

섭유아세포에서 민들레 추출물 함유제(AF-343)에 의한 제 1형 교원질 발현 증가

조수목 · 김재현 · 김종근* · 박기문** · 조호찬*** · 김인수**** · 김범준**** · 천영진***** · 조재위*****#

국립농업과학원 농식품자원부 기능성식품과, *(주)성균바이오텍, **성균관대학교 식품생명과학부,
계명대학교 의과대학 내과학교실, *중앙대학교 의과대학 피부과학교실,
*****중앙대학교 약학대학, *****계명대학교 의과대학 피부과학교실

(Received October 24, 2011; Revised November 18, 2011; Accepted December 26, 2011)

Increased Expression of Type I Collagen in AF-343 Treated Human Skin Fibroblasts

Soo Muk Cho, Jae Hyun Kim, Jong Keun Kim*, Ki Moon Park**, Cho Ho-Chan***, In Su Kim****, Beom Joon Kim****, Young-Jin Chun***** and Cho Jae We*****#

Functional Food & Nutrition Division, Department of Agrofood Resources, NAAS, RDA, Suwon 441-707, Korea
*Sung Kyun Biotech Co., Ltd., Ansan 425-839, Korea

**Department of Food Science and Biotechnology, Sungkyunkwan University, Seoul 110-745, Korea

***Departments of Endocrinology, Internal Medicine, Keimyung University College of Medicine, Daegu 704-701, Korea

****Departments of Dermatology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul 156-756, Korea

*****Chung-Ang University College of Pharmacy, Seoul 156-756, Korea

*****Dermatology, Keimyung University College of Medicine, Daegu 704-701, Korea

Abstract — We previously reported that the extract of *Taraxacum platycarpum* (AF-343) had several biological properties such as skin hydration and anti-inflammatory effects, thereby AF-343 be a promising anti-atopic dermatitis agent. However, few studies have been conducted to evaluate its effect on modulation of extracellular matrix proteins in human skin fibroblasts. The purpose of this study was to investigate the expressions of type I collagen, MMP-1, Smad2/3, and TIMP-1 proteins in AF-343-treated human skin fibroblasts. Human skin fibroblasts were treated by various concentrations of AF-343 (0~2 mg/ml). The expressions of type I collagen, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), Smad2/3, and TIMP-1 proteins were analyzed by Western blot analysis. In addition, level of type I collagen mRNA was analyzed by CAT assay. Expression of type I collagen protein was increased in AF-343-treated human skin fibroblasts by dose and time-dependent manners. Consistent with this result, the expressions of phospho-Smad2/3 in skin fibroblasts were increased and MMP-1 expression was decreased by AF-343 treatment. TIMP-1 expression was not significantly changed in AF-343 treated skin fibroblasts. Extract of *Taraxacum platycarpum* (AF-343)-induced up-regulation of type I collagen expression was through increased expression of phospho-Smad2/3. These results were occurred combined with down-regulation of MMP-1 in skin fibroblasts. Taken together, this study indicated that AF-343 has property of the modulation of ECM in tissue as well as skin hydration and anti-inflammation.

Keywords □ *Taraxacum*, type I collagen, MMP-1, Smad2/3

천연물 중 항염증, 항산화 혹은 항노화 기능이 있는 것으로 알려진 물질들을 사용하여 치료제로 개발하고자 하는 연구들이 급격히 증가하고 있다. 울금(*Curcuma longa*)에서 추출한 curcumin, 포도(grapes) 유래 resveratrol, milk thistle 유래 silymarin 등이

대표적인 예이다.

속명인 *Taraxacum*인 민들레(dandelion)의 잎과 뿌리는 식품, 차, 음료수 등에 사용 될 뿐만 아니라,¹⁾ 민들레에서 추출한 성분들이 항염증, 항알레르기 효과가 있는 것으로 알려져 염증을 억제하는 치료제 개발 시 사용될 수 있는 유용한 성분으로 각광 받고 있다.²⁾ 그러나 이러한 민들레 추출물이 피부의 결체조직 성분에 미치는 영향에 대한 연구는 미비한 실정이다.

