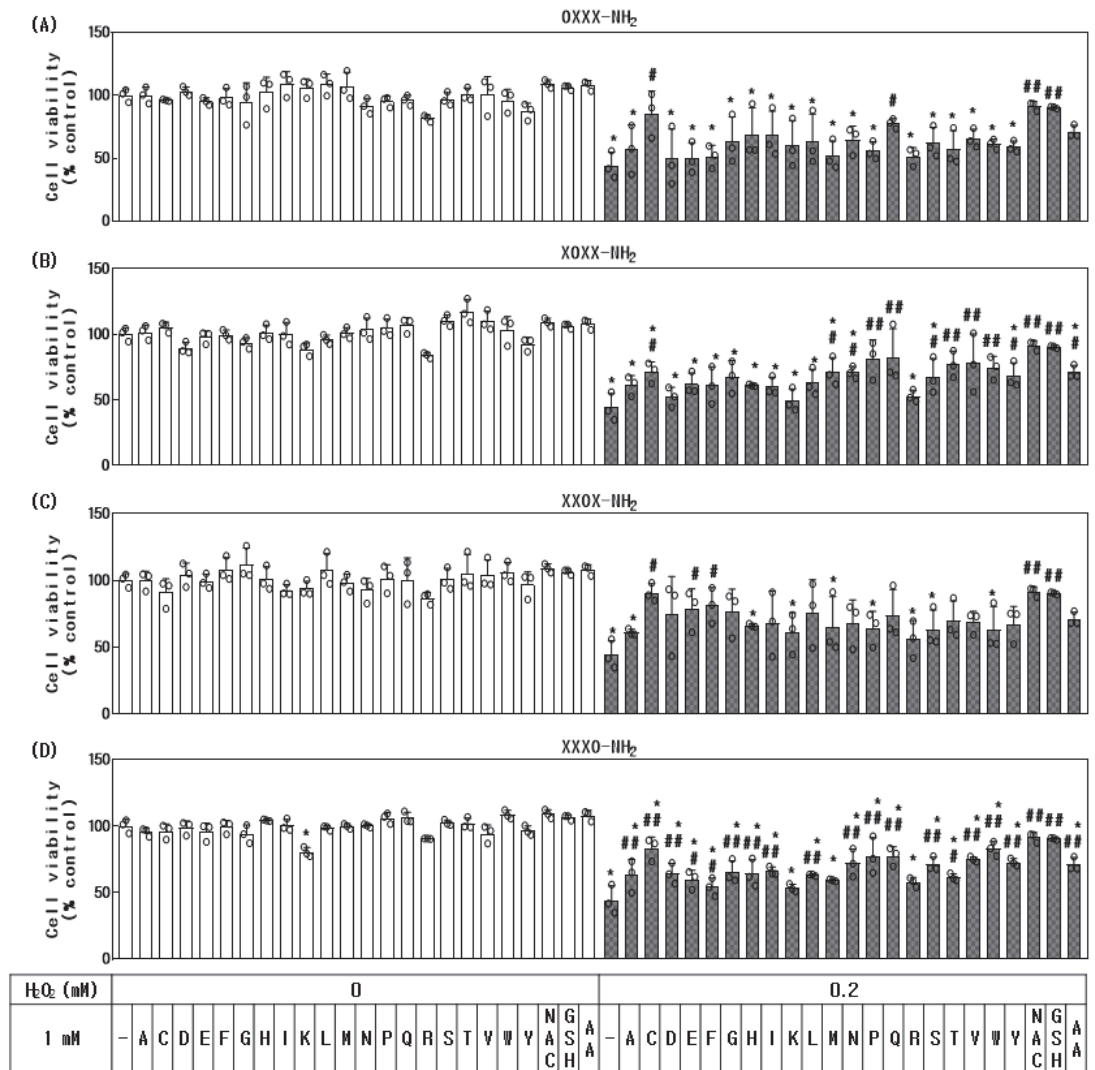


Figure 2. Effects of the tetrapeptide pools on the cell viability of human HaCaT keratinocytes cultured in the absence and presence of H₂O₂. Each panel represents the result obtained from tetrapeptide pools with known amino acids at each of the four positions. O positions of the peptide pools (i.e. OXXX-NH₂, XOXX-NH₂, XXOX-NH₂, and XXXO-NH₂) are occupied by the specified amino acid residue. X positions of the peptide pools are occupied by equimolar mixtures of the 20 kinds of amino acids. Statistical significance of intergroup differences was determined using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. * *p* < 0.05 versus vehicle control; # *p* < 0.05 versus H₂O₂ only control; ## *p* < 0.01 versus H₂O₂ only control. A, alanine; C, cysteine; D, aspartic acid; E, glutamic acid; F, phenylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M, methionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; W, tryptophan; Y, tyrosine; NAC, N-acetyl cysteine; GSH, glutathione; and AA, ascorbic acid.

3.3. 시스테인 함유 펩타이드가 H₂O₂ 유도 세포 독성 및 ROS 생성에 미치는 영향

위치 스캐닝 합성 테트라펩타이드 조합 라이브러리의 스크리닝 결과에 기초하여, 고정화된 아미노산 서열을 갖는 개별 펩타이드 C-NH₂, CC-NH₂, CCC-NH₂ 및 CCCC-NH₂를

합성하여 후속 연구를 진행하였다.

이 4가지 펩타이드들이 H₂O₂ 유무 조건에서 세포 생존율에 미치는 영향을 C, NAC 및 GSH와 비교하였다. 그 결과, C-NH₂는 1.0 mM까지 자체 독성이 나타나지 않았으며 H₂O₂ 노출 시 1.0 mM C-NH₂에서 약 23%의 유의한 세포

