

비타민 C, Silicon, 철분, Proline 및 Lysine의 처리가 피부 섬유아세포의 증식 및 Collagen I 과 III의 발현에 미치는 효과 비교

김선아 · 이진아 · 김정민 · 김현애 · 김영애 · 윤혜정 · 조윤희[†]
경희대학교 동서의학대학원 의학영양학과

Effect of Ascorbic Acid, Silicon, Fe, Proline and Lysine on Proliferation and Collagen Synthesis in the Human Dermal Fibroblast Cell (HS27)

Sun-Ah Kim, Jin-Ah Lee, Jung-Min Kim, Hyun-Ae Kim,
Young-Ae Kim, Hye-Jeong Yun, and Yunhi Cho[†]

Dept. of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science,
Kyung Hee University, Gyeonggi 446-701, Korea

Abstract

In the dermis, fibroblast plays an important role in the turnover of the dermal extracellular matrix. Collagen I and III, which are the most important dermal proteins of the extracellular matrix, function as a stabilizing scaffold of dermal connective tissues, as well as a regulator of differentiation and migration of dermal cells. In this study, we investigated the effect of various nutrients, such as ascorbic acid, silicon, Fe, lysine and proline which function as cofactors or building blocks on collagen synthesis. When the physiological concentrations of ascorbic acid (0~100 μ M), silicon (0~50 μ M), Fe (0~50 μ M), lysine (0~150 μ M) and proline (0~300 μ M) increased the expression of collagen I and III protein by 115~1300% without increasing cell proliferation. 3 or 5 days treatment of Fe increased the expression of collagen I and III proteins up to 323% in parallel with cell proliferation by 164%. However, cell proliferation and expression of collagen I and III protein in silicon treated HS27 did not differ. Proline and lysine only increased cell proliferation up to 247.9%. Taken together, we demonstrate that the physiological concentrations of ascorbic acid and Fe enhance the expression of collagen I and III protein for treatment of 3 or 5 days.

Key words: human dermal fibroblast, collagen, ascorbic acid, silicon, Fe

서 론

피부는 탄력성을 지닌 고체의 성질과 점성을 가지는 유체의 성질을 동시에 지닌 복잡한 신체 기관으로 이런 피부의 기계적인 특성을 점탄성이라 한다. 피부의 기계적인 성질은 여러 외부 요인과 내부 요인들에 의해서 영향을 받는데 주로 진피 층에서 일어난다(1-3). 진피세포의 기질의 대부분을 차지하며 피부의 강도와 점탄성 유지에 중요한 역할을 하는 콜라겐(1-3)은 피부 건조 중량의 75%를 차지하는 주요 구조 단백질로 진피층의 주세포인 섬유아세포(fibroblast)에서 생성된 후 세포의 기질로 분비되어 triple helix 구조를 통해 피부의 탄력성 유지 기능을 한다(4,5). 그러므로 콜라겐이 부족할 경우 피부는 탄력과 보습이 떨어지고 주름이 생기는 등 피부 노화가 나타난다(5,6). 체내 콜라겐은 20여 가지 유형으로 나누어지는데, 피부 진피에는 type I, III, V, VI, VII

유형의 콜라겐이 존재하며 특히 콜라겐 type I은 전체 콜라겐의 80~85%, 콜라겐 type III은 10~15%를 차지한다(4,5).

콜라겐은 비타민 C, Fe²⁺, silicon 등을 조효소로 hydroxylation 과정을 거쳐 합성된다(2,3,7). 콜라겐을 합성하는 효소인 hydroxylase는 2가 철분과 느슨하게 결합하여 활성형 효소로 작용하며(5) 특히 비타민 C는 hydroxylase 활성화에 이용된 Fe³⁺를 환원형인 Fe²⁺로 유지시키는데 조효소로 작용한다(8). 콜라겐 단백질의 다량 존재하는 주요 아미노산인 proline과 lysine는 각각 hydroxylation 되는 posttranslational modification과 콜라겐의 triple helix 구조를 형성하여 피부 탄력을 유지시키는 기능을 하며, Gly-X-Y 형태의 아미노산 배열에 위치하는 규칙성에 의해 그 구조를 안정화시킨다(7,9,10). Hydroxyproline보다 양적으로 적은 hydroxylysine은 triple helix 안정화뿐 아니라 콜라겐 합성의 최종 단계인 섬유소 결합, 즉, cross-linking 형성에 중요한 역할

[†]Corresponding author. E-mail: choyunhi@khu.ac.kr
Phone: 82-31-201-3817, Fax: 82-31-201-3817

을 하며(11) 이 단계에 미량 원소인 silicon이 효소 활성을 조절하여 콜라겐을 안정화시킨다(12,13).