피부의 진피는 피부 부피의 대부분을 차지하며, 유연성, 탄력

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-250-7404 (팩스) 053-250-7625
(E-mail) janylove99@dsmc.or.kr

성, 장력과 같은 피부의 특성에 주로 관여한다. 진피 내 결합조직의 주성분은 제 1형 교원질이며, 섬유아세포에서 생성되는 것으로 알려져 있다.³⁾ 제 1형 교원질 생성 촉진에는 TGF- β /Smad 신호전달 체계가 관여하는데,⁴⁾ TGF- β 1이 섬유아세포 표면의 TGF- β 1 수용체에 결합하면, Smad family라고 불리는 세포내 단백질이 활성화 된다. 특히 Smad2와 Smad3가 활성화되면 제 1형 교원질의 생성이 촉진되며, Smad7이 활성화 되면 교원질 생성은 억제되어 시기 적절하게 Smad 단백질들이 교원질 생합성을 조절하는데 관여한다. Matrix metalloproteinase(MMP)는 세포외기질을 분해시키는 중요한 단백질로 교원질이 진피내에 과다하게 축적되는 것을 막아주는 중요한 역할을 한다. MMP 단백질이 과도하게 활성화 되면, 필요이상으로 교원질의 분해가 진행되기 때문에, MMP의 활성을 억제하는 TIMP(tissue inhibitor of MMPs)가 시기 적절하게 발현되어 진피 내 제 1형 교원질의 항상성에 관여하고 있다.⁵⁾ 이처럼 제 1형 교원질의 생합성은 TGF- β /Smad 신호전달체계 및 MMP, TIMP-1의 상호작용에 의하여 정교하게 조절 되고 있다.

본 연구는 배양한 피부섬유아세포에 다양한 농도의 민들레 추출물 함유제(AF-343)를 처리하고, 피부 조직의 탄력과 유연성 및 항상성을 좌우하는 제1형 교원질 생합성 과정에 미치는 영향 및 그 기전을 규명한 것이다.

실험방법

세포주 및 세포 배양

섬유아세포는 10% fetal bovine serum(FBS)과 penicillin/streptomycin(10 μ /m)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, GibcoBRL, Braunschweig, Germany) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 세포배양기에서 배양하면서, 주로 3~7 세대 섬유아세포주를 실험에 사용하였다.

AF-343의 처리

민들레추출물 함유제(AF-343)는 포공영 추출물 28%, 결명자 추출물 28%, 유근피 추출물 14%, 말토덱스트린 30%으로 구성되었고, AF-343의 제조는 이전에 보고한 방법과 동일한 방법을 사용하였으며,⁶⁾ 섬유아세포에 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 μ g/ μ l 농도로 처리하고 48시간 동안 세포를 배양한 후 단백질을 추출하여 실험에 사용하였다.

Western blot 분석

배양 세포에 lysis buffer[10 mM Tris-Cl(pH 7.4), 5 mM EDTA(pH 8.0), 130 mM NaCl, 1% TritonX-100]에 0.2 M PMSF(phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride), 단백질분해효소 억제제(0.02 mM aprotinin, 2 mM leupeptin, 5 mM phenanthroline, 28 mM benzamidine-HCl)를 넣어 단백질을 추출한 후 각각 30 μ g

농도로 정량화 하여 실험에 사용하였다. 제 1형 교원질, Smad2/3, MMP-1, 그리고 TIMP-1(Santa Cruz Co., CA, USA)에 대한 각각의 일차 항체들을 사용하여 단백질 발현 양상을 분석하였다.

CAT Assay

제1형 교원질 촉진자 유전자의 CAT-promoter plasmid (COL1A2)를 1×10^5 cells/ml의 밀도로 접종한 섬유아세포에 calcium chloride/DNA coprecipitation 방법으로 4시간 방치한 후 1분 동안의 glycerol(15%) shock을 시행하여 transfection하였다. Calcium chloride 침전물은 25 μ g/ μ l의 plasmid DNA 농도로 준비하였다. 세포들을 curcumin 처리된 실험 배지에서 24시간 동안 배양한 후 pH 7.8의 0.25 mol Tris-HCl에서 3주기의 냉동-해동에 의해 분해하였다. 각각에서 추출된 단백질은 [¹⁴C]-chloramphenicol을 기질로 사용하는 CAT 활성도의 측정에 사용하였다. 아세틸화 및 비아세틸화된 형태의 방사성 chloramphenicol은 thin layer chromatography로 분리되어 autoradiography를 실시하였다.

