

발아 검은쌀 올리고펩타이드의 각질형성세포에서 Hyaluronan Synthase 발현과 피부 탄력 개선 효과

심관섭[†] · 이동환 · 김진화 · 이범천 · 안성관* · 최태부* · 표형배

한불화장품(주) 기술연구소, *건국대학교 생물화학공학부
(2006년 2월 1일 접수, 2006년 2월 10일 채택)

Sprouted Black Rice Oligopeptide Induces Expression of Hyaluronan Synthase in HaCaT Keratinocytes and Improves Skin Elasticity

Gwan Sub Sim[†], Dong Hwan Lee, Jin Hwa Kim, Bum Chun Lee, Sung Kwan Ahn*,
Tae Boo Choe*, and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics Co. Ltd., 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk 369-830, Korea

*Division of Chemical and Biological Engineering, Konkuk University

(Received February 1, 2006; Accepted February 10, 2006)

요약: 본 연구에서는 발아 검은쌀로부터 분리한 올리고펩타이드(Oligosproutin[®])의 피부 탄력 개선 효과에 대하여 연구하였다. 올리고펩타이드가 각질형성세포의 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 DNA microarray를 수행하였다. 각질형성세포에 올리고펩타이드를 처리하여 유전자의 발현이 2배 이상 증가하는 유전자는 745개이고, 2배 이상 감소하는 유전자는 1011개로 나타났다. 이 중 hyaluronan synthase 2 (HAS2)의 유전자 발현이 2배 이상 증가함을 확인하였다. 올리고펩타이드를 처리한 각질형성세포에서 세포활성 증가, HAS2 유전자 발현 증가, 세포내 항산화 효과를 확인하였다. 올리고펩타이드를 함유한 O/W 에멀전을 이용한 임상실험에서 피부의 탄력 개선 효과를 확인하였다. 본 연구를 통하여 발아 검은쌀로부터 분리한 올리고펩타이드는 피부 탄력 개선을 주는 항노화 화장품 개발에 응용될 수 있을 것이라 기대된다.

Abstract: In this study, the effect of oligopeptide (Oligosproutin[®]) from sprouted black rice was evaluated for possible improvement in skin elasticity. We examined the changes in gene expression on oligopeptide-treated HaCaT cells using DNA microarray analysis. As a result, oligopeptide treatment showed a differential expression ratio of more than 2-fold : 745 genes were activated and 1011 genes were repressed. One of the most interesting findings is a 2-fold increase in hyaluronan synthase 2 (HAS 2) gene expression by oligopeptide. We also found that oligopeptide increased cell proliferation, HAS2 mRNA expression and intracellular ROS scavenging activity in HaCaT cells. A human clinical study which oil-in-water emulsion with oligopeptide was topically applied showed significant increase in skin elasticity. These results suggest that the sprouted black rice oligopeptide (Oligosproutin[®]) can be effective anti-aging ingredient for cosmetics.

Keywords: sprouted black rice, microarray, oligopeptide, hyaluronan synthase, elasticity

1. 서 론

펩타이드는 단백질을 형성하여 생체를 구성하고, 생명 활동을 유지하며, 특히 생체 내 제어 및 정보 전달에 중요한 역할을 담당하여, 생체 내 조절 작용에 90% 정도의 조절 요인들로 작용하고 있다. 이들 생체기능 조절 펩타이드는 생체 내에서 호르몬, 세포증식, 혈압조절, 신경전

달, 항생작용 등의 다양한 생물 활성을 가진다. 펩타이드의 다양하고 강력한 생물 활성에 주목하여 최근, 다양한 분야에서 급속한 발전을 거듭하고 있는 생명과학을 응용한 고부가가치 생물소재의 하나로 기능성 펩타이드에 대한 관심과 개발 노력이 집중되고 있으며 이러한 펩타이드를 화장품 소재로 응용하고자 화장품 원료로의 개발이 증가되고 있다.

식물의 종자는 발아의 과정에서 다양한 생명 활성을 나타내는데, 우선 발아 과정과 이후의 생명 활동에 영양

[†] 주 저자 (e-mail: gssim@hanbul.co.kr)

을 공급하기 위해 단백질을 포함한 각종 영양 성분이 분해되기 시작하며, 각종 효소 및 비타민, 미네랄 등이 다량 생성된다. 현미를 싹 틔운 발아 현미 성분에는 감마 오리지놀, 비타민, 아미노산, 지방산, 식이섬유 등이 증가하며 특히, 감마 오리지놀의 경우, 발아의 과정에서 현미 100 g 당 295 mg이나 생성되는 것으로 보고되고 있다. 최근 연구에 의하면 검은 쌀은 백미보다 단백질과 지방, 비타민 B₁, B₂, E, 무기질, 인, 철, 칼슘이 풍부하여 아미노산이 많고, 특히 lysine이 백미보다 훨씬 많이 함유되어 있어, 노화를 방지하며, 셀레늄(Se)의 함량이 높아 암의 예방에서도 효과가 있다고 보고되고 있다[1].

