

미세먼지에 의해 유발되는 인간각질형성세포 손상에 대한 신규 트리펩타이드의 보호 효과

이 응 지[†] · 강 한 아 · 황 보 별 · 이 영 민 · 정 용 지 · 김 은 미

(주)케어젠 중앙연구소

(2021년 1월 12일 접수, 2021년 2월 18일 수정, 2021년 2월 24일 채택)

Protective Effects of Novel Tripeptide Against Particulate Matter-induced Damage in HaCaT Keratinocytes

Eung Ji Lee[†], Hana Kang, Bo Byeol Hwang, Young Min Lee, Yong Ji Chung, and Eun Mi Kim

Caregen R&D center, 46-38, LS-ro 91 beon-gil, Dongan-gu, Anyang-si, Gyeonggi-do 14119, Korea

(Received January 12, 2021; Revised February 18, 2021; Accepted February 24, 2021)

요 약: 본 연구에서는 3 개의 아미노산으로 이루어진 트리펩타이드의 미세먼지에 의한 인간각질형성세포의 손상 억제 효과에 대해 확인하였다. 실험 결과 트리펩타이드 처리 시 미세먼지에 의한 세포 사멸이 억제되어 생존율 증가가 관찰되었으며, aryl hydrocarbon receptor (AhR) 기전 활성이 억제 되어 독성 대사체 생성과 염증반응에 관여하는 하위 인자인 cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1 (CYP1A1) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)의 발현이 저해되었다. 또한 미세먼지에 의한 산화적 스트레스 억제 효과를 나타내어 염증성 사이토카인의 발현을 저해하였고, 피부 구성 단백질의 분해를 유도하는 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 발현을 저해하였으며, 세포 사멸 인자의 수준을 저해하였다. 이 결과를 종합해 볼 때, 본 연구의 트리펩타이드는 미세먼지에 의한 인간각질형성세포의 사멸 및 주변 피부 조직의 손상을 유도할 수 있는 기전들을 억제하여 보호 효과를 나타내는 것으로 보인다. 트리펩타이드의 이러한 안티폴루션 효과는 신규 기능성 화장품 소재로 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract: In this study, we investigated inhibitory effect of Tripeptide against particulate matter (PM)-induced damage in human keratinocytes. PM-induced cell death was inhibited by Tripeptide and the activity of aryl hydrocarbon receptor (AhR) also inhibited by Tripeptide resulting in reduced expression of its downstream targets, cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1 (CYP1A1) and cyclooxygenase-2 (COX-2), which are responsible for toxic metabolites production and inflammation. Furthermore, PM-induced expressions of pro-inflammatory cytokines, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and apoptosis-related factors were decreased by anti-oxidant activity of Tripeptide. From these results, it has been shown that the Tripeptide has protective effect against PM-induced skin damage not only through the inhibiting of keratinocyte death but also through the inhibiting the secretion of several damage-inducing factors to adjacent skin tissue. And the results suggested that Tripeptide with anti-pollution effect could be applied as a new functional cosmetic material.

Keywords: tripeptide, particulate matter, ambient air pollution, aryl hydrocarbon receptor, reactive oxygen species

[†] 주 저자 (e-mail: witch83@caregen.co.kr)
call: 031-420-9283

1. 서 론

급격한 산업화와 도시화로 인해 발생한 대기 오염은 전 세계인의 건강을 위협하는 주요 인자 중 하나이다[1]. World health organization (WHO; Fact Sheet N 313, 2018)의 보고에 따르면, 2016년도 한 해 실외 대기오염으로 약 420만 명이 조기사망 했으며 이 중 58%가 허혈성 심질환 및 뇌졸중, 18%가 만성 폐쇄성 폐질환, 18%가 급성 하기도 감염, 그리고 6%가 폐암으로 인한 사망으로 집계되었다. 상기 대기 오염에 의한 조기사망의 주원인으로 알려진 미세먼지 (particulate matter, PM)는 입자 (particle) 지름 10 μm 미만의 coarse particle, 2.5 μm 미만의 fine particle, 0.1 μm 미만의 ultrafine particle로 분류되며, 입자의 크기가 작을수록 심부 기관지나 혈류에 도달해 전신에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[2-4]. 이러한 미세먼지 구성 성분으로는 황산화물, 질소산화물, 암모니아와 같은 이온 성분, 금속화합물, 휘발성 유기화합물, 그리고 다환방향족탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 등이 있으며, 기관지나 심혈관계에 대한 영향 외에도 피부 노출 시 피부 노화, 홍반, 부종, 접촉성 피부염, 아토피성 피부염, 건선, 피부암 등을 야기하는 것으로 알려져 있다. 미세먼지의 생물학적 영향은 주로 활성산소 형성이나 독성 대사산물에 의한 세포독성으로 알려져 있다[5-8].