이와 같이 콜라겐 type I 과 III의 합성은 비타민 C, 철분, silicon에 의해 영향을 받고 콜라겐의 주요 구성 아미노산인 proline과 lysine이 관여하는 것으로 생각되어진다. 그러나 비타민 C를 제외한 영양소들의 중요성 연구는 미비한 수준이다. 따라서 본 연구에서는 HS27 피부 섬유아세포에 콜라겐 합성의 주요 인자인 비타민 C를 비롯하여 철분, silicon, proline 및 lysine을 혈청 및 피부 내 농도 범위로 처리하여 세포의 증식과 콜라겐 type I 과 III의 mRNA 및 단백질의 발현을 비교하고자 한다. 이를 통해 콜라겐 합성에 대한 각 영양소의 상대적인 중요도를 알아보고 산업적으로 이들 영양소를 식품 소재로 사용할 수 있는 계기를 마련하여 산업적 소재로의 활성화를 유도하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구에서 사용한 HS27 피부 섬유아세포(human fibroblast cell)는 한국 세포주 은행에서 분양받아 본 연구실에서 계대 배양하여 사용하였다. 실험에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), Fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin 및 Trypsin-EDTA는 Gibco사(CA, USA)에서 구입하였다. 비타민 C(ascorbic acid: A4544), silicon(sodium silicate solution: 338443), lysine(L5501), proline(P5607), Fe(ferric citrate: F6129) 그리고 1차 항체(collagen type I 과 III)와 본 연구에서 사용한 일반적인 시약은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포 배양

HS27 피부 섬유아세포는 Polystyrene 세포 배양접시에 부착시키고 10% FBS(Gibco, CA, USA), 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 DMEM(Gibco)을 사용하여 5% CO₂와 95% 습도가 유지되는 37°C Incubator에서 배양하였다(14). 세포가 배양 접시의 80~90% 차면 배지 제거 후 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 씻어낸 후 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 계대 배양하였다.

비타민 C, silicon, 철분, proline 및 lysine 표준물질 준비

0~100 µM 농도의 비타민 C, 0~50 µM의 철분(ammonium ferrous sulfate)과 silicon(sodium silicate solution), 0~300 µM proline과 0~150 µM의 lysine 표준물질을 dimethylsulfoxide(DMSO, 최종농도 <0.05%, v/v)에 녹여 사용하였다. 각 표준물질의 농도는 각 영양소의 혈청 및 피부 내 농도를 기준으로 하였다. 구체적으로 본 실험에 사용한 비타민 C 농도는 혈청 내 농도 45 µM(15) 및 피부 내 농도인 7.6 µM(16)을 기준으로 하여 0~100 µM 범위로

정하였다. Silicon과 철분(Fe²⁺: ferrous ion)은 silicon의 혈청 내 농도 5~20 µM(17)과 철분의 혈청 내 농도 6.27~32.23 µM(14)을 기준으로 하여 0~50 µM을 처리 농도로 정하였다. Proline은 혈청 내 농도 200~300 µM(18)을 기준으로 0~300 µM을, lysine는 혈청 내 농도 71~151 µM(19)를 기준으로 0~150 µM 범위를 처리 농도로 정하였다.

HS27 피부 섬유아세포의 증식 측정

HS27 피부 섬유아세포의 증식 측정은 단기간에 대량 검색이 가능한 MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) colorimetric assay 방법(Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay: Promega, CA, USA)을 사용하여 측정하였다. 96 well plate에 0.2×10⁴ cells/well의 농도로 분주하고 24시간 후에 비타민 C, 철분, silicon, proline 및 lysine을 농도별로 투여하여 3일 및 5일간 배양하였다. 3일 또는 5일째 되는 날 MTS (40 µL/well) 시약을 첨가하고 2시간 30분 동안 37°C에서 배양한 후 MTS가 formazan으로 분해되는 양을 ELISA reader(CA, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

Collagen type I 과 III의 단백질 발현 측정(Western blot analysis)

피부 섬유아세포의 대표적인 collagen인 collagen I 과 III 단백질의 발현을 western blotting으로 측정하였다. 각 농도의 영양소를 3일 및 5일간 처리한 세포를 RIPA buffer(20 mM Tris-HCl, pH8, 150 mM NaCl, 10 mM NaPO₄, 10% glycerol, 100 µM Na₃VO₄, 100 µM ammonium molybdate, 1% NP-40, 0.1% SDS)에 4°C 상태로 풀어놓고 원심분리하여 상층액을 단백질 추출액으로 준비하였다. 단백질 양은 bovine serum albumin(BSA)을 표준액으로 하여 Bradford assay(Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

준비된 단백질을 4x sample buffer에 혼합하고 95°C에서 5분간 가열한 다음 10% SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)에서 전기영동 시킨 후 Hybond ECL nitrocellulose membrane에 흡착시켰다. 각각의 1차 항체(Collagen Type I antibody: Collagen Type III antibody: Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Germany)는 5% skim milk, 0.1% Tween-20을 함유한 PBST에 희석시켜서 4°C에서 16시간 동안 반응시킨 후, 0.1% Tween-20을 함유한 PBST로 15분씩 3차례 세척하였다. Blocking solution으로 1:5000배로 희석시킨 peroxidase-conjugated anti-IgG 이차 항체와 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 0.1% Tween-20을 함유한 PBST로 3차례 세척하고 발색은 ECL hyperfilm으로 확인하였다.(20) 각 Band의 intensity는 imaging densitometer (model GS-700, Bio-Rad)를 사용하여 정량하였다.