포유류의 체내에 존재하는 hyaluronan의 50% 이상이 피부, 특히 표피의 세포 간 간격과 진피의 결합 조직에 분포한다고 보고되었고, 이러한 hyaluronan는 주로 표피 각질 형성세포와 진피 섬유아세포에 의해 합성되는 것으로 알려져 있다. 인체 피부에서의 hyaluronan 양은 노화와 함께 감소되는 것으로 피부 탄력 저하 및 수분 함유량 감소의 직접적인 원인 중 하나라고 여겨지고 있다[2-4]. 피부 세포 배양 상태에서의 hyaluronan의 합성은 여러 종류의 성장인자와 trans-retinoic acid, N-methyl-L-serine 등에 의해 증가된다는 보고[5-10]와 피부에 도포된 여성 호르몬(estradiol) 및 그 유사물질이 hyaluronan의 합성을 증가시킨다는 보고[11-13]가 있으나, hyaluronan 대사에 대한 자세한 기작은 아직까지 밝혀지지 않았으며, hyaluronan의 합성은 세포막의 안쪽 표면에서 hyaluronan synthase에 의해 진행되며, 합성되는 동안 세포막을 뚫고 나와 세포외 기질에 축적되는 것으로 알려졌다[14].

본 연구에서는 발아 검은 쌀에서 분리한 올리고펩타이드를 사람 각질형성세포에 처리하여 유전자 발현에 미치는 영향을 DNA microarray를 수행하여 살펴본 결과 hyaluronan synthase 2 유전자 발현이 증가함을 확인하였다. 또한 각질형성세포에서 올리고펩타이드를 처리 시에는 세포활성이 증가하고, 세포내 활성산소를 소거하는 효과를 나타냈으며, 임상실험에서는 올리고펩타이드를 함유한 O/W에멀전을 피부에 도포하여 피부 탄력의 개선효과를 확인하였으며 향후 항노화 화장품 개발에 응용될 수 있을 것이라 기대된다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 발아 검은 쌀로부터 올리고펩타이드(Oligosproutin[®]) 제조 방법

발아 검은 쌀로부터 올리고펩타이드를 제조하기 위하여 검은 쌀에 적정 수분을 가하고 30°C의 온도조건에서 발아시켰다. 발아된 검은 쌀을 마쇄하고 음건한 후 papain (30,000 usp-U/mg, Merck)을 처리하여 가수분해하였다.

가수분해물은 한외여과막 장치(ultrafiltration membrane system, Millipore Co. Bedford, USA)를 사용하여 분자량이 1 kDa 이하의 가수분해물을 감압 농축하였다. 발아된 검은 쌀의 펩타이드 분자량은 gel permeation chromatography (GPC)를 이용하여 측정하였으며, 이동상을 초순수 용액으로 평형시킨 Shodex OHPak KB-804 column (0.8 × 30 cm, Showa Denko K.K., Tokyo, Japan)을 이용하였으며, photo detector array (PDA)를 이용하여 210 nm에서 측정하였다. 분자량은 5종의 펩타이드 standard marker의 용출 부피를 도시하여 얻은 표준곡선으로부터 결정하였다. 이때 standard marker는 angiotensin II acetate (octapeptide, M.W. 1,046), methionine enkephalin Acetate (pentapeptide, M.W. 574), leucine enkephalin (pentapeptide, M.W. 556), Val-Tyr-Val (M.W. 380), Gly-Tyr (M.W. 238)를 사용하였다.

2.2. 세포 배양

본 연구에 사용한 HaCaT 사람 각질형성 세포주는 dulbeccos modification of eagles medium (DMEM, BioWhittaker, MD, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, BioWhittaker, MD, USA), 1% penicillin-streptomycin (BioWhittaker, MD USA)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하고 trypsinization으로 계대 배양한 뒤 세포를 실험에 이용하였다.

2.3. 세포 활성 측정

세포 활성 측정은 mosmann[15]의 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 방법을 변형하여 실시하였다. HaCaT 세포주를 4 × 10⁴ cells/well 농도로 48-well plate의 well에 시료를 처리하여 CO₂ 배양기에서 48 h 배양하였다. MTT 용액(5 µg/mL)을 첨가하고 4 h 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 100 µL acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 565 nm에서 microplate reader (Model ELX 800, BIO-TEK Instruments Inc., USA)로 흡광도를 측정하였다.

2.4. RNA 준비

Total RNA추출은 RNeasy mini kit (Qiagen, Maryland, USA)을 이용하였고, RNA의 순도를 확인하기 위하여 2,100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 28S rRNA와 18S rRNA를 확인하였다.

2.5. Microarray Analysis

18,000개 이상의 유전자를 함유한 human 1A oligo

microarray (Agilent Technologies, Palo alto, CA. USA) slide를 이용하였다. 2 μg 의 total RNA를 amino allyl messangeamp RNA kit (Ambion, Inc. TX, USA)으로 labeling하고 labeled cRNA 10 μg 을 60°C에서 hybridization하였다. Microarray chip slide을 6 X SSPE, 0.005% N-Lauroyl sarcosine 용액으로 세척한 후, 다시 0.06 X SSPE, 0.005% N-Lauroyl sarcosine 용액으로 1 min간 세척 후 700 rpm에서 5 min간 원심분리 하였다. Microarray의 결과는 Axon Scanner GenePix 4000B (Axon Instruments, Inc. CA, USA)를 이용하여 스캔하고 GenePix Pro 3.0 (Axon Instruments, Inc. CA, USA)을 이용하여 분석하였다.