활성산소 형성에 의한 산화적 스트레스는 미세먼지 내 유기화합물과 금속이 주요 원인이다. 퀴논류의 유기화합물은 직접적으로 산소에 전자를 제공하여 활성산소를 형성하며, 미세먼지 내 전이금속 중 상당량을 차지하는 철의 경우 펜톤 반응을 통한 활성산소를 형성한다. 또한 금속의 경우 티올과 반응하여 항산화능을 낮추고 결과적으로 산화적 스트레스에 대한 반응성을 떨어뜨리게 된다[9-12].

PAH는 친유성을 띠며 피부 투과가 쉽고 아릴 탄화수소 수용체 (aryl hydrocarbon receptor, AhR)에 결합하여 cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)의 발현을 촉진한다. CYP1A1 효소 활성으로 인해 PAH가 퀴논과 같은 독성 대사체로 전환되어 세포 독성을 유도하기도 하며, 그 과정에서 발생하는 활성산소에 의해 염증 및 피부 장벽 약화와 관련된 인자들의 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다[13,14].

펩타이드는 단백질의 최소 단위인 아미노산들의 연결체로 생체친화성이 높고 인체 내 단백질의 활성을 높은 안정성으로 모사할 수 있는 장점이 있어, 최근 화장품 및 의약품 업계에서 활성 소재로 많은 연구 개발이 이루어지고 있

Table 1. Inhibitory effects of peptide candidates on P450 activity

Peptide (100 μM)	Amino acid sequence	P450 activity (Inhibition rate, %)
Pep-1	NH ₂ -WYM-OH	21.23
Pep-2	NH ₂ -KKMMM-OH	15.21
Pep-3	NH ₂ -LRSGA-OH	14.88
Pep-4	NH ₂ -DEKE-OH	12.25

다[15,16]. 하지만 대체로 친수성을 띠고 있어 지질로 구성된 경피를 투과하는데 어려움이 있으며 피부에 존재하는 단백질 분해효소들의 영향으로 분해가 쉽다는 단점도 가지고 있다[17]. 경피 투과를 용이하게 하기 위한 방법으로 alcohols, azones, hexanoates, unsaturated fatty acids와 같은 투과 유도제를 사용하는 방법, 특정 펩타이드 서열을 이용하는 방법, 친유성 유도체를 결합하는 방법, 그리고 liposomes, transfersomes, niosomes, ethosomes 과 같이 펩타이드를 캡슐화 하는 방법 등이 연구되고 있다[18-20]. 또한 단백질 분해 효소들에 의한 분해를 막아 펩타이드의 안정성을 높이는 방법으로는 절단 예상 서열을 치환하는 방법, 또는 N 말단을 아세틸화(acetylation) 하거나 C 말단을 아미드화(amidation) 하는 방법 등이 연구되고 있다[21].

본 연구자들은 미세먼지에 의한 세포 독성을 억제하는 펩타이드 소재를 확보하기 위해, 소속기관에서 보유한 2 - 20 개 아미노산으로 이루어진 펩타이드 라이브러리를 대상으로 AhR 기전 억제 효과를 스크리닝 하였고, 이 중 P450 활성 억제가 가장 탁월한 트리펩타이드를 선별하였다(Table 1). 본 연구에서는 이 트리펩타이드의 미세먼지 영향 억제 기전을 밝히고자 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

펩타이드 합성 과정에서 사용한 2-CTC resin은 BeadTech (Korea)사의 제품을 사용하였고 fmoc-아미노산, hydroxybenzotriazole (HOBt), N,N,N',N'-tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU)는 CSBio Co. (USA) 제품을 사용하였다. Dimethylformamide (DMF), N,N-diisopropylethylamine (DIEA), piperidine, trifluoroacetic acid (TFA), thioanisole, phenol, ethane dithiol (EDT), triisopropyl silane (TIS), diethyl ether 와 같은 합성에 사용된 시약은 대정화금 (Korea)의 제품을 구입하여 사용하였다.

