

## 불가사리 유래 콜라겐 펩타이드의 피부 면역 증진 효과

정향숙<sup>1</sup> · 권민철<sup>1</sup> · 한재건<sup>1</sup> · 하지혜<sup>1</sup> · 김 령<sup>1</sup> · 김진철<sup>1</sup> · 곽형근<sup>2</sup> · 황보영<sup>2</sup> · 이현용<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 BT특성화학부대학 생물소재공학과, <sup>2</sup>(주)SKY007, <sup>3</sup>강원대학교 생명공학연구소

### Enhancement of Skin Immune Activation Effect of Collagen Peptides Isolated from *Asterias amurensis*

Hyang Suk Jeong<sup>1</sup>, Min Chul Kwon<sup>1</sup>, Jae Gun Han<sup>1</sup>, Ji Hye Ha<sup>1</sup>, Ling Jin<sup>1</sup>, Jin Chul Kim<sup>1</sup>,  
Hyeong Geun Kwak<sup>2</sup>, Bo Young Hwang<sup>2</sup>, and Hyeon Yong Lee<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomaterials Engineering, College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University  
<sup>2</sup>SKY007 Co.

<sup>3</sup>Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University

**Abstract** Low molecular peptides were isolated from *Asterias amurensis* via SDS-PAGE. The peptides were separated via consecutive gel filtration as five fractions (F1-F5) according to molecular weights, based on the results of MALDI-TOF MS analysis. The molecular weight of the most active peptide was estimated as 15,000 daltons. The peptide showed cytotoxicity on normal human fibroblast cells at levels as low as 20% when 1.0 mg/mL of the samples was added. The peptide also exhibited higher levels of nitric oxide production from macrophages than the lipopolysaccharides. It was determined that prostaglandin E<sub>2</sub> production was significantly inhibited, up to 127.8% as compared to the control. The low molecular peptide inhibited hyaluronidase activity as 535.7 µg/mL of IC<sub>50</sub>. It can be concluded that the relatively low molecular weight peptide, fucoidan, from *A. amurensis* has excellent cosmetic and immunomodulatory activities, which can be considered as a possible resource of new cosmetic agents for skin immunomodulation.

**Key words:** *Asterias amurensis*, low molecular peptide, collagen, prostaglandin E<sub>2</sub>, hyaluronidase, skin immunomodulation

## 서 론

불가사리는 극피 동물문에 속하는 해양 저서생물로서 전 세계에 1,700여종이 보고되어 있으며 우리나라 근해에도 200여종이 서식하고 있다. 특히, 이들 중에 아무르 불가사리(*Asterias amurensis*)는 전복, 바지락, 피조개, 가리비 등 패류를 그 먹이로 하고 있어 패류 양식 산업에 큰 피해를 주고 있으며, 최근 우리나라에서는 불가사리 대량 번식으로 인해 해양생태계가 파괴될 위험에 처해있다(1). 이에 해양수산부에서는 해양생태계 파괴의 주요 원인이 되고 있는 불가사리의 구제사업과 더불어 불가사리를 산업에 이용하기 위한 방안으로 관주시비 및 사료(2), 폐수 중의 중금속 처리(3) 및 생리활성 물질(4)로의 이용, 칼슘활용 기술 개발(5) 등 산업적 활용을 위한 연구를 진행하고 있다.

불가사리가 속한 극피동물문은 통상 골편과 몸통 부위로 나누어볼 수 있는데 이들의 활성성분이 규산과 탄산칼슘으로 이루어진 골편보다는 몸통에 있을 것으로 기대됨에 따라, 최근 이로부터 얻어지는 펩타이드 정제(6) 등에 대한 연구가 진행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 불가사리를 이용한 산업적 활용의 일환으로 불가사리 체벽에 함유되어 있는 펩타이드가 가지는 활성을 탐색하고자 한다.

생리활성 펩타이드는 구조와 활성이 다양하고, 유전공학 기술을 통한 생산 및 개조가 가능할 뿐 아니라, 높은 안전성을 기대할 수 있어 최근 다양한 분야에서 새로운 활용소재로 주목받고 있다(7). 생리활성으로는 opioid agonist 또는 antagonist, angiotensin I-converting enzyme 저해, 면역조절, 항균, 항혈전, 지질산화억제, 미네랄 결합 활성 등이 보고된 바 있으며, 1970년대부터는 우유, 대두, 어류 근육, 밀 등으로부터 얻을 수 있는 각종 식품 단백질로부터 다양한 생리활성 펩타이드들이 생산되어 기능성식품 소재로서 이용 가능성이 제시되어 왔다(8,9). 특히 최근에는 해양생물 유래 펩타이드에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이들 펩타이드를 이용하여 식품 첨가물과 기능성식품 소재, 향장소재로 이용하려는 연구가 활발히 진행 중인데, 펩타이드는 생리활성을 그대로 유지할 뿐 아니라 물과의 높은 결합력을 가지고 있어 높은 보습력을 가짐에 따라 향장소재로의 활용이 기대된다.

