

피토케미칼 융합 펩타이드 신소재의 안티에이징 효능

조문진¹, 서효현¹, 이유리¹, 모지홍¹, 모상현¹, 조석형², 김영준³, 이정훈^{1*}

¹(주)바이오에프디엔씨 항노화연구소

²혜전대학교 소방안전관리과

³청운대학교 화장품과학과

*e-mail: jhlee@biofdnc.com

Anti-aging Effect of Phytochemical fused Peptides

Moon Jin Cho¹, Hyo Hyun Seo¹, Yu Ri Lee¹, Ji Hong Moh¹,
Sang Hyun Moh¹, Suk Hyung Cho², Young Jun Kim³, Jeong Hun Lee^{1*}

¹Anti-aging Research Institute of BIO-FD&C Co.,Ltd.

²Dept of Fire Safety Management, Hyejeon College

³Dept of Cosmetic Science, Chungwoon University

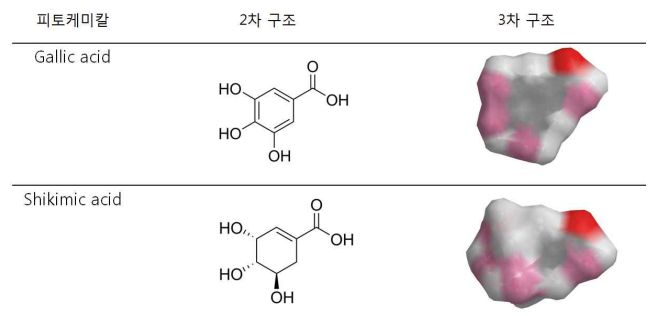
요약

본 연구는 피토케미칼과 펩타이드의 융합된 신소재의 항노화 효능에 관한 연구이다. 대표적인 피토케미칼인 갈릭산 및 시키믹산에 식물유래 Pentapeptide인 Exorphin을 융합시켜 만든 Galloyl Exorphin 및 Shikimoyl Exorphin은 콜라겐 합성능 및 항염증 효능 등을 보여주었다. 이러한 피토케미칼 융합 펩타이드 신소재는 피토케미칼이 가진 Stability 및 Solubility를 향상시키며, 피토케미칼 및 펩타이드 소재가 가진 각각의 효능을 유지시켰다. 이러한 결과는 피토케미칼 융합 펩타이드 소재가 항노화 소재로서 화장품 포몰레이션에 널리 활용될 수 있음을 의미한다.

1. 서론

피토케미칼(Phytochemical)은 식물체 내에서 생산되는 케미칼로서 항산화, 항염 효능 등 다양한 효능을 지니고 있어서 산업적 응용가치가 크다. 특히, 갈릭산(Gallic acid), 시키믹산(Shikimic acid)은 대표적인 피토케미칼들이다(그림 1). 이러한 피토케미칼들은 식물에서 중요한 역할뿐만 아니라, 분리정제된 산물은 식품, 의약품 소재 등으로 널리 활용되고 있다. 갈릭산은 녹차 등에 많이 포함되어 있으며, superoxide anion 등 자유라디칼(Free radical)제거능이 아주 우수하여 항산화제제로 많이 활용되고 있다. 시키믹산은 식물대사에서 중요한 역할을 하는 피토케미칼로서 항바이러스제제인 oseltamivir (Tamiflu®) 중간대사체이기도 하다. 시키믹산은 화학적 합성, 미생물 발효 혹은 식물체로부터 분리정제하여 얻는다 (Ghosh S. et al Biotechnol Adv. 2012). 이러한 피토케미칼은 항산화, 항염 효능 등이 우수함에도 불구하고, 화장품 제형 내에서 시간 경

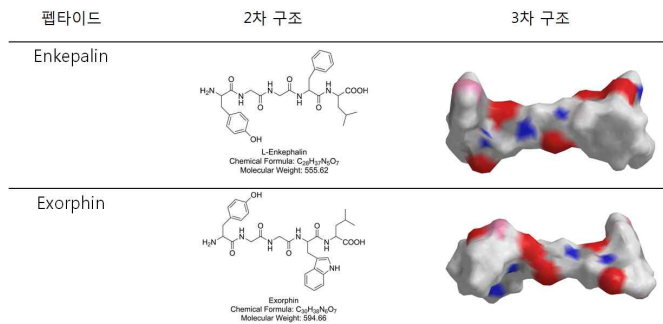
과에 따른 색상 변화 등 불안정성이 야기되어 화장품 분야에서는 제한적으로 쓰이고 있다.



