

## Peptides-derived from Scales of *Branchiostegus japonicus* Inhibit Ultraviolet B-induced Oxidative Damage and Photo-aging in Skin Cells

Min Chang Oh<sup>1</sup>, Ki Cheon Kim<sup>1</sup>, Chang-ik Ko<sup>2</sup>, Yong Seok Ahn<sup>2</sup> and Jin Won Hyun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Medicine, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

<sup>2</sup>Research Institute of Processing of Jeju Fisher Food, Choung Ryong Fisheries Co., LTD, Jeju 697-943, Korea

Received November 30, 2014 /Revised January 27, 2015 /Accepted March 9, 2015

Collagen peptides, which are found at high concentrations in the human body, are present in animal bones and the skin of marine organisms, namely, fish scales. Collagen is the most abundant structural protein of various connective tissues in animals. Furthermore, it is widely used in biomedical material, pharmaceutical, cosmetic, food, and leather industries. Peptides extracted from scales of various fish protect against ultraviolet B (UVB)-induced skin damage and photo-aging. However, the protective effects of collagen peptides derived from the scales of *Branchiostegus japonicus* against UVB exposure are unclear. This study investigated the effects of peptides larger than 1 kDa (high-molecular weight peptides [HMP]) and smaller than 1 kDa (low-molecular weight peptides [LMP]), derived from extracts of *B. japonicus* scales, against UVB-induced skin damage and photo-aging. These peptides scavenged 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals in a dose-dependent manner. In UVB-exposed HaCaT human keratinocytes, LMP inhibited 8-isoprostanate generation, a marker of cellular lipid peroxidation. The peptides also suppressed the UVB-induced increase in tyrosinase activity and melanin content in B16F10 mouse melanoma cells. In addition, the LMP and HMP treatment suppressed UVB-induced elastase and matrix metalloproteinase-1 activities in the HaCaT cells. These results indicate that peptides derived from *B. japonicus* scales have antioxidant, antiphoto-aging, and skin-whitening effects.

**Key words :** B16F10 cells, *Branchiostegus japonicas* scales, collagen peptides, HaCaT cells, ultraviolet B

### 서 론

자외선 B (ultraviolet B, UVB)는 최근 오존층 파괴로 인한 투과가 증가되는 추세이며[31], 따라서 UVB에 대한 피부의 노출에 의하여 피부 질환 및 광 노화 등이 증가되고 있다[19]. 특히 피부 세포가 UVB에 노출이 되면 직접적인 경로로 DNA의 손상과 간접적인 경로인 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성되고 그 ROS로 인해 손상이 일어나 광노화를 초래한다[7, 16, 20]. UVB로 유도된 ROS 중 가장 높은 반응성을 가진 hydroxyl radical은 L-tyrosine-tyrosinase 반응을 통해서 생성된다. 따라서 L-tyrosine-tyrosinase 과정에 의해 생성되는 melanin은 피부 산화적 스트레스를 유도할 수 있다[26]. Melanin은 피부색이나 눈동자, 머리카락 등의 색을 결정하는 색소로써 UVB 노출에 의한 세포의 손상을 억제하는 기능을 하지만, 과도한 UVB의 노출은 과도한 melanin의 생성으로 기미, 주근깨, 검버섯, 흑색종 등의 질병의 원인이 된다[3,

13]. 이러한 melanin의 생합성 과정에 중요한 역할을 하는 tyrosinase는 melanin 합성 과정에서 tyrosine이 dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 변환시키고 다시 DOPA를 DOPA quinone으로 변환시키는데 작용하여 최종적으로 melanin을 합성한다[4, 9]. 따라서 미백효과를 보기 위해서는 tyrosinase의 억제효과를 봄으로써 melanin 생성의 억제효과를 입증하게 된다. 미백제로 잘 알려진 arbutin은 이러한 tyrosinase 억제제인 hydroquinone과 유사한 hydroquinone 부분을 갖고 있다[1, 23, 24]. 하지만 안정성의 문제로 인해 사용이 제한되고 있다. 콜라겐은 피부세포의 구성요소 중 하나이며, 피부세포는 노화가 진행될수록 콜라겐의 생산이 감소된다[29]. 또한 UVB의 노출은 콜라겐이 감소하여 조기 피부노화가 발생하게 되는데, 이를 광 노화(photo-aging)라 하며 주름, 색소 침착, 건조하고 거친 피부 등을 유도한다[12]. 이전의 연구에서 부산물인 *Labeo rohita*, *Catla catla*, *Pogonias cromis*, *Archosargus probatocephalus*, *Lates calcarifer* 등 각종 어류 비늘을 이용하여 단백질, 콜라겐, 아미노산 등 유용한 물질들이 확인되었다[17, 21, 22, 25]. 그리고 *Tilapia zillii*의 비늘 추출물에서 콜라겐 펩타이드 성분이 UVB로 유도된 피부 손상을 억제하였다[27]. 또한, *Otolithes ruber* 추출 펩타이드에서 항 산화 효과가 보고되었다[18]. 그러나 옥돔(*Branchiostegus japonicas*) 비늘에서 추출된 펩타이드에 대한 생리 활성 연구는 많이 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 UVB가 조사된 피부세포에서 옥

\*Corresponding author

Tel : +82-64-754-3838, Fax : +82-64-702-2687

E-mail : jinwonh@jejunu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

돌비늘 유래 펩타이드의 항 노화, 항 산화, 미백 효과에 대한 연구를 진행하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용한 옥돔(*B. japonicas*) 비늘은 제주도 서귀포시에 위치한 주제 청룡수산에서 제공되었으며, 담수를 이용하여 수세 후 냉동 보관하였다.