피부 표면의 각질은 일정한 재생주기에 따라 각질층 바깥에서부터 탈락이 이루어지는데, 피부의 수분이 부족하거나 각질층 내 지질합성에 이상이 생겨 생리활성 인자들의 활성이 원활하지 못할 경우 각질이 탈락되지 않아 각질세포가 쌓이게 된다(10). 따라서 피부 표면의 각질들이 감소하였다는 증거는 피부 보습 및 장벽기능이 정상화되었다는 것을 의미하게 된다. 이외에도 피부 노화가 진행되면 피부 두께가 얇아지고, 자외선 조사에 따른 피

\*Corresponding author: Hyeon Yong Lee, College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon-do 200-701, Korea  
Tel: 82-33-250-6455  
Fax: 82-33-256-4819  
E-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr  
Received June 19, 2007; revised October 24, 2007;  
accepted September 2, 2008

부식의 흑변 및 면역적인 약화 등을 가져오게 되는데, 콜라겐 층의 얇아짐은 외부로부터의 세균 침입 등을 막는 피부장벽의 부실을 의미한다. 따라서 최근에는 피부면역 증진 측면에서 진피 내의 콜라겐 분해 성분을 억제(11)하고 콜라겐 합성을 촉진함으로써 물리적, 면역적 피부장벽을 두텁게 하는 물질(12)에 대한 관심 및 연구가 증가하고 있다.

항염증 활성은 면역반응의 중요기작으로, 염증 반응에 관여하여 상처 치유 및 조절에 중요한 역할을 수행하고 있는 물질이 hyaluronic acid와 hyaluronidase이다(13). Hyaluronidase는 glucuronic acid와 glucosamine이 반복하여 연결된 고분자 다당류인 hyaluronic acid의 분해효소인데, 고분자인 hyaluronic acid가 염증형성의 중요한 요소인 대식세포의 phagocytic ability를 저해하는 반면, hyaluronic acid의 분해 산물 혹은 저분자 hyaluronic acid는 류머티즈 관절염 등의 염증 환자에게서 높은 농도로 관찰되고 있다. 이러한 기작을 통해 최근 아토피성 피부염 치료제 연구 등에서 hyaluronidase 저해제가 많은 관심을 끌고 있다(14).

따라서 본 연구에서는 우리나라 동해의 주요 해적생물인 아무르 불가사리를 구제 및 활용하고자 유용활성이 기대되는 불가사리로부터 저분자 콜라겐 펩타이드를 분리하고 피부면역과 관련된 활성을 탐색함으로써 기능성 향장소재로 활용하기 위한 기초 자료를 확보하고자 실험연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시료의 조제

본 실험에 사용한 불가사리는 우리나라 해안에서 가장 대표적 종인 *A. amurensis*로서 2006년 10월경 강릉시 연안에서 채취한 것을 수세 후 잘라 동결 건조한 것을 사용하였다.

시료를 5 cm 크기로 나누어 내피부위가 잘 드러나도록 자른 뒤 찬물에 침지하였다가 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1 N NaOH 용액에 20%(w/v)이 되도록 첨가하고 12시간 동안 진탕을 통해 비 콜라겐 물질의 제거하였다. 이를 다시 증류수에 중량대비 0.5%의 구연산과 비타민 C를 가용화하여 변성점 이하인 20°C에서 골편과 골편에 붙은 콜라겐만 남도록 하였다. 이때 비 콜라겐 물질의 제거 및 콜라겐 수율 증진을 위해 골편을 초음파 추출기(Ultrasonic extraction system, Asia Industry, Incheon, Korea)에 넣어 콜라겐 변성점 이하의 온도에서 40 kHz의 초음파로 1시간 동안 초음파 공정을 병행하였다. 초음파 공정 시 초음파로 인한 열 발생을 방지하기 위하여 실시간으로 온도를 확인하고 20°C를 넘지 않도록 하였다. 이후 collagenase를 중량대비 0.7% 농도로 처리하고 다시 pepsin을 중량대비 0.5% 첨가하여 4시간 동안 가수분해시켰다. 여과액의 부피를 줄이기 위하여 감압 농축 후, 동결건조기(Cleanvac 8B, Biotron, Bucheon, Korea)를 이용하여 -70°C, 0.1 torr에서 진공 동결건조하여 동해산 불가사리 유래 펩타이드 분말을 제조하였다.

### 저분자 펩타이드 분리

불가사리 콜라겐 단백질은 broad-range pre-stained marker (DokDo-Mark™, EBM-1032, Elpis-biotech, Daejeon, Korea)를 이용해 표지하고 SDS-PAGE(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 분자량을 측정 후, 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> Da의 분자량 부근을 용출할 수 있는 sephadex G-75(Sigma)로 여과하여 fraction별로 구분하였다. Spectrophotometer 측정을 통해 OD(Optical density)값이 증가하는 시점을 기준으로 한 분자량별로 10회씩 모아 총 5개 균을 시료로 사용하였으며 MALDI-TOF MS(Voyager-DE™ PRP, Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA)를 이용하여 분자량을 확인하였다.