Real time PCR

각 농도의 영양소를 3일 또는 5일간 처리한 HS27 피부 섬유아세포에 RNAzol-Bee reagent(TEL-TEST, TX, USA)를 이용하여 RNA를 분리 정제하고 파장 260 nm에서 정량하였다. Total RNA 10 μ L(0.5 μ g/ μ L)를 65°C에서 10분간 가열하고 4°C에서 10분 동안 방치한 후 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 250 ng Oligo-dT 18mer, 0.5 unit RNase inhibitor와 1 mM dNTP mixture가 포함된 10 mM Tris-HCl buffer(pH 8.3)(final volume 20 μ L)에 분리된 total RNA(2 μ g), 0.25 units of AMV reverse transcriptase(Seoulin bio-science Inc., Seoul, Korea)를 첨가하여 50°C에서 50분간 반응시킨 후 85°C에서 5분간, 4°C에서 5분간 반응하여 cDNA(250 ng/ μ L)를 합성하였다. 합성된 cDNA template를 gene-specific 한 oligonucleotide primer Collagen type I (GeneBank accession No. NM00089)(10 pmol/ μ L)(21)의 sense primer(5'-CGGACGACCTGGTGAGAGA-3') 및 antisense primer(5'-CATTGTGTCCCCTAATGCCTT-3'), Collagen type III(GeneBank accession No. NM 000090)(10 pmol/ μ L)(22)의 sense primer(5'-TGGTCCCCAAGGTGTCAAAG-3') 및 antisense primer(5'-GGGGGTCCCTGGGTTACCATTA-3')를 사용하여 SYBR Green(Qiagen, Hilden, Germany) dye를 넣고 Applied Biosystems prism 7900 Sequence Detection System(Applied Biosystems, CA, USA)으로 증폭한 후 PCR product를 정량 분석하였다.

통계분석

실험 결과는 SPSS(Ver 15.0 program Statistical package for social science, Illinois, USA) 통계 프로그램을 이용하여 분석하며 결과는 평균 표준 오차로 표시하였다. 대조군과 처리군 간의 효과 비교는 one way ANOVA로 분석한 후 Duncan's multiple range test로 각 실험군 간의 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

비타민 C, 철분, silicon, proline, lysine이 HS27 피부 섬유아세포 증식에 미치는 효과

HS27 피부 섬유아세포에 비타민 C, 철분, silicon, proline 및 lysine을 혈청 및 피부 내 농도 범위로 처리한 후 세포 증식을 MTS assay로 측정하였다. 사전연구(23,24)에 따라 비타민 C는 장기간 처리 시 불안정하여 쉽게 산화되고 H₂O₂를 생산하기 때문에 단기간인 3일과 5일로 나누어 살펴보았다(Table 1). MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]는 phenazine methosulfate(PMS)와 함께 세포의 미토콘드리아 내의 효소에 의해 환원반응이 일어나 water soluble formazan을 생성하는 특징을 가진다. 따라서 죽은 세포

Table 1. Proliferation of HS27 dermal fibroblast cells with treatment of ascorbic acid, silicon, and Fe¹⁾

Treatment ²⁾	Concentration (μ M)	Proliferation (% control)	
		3 days	5 days
Ascorbic acid	0	100 \pm 0.3 ^a	100 \pm 0.4 ^a
	5	99.1 \pm 12.3 ^a	103.6 \pm 7.0 ^a
	10	109.6 \pm 9.7 ^a	105.1 \pm 3.7 ^a
	50	106.0 \pm 7.7 ^a	108.2 \pm 10.3 ^a
	100	116.9 \pm 9.6 ^a	100.8 \pm 7.6 ^a
Silicon	0	100 \pm 0.2 ^{ab}	100 \pm 0.2 ^a
	5	106.9 \pm 6.6 ^a	87.3 \pm 5.9 ^a
	10	100.7 \pm 4.6 ^{ab}	101.1 \pm 8.8 ^a
	25	80.5 \pm 3.9 ^c	92.9 \pm 12.7 ^a
	50	89.0 \pm 6.2 ^{bc}	94.9 \pm 9.2 ^a
Lysine	0	100 \pm 0.1 ^b	100 \pm 0.1 ^b
	50	185.2 \pm 39.1 ^{ab}	172.7 \pm 30.2 ^{ab}
	100	246.9 \pm 73.7 ^a	187.0 \pm 47.4 ^{ab}
	150	178.2 \pm 22.3 ^{ab}	207.1 \pm 38.9 ^a
Proline	0	100 \pm 0.1 ^a	100 \pm 0.1 ^b
	100	92.5 \pm 4.0 ^{ab}	247.9 \pm 33.8 ^a
	200	75.8 \pm 8.5 ^b	192.0 \pm 19.2 ^a
	300	81.7 \pm 6.3 ^b	175.0 \pm 32.4 ^{ab}
Fe	0	100 \pm 0.2 ^c	100 \pm 0.3 ^{ab}
	5	114.5 \pm 8.1 ^c	153.6 \pm 23.5 ^{ab}
	10	122.5 \pm 9.6 ^{bc}	164.1 \pm 32.0 ^a
	20	133.8 \pm 16.1 ^{abc}	117.6 \pm 22.8 ^{ab}
	30	162.5 \pm 9.9 ^a	112.4 \pm 15.7 ^{ab}
	50	155.1 \pm 15.7 ^{ab}	89.5 \pm 10.1 ^b

¹⁾Values are mean \pm SE (%) (ascorbic acid, n=8; silicon, n=8; lysine, n=7; proline, n=7; Fe, n=8). Means with different letters in the same column differ $p < 0.05$.