실험결과

AF-343 처리 시간에 따른 제 1형 교원질 발현 증가 및 MMP-1 발현 감소

AF-343 처리가 섬유아세포에서 제 1형 교원질의 발현에 미치는 영향을 알아보하고자, AF-343(2 μ g/m)을 섬유아세포에 처리하고 48시간 뒤 Western blot 분석을 시행하였다. AF-343 처리 24

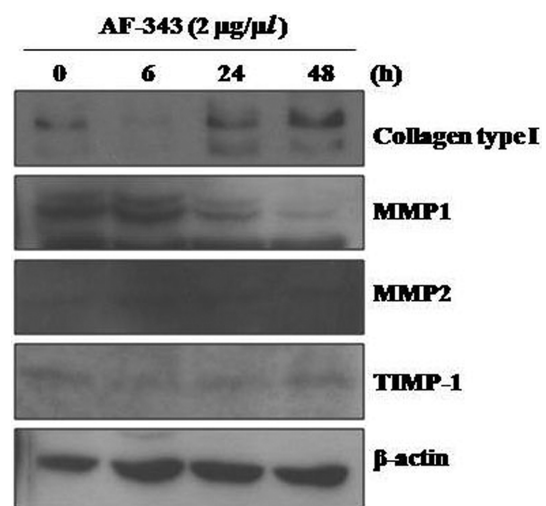


Fig. 1 – Increased expression of type I collagen in AF-343 treated human skin fibroblasts (Time-dependent manner). Human skin fibroblasts were cultured with AF-343 (2 mg/ml) for the designated culture times (6, 24, and 48 h). Western blot analyses were performed to measure levels of type I collagen, MMP1, MMP2, TIMP-1. The level of β -actin was determined as a loading control.

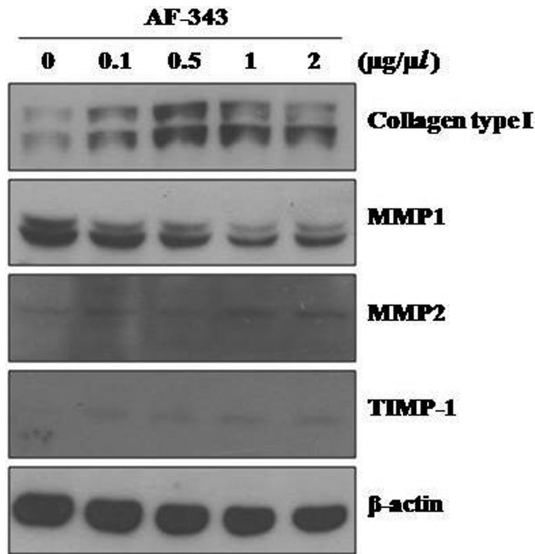


Fig. 2 – Concentration-dependent increase of type I collagen in human skin fibroblasts by AF-343. Human skin fibroblasts were cultured with various concentration of AF-343 (0.1, 0.5, 1 and 2 mg/ml) for 48 h. Western blot analyses were performed to measure levels of type I collagen, MMP1, MMP2, TIMP-1. The level of β-actin was determined as a loading control.

시간 뒤부터 제 1형 교원질의 단백질 발현이 증가함과 동시에, MMP-1의 발현은 현저하게 감소하였다(Fig. 1). MMP-2 및 TIMP-1은 현저한 발현 차이가 관찰되지 않았다.

AF-343 처치 농도에 따른 제 1형 교원질 발현 증가 및 MMP-1 발현 감소

섬유아세포에서 AF-343 농도 의존적으로 제 1형 교원질, MMP-1, MMP-2, TIMP-1 발현이 변화하는지를 알아보려고, AF-343을 농도별로(0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 µg/ml) 섬유아세포에 처리하고, 48 시간 뒤 Western blot을 시행하였다(Fig. 2). AF-343 농도가 증가하면 제 1형 교원질의 발현이 증가한 반면, MMP-1은 AF-343 농도가 증가 할수록 점진적인 발현 감소가 관찰 되었다(Fig. 2). MMP-1을 억제하는 기능이 있는 TIMP-1은 AF-343 농도가 증가 할수록 소폭의 발현 증가가 관찰되었다(Fig. 2). MMP-2 및 TIMP-1의 경우는 제 1형 교원질 및 MMP-1과 비교하여 현저한 발현 변화는 관찰되지 않았다.