### 세포 및 시약

세포배양에 필요한 시약으로 배지는 RPMI 1640(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 사용하였고, 혈청은 fetal bovine serum (Hyclone, Logan, Utah, USA)을 이용하였다. 그 외에 세포 배양에 필요한 시약으로 Hepes buffer(Sigma), gentamycin sulfate(Sigma), trysin-EDTA(Sigma) 등을 사용하였다.

Human skin fibroblasts(HSFs)인 CCD-986sk(KCLB, No. 21947)와 mouse 유래 대식세포인 J774.1(KCLB, No. 40067)은 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)로부터 동결 상태로 구입하여 각 배지에서 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin-streptomycin을 첨가해 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하여 사용하였다.

### 세포 독성 측정

세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosmann 방법(15)을 변형하여 실시하였다. CCD-986sk 세포를 2×10<sup>4</sup> cells/well 농도로 96 well plate에 접종한 후, 각 well에 70-80% confluency 배양시점에 시료를 투여하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. MTT 용액(5 µg/mL)을 첨가하고 4시간 후 원심분리를 통해 상층액을 제거하였으며, 다시 10 µL acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Macrophage를 이용한 nitric oxide(NO) 생성량 측정

NO<sup>-</sup> 생성량 측정을 위해 사용된 세포주는 마우스 유래 J774.1 대식세포를 사용하였다. 세포를 10% FBS와 RPMI 1640 배지에 배양하여 24 well plate에 4.5×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 넣은 다음, 시료를 첨가한 것과 첨가하지 않은 두 가지 균을 나누어 모두 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 동안 배양한 후 LPS (lipopolysaccharide)를 200 ng/well의 농도로 처리하여 48시간 동안 세포를 배양하였다. 상등액 50 µg을 취하여 동일 부피의 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였으며 농도는 32 µM에서부터 0.25 µM까지 RPMI 1640 배지로 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다(16).

### PGE<sub>2</sub> 생성량 측정

일반적으로 염증 및 통증에 관여한다고 알려진 prostaglandin(PG)이 생성되는 기전은 LPS, SNP 또는 UV 자극에 의해 interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor(TNF), interleukin-6(IL-6) 같은 염증성 cytokine이 분비되면, phospholipase A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)가 활성화 되고 PLA<sub>2</sub>에 의해 세포막의 phospholipid에서 arachidonic acid가 분비되어 세포내 arachidonic acid가 cyclooxygenase(Cox)에 의해 PG로 변하는 과정을 통해 이루어진다(17).

UV 조사는 cyclooxygenase enzyme의 양을 크게 변화시키며 높은 수준의 PGE<sub>2</sub> 발현량을 나타낸다(18). 인간 fibroblast인 CCD-986sk 세포를 10% FBS와 DMEM 배지에 현탁하여 1×10<sup>6</sup> cells/mL로 하였다. 이 현탁액에 aspirin을 50 µM이 되도록 첨가하여 세포에 잔존하는 Cox 효소의 활성을 비가역적으로 억제시켜 동일한 PGE<sub>2</sub> 양이 될 수 있도록 조절하였다. 다음 세포 현탁액과 시료를 96 well 세포 배양관의 각각 well에 20 µL씩 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 동안 UV 등에 필터를 이용하여

UVA(6.3 J/cm<sup>2</sup>)를 조사하였다. 배양 후 세포를 well 바닥에 부착시켰다. 그런 다음 부착된 세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 후, 표면에 남아 있는 세포를 실험에 사용하였다.

### Collagen type I 생성량 측정

0.2% DMSO를 음성대조군으로, 0.2 mM ascorbic acid를 양성대조군으로 사용하였으며 시험물질의 농도는 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL로 각각 조제 하였다. 배양된 human fibroblast인 CCD-986sk를 96 well plate에 2×10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 세포들을 serum-free DMEM으로 3회 세척하고, 시료를 농도별로 녹인 DMEM용액에 10% FBS를 첨가하여 다시 24시간 배양하였다. 배양액으로부터 생성된 procollagen type I C-peptide를 enzyme-linked immunosorbent assay kit(Takara Bio Inc., Otsu, Japan)을 이용하여 정량하였다(19).

### Hyaluronidase 활성 저해 효과

Hyaluronidase 억제효과는 Rooster Comb에서 형성된 N-acetylglucosamine의 양을 분광광도계로 측정하여 활성을 판단하였다(20). 0.1 M acetate buffer(pH 3.5)에 녹인 hyaluronidase(7,900 unit/mL) 50 µL에 시료를 최종농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL가 되도록 하여 20 µL씩 가하고, 효소의 활성화를 위해 12.5 mM의 CaCl<sub>2</sub> 200 µL를 혼합한 후 37°C 수욕상에서 20분간 배양시켰다. 대조군은 DMSO 용액을 넣고 수욕상에서 20분간 배양하였다. Ca<sup>2+</sup>로 활성화된 hyaluronidase 용액에 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 hyaluronic acid(12 mg/5 mL) 250 µL를 첨가하여 다시 수욕 상에서 40분간 배양하였다. 배양 후 0.4 N NaOH 용액 100 µL와 0.4 M potassium tetraborate 100 µL를 반응 혼합물에 첨가하여 끓는 수조에서 3분간 배양시킨 후 냉각시켰다. 냉각시킨 반응물에 dimethyl aminobenzaldehyde 용액(p-dimethyl amino-benzaldehyde 4 g, 100% acetic acid 350 mL 및 10 N HCl 50 mL 혼합액) 3.28 mL를 반응 혼합물에 첨가한 후 37°C 수욕상에서 20분간 배양하고 585 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해율은 다음과 같이 계산하고, 효소의 활성을 50% 저해하는 농도를 내삽으로 구하여 이를 IC<sub>50</sub> 값으로 하였다.