[그림 1] 갈릭산 및 시키믹산의 구조 비교

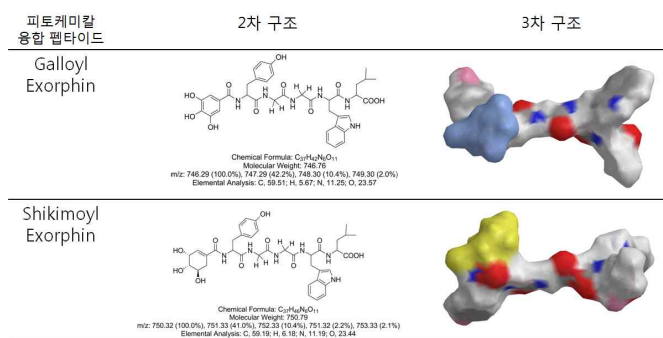
본 연구에서는 피토케미칼의 화장품 제형 내 Stability를 증대시키고자 식물성 뉴로펩타이드로 알려진 YGGWL이라는 서열을 가진 Exorphin이라는 펩타이드를 피토케미칼에 아미드 결합으로 연결시켰다. Exorphin은 대표적인 뉴로펩타이드로 알려진 YGGFL이라는 서열을 가진 Enkephalin과 그 아미노산 서열 및 구조가 상당히 유사하다(그림 2).

Enkephalin은 통증억제 및 상처재생 효능 등이 우수하여 화장품용 항노화 소재로 널리 쓰이고 있다.



[그림 2] Enkephalin 및 Exorphin의 구조 비교

일반적으로 펩타이드는 친수성기가 많아 수용액 상태에서 그 용해도가 상당히 높다. 반면, 갈릭산과 시키믹산 같은 피토케미칼은 항산화 효능 등이 우수함에도 불구하고 화장품 제형 내 안정성이 낮은 단점이 있다. 이러한 점을 극복하고자 본 연구에서는 갈릭산과 시키믹산에 식물유래 YGGWL이라는 Pentapeptide를 결합시켰다. 피토케미칼 용합 펩타이드 신소재인 Galloyl Exorphin 및 Shikimoyl Exorphin은 고체상 합성법(Solid Phase Peptide Synthesis)을 이용하여 합성하여, 정제하였으며 구조로 도식화하였다(그림 3). 합성, 정제된 피토케미칼 용합 펩타이드 신소재의 효능이 유지되는지 알아보기 위하여 갈릭산, 시키믹산, Exorphin, Galloyl Exorphin, Shikimoyl Exorphin으로 항노화와 관련된 항산화, 콜라겐 합성능, 항염증 효능을 조사하였다.



[그림 3] Galloyl Exorphin 및 Shikimoyl Exorphin의 구조 비교

2. 재료 및 방법

2.1. 펩타이드 합성 및 정제

실험에 사용한 Exorphin, Galloyl Exorphin, Shikimoyl Exorphin들은 Fmoc을 이용한 고체상합성법(Solid Phase Peptide Synthesis)을 사용했다.