AF-343에 의한 제 1형 교원질 mRNA 증가

AF-343이 섬유아세포에서 제 1형 교원질의 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보려고, AF-343(2 µg/µl)을 섬유아세포에 처리하고 시간 대별 CAT 분석을 시행하였다. AF-343 처리 시 제 1형 교원질의 CAT 활성도가 소폭 증가하였으며(Fig. 3), 이는 AF-343 처리 시 제 1형 교원질 발현 증가가 mRNA 수준에서 이루어

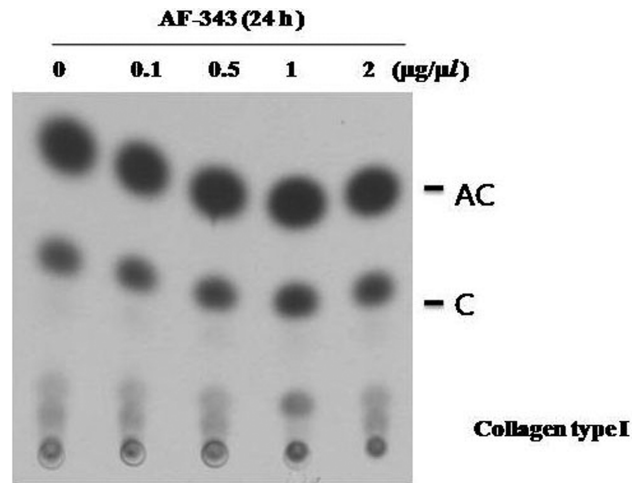


Fig. 3 – Effect of AF-343 on CAT activity of type I collagen in human skin fibroblasts. Human skin fibroblasts were transfected with COL1A2 CAT promoter plasmid for 24 h. Cells were treated with various concentration of AF-343 (0.1, 0.5, 1 and 2 mg/ml) for 24 h. Cell lysates were prepared and CAT activities were determined. AC, acetylated chloramphenicol; C, chloramphenicol.

어짐을 시사한다.

AF-343에 의한 Smad 단백질들의 발현 변화

AF-343에 의한 제 1형 교원질 발현 증가에 Smad2/3 활성화가

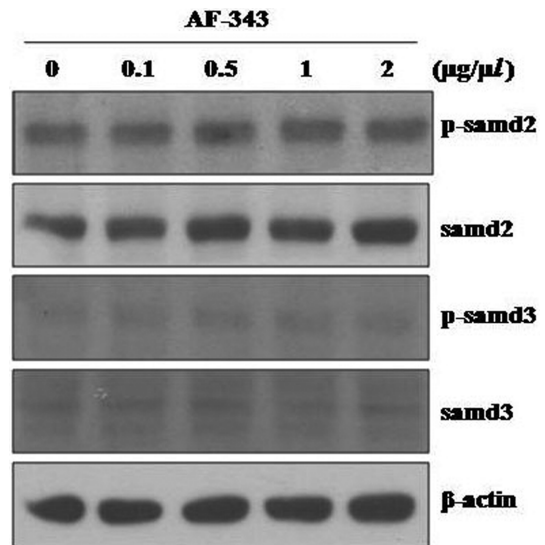


Fig. 4 – Effect of AF-343 on activation of Smad in human skin fibroblasts. Human skin fibroblasts were cultured with various concentration of AF-343 (0.1, 0.5, 1 and 2 mg/ml) for 48 h. Western blot analyses were performed to measure levels of total Smad2, phospho-Smad2, total Smad3, and phospho-Smad3. The level of β-actin was determined as a loading control.

관여하는지 알아보기 위하여, AF-343을 농도별로(0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{g/ml}$) 섬유아세포에 처리하고 48시간 뒤 Western blot을 시행한 결과, AF-343 농도가 증가할수록 Smad2/3의 활성화를 시사하는 phosphor-Smad2/3의 발현이 소폭 증가하였다(Fig. 4).

고 찰

본 연구에서는 민들레 추출물 함유제(AF-343)가 섬유아세포의 제 1형 교원질 생합성에 관여하는 신호전달체계에 미치는 영향을 연구한 결과, AF-343은 섬유아세포에서 smad2/3 활성화를 통하여 제 1형 교원질 발현이 증가할 뿐만 아니라, 교원질을 분해하는 MMP-1의 발현은 감소함을 확인하였다. 이는 본 연구팀이 이미 보고한 아토피피부염 동물모델에서 AF-343의 항알레르기 및 피부 보습 효능 외에 항노화 기능을 시사하는 새로운 효능을 제시한 것이다.