$$\text{Hyaluronidase Inhibition(\%)} = \frac{[(\text{ODc}-\text{ODs})/\text{ODc}] \times 100}{}$$

여기서 ODc는 대조군의 OD값이고, ODs는 시료 용액의 585 nm에서의 OD값이다.

### 통계

본 연구에서 실험값의 통계는 SPSS package program의 paired t-test로 검정하였으며 모든 실험값은 평균±표준편차(Mean±standard deviation)로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 분자량 측정

SDS-PAGE를 통한 분자량 측정 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 불가사리 콜라겐의 펩타이드는 15-240 kDa 범위에 분포하였으며, 특정 밴드는 100-70, 70-50, 50-35, 35-25 kDa 영역에서 각각 나타났다. MALDI-TOF MS를 이용하여 분자량을 검증한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. SDS-PAGE와 같은 영역대에 피크를 형성하였으며 86, 46, 38, 27 kDa 부근에서 각 영역의 최대 피크를 나타내었다. 이는 2개의 폴리펩티드 사슬이 수소결합으로 상호 결합되어 감겨있던 콜라겐형 구조가 collagenase의 작용으로 풀어진

Peptides Standard (kDa)

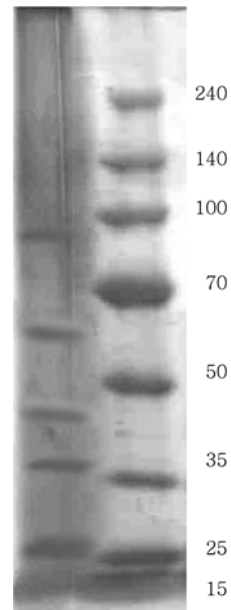


Fig. 1. SDS-PAGE separation of peptides isolated from *A. amurensis*.

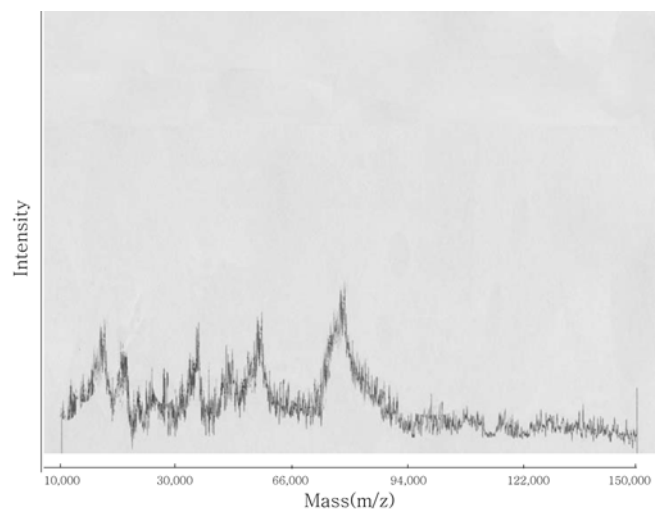
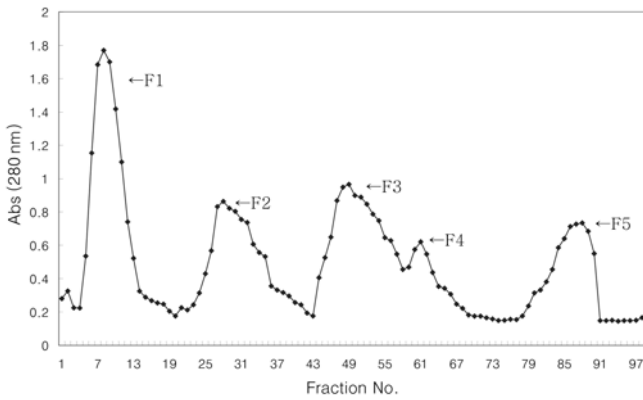


Fig. 2. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) analyses of peptides isolated from *A. amurensis*.