2.6. Semiquantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

cDNA합성은 1 μg 의 total RNA를 oligo (dT)15 primer, dNTP (0.5 μM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 4 unit Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany)로 37°C에서 60 min, 93°C에서 5 min heating 시킴으로써 반응을 중지시켰다. PCR은 cDNA로부터 HAS1, 2, 3, GAPDH를 증폭하기 위하여 1 μL cDNA, 0.5 μM 의 5'과 3'primer, 10 X buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 200 μM dNTP, 25 mM MgCl₂, 2.5 unit Taq polymerase (Qiagen, Hilden, Germany)를 섞고 distilled water로 전체를 25 μL 로 맞추는 다음 PCR을 실시하였다. PCR증폭은 94°C 0.5 min, 50°C 0.5 min, 72°C 1 min, 26~30 cycles로 반응시켰다. PCR에 의하여 생성된 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 HAS1, 2, 3, GAPDH 유전자의 발현을 image analyzer (BIS303PC, DNR Imaging Systems Ltd, UK)로 확인하였으며, 각 band의 density는 densitometric program (NIH Image software, Maryland, USA)을 이용하였다. 각 유전자의 서열은 Table 1에 나타내었다.

2.7. 세포내 자유라디칼 소거 효과

HaCaT 세포주를 96 well plate에 1×10^5 cells/mL로 분주하여 약 80%의 confluency에 도달할 때까지 배양한다. 자외선(UVB) 조사 전에 배양 배지를 제거한 후 HEPES-buffered control salt solution (HCSS : 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂, 2.3 mM CaCl₂, 15 mM Glucose, 20 mM HEPES, 10 mM NaOH)로 세척하였다. HCSS에 0.1% Pluronic F-127 (Molecular Probe)을 혼합한 후 4 μM 5-(6-chloromethyl)-2', 7'-dichloro-dihydrofluoresceindiacetate (CM-H₂DCFDA, Molecular Probe, Eugene, OR, USA)를 처리하고 시료를 농도 별로 처리하였다. 37°C에서 반응 후 20 mJ/cm² UVB를 조사 후 Lumin-

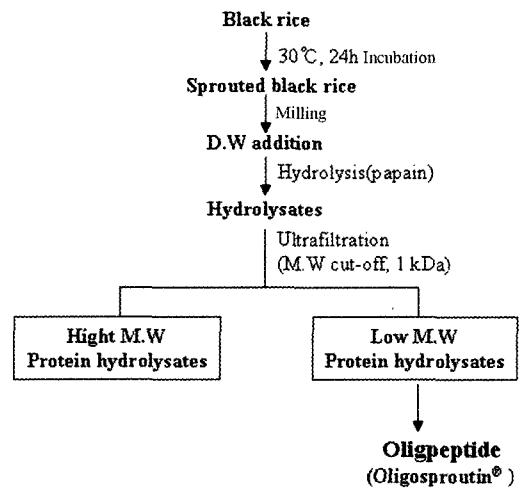


Figure 1. Separation procedure for oligopeptide (from sprouted black rice).

escence spectrophotometer (Perkin Elmer, UK)를 사용하여 DCF (Ex: 488 nm, Em: 525 nm)에 의한 세포내 형광 값을 측정하였다[16,17].

2.8. 피부 탄력 개선 효과

연구대상은 건강한 30 ~ 40대 성인 남녀 10명을 대상으로 하였다. 시험 초기(baseline), 2주, 4주, 6주에 항온 항습실(온도 20 ~ 22°C, 상대습도 40 ~ 60%)에서 피검자는 세안 후 1 h 동안 피부를 안정화한 다음 측정을 수행하였다. 피부의 탄력도는 Cutometer SEM 474(Courage + Khazaka, Germany)로 눈가(crow's feet) 부위를 측정하였으며, 측정 시 음압은 500 mbar, 흡입 시간은 2 sec, 반복 측정 횟수는 5회로 측정하여 평균 수치를 이용하였다. 탄력개선효과 결과 분석은 Cutometer의 측정 매개변수 중 피부점탄성(Uv/Ue)과 탄력회복력(Ur/Uf)을 이용하여 측정, 분석하였다.