### 펩타이드 제조

옥돔비늘에 원료대비 20배(v/w)의 증류수를 가해 60°C에서 3시간 3회 반복하여 열수 추출하였다. 열수 추출한 용액은 단백질 가수 분해 효소인 alcalase를 이용하여 pH 8.0, 50°C, 6시간, 기질 대 효소 비는 100(wt/wt)에서 가수분해하였으며, 다시 원심분리(12,000 rpm, 15 min) 과정을 거쳐 상등액을 분리하였다. 분리된 상등액을 1.2 μm과 0.45 μm 멤브레인 필터를 통한 여과 후 한외 여과막(1 kDa, Satorius Stedim Biotech, Germany)을 이용하여 투과된 펩타이드를 1 kDa 이하 저분자 펩타이드(LMP)로 분류하였고, 투과되지 않은 펩타이드를 1 kDa 이상 고분자 펩타이드(HMP)로 분류하였다.

### 세포 배양과 UVB 조사

인간 각질세포(HaCaT)와 마우스 흑색종 세포(B16F10)는 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 배양하였다. 세포배양에 사용되는 배지는 HaCaT 세포는 RPMI 1640, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), streptomycin (100 μg/ml) and penicillin (100 U/ml)를 사용하였고 B16F10세포는 DMEM에 10% heat-inactivated FBS, streptomycin (100 μg/ml) and penicillin (100 U/ml)를 사용하였다. UVB 조사장치는 UV Crosslinker CL-1,000M를 사용하였으며 30 mJ/cm<sup>2</sup>의 조사 강도로 실험을 하였다.

### 세포 생존율 측정

HaCaT 세포를 6 well culture plate에 1.7×105 cells/well로 심었다. 16시간 이후 세포들이 plate 표면에 안착되었는지를 확인한 후, 최종 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 mg/ml 농도의 LMP와 HMP를 처리한 후 24시간 동안 습윤 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 배양하였다. 배양 조건을 완료 후 2 mg/ml의 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium] (MTT) 시약을 최종 200 μg/ml이 되게 세포 배양액에 처리하여 3시간 동안 세포배양기에서 배양했다. 세포 내에 formazan이 생성된 것을 확인한 뒤 상등의 세포배지를 제거한 후 유기용매인 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 이용하여 세포와 formazan을 녹여준다. 완전히 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[5].

### DPPH radical 소거능 측정

LMP와 HMP은 최종 volume 200 μl에서 농도가 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 mg/ml가 되도록 희석하였다. 항산화제로 잘 알려진 N-acetyl cysteine (NAC)을 양성 대조군으로 1 mM 농도 처리하였다. 150 μl의 DPPH radical 시약과 50 μl의 LMP, HMP 그리고 NAC을 섞은 뒤 3시간 동안 실온 배양 후, 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 지질과산화 측정

UVB로 유도되는 세포 지질막의 산화적 손상 지표인 지질과산화를 측정하였다. HaCaT 세포를 24 well culture plate에 3.5×10<sup>4</sup> cells/well로 심었다. 16시간 이후 세포들이 plate 표면에 안착되었는지를 확인한 후, serum free 배지로 교체해주었다. 1시간 이후 LMP와 HMP 각각 8 mg/ml 농도와 양성 대조군 NAC 1 mM 농도 처리하였다. 1시간 이후에 30 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 조사하였다. 24시간 이후에 세포 배양액을 회수하여 8-isoprostanate EIA kit (Caymen chemical Company, Wilmington, DE, USA)에 따라 측정하였다.

### Elastase 활성 측정

HaCaT 세포를 100 mm culture dish에 1.0×10<sup>6</sup> cells/dish로 심었다. 16시간 이후 세포들이 plate 표면에 안착되었는지를 확인한 후, LMP와 HMP 8 mg/ml 농도와 양성 대조군 1 mM 농도의 NAC을 처리하였다. 1시간 이후에 30 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 조사하였다. 24시간 이후에 세포를 cell scraper로 회수하여 4°C, 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 세포 pellet을 모아주고, 세포 pellet에 0.5 ml의 0.1% Triton X-100/100 mM Tris-Cl (pH 8.0) 시약을 넣고, sonication을 하였다. 세포 혼탁액을 4°C, 1,700 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 취한 뒤, 혼탁액의 단백질 농도를 Bradford 시약을 이용하여 측정 후 정량하였다. Metalloproteinase 억제제인 phosphoramidon 1 μM을 정량된 상등액 100 μl에 넣은 후 37°C에서 20분간 배양하여 elastase 활성의 음성 대조군으로 사용하였고 elastase의 기질로 N-succinyl-tri-alanyl-p-nitroanilide를 0.3 mM의 농도가 되도록 100 μl의 상등 액과 음성 대조군에 넣고, 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 배양된 시료를 회수하여 96 well-plate에 옮긴 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다[28].