세포 실험에서 사용한 fetal bovine serum (FBS)는 thermo fisher scientific (USA)에서 구입하였고 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 및 penicillin/streptomycin 은 웰진 (Korea)에서 구입하였다. 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) 및 미국 국립표준기술연구소 NIST의 도시 대기 표준 미세먼지인 NIST SRM 1648a urban particulate matter (PM)는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다. CYP1A1, Bax, β -Actin, HDAC1 에 대한 항체는 Santa cruz biotechnology (USA)에서 구입 하였고, AhR, COX-2, Cleaved Caspase-3, Cleaved PARP 에 대한 항체는 Cell Signaling Technology (USA)에서 구입 하였다. 또한 MMP1 및 Cleaved Caspase-9 에 대한 항체는 Abcam (UK)에서 구입하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 펩타이드 합성

Capacity 0.84 mmol/g인 CTC 레진을 DMF 용매를 포함한 반응기에서 팽윤 반응을 실시한다. 위의 반응기에 2 당량 fmoc-methionine 과, 2.5 당량 DIEA 를 DMF 용매로 가한 후 2 h 동안 반응 실시한다. 카이저 테스트 키트(Sigma Aldrich, USA)로 반응의 종결을 확인하고 DMF로 세척 실시한다. 세척 완료 된 레진에 20% piperidine / DMF를 2 회 가하여 아미노산의 fmoc을 제거 한다. 카이저 테스트로 반응의 종결을 확인하고 DMF로 세척 실시한다. 이 후 tyrosine, tryptophan 순서로 다음 과정을 반복한다. 2 당량 fmoc-아미노산과 2 당량 HBTU, 2 당량 HOBT, 2.5당량 DIEA 를 DMF 용매로 가한 후 2 h 동안 반응 실시한다. 카이저 테스트로 반응의 종결을 확인하고 DMF로 세척 실시한다. 세척 완료 된 레진에 20% Piperidine / DMF를 2 회 가하여 아미노산의 fmoc을 제거 한다. 카이저 테스트로 반응의 종결을 확인하고 DMF로 세척 실시한다. 최종 합성 완료 후, cleavage solution (TFA : H₂O : thioanisole : phenol : EDT : TIS = 81.5 : 5:5 : 5 : 2.5 : 1)을 사용하여 펩타이드를 레진에서 분리 하고, diethyl ether를 이용하여 침전 시킨 후 원심분리기를 이용한 세척을 5 회 실시한다. 이 후 건조를 진행하여 펩타이드 최종 생성물을 회수하였다.

합성된 펩타이드의 순도를 앞에 high-performance liquid chromatography (HPLC, U-3000, Thermo fisher scientific, USA) 분석을 통해 확인하였으며, C18 (Pursuit XRs, 250 *

Table 2. Synthesized Tripeptide

Name	Sequence	Purity (%)	M.W. (Da)
Tripeptide	NH ₂ -WYM-OH	99.8	498.6

4.65 mm 100 Å, Agilent, USA) 컬럼을 이용하여 이동상 0.1% TFA in water / 0.1% TFA in acetonitrile gradient 하에 유속 1 mL/min 조건으로 UV 214 nm 에서 검출하여 확인 하였다.

분자량 확인을 위해 LC-MS/MS (3200 Q-trap, AB SCIEX, USA) 분석을 진행하였으며 C18 컬럼을 이용하여 이동상 0.1% formic acid in water / 0.1% Formic acid in acetonitrile gradient 하에 유속 0.25 mL/min 조건으로 MS/MS로 검출 확인 하였다. MS/MS 분석 조건은 ESI Positive mode, Source/Gas : CUR = 20, CAD = High, IS = 5500, TEM = 350, GS1 = 50, GS2 = 50/ Compound DP = 50 - 80, EP = 10, CE = 10 - 50, CES = 1 - 10로 확인 하였다(Table 2, Figure 1).

2.2.2. 세포 배양

실험에 사용한 HaCaT 세포주는 CLS (Germany)에서 구입하였고 10% heat-inactivated FBS, 1% penicillin/streptomycin 을 포함한 DMEM 배지로 37 °C, 5% CO₂조건 하에서 배양한다.

2.2.3. 세포 생존율 측정 실험

HaCaT 세포를 1 X 10⁴ cells/well 밀도로 96 well plate에 분주하여 16 h 배양 한다. Serum-free DMEM 배지 조건에서 트리펩타이드를 농도별로 1 h 전 처리 한 후 50 μ g/cm² PM 처리하여 72 h 동안 배양 한다. 4 mg/mL MTT를 각 well에 20 μ L씩 첨가하고 4 h 동안 37 °C 조건에서 배양을 진행한 후 배지를 제거하고 DMSO 500 μ L를 처리하여 포마잔(formazan)을 녹여낸다. 분광광도계(SpectraMax M2e, Molecular device, USA)를 사용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정한다.