2.9. 자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 하였으며 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 발아 검은 쌀로부터의(Oligosproutin®) 제조

발아 검은 쌀로부터 올리고펩타이드를 제조하기 위하여 papain을 이용하여 가수분해하고 환외여과막 장치를 통하여 올리고펩타이드 얻었다(Figure 1). 수득한 올리고펩타이드의 분자량은 GPC를 통해 확인하였다. 시료를 동

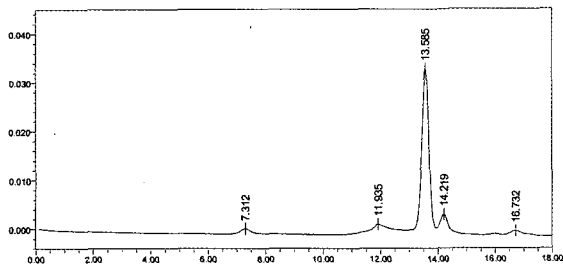


Figure 2. Gel permeation chromatography analysis of the oligopeptide (Oligosproutin[®]).

결 건조하고 0.5 g/mL로 용해하여 Sephadex G-15 column (2.5 × 50 cm)에 1 mL 주입한 후, 상온에서 20 mL/h의 유속으로 전개하고 3 mL 씩 분취하였다. 그 결과, elution volume이 약 80, 180, 200, 320 및 400 mL 부근에서 5개의 분획을 확인할 수 있었으며, 5개의 분획 중 standard marker 펩타이드의 elution volume (data not shown)을 기준으로 약 850 daltons 정도의 분자량을 가지는 펩타이드인 올리고펩타이드(Oligosproutin[®])를 얻었다(Figure 2).

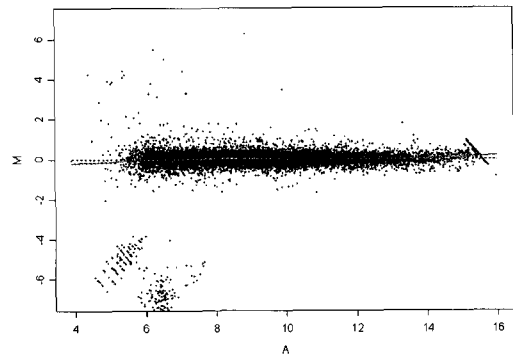
3.2. 세포 활성화

발아 검은 쌀로부터 수득한 Oligosproutin[®]이 피부구형 세포인 HaCaT 세포주의 세포활성에 미치는 영향을 알아보고자 Oligosproutin[®]을 HaCaT 세포주에 처리하여 세포 활성을 측정된 결과 무처리군에 비하여 배양 24 h에서는 5 mg/mL 농도에서 21%의 세포활성 증가를 나타내었으며, 배양 48 h에서는 5 mg/mL 농도에서 41%로 가장 우수한 세포활성 증가를 나타내었다(Figure 3).

3.3. Microarray 결과 해석

발아 검은 쌀로부터 수득한 Oligosproutin[®]이 피부 각질 형성세포인 HaCaT 세포주의 유전자 발현에 미치는 영향

(a)



(b)

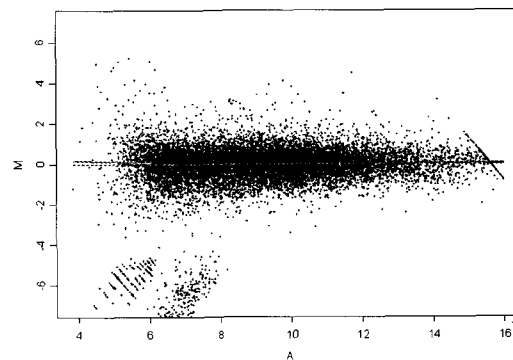


Figure 3. Cell proliferation effect of Oligosproutin[®] on HaCaT cells. The cell proliferation was determined by the MTT assay. The results are expressed as the percentage of the control and values represent the mean ± S.E. from 3 separate experiments.

을 알아보기 5 mg/mL 농도의 Oligosproutin[®]을 HaCaT 세포주에 처리하고 0, 24, 48 h 배양 후 RNA를 분리하여 microarray를 실시하였다. Microarray를 실시한 24 h,

Table 1. Sequences of Primers and Fragment Sizes of the Investigated Genes in RT-PCR Analysis

Gene		Sequence	Fragment size
HAS1	Forward	5'-GAC TCC TGG GTC AGC TTC CTA AG-3'	453 bp
	Reverse	5'-GTA GAA CAG ACG CAG CAC AG-3'	
HAS2	Forward	5'-GCT ACC AGT TTA TCC AAA CG-3'	393 bp
	Reverse	5'-GTG ACT CAT CTG TCT CAC CG-3'	
HAS3	Forward	5'-GAG GAC TGG TAC CAT CAG AA-3'	498 bp
	Reverse	5'-GCC AGA TTT GTT GAT GGT AGC-3'	
GAPDH	Forward	5'-ATT GTT GCC ATC AAT GAC CC-3'	546 bp
	Reverse	5'-AGT AGA GGC AGG GAT GAT GT-3'	