²⁾HS27 cells were plated at 0.2×10^4 cells/well. After 24 hrs, each treatment were added at an indicated concentration. After 3 or 5 days, cells were trypsinized, MTS solution was added and absorbance was measured at 490 nm.

에서는 반응이 일어나지 않으므로 이 formazan의 생성량을 세포생존을 측정에 이용한다(25). 비타민 C의 3일 및 5일 처리는 농도와 무관하게 세포 증식에 영향을 미치지 않았다. 이는 최근 연구(23)에서 동일 기간 및 농도 처리 시 비타민 C가 피부 섬유아세포의 증식에 영향을 미치지 않는다는 보고와 일치하였다. Silicon의 3일 처리는 세포 증식을 감소시키는 반면 5일 처리는 세포 증식에 영향을 미치지 않았다. Proline의 3일 처리는 세포 증식을 다소 감소시킨 반면 5일 처리는 247.9%까지 세포 증식을 증가시켰으며 lysine의 3일과 5일 처리는 세포 증식을 각각 246%, 207.1%까지 증가시켰다. 콜라겐의 주요 구성 아미노산인 proline과 lysine 처리에 의한 세포 증식 증가는 콜라겐 합성 증가를 병행할 것으로 생각된다. 철분은 3일과 5일 처리 시 각각 162.5%, 164.1%까지 증가시켰으나 50 μ M 처리 시 세포 증식을 감소시켰다. 철분 역시 세포의 증식을 초래하였으나 proline 및 lysine의 증식 수준에는 미치지 못하였다. 이 결과 HS27 피부 섬유아세포에 각 영양소간에 3일과 5일 처리는 세포 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

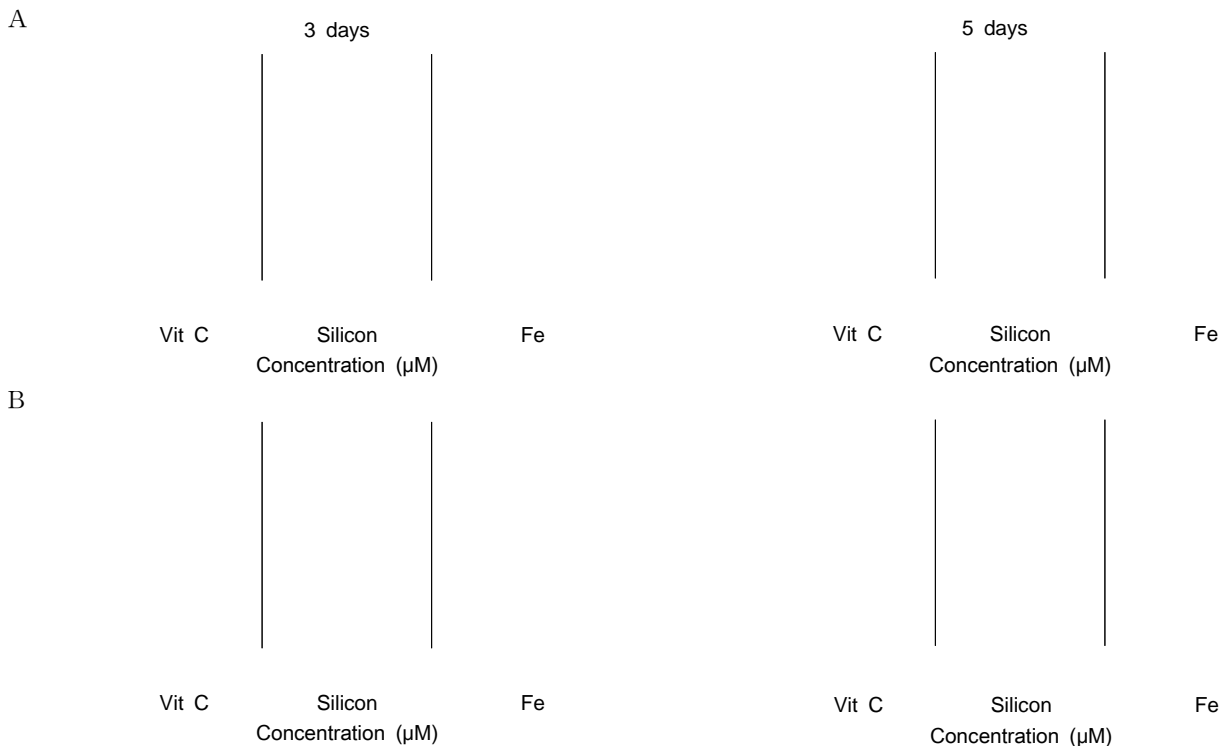


Fig. 1. Representative mRNA expression of collagen type I and III in HS27 cells treated with ascorbic acid, silicon and Fe. Real time-PCR analysis of mRNA for collagen type I (A) and III (B) in HS27. HS27 cells were treated with ascorbic acid (0, 5, 10, 50, 100 μ M), silicon (0, 5, 10, 25, 50 μ M), and Fe (0, 5, 10, 20, 30, 50 μ M) for 3 or 5 days. The signal intensities from multiple were quantified and normalized, first to the corresponding value of the GAPDH internal control and then to the signal observed in control cells (100%). Values are mean \pm SD (n=3).