### Melanin 생성량 측정

B16F10 세포를 60 mm culture dish에 3.9×10<sup>5</sup> cells/dish로 심었다. 16시간 이후 세포들이 plate 표면에 안착 후, LMP와 HMP 8 mg/ml과 NAC 1 mM, 미백제로 잘 알려진 arbutin 1 mM을 각각 처리하였다. 1시간 이후에 30 mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB를 조사하였다. 24시간 이후에 세포를 trypsinizing 과정으로 때어내어 세포를 계산하였다. 2×10<sup>5</sup> cells로 정량된 pellet에 10% DMSO가 함유된 1N 농도의 NaOH 용액을 200 μl 넣고, 80°C

shaking incubator에서 1시간 동안 배양하였다. lysis된 샘플을 96 well-plate에 옮긴 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다 [10].

#### Tyrosinase 활성 측정

B16F10 세포를 100 mm culture dish에  $1.0 \times 10^6$  cells/dish로 심었다. 16시간 이후 세포들이 plate 표면에 안착되었는지를 확인한 후, 8 mg/ml 농도 LMP와 HMP, 1 mM 농도의 NAC, 그리고 1 mM 농도의 arbutin을 처리하였다. 1시간 이후에  $30 \text{ mJ/cm}^2$ 의 UVB를 조사하였다. 24시간 이후에 세포를 trypsinizing 과정으로 떼어내어 세포를 counting 해주었다. 그리고 회수된 세포에 0.5 ml 80 mM의 phosphate buffer (pH 6.8)를 넣고 sonication 하였다. 그리고 이 세포현탁액을  $4^\circ\text{C}$ , 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 취하였고, 현탁액의 단백질 농도를 Bradford 시약을 이용하여 측정 후 정량하였다. 그 다음, 80 mM의 phosphate buffer (pH 6.8)에 회석된 8.3 mM의 L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine) 120  $\mu\text{l}$ 과 정량된 40  $\mu\text{l}$ 의 시료와 40  $\mu\text{l}$ 의 mushroom tyrosinase (125 U)를 잘 섞어서  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분간 배양한 후, tyrosinase 억제 활성을 측정하기 위해 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 활성 측정

HaCaT 세포를 24 well culture plate에  $3.5 \times 10^4$  cells/well로 심었다. 16시간 이후 세포들이 plate 표면에 안착되었는지를 확인한 후, serum free 배지로 교체해 주었다. 1시간 후, 8 mg/ml 농도로 LMP와 HMP와 1 mM 농도의 NAC을 처리하고, 2시간 이후에  $30 \text{ mJ/cm}^2$ 의 UVB를 조사하였다. 세포배양 기에서 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 배양액을 회수하여 샘플을 만들었다. Human Active MMP-1 Fluorescent Assay kit (R&D System, Inc., Minneapolis, MN, USA) 내에 있는 MMP-1 항체가 코팅된 well plate에 Assay Diluent RS1-64 100  $\mu\text{l}$ 를 넣고 150  $\mu\text{l}$ 의 샘플을 추가한 후 실온에서 3시간 동안 shaking 하며 배양하였다. 그 다음 Well을 washing 한 후, para-Aminophenylmercuric Acetate (APMA)를 200  $\mu\text{l}$  처리하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 2시간 동안 배양기에서 배양하였다. 다시 Well을 washing한 후, 200  $\mu\text{l}$ 의 기질을 넣고  $37^\circ\text{C}$ 에서 20시간 동안 빛을 차단하여 배양기에서 배양하였다. 20시간 후, Excitation 320 nm/emission 405 nm에서 형광을 측정하였다.

#### 통계처리

각 실험은 3회 이상 반복실험을 통하여 그 결과를 얻었으며, 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 유의차 검정은 Tukey's test 이용하여 분산 분석(ANOVA)을 실시하였다;  $p<0.05$  값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다.

## 결 과

#### 저분자와 고분자 펩타이드의 세포독성에 미치는 효과

저분자 peptide (1 kDa 이하, LMP), 고분자 peptide (1 kDa 이상, HMP)의 HaCaT 세포에서 독성을 확인하기 위해 농도 별로 MTT assay를 시행하였다. LMP와 HMP의 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 mg/ml의 농도에서 LMP와 HMP에서 대조군과 비교시 독성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

#### 저분자와 고분자 펩타이드의 DPPH radical 소거 능력 측정

DPPH radical를 이용하여 LMP와 HMP의 radical 소거능력을 시험하기 위해 시행하였다. 측정 결과, LMP에서는 0.5 mg/ml 농도에서 8%, 1 mg/ml 농도에서 10%, 2 mg/ml 농도에서 16%, 4 mg/ml 농도에서 20%, 8 mg/ml 농도에서 28%, 10 mg/ml 농도에서 28%의 소거능을 보였고, HMP에서는 0.5 mg/ml 농도에서 8%, 1 mg/ml 농도에서 11%, 2 mg/ml 농도에서 19%, 4 mg/ml 농도에서 18%, 8 mg/ml 농도에서 28%, 10 mg/ml 농도에서 29%의 소거능을 보였다. 양성 대조군 1 mM NAC에서는 약 88%의 소거능을 확인하였다(Fig. 2). 앞선 결과들을 통하여 최고 활성산소 소거효율, 최저 독성을 띠는 LMP와 HMP의 농도를 8 mg/ml로 정하여 다음 연구를 진행하였다.