2.2.4. AhR 핵 이동 확인 실험

HaCaT 세포를 5 X 10⁵ cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 16 h 배양 한다. Serum-free DMEM 배지 조건에서 트리펩타이드를 농도별로 1 h 전 처리 한 후 50 μ g/cm² PM 처리하여 1 h 동안 배양 한다. 배양 종료 후 세포를 회수하고 NE-PERTM Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (ThermoFisher Scientific, USA)을 이용하여 핵 단백질을 분리한다. 각 처리군의 단백질 양을 맞춰 샘플 준비 후 polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) 및

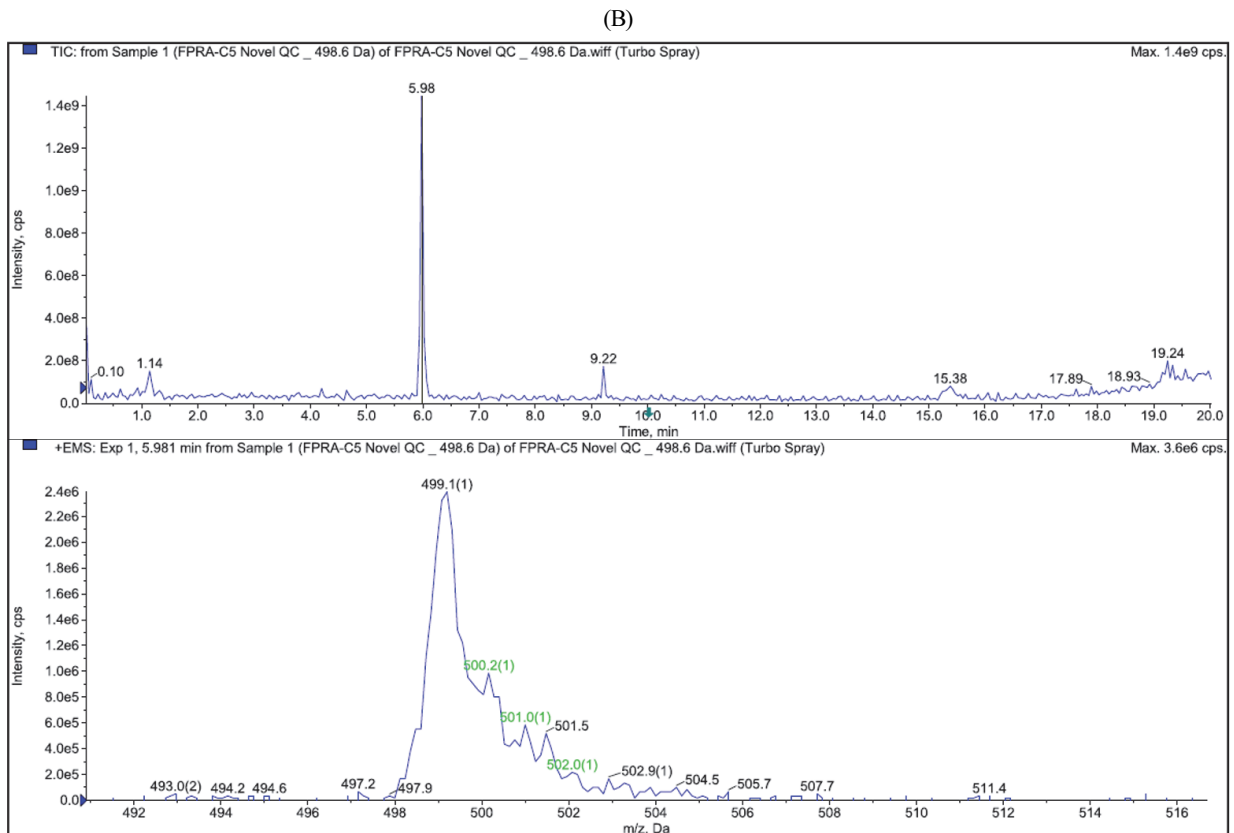
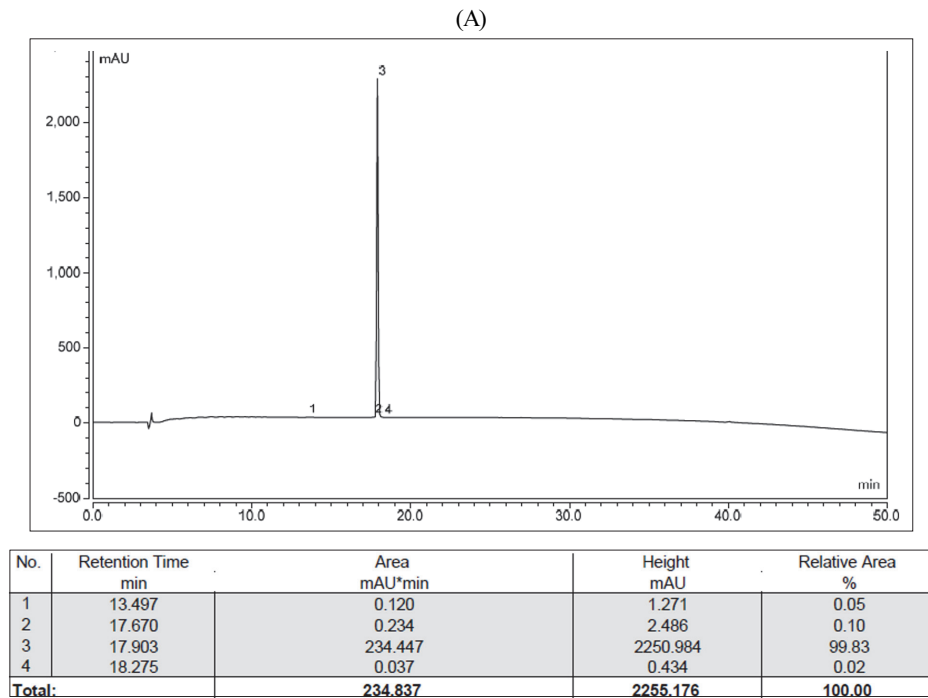