HS27 피부 섬유아세포에서 비타민 C, silicon, 철분이 collagen I 및 III의 mRNA 발현에 미치는 효과

HS27 피부 섬유아세포에 비타민 C, 철분, silicon의 농도 별 처리가 콜라겐 type I (Fig. 1-A)과 III (Fig. 1-B)의 mRNA 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. Proline과 lysine 처리에 의한 HS27 피부 섬유아세포의 증식 증가로 이와 병행하는 (Table 1) 콜라겐 합성 변화는 무의미할 것으로 생각되어 살펴보지 않았다. 비타민 C와 철분의 3일 및 5일 처리는 다소 증가하는 경향이나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. Silicon의 3일과 5일 처리 역시 콜라겐 type I의 mRNA 발현에 영향을 미치지 않았다.

또한 콜라겐 type III의 mRNA 발현에서 비타민 C 및 철분의 3일과 5일 처리는 다소 증가하는 경향이나 각각 100 μ M, 50 μ M의 농도에서는 감소하였으며 유의적인 차이는 나타나지 않았다. Silicon의 3일과 5일 처리는 콜라겐 type III의 mRNA 발현을 각각 116%, 108%까지 증가시켰으나 유의적인 차이가 없었다.

HS27 피부 섬유아세포에서 비타민 C, silicon, 철분이 콜라겐 type I 및 III 단백질 발현에 미치는 효과

HS27 피부 섬유아세포에 비타민 C, silicon, 철분의 농도 별 처리가 콜라겐 type I (Fig. 2)과 III (Fig. 3)의 단백질 발현에 미치는 영향을 western blotting으로 살펴보았으며 각

영양소별 0 μ M 처리를 기준으로 하여 %control로 나타내었다. 3일 동안 5 μ M의 비타민 C 처리는 콜라겐 type I 단백질 발현을 132.5%까지 증가시키나 유의적인 차이는 없었으며 100 μ M의 처리는 단백질 발현을 현저히 감소시켰다. 반면 5일 동안 5~50 μ M의 비타민 C 처리는 콜라겐 type I 단백질 발현을 558.8~683.9%까지 증가시켰으며 100 μ M의 처리는 콜라겐 단백질 발현을 1300% 이상으로 증가시켰다. 콜라겐 type III의 단백질 발현은 콜라겐 type I의 단백질 발현과 유사한 경향으로 나타났으며 3일 동안 5 μ M의 비타민 C 처리는 콜라겐 type III의 단백질 발현을 135.1% 증가시키나 유의적인 차이는 없었으며 100 μ M 처리 시 현저히 감소시켰다. 5일 동안 비타민 C의 10~50 μ M 처리는 콜라겐 type III의 단백질 발현을 182%까지 현저히 증가시켰다. 비타민 C의 혈청 내 농도인 45 μ M(15)와 피부 내 농도인 7.6 μ M(16) 범위에서 콜라겐 단백질 발현이 현저히 증가하였으며 단기간의 처리보다 장기간의 비타민 C 처리가 더 효과적으로 나타났다. 또한 진피 콜라겐의 80~85%를 차지하는 것으로 알려진(4,5) 콜라겐 type I의 발현이 10~15% 차지하는 콜라겐 type III보다 7배 이상 더 많이 발현이 되었으며 이는 여러 사전 연구(4,5)와 일치하는 결과이다. 또한 세포 증식 없이 콜라겐 단백질 발현 증가가 나타났으며 이는 콜라겐 합성에 있어서 비타민 C의 조효소로서의 역할