- Put a Fmoc-Leucine-loaded resin into a vessel. And swelling for 20 min in NMP (N-Methylpyrrolidinone).
- Add piperidine(20%) with NMP(80%) solution and mix for 10 min (repeat)
- Wash the sample three times with DCM (Dichloromethane) solvent and NMP solvent, respectively.
- Dissolve Fmoc-Tryptophan amino acid (10 molar equivalent to a Fmoc-Leucine-loaded resin), NHS (N-Hydroxysuccinimide)(10 molar equivalent to a Fmoc-Leucine-loaded resin), DCC (Dicyclohexylcarbodiimide) (10 molar equivalent to Fmoc-Leucine-loaded resin) into NMP.
- Mix the dissolved Fmoc-Tryptophan -OH, NHS, DCC (in NMP) with the Fmoc-removed Leucine -loaded resin.
- Repeat the cycle of step b to e with required amino acid in our sequence pentapeptide (sequence : YGGWL)
- Mixed the dissolved Shikimic acid or Gallic acid (10 molar equivalent to a Fmoc-Leucine-loaded resin), NHS (N-Hydroxysuccinimide)(10 molar equivalent to a Fmoc-Leucine-loaded resin), DCC (Dicyclohexylcarbodiimide) (10 molar equivalent to a Fmoc-Leucine-loaded resin) into NMP (In case of exorphin synthesis this step is omitted).
- Mixed the dissolved Shikimic acid, NHS, DCC (in NMP) with the Fmoc-removed -Tyr-Gly-Gly-Trp-Leu-loaded resin.
- After the final coupling is finished, wash the sample with DCM (three times), NMP (three times), and DCM (three times) respectively. Dry the sample under vacuum condition.
- Cleavage and deprotect the sample using phenol, distilled water, EDT (Ethandithio), TFA (Trifluoroacetic acid), and Thioanisole.
- Treat this solution with pre-cooled ether.
- After reaction the sample was centrifuged.
- The resulting solid product was purified by Reverse Phase (RP)-HPLC with Bondapack C18 column (Waters system).
- The finished product was obtained by

lyophilization and identified by MALDI-TOF mass spectrometry (Voyager DE-STR).

2.2 항산화 실험 방법

화합물 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH, Sigma D9132-1G, USA)는 에탄올 내에서 자유라디칼을 발생하는데, 본 발명에 따른 화장품 조성물과 일정 비율로 혼합하여 생성된 자유라디칼의 양이 어느 정도 감소하는지(자유라디칼 소거활성 시험)를 확인함으로써 항산화 효과를 갖는지를 알아보았다. 자유라디칼 소거활성 실험은 Kim 등 (Kor. J. Pharmacogn., 24(4), 299-303(1993))의 방법을 변형한 것으로서, 안정한 자유라디칼인 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, Sigma D9132-1G, USA)시약을 사용하였다.

0.2 mM DPPH 용액(Blank인 경우는 에탄올) 150 μ l에 Exorphin, Shikimic acid, Gallic acid, Shikimoyl Exorphin, Galloyl Exorphin을 각각 5ppm, 10ppm, 50ppm, 100ppm 농도로 함유하도록 제작하여, 이들을 각각 150 μ l 첨가하여 혼합하고, 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이에 대한 대조군은 정제수를 이용한 경우로 설정하였다. 상기 실험군과 대조군에 대한 흡광도 측정 후, 항산화능의 정도는 순수한 물을 사용한 대조군의 흡광 강도를 기준으로 백분율로 표시하였다. 하기 [수식 1]를 이용하여 자유라디칼 소거활성을 측정하였다.

[수식 1]

자유 라디칼 소거 효과 (%) = $1 - [(실험군\ 흡광도 - Blank\ 흡광도) / 대조군의\ 흡광도] \times 100$

2.3 Procollagen발현에 미치는 영향

사람 섬유아세포(Human dermal fibroblast)를 48 well-plate에 1×10^5 cell/ml로 분주하고, 약 60%의 confluency에 도달할 때까지 1일간 배양하고, FBS-free 배지에서 1일간 추가 배양하였다. 시료 처리 전에 배지를 제거한 후 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 다음 FBS를 첨가하지 않은 DMEM배지에 50 ppm 농도의 Exorphin, Shikimic acid, Gallic acid, Shikimoyl Exorphin 및 Galloyl Exorphin 시료를 처리하여 CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 음성 대조군(Negative Control, NC)은 상기와 동일한 배지에서 시험 물질을 첨가하지 않은 상태로 배양한 것을 이용하였다. 양성 대조군