Figure 1. Analysis of synthetic Tripeptide. (A) The purity of Tripeptide was confirmed by HPLC analysis and it was more than 99%. (B) The estimated molecular weight of Tripeptide was confirmed by LC-MS/MS analysis.

polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로의 transfer 진행한다. 0.5% Tween20을 포함한 phosphate buffered saline (PBS) 에 녹인 5% 탈지분유로 이 후 blocking 및 AhR, HDAC 항체 부착 과정을 진행한다. 항체에 부착된 horseradish peroxidase (HRP) 를 western detection reagent (Elpisbiotech, Korea)와 반응한 후 필름 노출을 진행하고 이 후 Gel Doc (Gel Doc TM XRT, Bio-Rad, USA)으로 이미지 분석을 진행한다.

2.2.5. P450 활성 확인 실험

HaCaT 세포를 1×10^4 cells/well 밀도로 96 well plate에 분주하여 16 h 배양 한다. Serum-free DMEM 배지 조건에서 트리펩타이드를 농도별로 1 h 전 처리 한 후 50 nM TCDD 처리하여 24 h 동안 배양 한다. 배양 종료 후 P450-Glo™ CYP1A1 assay system (Promega, USA)을 이용하여 P450 활성을 측정 한다. Serum-free DMEM 에 희석된 50 μ M Luciferin-CEE를 각 웰에 40 μ L 처리한 후 4 h 배양한다. 이 후 배양액과 substrate를 1 : 1 비율로 혼합하여 30 min 반응 후 분광광도계를 사용하여 luminescence를 측정한다.

2.2.6. 세포 내 ROS 억제 확인 실험

HaCaT 세포를 5×10^5 cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 16 h 배양 한다. Serum-free DMEM 배지 조건에서 트리펩타이드를 농도별로 1 h 전 처리 한 후 50 μ g/cm² PM 처리하여 24 h 동안 배양 한다. 10 μ M DCF-DA 처리하여 차광 조건에서 30 min 배양하고 세포를 회수한다. 유세포분석기(BD, USA)를 사용하여 FL1 값을 측정한다.

2.2.7. 유전자 발현 분석(RT-PCR)

AhR 하위 유전자인 CYP1A1, COX-2의 발현을 관찰하기 위한 처리 조건은 다음과 같다. HaCaT 세포를 5×10^5 cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 16 h 배양 한다. Serum-free DMEM 배지 조건에서 트리펩타이드를 농도별로 1 h 전 처리 한 후 50 μ g/cm² PM 처리하여 24 h 동안 배양 한다.