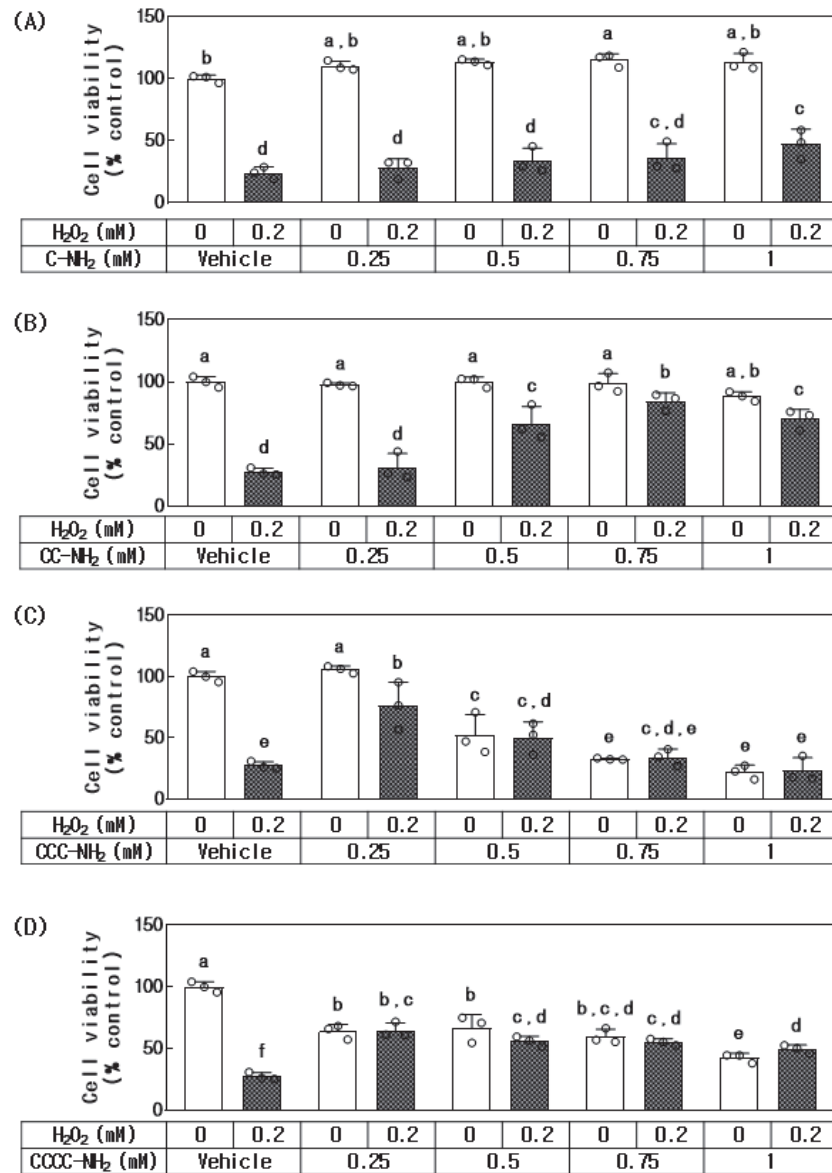


Figure 3. Effects of C-NH₂, CC-NH₂, CCC-NH₂, and CCCC-NH₂ on the cell viability of human HaCaT keratinocytes cultured in the absence and presence of H₂O₂. Cells were treated with vehicle (control) or each substance at the indicated concentrations for 48 h. Duncan's multiple range test was performed to compare all group means to each other. Groups that share the same letters (a-f) do not have significantly different means at the $p < 0.05$ level.

보호 효과를 나타냈다. CC-NH₂ 또한 1.0 mM까지 자체 독성이 나타나지 않았으며 H₂O₂ 노출 시 0.5 mM CC-NH₂에서 약 39%의 유의한 세포 보호 효과를 보였다. 반면 CCC-NH₂는 0.5 mM 이상에서 유의한 세포 독성을 보였고 CCCC-NH₂는 0.25 mM 이상에서 유의한 세포 독성을 보였다. H₂O₂ 노출 시 두 펩타이드 0.25 mM에서 각각 약 49%, 약 37%의 세포 보호 효과를 보였다(Figure 3).

다음 실험에서는 C-NH₂와 CC-NH₂의 세포 내 ROS 생성에 대한 영향을 0.5 mM 농도의 C, NAC 및 GSH와 비교하였다. 다른 펩타이드들은 이 농도에서 세포 독성을 보여 제외하였다. H₂O₂에 의해 형광을 나타내는 세포의 비율이 약 32% 증가하였고, H₂O₂에 의해 증가한 형광은 CC-NH₂, C, NAC 및 GSH에 의해 약 32% 감소하였고 C-NH₂에 의해 약 24% 감소하였다(Figure 4).