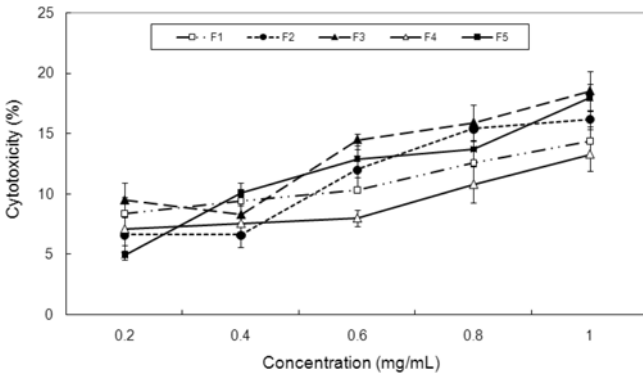
후 효소의 영향을 받아 가수분해되었기 때문인 것으로 사료된다. 이의 구분을 위하여 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup>의 분자량 부근을 용출할 수 있는 sephadex G-75를 이용하여 fraction 별로 구분한 것을 Fig. 3에 나타내었다. 수득된 총 100개의 fraction 중에서 특정 피크를 나타낸 fraction No. 4-13(F1), 25-30(F2), 45-55(F3), 59-63(F4), 79-90(F5)을 각각 모아 F1-F5의 5개 시료로 나누어 다음 실험을 수행하였다.

### 세포 독성 측정

인간 fibroblast에 펩타이드를 0.2-1.0 mg/mL까지 다섯 가지 농도로 처리하고 48시간 동안 배양한 후, MTT방법으로 측정된 세포 독성은 Fig. 4에 나타내었다. 결과에 나타난 바와 같이 대부분의 시료가 농도 의존적으로 세포독성이 증가되는 양상을 나타



**Fig. 3.** Sephadex G-75 gel-chromatography of peptides isolated from *A. amurensis*. 1) F1: Fraction No. 4-13, 86 kDa. 2) F2: Fraction No. 25-30, 68 kDa. 3) F3: Fraction No. 45-55, 46 kDa. 4) F4: Fraction No. 59-63, 38 kDa. 5) F5: Fraction No. 79-90, 27 kDa.

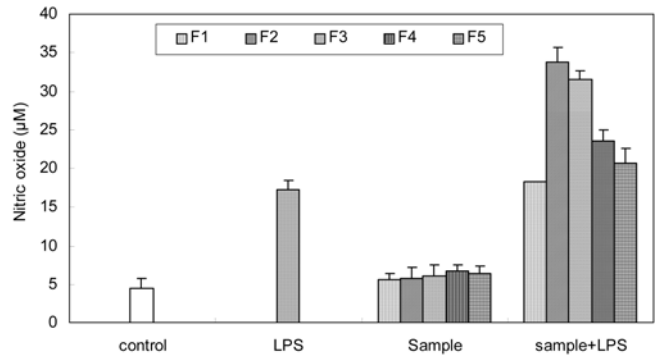


**Fig. 4.** Cytotoxicity of the peptides isolated from *A. amurensis* on human normal fibroblast, CCD-986sk. The results were expressed as the average of triplicate samples. The values represent the mean±standard deviation. See Fig. 3 for abbreviations.

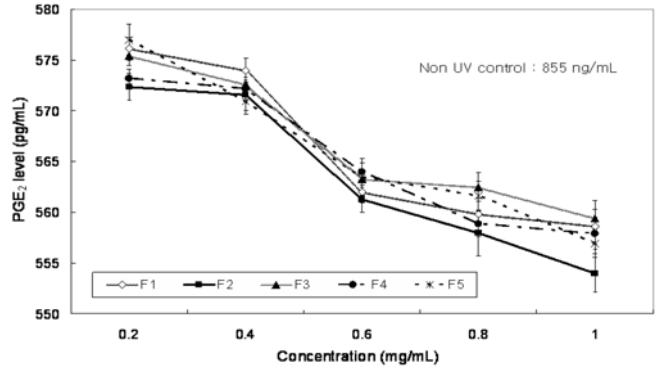
내었으며, 최대 농도인 1.0 mg/mL에서 F3가 18.53%의 값을 나타내며 가장 높은 세포독성을 보였다. 반면 F4는 1.0 mg/mL의 농도에서 13.28%의 값을 나타내며 대체적으로 낮은 세포독성을 보였다. 이처럼 불가사리 유래 저분자 펩타이드 시료 모두가 최고 농도인 1.0 mg/mL에서도 20%의 이하의 세포독성을 나타냄에 따라 불가사리 유래 펩타이드가 세포 수준에서 유의할만한 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

**Macrophage를 이용한 nitric oxide(NO) 생성량 측정**

대식세포를 이용하여 NO 생성능을 확인할 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 대식세포의 NOS(nitric oxide synthase)는 항상 존재하는 것이 아니라 TNF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 와 같은 여러 가지 cytokine이나 LPS(*E. coli* 유래 lipopolysaccharide) 등 세균내독소의 영향을 받아 NOS 유전자가 발현 유도됨으로써 나타나기 때문에 이를 확인하고자 시료와 LPS를 단독 및 병합 투여함으로써 NO의 생성능을 확인하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 시료를 단독 투여한 경우에는 무처리 대조군과 비교하여 각 시료에 따른 NO 생산량에 큰 변화를 관찰 할 수 없었다. 반면 시료와 LPS의 혼합 처리를 통해서 각각 18.2, 33.8, 31.8, 23.6, 20.6  $\mu$ M을 나타내며 LPS를 단독 처리 하였을 때 나타난 17.6  $\mu$ M를 상회하는 결과를 나타내었다. 이는 시료첨가를 통해 독소에 반응하는 대식세포의



**Fig. 5.** Stimulation of nitric oxide production on macrophage, J774.1, in adding 1.0 mg/mL of the peptides isolated from *A. amurensis*. The results were expressed as the average of triplicate samples. The values represent the mean±standard deviation. See Fig. 3 for abbreviations.