염증성 사이토카인 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8의 발현을 관찰하기 위한 처리 조건은 다음과 같다. HaCaT 세포를 5×10^5 cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 16 h 배양 한다. Serum-free DMEM 배지 조건에서 트리펩타이드를 농도별로 1 h 전 처리 한 후 50 μ g/cm² PM 처리하여 2 h 동안 배양 한다.

배양 종료 후 세포를 회수하고 RNA extraction kit (Qiagen, Germany)을 이용해 RNA를 분리한 후 RT-PCR premix (iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 cDNA 합성을 진

Table 3. Primer Sequences

Gene	Primer
CYP1A1	Forward 5'- CCATGTCGGCCACGGAGTT -3'
	Reverse 5'- ACAGTGCCAGGTGCGGGTT -3'
COX-2	Forward 5'- ATCATTACCAGGCAAATTGC -3'
	Reverse 5'- GGCTTCAGCATAAAGCGTTTG -3'
TNF- α	Forward 5'- AACATCCAACCTTCCCAAACG -3'
	Reverse 5'- GACCCTAAGCCCCAATTCTC -3'
IL-1 β	Forward 5'- TTCGACACATGGGATAACGA -3'
	Reverse 5'- TCTTCAACACGCAGGACAG -3'
IL-6	Forward 5'- AAAGAGGCACTGCCAGAAAA -3'
	Reverse 5'- ATCTGAGGTGCCCATGCTAC -3'
IL-8	Forward 5'- GAAGGTGCAGTTTGGCCAAG -3'
	Reverse 5'- ACCCTCTGCACCCAGTTTTC -3'
GAPDH	Forward 5'- GGTGTGAACGGATTGGCCGTATTG -3'
	Reverse 5'- CCGTTGAATTTGCCGTGAGTGGAGT -3'

행 한다. 이 후 PCR premix (iNtRON Biotechnology, Korea) 및 각 유전자 별 프라이머 (Table 3)를 이용하여 샘플 준비 후, PCR 장비(Vapo. Protect, Eppendorf, Germany)를 이용하여 PCR 진행하고 전기영동을 통해 발현 양상을 확인한다.

2.2.8. 단백질 발현 분석(Western Blotting)

HaCaT 세포를 5×10^5 cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 16 h 배양 한다. Serum-free DMEM 배지 조건에서 트리펩타이드를 농도별로 1 h 전 처리 한 후 50 μ g/cm² PM 처리하여 24 h 동안 배양 한다.

배양 종료 후 세포를 회수하고 lysis buffer로 세포를 용해한 후 BCA kit을 이용한 단백질 정량을 진행한다. 각 처리군의 단백질 양을 맞춰 샘플 준비 후 SDS-PAGE 및 PVDF membrane으로의 transfer 진행한다. 0.5% Tween 20을 포함한 PBS에 녹인 5% 탈지분유로 이 후 blocking 및 각 인자들에 대한 항체 부착 과정을 진행한다. 항체에 부착된 HRP를 western detection reagent 와 반응한 후 필름 노출을 진행하고 이 후 Gel Doc으로 이미지 분석을 진행한다.

2.2.9. 통계

본 연구에서 시행된 실험은 총 3 회 이상 반복되었고 데이터의 통계적 유의성 검정은 student's *t*-test로 시행 되었다. 결과 값들은 mean \pm standard deviation (SD)으로 나타내었고 *p* value 0.05 미만인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 간주 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. PM 처리 조건에서의 세포 생존율 확인 실험

PM 처리에 의한 세포 독성을 트리펩타이드가 억제하는지 확인하기 위해 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM 조건에서 20, 100, 200 μM 펩타이드 처리 후 MTT assay를 수행하였다.

그 결과 PM 처리에 의한 HaCaT 세포 생존율 감소를 트리펩타이드가 유의하게 회복시키는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 2).

3.2. AhR 기전 억제 실험

AhR은 리간드와 결합 후 핵 내로 이동하여 ARNT와의 복합체를 이룬 후 xenobiotic responsive element (XRE)에 결합하여 CYP1A1 및 COX-2의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다[22]. PM 내에 포함된 AhR 리간드로 알려진 PAHs의 자극을 트리펩타이드가 억제하는지 확인하기 위해 AhR 핵 이동 및 하위 유전자 발현 정도를 관찰하였다.

인간각질형성세포 HaCaT에 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM을 처리하였을 때 활성화된 AhR의 핵이동이 증가하였고, 이를 트리펩타이드가 농도 의존적으로 저해하였다(Figure 3A).