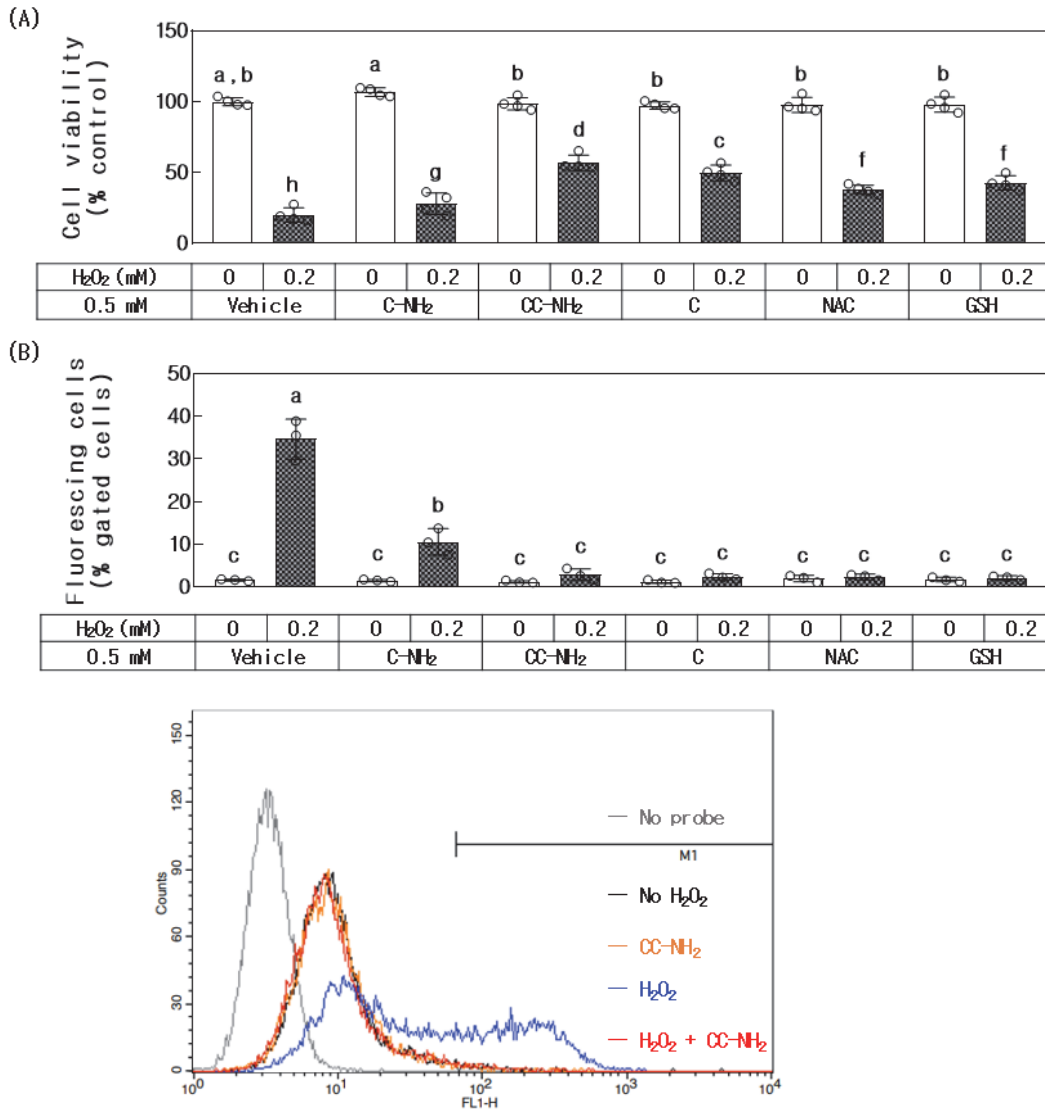


Figure 4. Effects of C-NH₂, CC-NH₂, C, NAC, and GSH on the cell viability, reactive oxygen species (ROS) production of human HaCaT keratinocytes. In (A), cells were treated with C-NH₂, CC-NH₂, C, NAC, and GSH at the 0.5 mM and incubated in the absence or presence of H₂O₂ for 48 h. In (B), Flow cytometry for the ROS production in human HaCaT keratinocytes exposed to H₂O₂ in the absence and presence of C-NH₂, CC-NH₂, C, NAC, and GSH. The ratios (%) of fluorescing cells to the total gated cells are presented. Duncan's multiple range test was performed to compare all group means to each other. Groups that share the same letters (a-h) do not have significantly different means at the $p < 0.05$ level.

4. 고 찰

산화 스트레스는 ROS의 생성이 항산화 능력을 초과하는 불균형에서 발생하며 세포의 주요 기능에 변화를 초래한다 [18]. 이전 연구에서 대기 입자상 물질은 인간 각질형성세포에서 세포 내 ROS를 증가시키고 전체 GSH 및 glutathione

disulfide (GSSG) 함량에서의 GSSG 비율을 크게 증가시켰으며 지질 과산화, lactate dehydrogenase (LDH)의 방출도 증가시켰다[19]. 또 구리 이온은 ROS 생성을 증가시키고, 지질 과산화, 단백질 카르보닐화를 증가시켰으며 전체 GSH 및 GSSG 함량에서의 GSSG 비율을 증가시켰다[20].