Table 2. Genes Up-Regulated by Oligosproutin® in HaCaT Cells

Gene name	GenBank no.	Fold change	
		24 h	48 h
Cell cycle			
Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53	NM_002392	2.21	3.39
Histone deacetylase 5	NM_005474	1.45	2.89
Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	NM_005356	2.14	2.11
Cellular physiological process			
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d isoform 2	NM_152565	1.99	8.17
Arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type	NM_001139	2.00	6.96
Superoxide dismutase 2, mitochondrial	NM_000636	1.91	4.14
Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	NM_000499	1.54	4.14
Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2	NM_016113	1.75	3.41
Activating transcription factor 3	NM_004024	1.54	3.25
Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 4	NM_002974	2.57	2.75
Arachidonate lipoxygenase 3	NM_021628	1.53	2.75
Ferritin, heavy polypeptide 1	NM_002032	1.85	2.57
Cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 8	NM_007253	1.58	2.11
Immune response			
Guanylate binding protein 2, interferon-inducible	NM_004120	1.42	3.41
Immunoglobulin lambda constant 1 (Mcg marker)	BC015833	1.87	3.12
Lymphocyte antigen 96	NM_015364	2.03	3.07
Signal transduction			
Growth differentiation factor 15	NM_004864	1.34	22.16
Defensin, beta 4	NM_004942	3.39	4.56
G protein-coupled receptor 45	NM_007227	1.57	2.48
Growth factor receptor-bound protein 10	AF000018	1.61	2.23
Interleukin 1 receptor-like 1	NM_016232	3.12	1.97
Melatonin receptor 1B	NM_005959	18.51	1.85
Others			
Thioredoxin interacting protein	NM_006472	10.78	17.15
Hypothetical protein BC012317	NM_138397	1.82	10.70
Interleukin 23, alpha subunit p19	NM_016584	1.78	10.41
Stress 70 protein chaperone, microsome-associated, 60kDa	NM_006948	1.30	7.73
S100 calcium binding protein P	NM_005980	2.08	5.90
Small proline-rich protein 1A	NM_005987	3.39	3.16
Brain-enriched guanylate kinase-associated protein	NM_020836	4.41	3.32
Interferon stimulated gene 20kDa	NM_002201	1.93	3.23
Hyaluronan synthase 2	NM_005328	3.45	3.17
Insulin growth factor-like family member 1	NM_198541	1.45	2.51
Keratinocyte associated protein 3	AY358993	1.44	2.03
Interleukin 13 receptor	NM_000640	3.36	1.58

48 h 배양한 Oligosproutin®의 signal intensity와 expression ratio는 Figure 4에 MA plot으로 나타내었다. HaCaT 세포주에서 Oligosproutin®을 처리하고 24 h 배양한 경우 보다 48 h 배양하였을 경우 유전자의 발현 증가 폭이 더 커짐을 확인할 수 있었다. HaCaT 세포주에서 Oligosproutin®을 처리하고 24 h 배양한 경우 유전자의 발현이 2배 이상 증가하는 유전자는 76개였으며, 2배 이

상 감소하는 유전자는 42개였다. 48 h의 경우에는 2배 이상 증가하는 유전자가 745개이고 2배 이상 감소하는 유전자는 1011개로 나타났다. 다양한 변화를 나타내는 유전자들을 세포고사(apoptosis), 세포주기(cell cycle), 세포의 생리적 과정(cellular physiological process), 면역반응(immune response), 스트레스 반응(response to stress), 신호전달(signal transduction) 등으로 분류하여 나타내었

Table 3. Genes Down-Regulated by Oligosproutin[®] in HaCaT Cells

Gene name	GenBank no.	Fold change	
		24 h	48 h
Cell cycle			
Asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated	NM_018136	-1.45	-4.53
M-phase phosphoprotein 1	NM_016195	-1.41	-3.61
PMS1 postmeiotic segregation increased 1	NM_000534	-1.48	-3.39
Chromosome condensation protein G	NM_022346	-1.42	-3.32
Cellular physiological process			
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	NM_001511	-1.47	-9.00
Clathrin, heavy polypeptide-like 1	NM_001835	-1.60	-5.31
Splicing factor, arginine/serine-rich 5	NM_006925	-1.44	-4.59
Hypothetical zinc finger protein FLJ14011	NM_022103	-1.49	-4.50
Zinc finger and SCAN domain containing 5	NM_024303	-1.71	-4.38
Solute carrier organic anion transporter family, member 3A1	AK130644	-1.54	-3.68
Ubiquitin specific protease 13 (isopeptidase T-3)	NM_003940	-1.73	-3.53
Fanconi anemia, complementation group A	NM_000135	-1.40	-3.34
Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 2	NM_005390	-1.43	-3.32
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	NM_002130	-3.20	-3.25
Hypothetical protein dJ12208.2	NM_020466	-1.51	-3.20
Distal-less homeo box 3	NM_005220	-2.11	-2.31
Immune response			
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	NM_002089	-2.16	-8.17
Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	NM_002090	-2.10	-3.07
Signal transduction			
Phosphoinositide-3-kinase, class 2, gamma polypeptide	NM_004570	-1.65	-2.01
Others			
Hypothetical protein FLJ14397	NM_032779	-1.73	-12.47
Fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)	NM_004960	-1.46	-5.46
SLIT and NTRK-like family, member 6	NM_032229	-1.45	-5.13
Serum deprivation response (phosphatidylserine binding protein)	NM_004657	-1.42	-3.61
Hypothetical protein FLJ25414	NM_152343	-1.60	-3.23
Epsin 3	NM_017957	-1.59	-3.05
DNA glycosylase hFPG2	NM_018248	-1.56	-2.95
FLJ38822 protein	NM_207398	-1.48	-2.91
Kinesin family member 20A	NM_005733	-1.35	-2.91

다(Table 1, 2).