트리펩타이드의 AhR 기전 억제를 추가 확인하기 위해 CYP1A1 활성도를 측정된 결과 AhR 특이적 리간드인 TCDD 처리 시 뚜렷하게 증가된 CYP1A1 활성도가 트리펩타이드 처리에 의해 농도 의존적으로 유의한 감소를 보였다(Figure 3B).

또한 인간각질형성세포 HaCaT에 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM을 처리

하였을 때 AhR 활성화에 따라 하위 유전자인 CYP1A1 및 COX-2의 mRNA 발현이 증가되었고 트리펩타이드 처리 시 농도 의존적인 감소가 관찰되었다(Figure 3C). 이러한 경향은 CYP1A1 및 COX-2 단백질 발현 수준을 관찰하였을 때에도 동일했다(Figure 3D).

이를 통해 트리펩타이드가 PM 내에 포함된 PAHs의 AhR 결합 및 활성을 억제함에 따라 독성 대사체 생성 또는 염증 환경을 조성하여 세포 독성을 유도할 수 있는 AhR 하위 인자들의 발현도 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.

3.3. 항산화 효능 실험

PM 노출 시 내부에 포함된 유기화합물과 금속 등에 의한 ROS 생성 또는 미토콘드리아 손상에 의한 산화적 스트레스가 염증 인자 및 matrix metalloproteinases 발현을 유도하거나 세포 사멸 기전을 유도하여 조직 손상을 나타내는 것으로 알려져 있다[23]. PM 처리에 의한 세포 내 ROS 생성을 트리펩타이드가 억제하는지 확인하기 위해 DCF-DA 처리 후 유세포분석기로 형광값을 측정하였다.

인간각질형성세포 HaCaT에 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM을 처리하였을 때 대조군에 비해 약 59% ROS 형성이 증가되었고, 이를 트리펩타이드가 모든 처리 농도에서 50% 이상 유의하게 감소시켰다(Figure 4).

이를 통해 트리펩타이드가 PM에 의해 유도된 세포 내 산화적 스트레스를 항산화 효능으로 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.

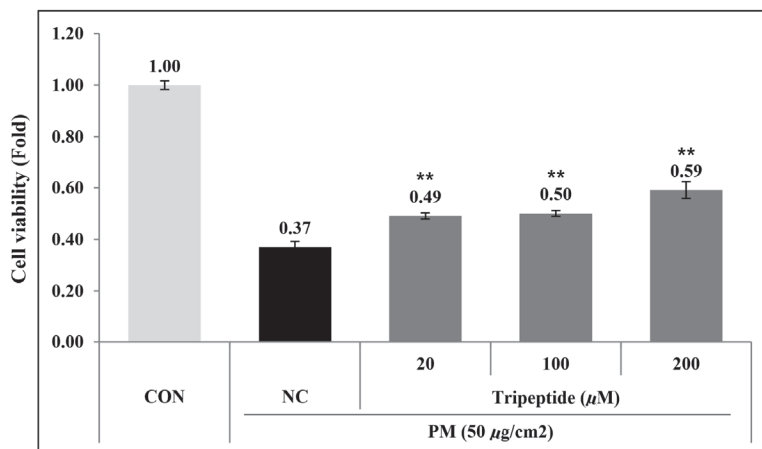


Figure 2. Effects of Tripeptide on HaCaT keratinocyte survival following exposure to PM. Cells were treated with various concentrations of Tripeptide with or without 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM for 72 h and cell viability was measured by MTT assay. The results were expressed as the mean \pm SD from the three independent experiments. ** $p < 0.01$.