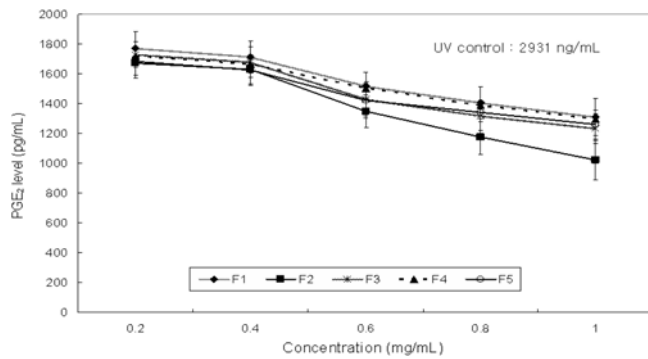
**Fig. 6.** Effect of peptides isolated from *A. amurensis* on PGE<sub>2</sub> secretion of human fibroblast CCD-986sk by Non-UV irradiation. The results were expressed as the average of triplicate samples. The values represent the mean±standard deviation. See Fig. 3 for abbreviations.

NO의 생성량이 획기적으로 증진된 것으로, 이를 통해 불가사리 유래 펩타이드가 면역체계 촉진에 영향을 끼치는 성분을 함유하고 있으며, LPS 등 세포내독소와의 혼합 작용을 통해 상승효과를 나타낼 수 있음을 보여주는 결과이다.

**PGE<sub>2</sub> 생성량 측정**

UV를 이용하여 인간 fibroblast인 CCD-986sk를 자극함으로써 염증과 관련이 있는 PGE<sub>2</sub>의 생성량을 측정된 결과는 Fig. 6과 7에 나타내었다. Fig. 6은 UV를 조사하지 않은 세포에서의 PEG<sub>2</sub>의 발현도를 나타낸 것으로, 시료 무첨가 대조군은 855 pg/mL를 나타내었다. 시료첨가를 통한 PGE<sub>2</sub>의 생성량은 대조군에 비해 낮게 나타났으며 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보여 1.0 mg/mL의 농도에서 F2가 553 pg/mL로 가장 낮은 PGE<sub>2</sub> 생성을 나타내었다. Fig. 7은 UV를 조사한 세포에서의 PEG<sub>2</sub> 생성량을 나타낸 것으로, 시료 무첨가 대조군은 2,931 pg/mL를 나타내었다. UV 비조사 조건에서와 마찬가지로 시료첨가를 통해 PEG<sub>2</sub>의 생성량이 감소하였으며, 농도 의존적으로 낮아지는 경향을 나타내었다. 또한 UV 비조사 조건에서와 마찬가지로 1.0 mg/mL의 농도에서 F2가 1100 pg/mL로 가장 낮은 PGE<sub>2</sub>값을 나타내며 다른 농도에서도 낮은 수치를 나타내었다.

이러한 결과는 UV로 인하여 IL-1과 TNF와 같은 cytokine의 분



**Fig. 7. Effect of peptides isolated from *A. amurensis* on PGE<sub>2</sub> secretion of human fibroblast CCD-986sk by UV irradiation.** The results were expressed as the average of triplicate samples. The values represent the mean±standard deviation. See Fig. 3 for abbreviations.

비되는 것을 특정 펩타이드가 저해하였을 가능성과 차후 PLA<sub>2</sub> 활성을 직접 저해하였을 가능성, 또는 직접적 염증 물질인 arachidonic acid가 phospholipid에서 분비되는 최종 과정을 막았을 가능성을 나타낸다. 또한 각 효소 또는 단백질에 경쟁적 binding 함으로써 나타나는 활성의 감소 또는 증강으로 인한 결과로 추측할 수도 있다. 따라서 추가적인 연구를 통해 펩타이드의 특이적 binding을 조사하고 메커니즘을 밝힘으로써 활성을 탐색하는 실험이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

#### Collagen type I 생성량 측정

세포 증식에 따른 콜라겐 합성능에 대한 실험을 실시하고 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 시료와 양성 대조군인 ascorbic acid의 콜라겐 합성능을 비교한 결과, 시료 첨가를 통해 모든 조건의 콜라겐 생성량이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 F1과 F2가 1.0 mg/mL의 농도에서 각각 121.2±3.7%과 127.8±1.1%를 나타내며 양성 대조군에 비해 높은 콜라겐 합성량을 나타내었다.