ROS에 의한 글루타치온과 시스테인 같은 티올 함유 화

합물의 산화는 신호 전달, 효소 활성 조절 및 항산화 반응을 포함한 광범위한 생물학적 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 간주된다[12,21,22]. Thioredoxin 1 (Trx1), peroxiredoxin 1 (Prx1) 및 glutathione reductase (GSR)과 같은 티올 함유 화합물은 세포 내 항산화제의 산화를 완화시켜 산화 스트레스로 인한 세포 사멸로부터 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다[23]. 티올 함유 항산화제인 NAC는 H9c2 심근세포에서 Trx1의 환원형을 증가시키고 Prx1, GSR, phosphatase and tensin homolog (PTEN)의 산화형을 감소시킴으로써 H_2O_2 로 인해 손상된 세포 내 항산화 단백질의 산화 환원 상태를 조절하여 세포 생존율을 증가시킨다[24].

우리의 최근 연구에서 C-NH₂가 인간 흑색종 MNT-1 세포와 정상 human epidermal melanocytes (HEM) 세포에서 tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) 및 dopachrome tautomerase (DCT)의 mRNA 및 단백질 발현 수준에 영향을 미치지 않고 유멜라닌 합성을 억제하여 아미드화 아미노산 20 종 중 가장 효과적인 anti-eumelanogenic 물질 중 하나로 밝힌 바 있다[25].

본 연구에서는 인간 각질형성세포에서 다양한 길이의 시스테인 함유 펩타이드가 H_2O_2 로 유도된 산화 스트레스에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 활성 펩타이드들의 시스테인 함유 펩타이드의 길이가 길어질수록 H_2O_2 가 있는 조건에서 세포 생존율 증가 효과가 높아지지만 자체 독성 또한 높아지기 때문에 CC-NH₂가 가장 안전하면서도 활성이 우수한 최적의 펩타이드로 사료된다. 이를 뒷받침 하는 결과로 CC-NH₂는 H_2O_2 에 의한 ROS 생성에서는 그 억제 효과가 C, NAC, GSH와 비슷했지만 H_2O_2 에 대한 세포 보호 효과는 가장 높았다. 현재 실험 결과로는 H_2O_2 가 있는 조건일 때 세포 밖에서 CC-NH₂가 산화되어 세포에 노출되는 H_2O_2 를 줄여주는 것인지, 세포 내 항산화 유전자들의 발현을 조절하여 세포를 보호하는 것인지 설명하기 어렵기 때문에 향후 분자 메커니즘 연구가 추가적으로 필요하다. 또한 CC-NH₂가 C, NAC, GSH보다 높은 세포 생존율 회복 효과를 보였기 때문에 그 응용을 위하여 효능과 안전성을 평가하는 *in vivo* 및 임상 연구가 추가적으로 필요하다.

Acknowledgement

본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건의료기술연구개발사업 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 HP20C0004).

References

1. J. D'Orazio, S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz, and T. Scott, UV radiation and the skin, *Int J Mol Sci*, **14**(6), 12222 (2013).
2. M. Rinnerthaler, J. Bischof, M. K. Streubel, A. Trost, and K. Richter, Oxidative stress in aging human skin, *Biomolecules*, **5**(2), 545 (2015).
3. E. Proksch, J. M. Brandner, and J. M. Jensen, The skin: an indispensable barrier, *Exp dermatol*, **17**(12), 1063 (2008).
4. Y. C. Hseu, H. W. Lo, M. Korivi, Y. C. Tsai, M. J. Tang, and H. L. Yang, Dermato-protective properties of ergothioneine through induction of Nrf2/ARE-mediated antioxidant genes in UVA-irradiated human keratinocytes, *Free Radic Biol Med*, **86**, 102 (2015).
5. A. Gilhar, Y. Ullmann, R. Karry, R. Shalaginov, B. Assy, S. Serafimovich, and R. S. Kalish, Aging of human epidermis: reversal of aging changes correlates with reversal of keratinocyte fas expression and apoptosis, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **59**(5), B411 (2004).
6. P. J. Crack and J. M. Taylor, Reactive oxygen species and the modulation of stroke, *Free Radic Biol Med*, **38**(11), 1433 (2005).
7. M. A. Farage, K. W. Miller, P. Elsner, and H. I. Maibach, Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review, *Int J Cosmet Sci*, **30**(2), 87 (2008).
8. J. Cadet, T. Douki, and J. L. Ravanat, Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation, *Photochem photobiol*, **91**(1), 140 (2015).
9. M. B. Hampton and S. Orrenius, Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis, *FEBS Lett*, **414**(3), 552 (1997).
10. R. L. Levine, B. S. Berlett, J. Moskovitz, L. Mosoni, and E. R. Stadtman, Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage, *Mech Ageing Dev*, **107**(3), 323 (1999).
11. S. Garcia-Santamarina, S. Boronat, and E. Hidalgo, Reversible cysteine oxidation in hydrogen peroxide sensing and signal transduction, *Biochemistry*, **53**(16), 2560 (2014).
12. L. B. Poole and K. J. Nelson, Discovering mechanisms of