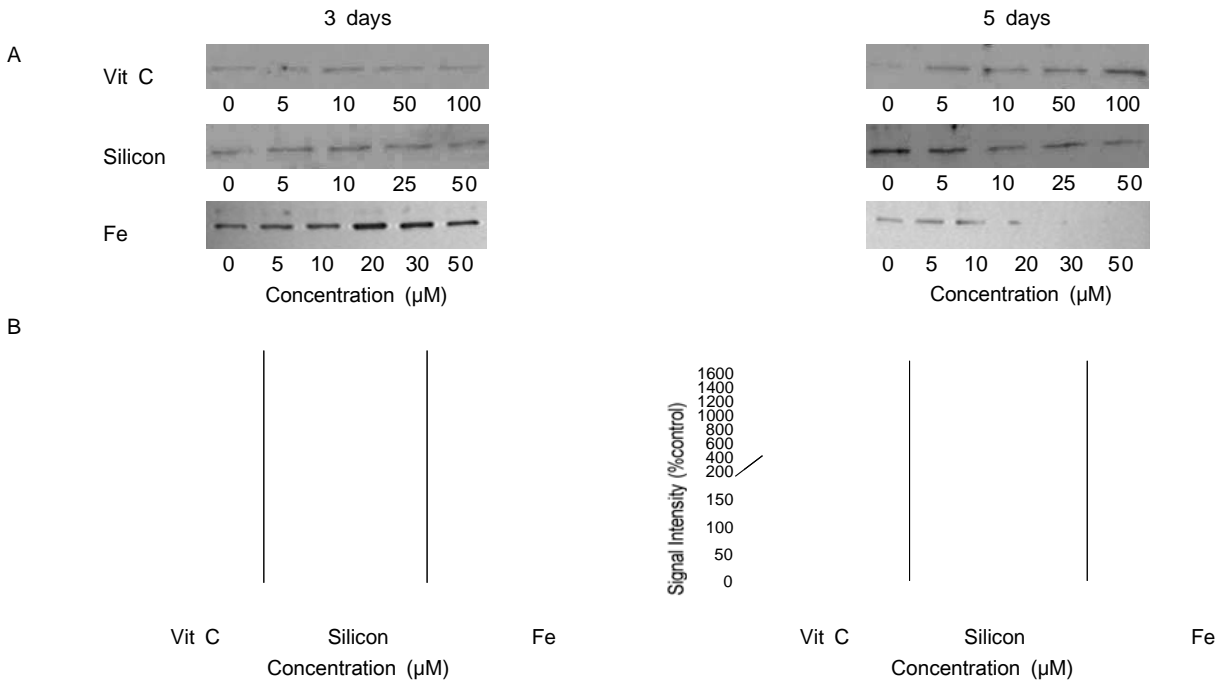


Fig. 2. Representative protein expression of collagen type I in HS27 cells treated with ascorbic acid, silicon and Fe. A: HS27 cells were treated with ascorbic acid (0, 5, 10, 50, 100 μM), silicon (0, 5, 10, 25, 50 μM), and Fe (0, 5, 10, 20, 30, 50 μM) for 3 or 5 days. Whole cell extracts (15 μg protein/lane) were subjected to 10% SDS-PAGE and immunoblotting with collagen type I specific antibodies. B: The signal intensities of A were quantified and the integrated areas were percentaged to the signal observed in control cells (100%). Values are mean±SD (n=3).

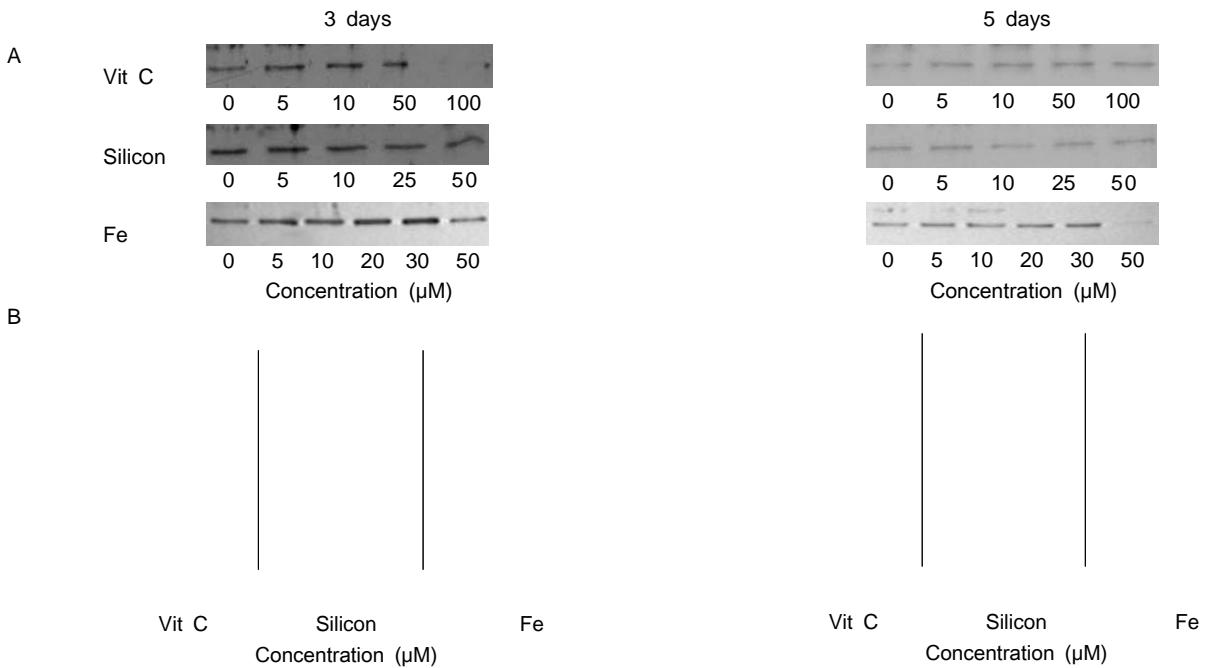


Fig. 3. Representative protein expression of collagen type III in HS27 cells treated with ascorbic acid, silicon and Fe. A: HS27 cells were treated with ascorbic acid (0, 5, 10, 50, 100 μM), silicon (0, 5, 10, 25, 50 μM), and Fe (0, 5, 10, 20, 30, 50 μM) for 3 or 5 days. Whole cell extracts (15 μg protein/lane) were subjected to 10% SDS-PAGE and immunoblotting with collagen type III specific antibodies. B: The signal intensities of A were quantified and the integrated areas were percentaged to the signal observed in control cells (100%). Values are mean±SD (n=3).