사람 피부의 진피에 있는 결합조직 교원질 중 80%가 제 1형 교원질이며, 섬유아세포에서 주로 생성된다. 교원질은 피부 조직의 탄력성, 유연성에 관여할 뿐만 아니라, 피부 노화, 상처 재생 과정에서도 교원질의 생합성 및 분해가 중요하게 관여하고 있다.^{7,8)} 제 1형 교원질 생성에는 Smad, AP-1, SP-1 등이 주요한 전사조절 인자로 작용하고 있는데, 그 하위 신호 전달 체계 중 TGF- β /Smad pathway가 제 1형 교원질 생성에 있어 가장 중요하다고 인식되고 있다.⁹⁾ 교원질의 분해에는 MMP-1, MMP-2 단백질이 관여하며, 과도한 MMP의 활성화를 막기 위하여 TIMP-1 단백질이 MMP 기능을 적절하게 억제하여 항상성을 유지하고 있다.¹⁰⁾

민들레(*Taraxacum platycarpum*)는 포공영이란 생약명을 가지는 국화과의 다년생 식물로서 한방에서는 각장, 해열, 이뇨, 건위, 거담, 해독 등에 사용하였고, 서양에서는 항산화, 항균, 담즙 분비 촉진, 항류마티스 및 이뇨 등에 사용하는 등 동서양에서 오래 전부터 여러 가지 질병에 대하여 민간에서 유용하게 사용하여 온 약용 식물 중의 하나이다.¹¹⁾ 민들레는 비타민H(비오틴), 콜린, 글루텐, 검, 이노시톨, 이눌린, 철분, 락토프린, 리놀렌산, 마그네슘, 나이아신, para-aminobenzoic acid(PABA), 인, 칼륨, 단백질, 레신, 황, 아연, 비타민 A, B1, B2, B5, B6, B9, B12, C, E, P 등의 성분을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ 이전의 연구에서 민들레 추출물의 화학 성분과 항균, 항종양,¹³⁾ 항염,^{14,15)} 항산화¹⁶⁾ 작용 등에 대하여 보고된 바 있고, 이들을 이용한 차 등의 건강보조식품이나 항암제 등의 약제가 개발되고 있다.

민들레 추출물은, thrombin에 결합하여 항응고제 효능이 있음이 밝혀졌으며, 특히 desacetylmaticarin은 항알레르기 기능이 있음이 보고 되어 민들레 추출물을 이용한 항염증, 항알레르기 제제 개발이 대두되고 있다.¹⁵⁾

본 연구에서 배양한 피부 섬유아세포에 AF-343을 처리한 후 제 1형 교원질의 발현 양상을 분석한 결과, CAT assay에서 제 1형 교원질 mRNA 발현이 소폭 증가 하였으며, 이는 Western

blot에서도 제 1형 교원질의 단백질 발현 증가 결과와 일치하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 AF-343이 향후 교원질 감소와 관련된 노화과정, 혹은 상처 재생을 촉진시키는 약제 개발 시 중요한 성분으로 역할을 할 수 있음을 시사한다.

TGF- β /Smad 신호전달체계는 제 1형 교원질 생성에 중요한 상위신호전달체계이다. 이번 연구에서 AF-343에 의한 제 1형 교원질의 발현 증가가 TGF- β /Smad 신호전달체계의 억제에 의한 것 인지를 확인한 결과, AF-343 처리 시 Smad2, Smad3 단백질의 인산화가 소폭 증가하였는데, 이는 smad2, smad3의 활성화를 의미하며, 활성화된 smad2, smad3가 핵 내로 이동하여 제 1형 교원질의 전사(transcription) 과정을 촉진시킨 것으로 생각된다.

AF-343이 섬유아세포에서 교원질을 분해하는 MMP-1 및 MMP-2, 교원질 분해를 억제하는데 관여하는 TIMP-1의 발현에 미치는 영향에 대한 보고는 미비한 실정이다. 이번 연구에서 AF-343은 섬유아세포에서 농도 의존적으로 MMP-1 단백질의 발현을 감소 시켰으며, MMP-2 및 TIMP-1 단백질의 발현에는 현저한 영향을 미치지 못하였다. MMP-1은 p38 혹은 extracellular signal-regulated kinase(ERK)와 같은 mitogen activated protein kinases(MAPK)에 의하여 발현이 촉진된다고 알려져 있는데, 섬유아세포에 AF-343 처리 시 p38 및 ERK MAPK가 억제 되는지를 연구하면 더 상세한 조절 기전이 규명 될 것으로 사료된다.