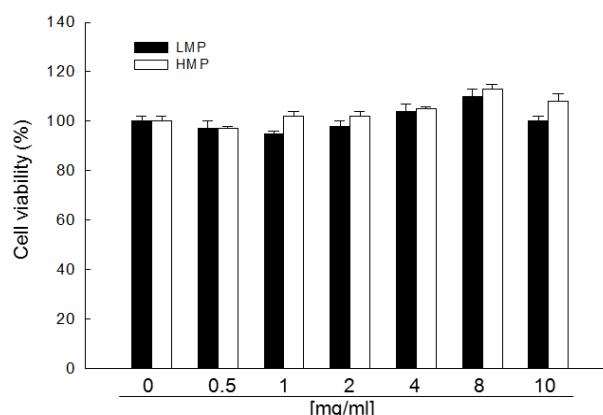


Fig. 1. Cytotoxic effects of low molecular weight peptides (LMP) and high molecular weight peptides (HMP) on HaCaT cells. HaCaT cell viability was investigated using the MTT assay to determine the cytotoxic effects of LMP and HMP. After incubation for a further 24 hr, MTT stock solution (10  $\mu\text{l}$ , 2 mg/ml) was added to each well to yield a total reaction concentration of 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Cells were treated with LMP or HMP at a concentration of 0.5, 1, 2, 4, 8, or 10 mg/ml. 3 hr later, the supernatants were sucked, and application of the DMSO dissolved formazan crystals in each well, and the absorbance of solution was read at 540 nm on a scanning multiwell spectrophotometer.

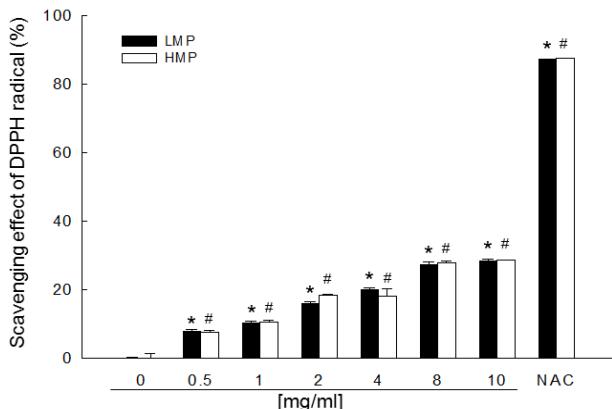


Fig. 2. Scavenging effects of LMP and HMP against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. The radical-scavenging effects of LMP and HMP were investigated using the DPPH assay. LMP or HMP were treated at a concentration of 0.5, 1, 2, 4, 8, or 10 mg/ml. After 3 hr, the amount of residual DPPH was measured at 520 nm using a spectrophotometer. Treatment with N-acetyl-cysteine (NAC, 1 mM) was used as a positive control. \*#Significantly different from control cells of LMP and HMP, respectively ( $p<0.05$ ).

#### 저분자와 고분자 펩타이드의 지질과산화 억제 능력 측정

UVB로 유도되는 세포 지질막의 산화적 손상인 8-isoprostanate의 함량을 측정하였다. LMP와 HMP의 농도에 따라 HaCaT 세포에 처리하고, 이어 UVB를 조사하여 LMP와 HMP의 세포 내에서 UVB로 유도된 산화적 손상을 억제하는지 확인하기 위해 배지를 수거하여 8-isoprostanate 측정 kit를 이용하여 실험하였다. 결과에 따르면 LMP 8 mg/ml를 전 처리한 세포군에서 UVB만 단독으로 조사한 세포군에 비해 유의적인 차이를 확인할 수 있었지만, HMP 8 mg/ml을 처리한 세포에서는 UVB에 의한 8-isoprostanate의 증가가 억제되지 않았다 (Fig. 3). 이 결과로 LMP를 처리한 경우 UVB에 의해 유도된 지질과산화가 억제되는 효과를 확인할 수 있었다.

#### 저분자와 고분자 펩타이드의 elastase 억제 활성 측정

Elastase는 proteinase의 일종으로 피부세포에서 주름생성에 관여하며, UVB가 조사된 세포에서 그 함량이 증가되는 것으로 알려졌다[14]. LMP와 HMP의 elastase 억제활성을 측정하기 위해 HaCaT 세포에 LMP와 HMP를 8 mg/ml 농도로 처리한 후 1시간 뒤에 UVB를 조사하여 24시간 배양하여 실험하였다. 실험결과에 따르면 UVB를 조사한 세포에서 elastase 활성이 대조군의 64 units/mg protein에 비해 109 units/mg protein으로 증가되었으며, 양성 대조군 NAC에서는 85 units/mg protein으로 유의적으로 감소하였다. LMP 처리군에서는 80 units/mg protein, HMP 처리군에서는 73 units/mg protein으로 elastase 억제 활성이 두 시료 모두 UVB 단독으로 조사된 세포와 비교 시 유의적으로 차이를 보