이 본 연구를 통해 그 중요성이 다시 강조되었다. Silicon의 3일 처리는 콜라겐 type I 단백질 발현을 115.1%까지 증가

시켰으나 유의적인 차이가 없었으며 5일 처리는 단백질 발현이 현저히 감소되었다. 또한 콜라겐 type III의 단백질 발

현은 silicon의 3일과 5일 처리 시 감소하는 경향이나 유의적인 차이가 없었다. Silicon 역시 콜라겐 합성에 관여하는 주요한 조효소로 뼈의 정상적인 성장과 발달 및 연골 등 섬유성 결합 조직의 형성에 필요한 초미량 영양소로 알려져 있는데 최근 연구들은 silicon의 식이 섭취가 골세포의 콜라겐 합성 증가를 초래한다고 보고하고 있다(26). 그러나 본 연구에서 silicon의 혈청 내 농도 범위인 5~20 μM (17) 처리 시 콜라겐에 대한 영향을 조사한 결과 콜라겐 단백질 발현 증가에 영향을 미치지 않는 것으로 생각되어진다. 철분은 3일 동안 10~50 μM 처리에서 323.0%까지 콜라겐 type I 단백질의 발현을 증가시켰으나 30 μM 이상의 농도처리에서는 콜라겐 type I 단백질의 발현 증가가 다소 감소(179.7%)하였다. 또한 5일 동안 철분의 5~10 μM 처리 시 콜라겐 type I 발현을 158.2%까지 현저히 증가시켰으나 20 μM 이상의 농도처리에서 콜라겐 type I 발현을 현저히 감소시켰다. 철분의 콜라겐 type III 단백질의 발현은 3일과 5일 처리 시 5~30 μM 에서 각각 250.3%, 185.1%까지 증가시켰으나 50 μM 의 처리에서는 콜라겐 type III 단백질 발현을 감소시켰으며 3일 처리에 비해 5일 처리 시 감소 정도가 현저히 컸다. 철분은 비타민 C와 더불어 콜라겐 합성에 중요한 조효소로 작용하는 영양소로 혈청 내 농도 11~35 μM (14)에서 콜라겐 단백질 합성을 현저히 증가시켰다. 이는 여러 사전 연구(27,28)와 일치하는 결과로서 철분 역시 콜라겐 합성에 중요한 조효소임을 확인하였다. 본 연구에서 철분은 다소 세포 증식 증가를 수반하나 증가 정도에 비해 콜라겐 단백질 합성 증가가 현저히 크게 나타났다. 따라서 단기간의 콜라겐 합성 증가에는 철분이 중요한 영양소로 생각되어지며 장기간의 콜라겐 합성 증가의 중요한 영양소는 비타민 C로 생각되어진다.

요 약

본 연구에서는 HS27 피부 섬유아세포에 비타민 C, silicon, 철분, proline 및 lysine을 혈청 및 피부 내 농도 범위로 처리한 후 세포의 증식을 비롯하여 콜라겐 I 과 III의 mRNA 및 단백질의 발현을 비교하였다. 비타민 C는 처리 기간 및 농도와 무관하게 세포 증식 및 mRNA 발현에 영향을 미치지 않았으며 콜라겐 type I 및 III의 단백질 발현은 각각 5~50 μM , 10~50 μM 농도에서 5일 처리 시 683.9%, 182% 이상으로 발현을 증가시켰다. Silicon의 3일 및 5일 농도별 처리는 세포증식과 콜라겐 mRNA 및 단백질 발현을 다소 감소시키거나 영향을 미치지 않았다. 철분의 3일 및 5일 처리는 혈청 내 농도(11~35 μM)에서 콜라겐 mRNA 발현에 영향을 미치지 않았으며 세포 증식 및 콜라겐 단백질 발현을 증가시켰다. 또한 철분의 5~30 μM 의 농도 처리는 5일 처리보다 3일 처리 시 발현수준이 훨씬 컸다. 콜라겐의 구성 아미노산인 proline 및 lysine은 섬유아세포의 증식을 증가시켰다. 따라

서 단기간의 콜라겐의 합성 증가는 철분의 섭취가 적합하나 장기간의 섭취에는 비타민 C의 섭취와 더불어 철분의 섭취가 필요한 것으로 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 2006년 정부지원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(2006-KRF-531-C00063).