3.4. Hyaluronan Synthase 유전자 발현에 미치는 영향

Microarray를 통하여 Oligosproutin[®]가 HaCaT 세포주에서 HAS2의 발현을 증가시킴을 주목하고 이에 대한 재확인을 하고자 RT-PCR을 이용하여 HAS mRNA 발현을 하였다. HAS는 세포의 기질의 주요 성분 중 하나인 hyaluronan을 합성하는 효소로 알려져 있다. Hyaluronan은 표피의 세포간 간격과 진피의 결합 조직에 분포하며, 주로 표피 각질 형성세포와 진피 섬유아세포에 의해 합성

되는 것으로 알려져 있다. 인체 피부에서의 hyaluronan 양은 노화와 함께 감소되는 것으로 피부 탄력 저하 및 수분 함유량 감소의 직접적인 원인 중 하나라고 여겨지고 있다.

HaCaT 세포주에 Oligosproutin[®]을 처리하고 24 h, 48 h 배양후 HAS2 mRNA 발현을 RT-PCR로 확인한 결과 HAS2 mRNA 발현이 각각 2.8배, 2.6배 증가하였다 (Figure 5(a)). 또한, HaCaT 세포주에서 Oligosproutin[®]가 HAS1, HAS2, HAS3 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아 보고자 RT-PCR을 수행한 결과 HAS1, HAS3 mRNA 발

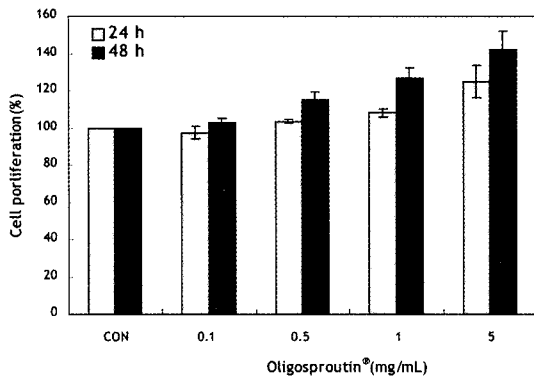
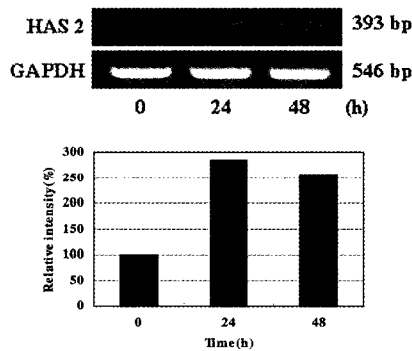


Figure 4. MA-plots (M, expression ratio; A, Signal intensity) represent genes activated and repressed by Oligosproutin® in HaCaT cells. The MA-plot is used to represent the (R,G) data (R, red for Cy5; G, green for Cy3) where $M = \log_2 R/G$ and $A = \log_2 (R \times G)$. (A) Oligosproutin® treatment/24-h, (B) Oligosproutin® treatment/48-h.

(a)



(b)

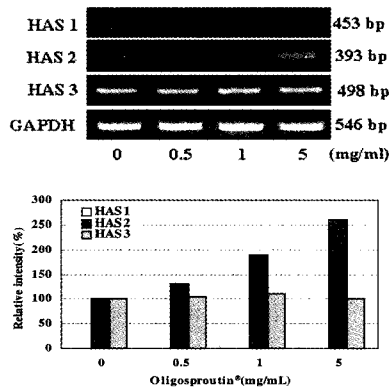


Figure 5. Further confirmation of microarray data by semi-quantitative RT-PCR. HaCaT cells were treated with the 5 mg/mL Oligosproutin® for indicated time periods (a). The different regulation of hyaluronan synthase 1, hyaluronan synthase 2 and hyaluronan synthase 3 transcripts by oligopeptide were examined in HaCaT cells (b).

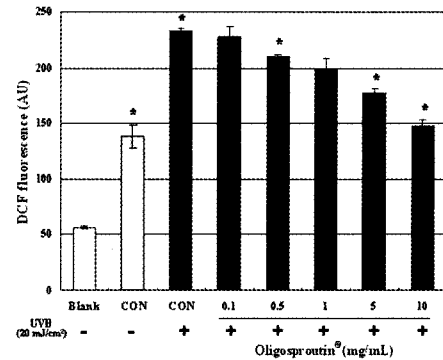


Figure 6. Effect of Oligosproutin® on the production of intracellular ROS in HaCaT cells. HaCaT cells were incubated with 4 μ M CM-H₂DCFDA for 20 min, and irradiated by UVB 20 mJ/cm². Various concentrations of Oligosproutin® were treated directly. ROS generation was assessed by luminescence spectrophotometer. The values of DCF fluorescence is significant (**p* < 0.05) and the values are mean \pm S.E. from 5 individual experiments.