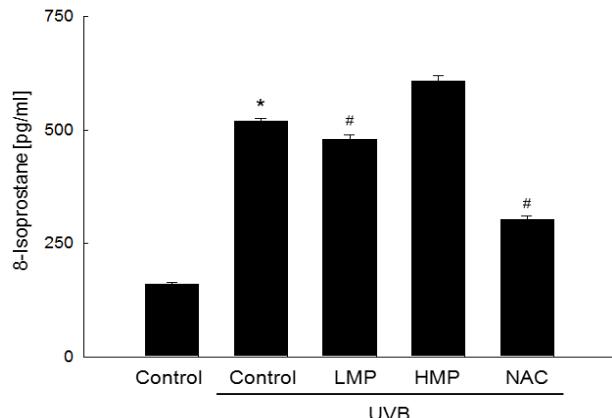


Fig. 3. Inhibitory effect of LMP and HMP on 8-isoprostanate generation. HaCaT cells were treated with LMP or HMP (8 mg/ml) and after 1 hr, exposed to UVB radiation. After incubation for a further 24 hr, lipid peroxidation was determined using an 8-isoprostanate EIA kit. Treatment with NAC (1 mM) was used as a positive control. \*Significantly different from control cells ( $p<0.05$ ) and #significantly different from cells only exposed to UVB radiation ( $p<0.05$ ).

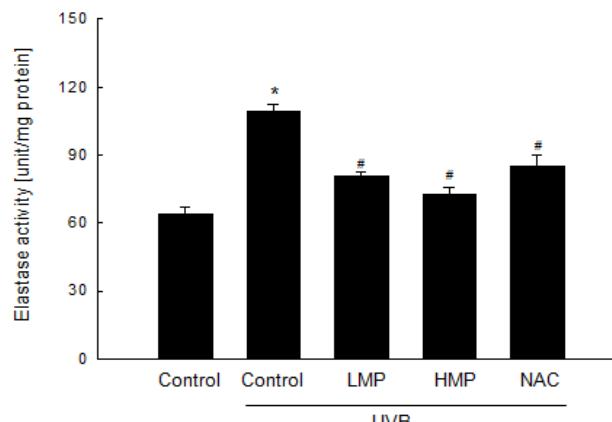


Fig. 4. Inhibitory effects of LMP and HMP on elastase activity. HaCaT cells were treated with LMP or HMP (8 mg/ml) and after 1 hr, exposed to UVB radiation. After incubation for a further 24 hr, elastase activity was determined by measuring absorbance at 410 nm using a spectrophotometer. Treatment with NAC (1 mM) was used as a positive control. \*Significantly different from control cells ( $p<0.05$ ) and #significantly different from cells only exposed to UVB radiation ( $p<0.05$ ).

였다(Fig. 4).

#### 저분자와 고분자 펩타이드의 melanin 생성과 tyrosinase 활성 억제 측정

Melanin은 melanocyte에서 생성되는 색소로서 UVB의 자극으로 인해 함량이 증가된다. LMP와 HMP의 melanin 생성

억제 능력을 측정하기 위해 HaCaT 세포에 LMP와 HMP를 8 mg/ml 농도로 처리한 후, UVB를 조사하고 배양 24시간 이후에 같은 수의 세포를 계수하여 회수하여 실험하였다. Melanin은 tyrosinase에 의해 합성이 되는데, 같은 방법으로 세포를 회수하여 tyrosinase 활성을 측정하였다. UVB 조사에 의해 melanin 색소가 대조군에 비해 212% 정도 증가하였으며, 미백제로 잘 알려진 arbutin에 의해 131%로 감소되었고, 항산화제 NAC에 의해 184%로 억제되는 것을 확인하였다. LMP 처리군에서는 167%, HMP을 처리군에서는 178%로 두 시료 모두에서 UVB 단독 처리한 군에 비해 melanin 생성에 유의적으로 감소하였다(Fig. 5A, B). Tyrosinase 활성을 측정해본 결과 UVB를 조사한 군에서 대조군에 비하여 137%로 증가하였다. Arbutin을 처리한 경우 UVB에 의해 증가된 활성이 94%로 억제하였고, NAC 처리군에서도 125%로 UVB를 단독으로 처리한 군에 비해 유의적으로 감소하였다. LMP와 HMP 처리군 각각 대조군과 비교하여 각각 100%, 102%로 UVB 단독 조사한 군에 비해 tyrosinase 활성이 유의적으로 억제되었다(Fig. 5C).

#### 저분자와 고분자 펩타이드의 MMP-1 활성 측정

MMP-1은 interstitial collagenase라고도 불리며 콜라겐의 펩타이드 결합을 분해하는 효소이다. 피부세포에 UVB를 조사하거나 활성산소를 노출시킨 경우, 활성형 MMP-1이 증가되

어 주름을 유도한다고 알려졌다[15]. LMP와 HMP의 UVB에 의한 MMP-1 활성 억제능력을 측정하기 위해, HaCaT세포에 각각의 LMP, HMP, NAC을 처리하고 1시간 이후에 UVB를 조사하였다. 세포를 24시간을 배양한 이후 MMP-1 활성을 측정하기 위해 세포배지를 회수하여 실험하였다. 대조군에서 2 ng/ml의 농도로 활성형 MMP-1이 존재 하다가 UVB가 조사된 세포에서는 9 ng/ml로 MMP-1의 활성이 크게 증가하였다. NAC을 전 처리한 군에서 5 ng/ml로 UVB 단독 조사된 군에 비해 유의적으로 감소하였으며, LMP와 HMP 처리군에서는 5 ng/ml, 2 ng/ml로 UVB 군에 비해 유의적으로 감소하였다 (Fig. 6).