외부 염증 자극에 대한 민감도와 연관된 자료로서 만성 염증성 질환과 단기적 염증 질환인 결절, 낭종, 농도 등의 추가적인 병인으로 피부장벽의 붕괴로 발생하는 기전이 제시되고 있다. 콜라겐 층은 collagenase 이외의 효소작용을 받지 않으며 방수력, 보습, 탄력 유지 등 피부건강에 중요한 역할을 담당함에 따라 본 연구에서와 같은 콜라겐의 합성 촉진 결과는 피부 장벽을 두텁게 해주는 작용을 하는 것으로 사료된다. 따라서 콜라겐 합성을 촉진시켜 피부부귀 및 상처의 치유 등을 돕는 대표적 물질로 알려진 병풀의 주성분으로 asiaticoside, asiatic acid, madecasic acid

**Table 2. Hyaluronidase inhibitory activity of peptides isolated from *A. amurensis***

Samples	IC <sub>50</sub> (μg/mL)
F1 <sup>1)</sup>	>1000
F2	535.7
F3	673.1
F4	>1000
F5	>1000

<sup>1)</sup>See Fig. 3 for abbreviations.

등과의 활성 비교를 통한 유효성 연구 등이 추가적으로 이루어져야 할 것으로 기대된다.

#### Hyaluronidase 활성 저해 효과

불가사리 유래 펩타이드를 이용하여 염증과 관련이 있는 hyaluronidase의 저해효과를 측정하고, 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 각 시료는 5개의 농도로 활성을 측정하고 계산식을 통해 효소 활성을 50% 저해하는 농도를 구하여 IC<sub>50</sub>으로 나타내었다. PGE<sub>2</sub> 저해 활성 측정에서와 마찬가지로 F2가 535.7 μg/mL로 가장 낮은 IC<sub>50</sub>을 나타내었으며, 다음으로 F3가 673.1 μg/mL의 IC<sub>50</sub>을 보이며 높은 활성 저해 효과를 나타내었다. 이와 같은 펩타이드의 hyaluronidase 저해활성은 기존 연구를 통해 보고된 바가 없어 본 연구의 결과를 통해 다양한 펩타이드의 염증 저해 활성 실험이 이루어질 것으로 기대된다.

이상의 실험을 통해 불가사리 유래 콜라겐의 저분자 펩타이드는 세포독성 낮고 NO 생성 촉진 활성, PGE<sub>2</sub> 발현 저해 및 콜라겐의 생성 촉진 효과를 가지는 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 불가사리 유래 콜라겐 펩타이드의 기능성 향상 소재로서 활용 가능성을 확인해주는 긍정적인 결과이나 분자량에 따라 활성에 많은 차이를 보이는 만큼 기능성식품 또는 향상소재로 사용하기 위해서는 정제과정을 통한 특정 펩타이드의 선별 과정이 필요할 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서는 펩타이드 제조 시 초음파 공정을 처리함에 따라 기존의 효소와 열처리에서 나타나지 않은 특이 활성이 나타나거나 세포독성에서 차이를 보인 사료되므로, 앞으로 초음파 공정과 일반 공정을 통한 펩타이드의 제조 특성 및 활성 비교 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

#### 요 약

불가사리 콜라겐으로부터 저분자 활성 펩타이드를 SDS-PAGE로 분리하고 MALDI-TOF MS를 이용한 분자량 측정을 통해 fraction별로 F1-F5의 5개 시료로 나누어 실험을 수행하였다. 인

**Table 1. Effects of the peptides isolated from *A. amurensis* on collagen synthesis in human fibroblast (CCD-986sk)**

Sample	Concentration (mg/mL)				
	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Ascorbic acid	99.6±0.7 <sup>1)</sup>	104.3±0.6	105.3±2.1	113.1±0.7	113.1±2.5
F1 <sup>2)</sup>	102.8±1.1	101.2±2.5	118.8±2.2	112.9±1.1	121.2±3.7
F2	108.1±3.5	109.3±0.9	114.0±0.6	116.3±0.9	127.8±1.1
F3	107.8±4.6	106.3±2.0	116.6±2.5	113.0±2.0	118.3±4.3
F4	100.7±4.0	102.9±4.0	114.6±3.5	115.1±3.5	116.8±4.1
F5	107.1±0.6	109.6±4.5	117.3±4.6	104.3±0.6	107.6±1.5

<sup>1)</sup>Each value represents mean±standard error (n=3).

<sup>2)</sup>See Fig. 3 for abbreviations.