(Positive Control, PC)로서 TGF- β (10ng/ml)을 처리하였다. Procollagen의 발현을 평가하기 위하여 상기의 배양 방법으로 배양하여 얻은 배양액을 Procollagen Type I C-Peptide(PIP) EIA Kit (Cat #. MK101, Takara, Japan)를 이용하여 정량분석 하였다. 상층액을 이용하여 Kit에서 제공된 Coating된 96-well plate에 Primary antibody인 Anti-collagen antibody를 37°C에서 90분간 처리한 후, TPBS(0.1% Tween 20 in PBS)로 3회 세척하였다. Secondary antibody인 anti-mouse IgG(Whole mouse, alkaline phosphatase conjugated)를 90분간 반응시킨 후 TPBS로 3회 세척하였다. Alkaline phosphatase substrate solution (1 mg/mL *p*-nitrophenyl phosphate in diethanolamine buffer)을 상온에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4 iNOS 활성 저해 시험

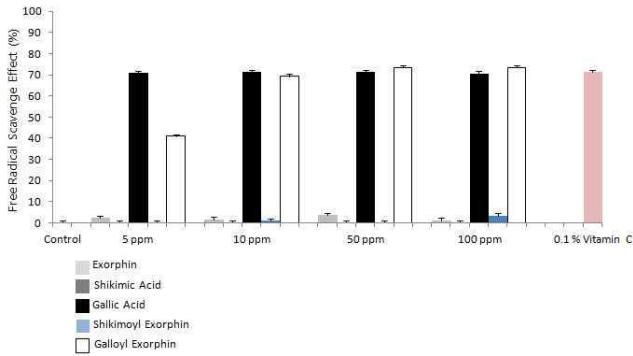
생쥐의 대식세포인 Raw264.7 세포를 이용하여 인위적으로 유발시킨 염증의 억제 효과를 알아보기 위하여, iNOS가 들어있지 않은 10% FBS-DMEM(Fetal Bovine Serum, 우태아혈청, Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO사) 배지에 1×10^5 세포를 현탁시켜 24 well plate에 접종하여 부착시켰다. 하루 후 본 발명에서 제조된 화장품 조성물을 농도별로 처리하여 18시간 배양한 후 1 μ g/ml의 Lipopolysaccharide (Sigma사)를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 상층액을 회수하여 96 well plate에 100 μ l씩 넣고 Griess reagent (Sigma사)을 동량 첨가하여 상온에서 10분간 가볍게 흔들어 주어 570 nm에서 흡광도를 측정했다. Sodium Nitrite를 표준품으로 하여 검량선을 작성하고 각 시료를 배양액 중의 Nitric Oxide의 생성량을 구하였다. Lipopolysaccharide를 처리한 군의 Nitric Oxide의 생성량을 100%로 하여 각 시료의 % 수득율을 구하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 항산화능(Anti-oxidation capacity) 비교

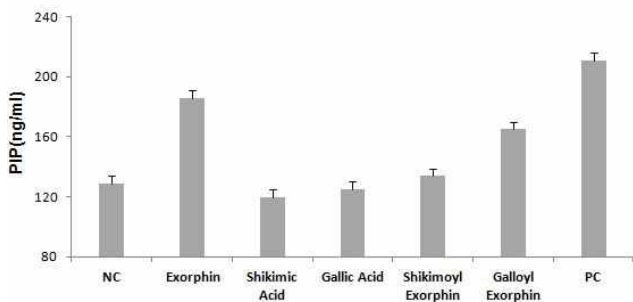
갈릭산의 경우, 5ppm의 낮은 농도에서도 자유라디칼 제거능이 70% 정도로 우수한 항산화능을 보였으며, Galloyl Exorphin 또한 10ppm 이상 농도에서 양성 대조군인 0.1% Vitamin C와 유사한 70% 정도의

자유라디칼 제거능을 보였다. 반면, 버퍼 용액인 음성대조군 및 Exorphin, 시키믹산, 및 Shikimoyl Exorphin의 경우는 자유라디칼 제거능이 거의 없음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 갈릭산에 펩타이드가 결합하더라도 항산화능이 유지된다는 것을 증명하며, 이렇게 갈릭산에 Exorphin 펩타이드가 결합되면 화장품 제형내 Stability가 훨씬 증가하여 갈릭산이 가진 제형 내 불안정성을 증대시킬 수 있다.