## 고 칠

피부세포에 UVB가 노출되면 tyroninase activity와 melanin의 합성이 증가한다[2, 30]. 따라서 UV 등 기타 스트레스에 노출된 피부는 그 결과물인 melanin에 의하여 주근깨, 기미 등의 피부 색소침착을 일으킨다. Tyrosinase는 melanin 생성의 첫 번째 단계로써, tyrosine이 DOPA로 전환될 때, 그리고 DOPA에서 DOPA quinone으로 전환될 때 관여하는 효소이다[8]. MMP-1은 interstitial collagenase라고도 불리며 콜라겐의 펩타이드 결합을 분해하는 효소이다[6]. Melanin은 melanocyte에서 생성되는 색소로서 UVB의 자극으로 인해 함량

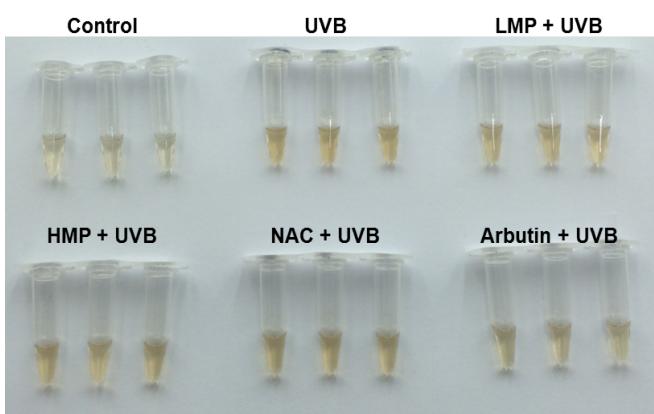
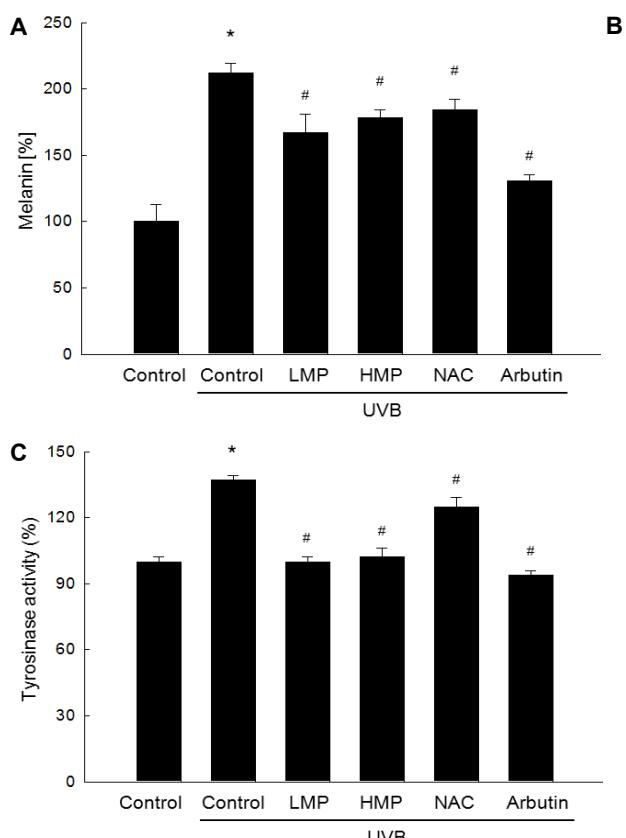


Fig. 5. Inhibitory effects of LMP and HMP on melanin generation and tyrosinase activity. B16F10 cells were treated with LMP or HMP (8 mg/ml) and after 1 hr, exposed to UVB radiation. After incubation for a further 24 hr, melanin generation was determined by (A) measuring absorbance at 405 nm using a spectrophotometer and by (B) examining the color of melanocyte lysates. Treatment with NAC (1 mM) and arbutin (1 mM) was used as a positive control. (C) Tyrosinase activity was determined by measuring absorbance at 490 nm using a spectrophotometer. Treatment with NAC (1 mM) and arbutin (1 mM) was used as a positive control. \*Significantly different from control cells ( $p<0.05$ ) and #significantly different from cells only exposed to UVB radiation ( $p<0.05$ ).

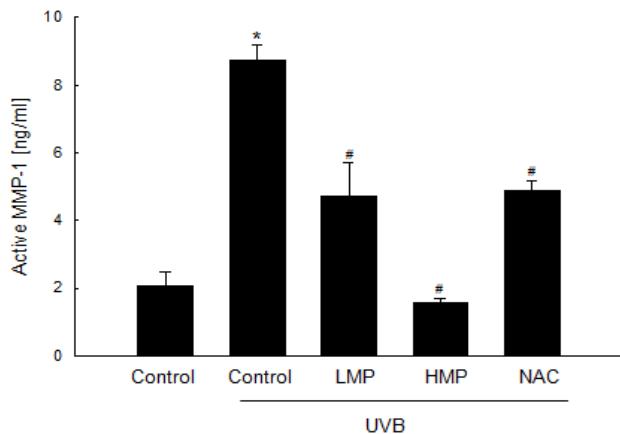


Fig. 6. Inhibitory effects of LMP and HMP on matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) activity. HaCaT cells were treated with LMP or HMP (8 mg/ml). After 1 hr, exposed to UVB radiation. After incubation for a further 24 hr, MMP-1 activity was determined using the Fluorokine®E Active MMP-1 Fluorescent Immunoassay Kit. Treatment with NAC (1 mM) was used as a positive control. \*Significantly different from control cells ( $p<0.05$ ) and #significantly different from cells only exposed to UVB radiation ( $p<0.05$ ).