문 헌

- Ishikawa T, Ishikawa O, Miyachi Y. 1995. Measurement of skin elastic properties with a new suction device (I): Relationship to age, sex and the degree of obesity in normal individuals. *J Dermatol* 22: 713-717.
- Elsner P, Wilhelm D, Maibach HI. 1990. Mechanical properties of human forearm and vulvar skin. *Br J Dermatol* 122: 607-614.
- Jemec GB, Jemec B, Jemec BI, Serup J. 1990. The effect of superficial hydration on the mechanical properties of human skin *in vivo*: implications for plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 85: 100-103.
- Uitto J, Olsen DR, Fazio MJ. 1989. Extracellular matrix of the skin: 50 years process. *J Invest Dermatol* 92: 61s-77s.
- Nimni ME, Harkness RD. 1993. Molecular structure and functions of collagen. In *Collagen*. Nimni ME, ed. CRC Press, Florida. p 1-3.
- Kim NM, Koo BS, Lee SK, Hwang EI, So SH, Do JH. 2007. Effect of Korean red ginseng on collagen biosynthesis and MMP-1 activity in human dermal fibroblast. *J Ginseng Res* 31: 86-92.
- Bauer EA, Uitto J. 1982. *Skin, collagen in health and disease*. JB Weiss, MIV Jayson, eds. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK. p 474-487.
- Pinnel SR, Murad S, Darr D. 1987. Induction of collagen synthesis by ascorbic acid. A possible mechanism. *Arch Dermatol* 123: 1684-1686.
- Tinker D, Rucker RB. 1985. Accumulation and chemical modification of connective tissue proteins. *Physiol Rev* 65: 607-657.
- Berg RA, Kerr JS. 1992. Nutritional aspects of collagen metabolism. *Annu Rev Nutr* 12: 369-390.
- Passoja K, Rautavuoma K, Ala-Kokko L, Kosonen T, Kivirikko KI. 1998. Cloning and characterization of a third human lysyl hydroxylase isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10482-10486.
- Seaborn CD, Nielsen FH. 2002. Silicon deprivation decreases collagen formation in wounds and bone, and ornithine transaminase enzyme activity in liver. *Biol Trace Elem Res* 89: 251-261.
- Groff JL, Gropper SS. 1999. *Advanced nutrition and human metabolism*. 3rd ed. Peter Marshall Publisher, Wadsworth/Thomson Learning, Belmont, USA. p 251.
- Tajima S, Pinnel SR. 1996. Ascorbic acid preferentially enhances type I and III collagen gene transcription in human skin fibroblasts. *J Derm Sci* 11: 250-253.
- Walingo KM. 2005. Role of vitamin C (ascorbic acid) on human health—A review. *African J Food Agric Nutr Develop (AJFAND)* 5: 1-13.

16. Murad S, Grove D, Lindberg KA, Reynolds G, Sivarajah A, Pinnell SR. 1981. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2879-2882.
17. Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HF, Evans BA, Thompson RP, Powell JJ, Hampson GN. 2003. Orthosilicic acid stimulates collagen type I synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells *in vitro*. *Bone* 32: 127-135.
18. Che P, Xu J, Shi H, Ma Y. 1995. Quantitative determination of serum iron in human blood by high performance capillary electrophoresis. *J Chromato B* 669: 45-51.
19. Dionisi-Vici C, De Felice L, El Hachem M, Bottero S, Rizzo C, Paoloni A, Goffredo B, Sabetta G, Caniglia M. 1998. Intravenous immune globulin in lysinuric protein intolerance. *J Inherit Metab Dis* 21: 95-102.
20. Kang SA, Jang KH, Cho YH, Hong KH, Kong SH, Choue RW. 2001. High performance liquid chromatographic analysis of isoflavones in soybean and blackbean. *J Arache* 8: 44-48.
21. Bernard MP, Myers JC, Chu ML, Ramirez F, Eikenberry EF, Prockop DJ. 1983. Structure of a cDNA for the pro alpha 2 chain of human type I procollagen. Comparison with chick cDNA for pro alpha 2 (I) identifies structurally conserved features of the protein and the gene. *Biochemistry* 22: 1139-1145.
22. Ala-Kokko L, Kontusaari S, Baldwin CT, Kuivaniemi H, Prockop DJ. 1989. Structure of cDNA clones coding for the entire prepro alpha 1 (III) chain of human type III procollagen. Differences in protein structure from type I procollagen and conservation of codon preferences. *Biochem J* 260: 509-516.
23. Shibayama H, Hisama M, Matsuda S, Ohtsuki M, Iwaki M. 2008. Effect of a novel ascorbic derivative, disodium iso-stearyl 2-O-L-ascorbyl phosphate on human dermal fibroblasts: increased collagen synthesis and inhibition of MMP-1. *Biol Pharm Bull* 31: 563-568.
24. Duarte TL, Cooke MS, Jones GD. 2009. Gene expression profiling reveals new protective roles for vitamin C in human skin cells. *Free Radic Biol Med* 46: 78-87.
25. Etienne-Manneville S, Hall A. 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 106: 489-498.
26. Carlisle EM. 1981. Silicon: a requirement in bone formation independent of vitamin D1. *Calcif Tissue Int* 33: 27-34.
27. Ruiz IG, de la Torre P, Diaz T, Esteban E, Morillas JD, Muñoz-Yagüe T, Solís-Herruzo JA. 2000. Sp family of transcription factors is involved in iron-induced collagen alpha1 (I) gene expression. *DNA Cell Biol* 19: 167-178.
28. Gardi C, Arezzini B, Fortino V, Comporti M. 2002. Effect of free iron on collagen synthesis, cell proliferation and MMP-2 expression in rat hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol* 64: 1139-1145.

(2009년 7월 6일 접수; 2009년 10월 23일 채택)