현에는 영향을 나타내지 않았으며, HAS2 mRNA 발현은 Oligosproutin® 처리 농도별로 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 5(b)).

3.5. 세포내 항산화 효과

DCFH의 산화로 생성된 DCF의 형광값을 측정하는 실험으로 세포내에 생성된 산화적 스트레스를 실험하였다. DCFH는 hydroxyl radical, nitrogen oxide radical (NO·), thiyl radical, bicarbonate radical anion 등에 의해 산화된다. DCFH는 세포고사 동안 세포내 산화적 스트레스를 평가하는데 사용되어져 왔으며, H₂O₂나 자외선에 의해 생성된 라디칼 및 세포내 신호전달과 관련된 연구에 최근 사용되고 있다[19]. 형광 분광광도계를 이용하여 세포가 well plate에 부착되어 살아있는 상태에서의 형광값을 측정하는 결과, HaCaT 세포주를 배양함으로써 세포자체의 생리작용에 의한 기본적인 형광값과 비교하여 자외선(UVB 20 mJ/cm²) 조사 결과 약 1.8배 정도 증가함을 알 수 있었다. 이 조건에서 Oligosproutin®을 농도 별로 처리한 결과 자외선에 의해 높아졌던 형광값이 농도 의존적으로 다시 감소하였으며, 10 mg/mL 농도로 처리시 48%의 프리라디칼 소거효과를 나타내었다(Figure 6).

3.6. 피부 탄력도 측정 결과

피부의 탄력개선 효과를 평가하기 위하여 발아 검은쌀로부터 수득한 Oligosproutin®이 5% 첨가된 O/W에멀전을 이용하여 피부의 탄력도를 측정하는 결과 Figure 7(a)

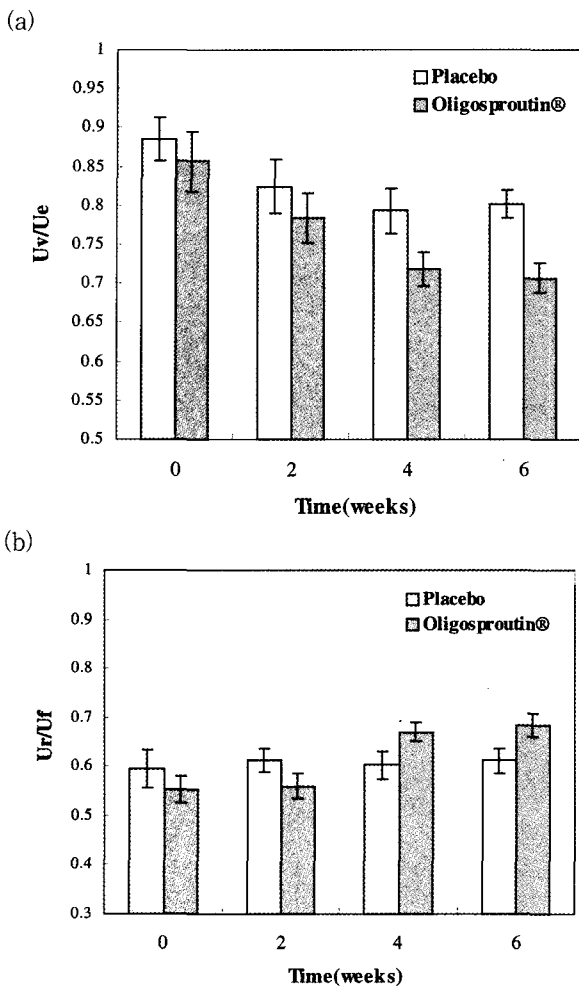


Figure 7. The effect of Oligosproutin® on skin elasticity. Uv/Ue, ratio between delayed distension and immediate distension. Ur/Uf, ratio between immediate reaction and final distension.

에 나타난 피부 점탄성을 나타내는 Uv/Ue 측정 시 Oligosproutin®를 첨가한 제품을 도포한 결과 도포 시간이 지날수록 측정값이 낮아져 탄력이 개선되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 피부의 탄력 회복력(Ur/Uf)을 Figure 7(b)에 나타난 것과 같이 도포 6주 후 탄력회복력이 개선되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, Oligosproutin®는 피부에 도포 시 피부점탄성 및 탄력회복력 개선효과가 우수한 것으로 나타났다.

4. 결 론

본 연구에서는 발아 검은 쌀로부터 분리한 올리고펩타이드(Oligosproutin®)를 이용 DNA microarray를 수행하

여 각질형성세포의 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보고, 세포활성, HAS 유전자 발현, 세포내 항산화 효과와 피부 탄력 개선 효과를 관찰하였다. 발아 검은 쌀에서 분리한 Oligosproutin®의 DNA microarray 결과 다양한 유전자 변화가 나타났으며, 이중 HAS2 유전자 발현이 증가함을 확인하였다. HaCaT 세포주에서 Oligosproutin®를 처리시 세포활성 41% 증가하였고, RT-PCR을 통한 HAS mRNA 발현에서는 HAS2 mRNA 유전자가 2.8 배 증가함을 확인하였다. 또한 세포내 항산화 효과를 측정할 결과 약 50%의 세포내 프리라디칼 소거 효과를 나타내었다. Oligosproutin®를 5% 함유한 O/W 에멀전을 이용한 임상시험에서는 피부 점탄성 및 탄력회복력 개선효과가 우수하게 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 발아 검은 쌀로부터 분리한 Oligosproutin®는 피부 탄력 개선을 주는 항노화 화장품 개발에 응용될 수 있을 것이라 기대된다.