간 fibroblast를 이용한 세포독성 측정에서 1.0 mg/mL 농도의 시료 첨가를 통한 모든 조건에서 20%의 이하의 세포독성을 나타냄에 따라 불가사리 유래 펩타이드가 세포 수준에서 유의할만한 세포독성을 나타내지 않음 확인하였다. 대식세포를 이용한 NO 생성능 측정에서는 시료만 처리했을 경우 무처리 대조군과 비교하여 큰 변화를 관찰 할 수 없었으나, LPS와의 혼합 처리를 통해 F2가 최대 33.8 µM의 NO의 생성량을 나타냄에 따라 시료첨가를 통해 면역 기작이 획기적으로 증진되는 효과를 보였다. 인간 fibroblast인 CCD-986sk의 생육에서 UV 조사를 통한 PGE<sub>2</sub> 발현도 측정 실험에서는 시료첨가를 통해 PGE<sub>2</sub>의 발현이 농도 의존적으로 감소되는 결과를 나타내었으며, 세포 증식에 따른 콜라겐 합성능의 비교 결과에서는 시료 첨가를 통해 모든 조건의 콜라겐 생성량이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 F1과 F2가 1.0 mg/mL의 농도에서 각각 121.2±3.7%과 127.8±1.1%를 나타내며 양성 대조군에 비해 높은 콜라겐 합성량을 나타내었다. 면역 활성 탐색을 위한 hyaluronidase 저해효과 측정에서도 F2가 535.7 µg/mL로 가장 낮은 IC<sub>50</sub>을 나타내었다. 이상의 실험을 통해 불가사리 유래 콜라겐의 저분자 펩타이드는 세포독성 낮고 NO 생성 촉진 활성, PGE<sub>2</sub> 발현 저해 및 콜라겐의 생성 촉진 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 불가사리 유래 콜라겐 펩타이드의 기능성 향장 소재로서 활용 가능성을 확인해주는 긍정적인 결과로 향후 추가적인 연구를 통해 불가사리의 향장소재로서의 활용이 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 해양수산부 수산특정연구개발사업(과제번호: 20060024)의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과로 지원에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Park HY. Development of industrialization technology with starfish. *Food Ind. Nutr.* 8: 18-22 (2003)
2. Yang JC, Chung HK, Lee HS, Choi SJ, Yun SS, Ahn KS, Sa TM. Selection of filamentous cyanobacteria and optimization of culture condition for recycling waste nutrient solution. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 37: 177-183 (2004)
3. Kim KH, Lee IY, Choi BJ, Lee SM, Kim SH. Treatment of acid mine drainage water using wasted sludge of seafood processing factory and starfish. *J. Korean Soc. Environ. Eng.* 24: 489-497 (2002)
4. Kwon MC, Qadir SA, Kim HS, Ahn JH, Cho NH, Lee HY. UV protection and whitening effects of collagen isolated from outer layer of the squid *todarodes pacificus*. *J. Korean Fish. Soc.* 41: 7-12 (2008)
5. Lee YS, Moon JY, Jang SJ, Park MN, Park HY. Effects of supplemental agents enhancing calcium absorption on bioavailability calcium in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 832-839 (2007)
6. Park HY, Lim CW, Kim YK, Choi TJ, Yoon HD, Lee KJ, Seo YK, Kim JY, Park KE. Effects of supplemental *Asterias amurensis* extract in the experimental diets on growth, blood chemistry and superoxide production of kidney phagocytes of *Sebastes schlegeli*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50: 362-366 (2007)
7. Park JH, Kim SM. Biofunctionality of peptides purified from naturally fermented anchovy sauce. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 1120-1125 (2003)
8. Meisel H. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livest. Prod. Sci.* 50: 125-138 (1997)
9. Gill I, Lopez Fandino R, Jorba X, Vulfson EN. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enzyme Microb. Technol.* 18: 162-183 (1996)
10. Peter TP. The Desquamation process, Vol. 1, pp. 17-28. In: *Physiology of the skin II: An expanded scientific guide for the skin care professional*, Allured Publishing Corporation. Carol Stream, IL, USA (2001)
11. Gilchrest BA. Skin aging and photoaging. *J. Am. Acad. Dermatol.* 21: 601-603 (1989)
12. Huang C, Ma WY, Dawson MI, Rincon M, Flavell RA, Dong Z. Blocking Activator protein-1 activity, but not activation retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5826-5830 (1997)
13. Jung MS, Yoon BS, Lim HJ. Study on the soluble collagen extraction from the remain after fillet. *Han Lim Technol. Res.* 32: 120-195 (2000)
14. Bu HJ, Ham YM, Kim JM, Lee SJ, Hyun JW, Lee NH. Elastase and hyaluronidase inhibition activities of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava*. *Korean J. Pharmacogn.* 37: 92-96 (2006)
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63 (1983)
16. Choi SY, Hwang JS, Kim S, Kim SY. Synthesis, discovery and mechanism of 2,6-dimethoxy-N-(4-methoxyphenyl)benzamide as potent depigmenting agent in the skin. *Biochem. Biop. Res. Co.* 349: 39-49 (2006)
17. Bernstein EF, Chen YQ. Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J. Invest. Dermatol.* 103: 182-186 (1994)
18. Liou JY, Ellent DP, Lee S, Goldsby J, Ko BS, Matijevic N, Huang JC, Wu KK. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin e2 protects mouse embryonic stem cells from apoptosis. *Stem Cells* 25: 1096-1103 (2007)
19. Park U. Unpigment fish paritcurary from flat fish as a novel industrial source of collagen and biomaterial thereby obtained. *J. Chromatogr. A* 1054: 227-233 (2000)
20. Cui X, Bai I, He X, Zhang Y. Western Blot analysis of type I, III, V, VI collagen after laser epithelial keratomileusis and photo-refractive keratectomy in cornea of rabbits. *Eye Sci.* 21: 141-148 (2005)