결론적으로, AF-343은 배양한 피부 섬유아세포에서 Smad2와 Smad3의 활성화를 통하여 제 1형 교원질 생성을 증가시켰으며, 이와 동시에 MMP-1의 발현은 감소되었는데, 이는 향후 AF-343을 이용한 항노화 및 상처재생 제제 개발 시 AF-343이 주요한 구성요소로 사용될 수 있음을 시사한다.

결 론

본 연구에서 배양한 피부 섬유아세포에 AF-343을 처리한 결과 Smad 2, Smad 3 단백질의 활성화로 제 1형 교원질 단백질 발현이 증가하였으며, MMP-1 단백질의 발현은 감소하였다. 이 같은 결과는 AF-343이 향후 항노화 및 피부재생을 위하여 유효 성분으로 사용될 수 있음을 나타낸다.

감사의 말씀

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발 사업(과제번호 PJ0067532011)의 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Schütz, K., Carle, R. and Schieber, A. : Taraxacum-a review on

- its phytochemical and pharmacological profile. *J. Ethnopharmacol.* **107**, 313 (2006).
- 2) Cheong, H., Choi, E. J., Yoo, G. S., Kim, K. M. and Ryu, S. Y. : Desacetylmaticarin, an anti-allergic component from *Taraxacum platycarpum*. *Planta. Med.* **64**, 577 (1998).
 - 3) Bhogal, R. K., Stoica, C. M., McGaha, T. L. and Bona, C. A. : Molecular aspects of regulation of collagen gene expression in fibrosis. *J. Clin. Immunol.* **25**, 592 (2005).
 - 4) Verrecchia, F., Mauviel, A. and Farge, D. : Transforming growth factor-beta signaling through the Smad proteins: role in systemic sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **5**, 563 (2006).
 - 5) Homebeck, W. : Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *Pathol. Biol.* **51**, 569 (2003).
 - 6) Kim, J. H., Lee, H. I., Park, J. H., Lim, Y. Y., Kim, B. J., Lim, I. S., Kim, M. N., Kim, H. S., Kim, J. K., Han, S. H., Cho, S. M., Kim, J. H. and Park, K. M. : The effect of the extracts of *Taraxacum platycarpum* (AF-343) in atopic dermatitis. *Korean J. Asthma. Allergy. Clin. Immunol.* **30**, 36 (2010)
 - 7) Wulf, H. C., Sandby-Møller, J., Kobayasi, T. and Gniadecki, R. : Skin aging and natural photoprotection. *Micron* **35**, 185 (2004).
 - 8) Metcalfe, A. D. and Ferguson, M. W. : Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J. R. Soc. Interface.* **4**, 413 (2007).
 - 9) Cutroneo, K. R. : TGF-beta-induced fibrosis and SMAD signaling: oligo decoys as natural therapeutics for inhibition of tissue fibrosis and scarring. *Wound. Repair. Regen.* **15**, S54 (2007).
 - 10) Davis, G. E. and Saunders, W. B. : Molecular balance of capillary tube formation versus regression in wound repair: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **11**, 44 (2006).
 - 11) Chang, J. K. : Seasonly wild flowers of Korea. Doseochulpun Nexus, Seoul (1997).
 - 12) Leu, Y. L., Shi, L. S. and Damu, A. G. : Chemical constituents of *Taraxacum formosanum*. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)* **51**, 599 (2003).
 - 13) Jeong, J. Y., Chung, Y. B., Lee, C. C., Park, S. W. and Lee, C. K. : Studies on immunopotentiating activities of antitumor polysaccharide from aerial parts of *Taraxacum platycarpum*. *Arch. Pharm. Res.* **14**, 68 (1991).
 - 14) Kim, H. M., Shin, H. Y., Lim, K. H., Ryu, S. T., Shin, T. Y., Chae, H. J., Kim, H. R., Lyu, Y. S., An, N. H. and Lim, K. S. : *Taraxacum officinale* inhibits tumor necrosis factor-alpha production from rat astrocytes. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **22**, 519 (2000).
 - 15) Seo, S. W., Koo, H. N., An, H. J., Kwon, K. B., Lim, B. C., Seo, E. A., Ryu, D. G., Moon, G., Kim, H. Y., Kim, H. M. and Hong, S. H. : *Taraxacum officinale* protects against cholecystokinin-induced acute pancreatitis in rats. *World J. Gastroenterol.* **11**, 597 (2005).
 - 16) Hu, C. and Kitts, D. D. : Dandelion (*Taraxacum officinale*) flower extract suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide and prevents lipid oxidation *in vitro*. *Phytomedicine.* **12**, 588 (2005).