참 고 문 헌

1. J. S. Kum, B. K. Chio, H. Y. Lee, J. D. Park, and H. J. Park, Physicochemical properties of germinated brown rice, *Korean J. Food Preserv.*, **11**, 182 (2004).
2. R. Fleischmajer, J. S. Perlish, and R. I. Bashey, Human dermal glycosaminoglycans and aging, *Biochem. Biophys. Acta.*, **279**, 265 (1972).
3. M. O. Longas, C. S. Russell, and X. Y. He, Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging, *Carbohydr. Res.*, **159**, 127 (1987).
4. I. Gheretich, T. Lotti, G. Campanile, C. Grappone, and G. Dini, Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging, *Int. J. Dermatol.*, **33**, 119 (1994).
5. P. Heldin, T. C. Laurent, and C. H. Heldin, Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts, *Biochem. J.*, **258**, 919 (1989).
6. P. Heldin, T. Asplund, D. Ytterbeg, S. Thelin, and T. C. Laurent, Characterization of the molecular mechanism involved in the activation of hyaluronan synthetase by platelet-derived growth factor in human mesothelial cells, *Biochem. J.*, **283**, 165 (1992).
7. M. Suzuki, T. Asplund, H. Yamashita, C. H. Heldin, and P. Heldin, Stimulation of hyaluronan biosynthesis by platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor- β 1 involves activation of protein kinase C, *Biochem. J.*, **307**, 817 (1995).

8. E. Tirone, C. D. Alessandris, V. C. Hascall, G. Siracusa, and A. Salustri, Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulation hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming factor- β 1), *J. Biol. Chem.*, **272**, 4787 (1997).
9. R. Tammi, J. A. Ripellino, R. U. Margolis, H. I. Maibach, and M. Tammi, Hyaluronate accumulation in human epidermis treated with retinoic acid in skin organ culture, *J. Invest. Dermatol.*, **92**, 326 (1989).
10. H. Akiyama, M. Saito, G. Qiu, T. Toida, and T. Imanari, Analytical studies on hyaluronic acid synthesis by normal human epidermal keratinocytes cultured in a serum-free medium, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 361 (1994).
11. H. Sobel and R. A. Cohen, Effect of estradiol on hyaluronic acid in the skin of aging mice, *Steroids*, **16**, 1 (1970).
12. J. P. Bentley, R. M. Brenner, A. D. Linstedt, N. B. West, K. S. Carlisle, B. C. Rokosova, and N. MacDonald, Increased hyaluronate and collagen biosynthesis and fibroblast estrogen receptors in macaque sex skin, *J. Invest. Dermatol.*, **87**, 668 (1986).
13. K. Miyazaki, T. Hanamizu, R. Iizuka, and K. Chiba, Genistein and daidzein stimulate hyaluronic acid production in transformed human keratinocyte culture and hairless mouse skin, *Skin Pharmacol, Appl. Skin Physiol.*, **15**, 175 (2002).
14. P. H. Weigel, V. C. Hascall, and M. Tammi, Hyaluronan synthase, *J. Biol. Chem.*, **272**, 13997 (1997).
15. J. P. Pienimaki, K. Rilla, C. Fulop, R. K. Sironen, S. Karvinen, S. Pasonen, M. J. Lammi, R. Tammi, and V. C. Hascall, Epidermal growth factor activates hyaluronan synthase 2 in epidermal keratinocytes and increases pericellular and intracellular hyaluronan, *J. Biol. Chem.*, **276**, 20428 (2001).
16. Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. methods*, **65**, 55 (1983).
17. S. Y. Seo, E. Y. Kim, H. Kim, and B. J. Gwang, Neuroprotective effect of high glucose againsts NMDA, free radical and oxygen-glucose deprivation through enhanced mitochondrial potentials, *J. Neurosci*, **19**, 8849 (1999).
18. I. D. Trayner, A. P. Rayner, G. E. Freeamn, and E. Farzaneh, Quantitative multiwell myeloid differentiation assay using dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) or dihydrorhodamine 123 (H₂R123), *J. Immunol. Methods*, **186**, 275 (1995).
19. Y. Tampo, S. Kotamraju, C. R. Chitambar, S. V. Kalivendi, A. Keszler, J. Joseph, and B. Kalyanaraman, Oxidative stress-induced iron signaling is responsible for peroxide-dependent oxidation of dichlorodihydrofluorescein in endothelial cells, *Circ. Res.*, **92**, 56 (2003).