이 증가된다[2]. 본 연구에서는 UVB로 유도된 melanin 생합성과 tyrosinase 효소 활성에 대해 LMP와 HMP가 유의적으로 억제하였으며, 특히 melanin 생합성에서 미백제로 잘 알려진 arbutin과 유사한 효과를 나타내었다. 피부세포에 UVB를 조사하거나 활성산소를 노출시킨 경우, 활성형 MMP-1이 증가되어 주름을 유도하며, elastase 또한 proteinase의 일종으로 피부세포에서 주름생성에 관여하며, UVB가 조사된 세포에서 그 함량이 증가하였다[11]. 각각의 LMP와 HMP 처리군에서는 UVB로 유도되는 elastase와 MMP-1 활성 증가가 유의적으로 억제되었다. UVB로 유도되는 지질과산화에 있어서는 LMP은 억제효과를 보였으며, HMP의 경우 유의적으로 억제하지 못하였다. 또한 항 산화 효과를 보기 위해 DPPH radical assay에서도 LMP와 HMP 자체의 라디칼 소거능력이 확인되었다. 따라서 LMP와 HMP은 미백작용, 노화방지에 따른 주름개선 효과를 확인할 수 있었고 향후에 미백 및 항 산화 기능성 화장품의 원료로써 활용가치가 높을 것으로 기대된다.

### 감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역특화산업 육성사업으로 수행된 연구결과입니다.

### References

- Akiu, S., Suzuki, Y., Asahara, T., Fujinuma, Y. and Fukuda, M. 1991. Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis-biochemical study using cultured B16 melanoma cells. *Nihon Hifuka Gakkai Zasshi* **101**, 609-613.
- Barker, D., Dixon, K., Medrano, E. E., Smalara, D., Im, S., Mitchell, D., Babcock, G. and Abdel-Malek, Z. A. 1995. Comparison of the responses of human melanocytes with different melanin contents to ultraviolet B irradiation. *Cancer Res.* **55**, 4041-4046.
- Boisnic, S., Branchet-Gumila, M. C., Nocera, T. and Verriere, F. 2005. RALGA (Diacnéal®) decreases melanin content in a human skin model. *Dermatology* **1**, 35-38.
- Boissy, R. E., SaKai, C., Zhao, H., Kobayashi, T. and Hearing, V. J. 1998. Human tyrosinase related protein-1 (TRP-1) does not function as DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1. *Exp. Dermatol.* **7**, 198-204.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
- Chung, L., Dinakarpandian, D., Yoshida, N., Lauer-Fields, J. L., Fields, G. B., Visse, R. and Nagase, H. 2004. Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *EMBO J.* **23**, 3020-3030.
- Gragnani, A., Cornick, S. M., Chominski, V., de Noronha, S. M. R., de Noronha, S. A. A. C. and Ferreira, L. M. 2014. Review of major theories of skin aging. *Adv. Aging Res.* **3**, 49375.
- Hearing, V. J. and Ekel, T. M. 1976. Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation. *Biochem. J.* **157**, 549-557.
- Hearing, V. J. and Tsukamoto, K. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* **5**, 2902-2909.
- Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. 1985. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**, 1474-1478.
- Imokawa, G. 2008. Recent advances in characterizing biological mechanisms underlying UV-induced wrinkles: a pivotal role of fibroblast-derived elastase. *Arch. Dermatol. Res.* **1**, 7-20.
- Kang, S., Fisher, G. J. and Voorhees, J. J. 1997. Photoaging and topical tretinoin: therapy, pathogenesis, and prevention. *Arch. Dermatol.* **133**, 1280-1284.
- Kim, Y. J., No, J. K., Lee, J. H. and Chung, H. Y. 2005. 4,4'-Dihydroxybiphenyl as a new potent tyrosinase inhibitor. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 323-327.
- Labat-Robert, J., Fourtanier, A., Boyer-Lafargue, B. and Robert, L. 2000. Age dependent increase of elastase type protease activity in mouse skin: effect of UV-irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B* **57**, 113-118.
- Moon, H. J., Lee, S. R., Shim, S. N., Jeong, S. H., Stonik, V. A., Rasskazov, V. A., Zvyagintseva, T. and Lee, Y. H. 2008. Fucoidan inhibits UVB-induced MMP-1 expression in