[그림 4] 피토케미칼 및 피토케미칼 융합 펩타이드 신소재의 항산화능 비교

3.2 콜라겐 합성능(Collagen synthesis capacity) 비교
갈릭산 및 시키믹산은 콜라겐 합성능은 보이지 않았다. Exorphin의 경우 TGF-β(10ng/ml)을 처리한 양성 대조군(PC)보다는 발현량은 낮지만, 유의적 수준으로 Type I 콜라겐 합성을 증가시킴을 알 수 있었다. 또한, 피토케미칼 융합 펩타이드 소재인 Galloyl Exorphin 또한 Type I 콜라겐 합성을 증진시키는 것으로 보아 Exorphin이 가지고 있는 콜라겐 합성능이 갈릭산이 결합하더라도 유지됨을 알 수 있었다.

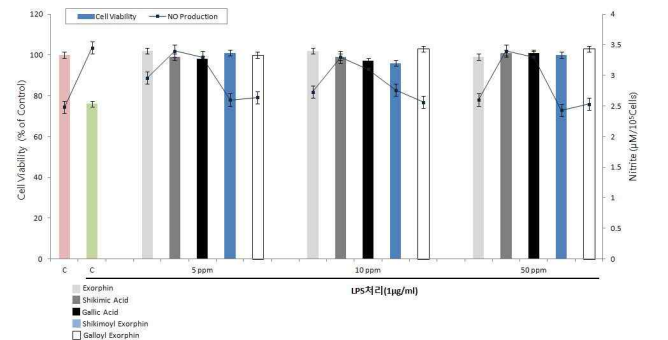


[그림 5] 피토케미칼 및 피토케미칼 융합 펩타이드 신소재의 콜라겐 합성능 비교

3.3 항염증(Anti-inflammation) 효능 비교

1 μg/ml의 Lipopolysaccharide (LPS) 를 처리하게 되면, 세포독성이 있어 일부 세포는 죽으며, 염증인자인 NO생성량이 증대됨을 음성 대조군 실험에서

알 수 있으며, 갈릭산 및 시키믹산 처리군보다 피토케미칼 융합 펩타이드 소재인 Galloyl Exorphin 및 Shikimoyl Exorphin 처리군에서 염증 유발과 관련된 NO합성을 줄이는 것을 나타내었다. 또한 NO합성을 줄이는 것은 5ppm, 10ppm, 50ppm 농도 의존적 유의성은 보이지 않았다. Shikimoyl Exorphin 및 Galloyl Exorphin은 NO 생성과 관련하여 5ppm 정도만 처리되더라도 유의적 결과를 보였으며, 이는 Shikimoyl Exorphin 및 Galloyl Exorphin 같은 피토케미칼 융합 펩타이드 소재가 우수한 항염 소재로 쓰일 수 있음을 의미한다.



[그림 6] 피토케미칼 및 피토케미칼 융합 펩타이드 신소재의 항염 효능 비교

4. 결론

효능이 우수한 피토케미칼의 화장품 제형 내 안정성은 펩타이드 결합으로 증대시킬 수 있으며, 피토케미칼 융합 펩타이드 소재인 Galloyl Exorphin 및 Shikimoyl Exorphin은 항노화와 관련된 항산화능, 콜라겐 합성능 및 항염증 효능이 우수한 소재임을 알 수 있었다. 앞으로 피토케미칼의 화장품 제형 내 안정성을 높이는 이러한 펩타이드 융합 신소재의 연구방향은 활발히 전개될 것으로 예상되며, 피토케미칼 융합 펩타이드 신소재는 안티에이징 화장품 분야 널리 쓰일 것으로 기대된다.

5. 사사

본 연구는 한국산업단지공단 현장맞춤형기술개발사업(2011)의 지원을 받아 수행되었습니다.

6. 참고문헌

[1] Yoshikawa M, Takahashi M, Yang S (2003) Delta opioid peptides derived from plant proteins. *Curr Pharm Des.* 9(16):1325-30. Review.