- signaling-mediated cysteine oxidation, *Curr Opin Chem Biol*, **12**(1), 18 (2008).
13. M. Poreba, A. Szalek, P. Kasperkiewicz, and M. Drag, Positional scanning substrate combinatorial library (PS-SCL) approach to define caspase substrate specificity, *Methods Mol Biol*, **1133**, 41 (2014).
 14. B. J. Backes, J. L. Harris, F. Leonetti, C. S. Craik, and J. A. Ellman, Synthesis of positional-scanning libraries of fluorogenic peptide substrates to define the extended substrate specificity of plasmin and thrombin, *Nat Biotechnol*, **18**(2), 187 (2000).
 15. J. H. Kim, J. K. Seok, Y. M. Kim, and Y. C. Boo, Identification of small peptides and glycinamide that inhibit melanin synthesis using a positional scanning synthetic peptide combinatorial library, *Br J Dermatol*, **181**(1), 128 (2019).
 16. F. Denizot and R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J Immunol Methods*, **89**(2), 271 (1986).
 17. E. Eruslanov and S. Kusmartsev, Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry, *Methods Mol Biol*, **594**, 57 (2010).
 18. G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, and A. Bitto, Oxidative stress: Harms and benefits for human health, *Oxid Med Cell Longev*, 13 (2017).
 19. J. W. Ha and Y. C. Boo, Siegesbeckiae Herba extract and chlorogenic acid ameliorate the death of HaCaT keratinocytes exposed to airborne particulate matter by mitigating oxidative stress, *Antioxidants (Basel)*, **10**(11), 1762 (2021).
 20. J. W. Ha, J. Y. Choi, and Y. C. Boo, Differential effects of histidine and histidinamide versus cysteine and cysteinamide on copper ion-induced oxidative stress and cytotoxicity in HaCaT keratinocytes, *Antioxidants (Basel)*, **12**(4), 801 (2023).
 21. K. Ulrich and U. Jakob, The role of thiols in antioxidant systems, *Free Radic Biol Med*, **140**, 14 (2019).
 22. S. Yardim-Akaydin, Y. Özkan, E. Özkan, M. Torun, and B. Şimşek, The role of plasma thiol compounds and antioxidant vitamins in patients with cardiovascular diseases, *Clin Chim Acta*, **338**(1-2), 99 (2003).
 23. J. Lu and A. Holmgren, The thioredoxin antioxidant system, *Free Radic Biol Med*, **66**, 75 (2014).
 24. X. Liu, L. Wang, J. Cai, K. Liu, M. Liu, H. Wang, and H. Zhang, N-acetylcysteine alleviates H₂O₂-induced damage via regulating the redox status of intracellular antioxidants in H9c2 cells, *Int J Mol Med*, **43**(1), 199 (2019).
 25. H. K. Lee, J. W. Ha, Y. J. Hwang, and Y. C. Boo, Identification of L-cysteinamide as a potent inhibitor of tyrosinase-mediated dopachrome formation and eumelanin synthesis, *Antioxidants (Basel)*, **10**(8), 1202 (2021).