- human skin fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 284-289.
16. Matsumura, Y. and Ananthaswamy, H. N. 2002. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert. Rev. Mol. Med.* **4**, 1-22.
  17. Masahiro, O., Ralph, J. P., Michael, W. M., Jon B., Mark, A. S. and Jack, N. L. 2004. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonias cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chem.* **88**, 495-501.
  18. Nazeer, R. A., Kumar, N. S. and Jai Ganesh, R. 2012. *In vitro* and *in vivo* studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. *Peptides* **35**, 261-268.
  19. Puglia, C., Offerta, A., Sajja, A., Trombetta, D. and Venera, C. 2014. Protective effect of red orange extract supplementation against UV-induced skin damages: photoaging and solar lentigines. *J. Cosmet. Dermatol.* **13**, 151-157.
  20. Palmer, D. M. and Kitchin, J. S. 2010. Oxidative damage, skin aging, antioxidants and a novel antioxidant rating system. *J. Drugs Dermatol.* **9**, 11-15.
  21. Pati, F., Adhikari, B. and Dhara, S. 2009. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresour. Technol.* **101**, 3737-3742.
  22. Qinghui, L., Caili, W. and Congli, L. 1999. Study on the senility-delaying effect of fish scale extract on rats. *Marine Fisheries Res.* **20**, 75-79.
  23. Sugimoto, K., Nishimura, T., Nomura, K., Sugimoto, K. and Kuriki, T. 2003. Syntheses of arbutin-alpha-glycosides and a comparison of their inhibitory effects with those of alpha-arbutin and arbutin on human tyrosinase. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **51**, 798-801.
  24. Sugimoto, K., Nishimura, T., Nomura, K., Sugimoto, K. and Kuriki, T. 2004. Inhibitory effects of alpha-arbutin on melanin synthesis in cultured human melanoma cells and a three-dimensional human skin model. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 510-514.
  25. Sankar, S., Sekar, S., Mohan, R., Rani, S., Sundaraseelan, J. and Sastry, T. P. 2004. Preparation and partial characterization of collagen sheet from fish (*Lates calcarifer*) scales. *Int. J. Biol. Macromol.* **42**, 6-9.
  26. Tada, M., Kohno, M. and Niwano, Y. 2014. Alleviation effect of arbutin on oxidative stress generated through tyrosinase reaction with L-tyrosine and L-DOPA. *BMC Biochem.* **9**, 15-23.
  27. Tanaka, M., Koyama, Y. and Nomura, Y. 2009. Effects of collagen peptide ingestion on UVB-induced skin damage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 930-932.
  28. Tsuji, N., Moriwaki, S., Suzuki, Y., Takema, Y. and Imokawa, G. 2001. The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem. Photobiol.* **74**, 283-290.
  29. Varani, J., Dame, M. K., Rittie, L., Fligiel, S. E., Kang, S., Fisher, G. J. and Voorhees, J. J. 2006. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am. J. Pathol.* **168**, 1861-1868.
  30. Wolber, R., Schlenz, K., Wakamatsu, K., Smuda, C., Nakaniishi, Y., Hearing, V. J. and Ito, S. 2008. Pigmentation effects of solar-simulated radiation as compared with UVA and UVB radiation. *Pigment. Cell Melanoma Res.* **21**, 487-491.
  31. Zlatev, Z. S., Lidon, F. J. C. and Kaimakanova, M. 2012. Plant physiological responses to UV-B radiation. *Emir. J. Food Agric.* **24**, 481-501.

### 초록 : 피부세포에서 옥돔 비늘로부터 추출한 펩타이드의 UVB에 대한 산화적 손상 및 광 노화 억제

오민창<sup>1</sup> · 김기천<sup>1</sup> · 고창익<sup>2</sup> · 안용석<sup>2</sup> · 현진원<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>제주대학교 의학전문대학원, <sup>2</sup>(주)청룡수산)

생체에서 가장 많은 비율로 분포하고 있는 콜라겐 펩타이드는 동물의 뼈와 해양 생물의 비늘에 많이 함유되어 있다. 콜라겐은 동물 생체의 여러 결합조직에서 구조 단백질로 흔하게 발견된다. 또한, 이들은 생물 의료 자재, 제약, 화장품, 식품 및 가죽 산업에 널리 이용된다. 각종 어류 비늘에서 추출된 펩타이드는 UVB 조사에 의해 유도된 피부의 손상 및 광 노화에 대한 보호 효과가 있었다. 그럼에도 불구하고, UVB 조사에 대한 옥돔 비늘 유래의 펩타이드 특성은 명확히 알려져 있지 않다. 이 연구에서는 옥돔 비늘 추출물에서 분리된 1 kDa 이상(HMP)과 1 kDa 이하(LMP)의 펩타이드를 이용하여 UVB 조사에 의해 유도된 피부 손상과 광 노화에 대한 효과를 연구하였다. 이를 펩타이드는 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능을 보였으며 LMP는 HaCaT 인간 피부세포에서 UVB 조사에 의해 유도된 세포 지질 과산화 산물인 8-isoprostanate 생성을 억제하였다. 그리고 LMP와 HMP는 B16F10 마우스 흑색종 세포에서 tyrosinase 활성 및 melanin 함량을 감소시켰으며 또한 HaCaT 세포에서 UVB로 유도된 elastase 활성을 감소시켰고 matrix metalloproteinase-1의 활성을 감소시켰다. 이러한 결과는 옥돔 비늘에서 유래된 펩타이드가 미백효과, 항산화제 및 광 노화 억제제로서 유용한 물질이 될 것으로 기대된다.