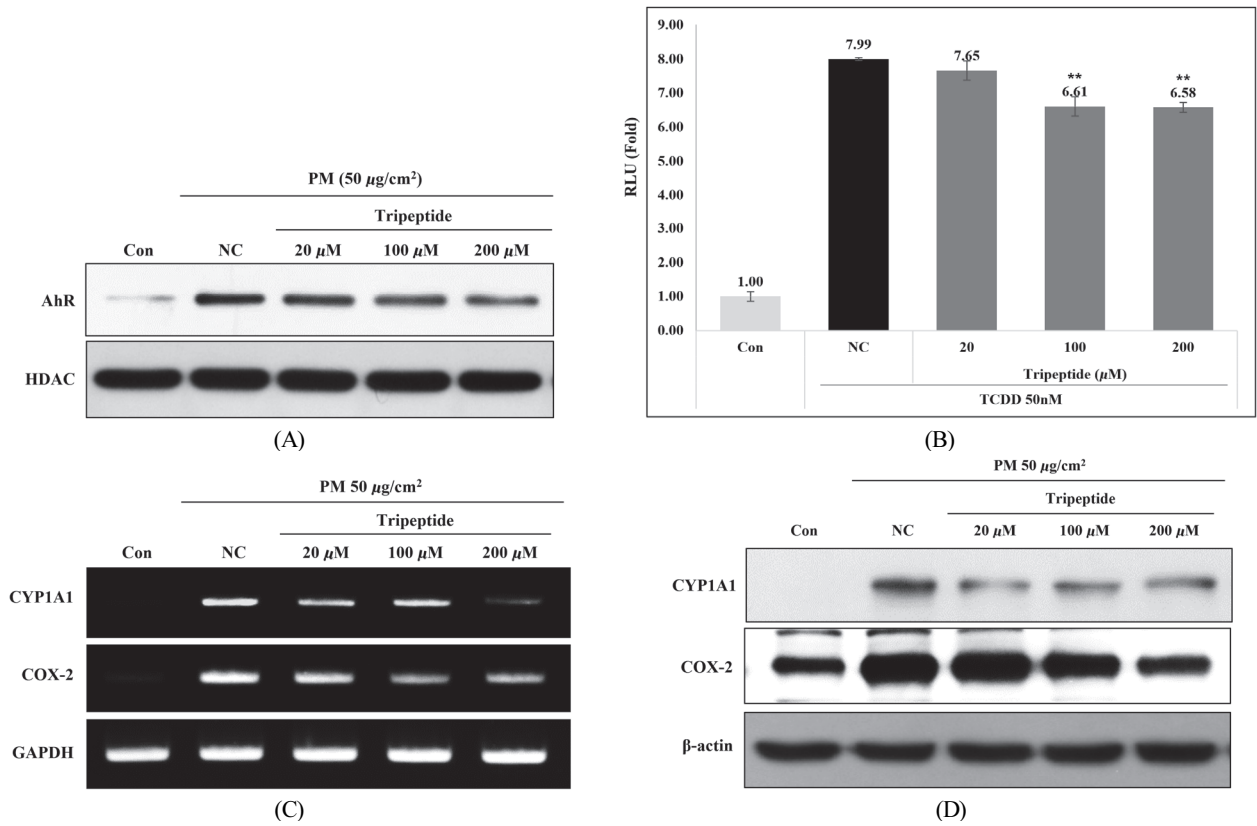


Figure 3. Inhibitory effects of Tripeptide on PM-induced AhR activation in HaCaT keratinocytes. (A) Cells were treated with various concentrations of Tripeptide with or without 50 μg/cm² PM for 1 h and nuclear translocation of activated AhR was detected. (B) Cells were treated with various concentrations of Tripeptide with or without 50 nM TCDD for 24 h and activity of CYP1A1 was analyzed. The results were expressed as the mean ± S.D. from the three independent experiments. ** *p* < 0.01. (C),(D) Cells were treated with various concentrations of Tripeptide with or without 50 μg/cm² PM for 24 h and mRNA and protein levels of CYP1A1 and COX-2 were analyzed by RT-PCR and western blotting each.

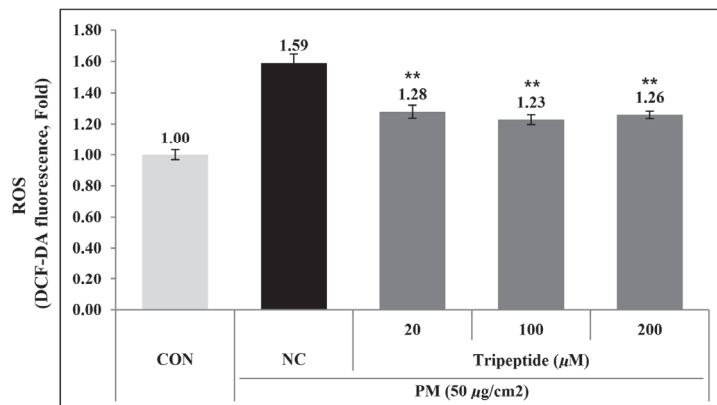


Figure 4. Inhibitory effects of Tripeptide on PM-induced intracellular ROS production in HaCaT keratinocyte. Cells were treated with various concentrations of Tripeptide with or without 50 μg/cm² PM for 24 h and intracellular ROS level of DCF-DA treated cells was analyzed by flow cytometry. The results were expressed as the mean ± SD from the three independent experiments. ** *p* < 0.01.

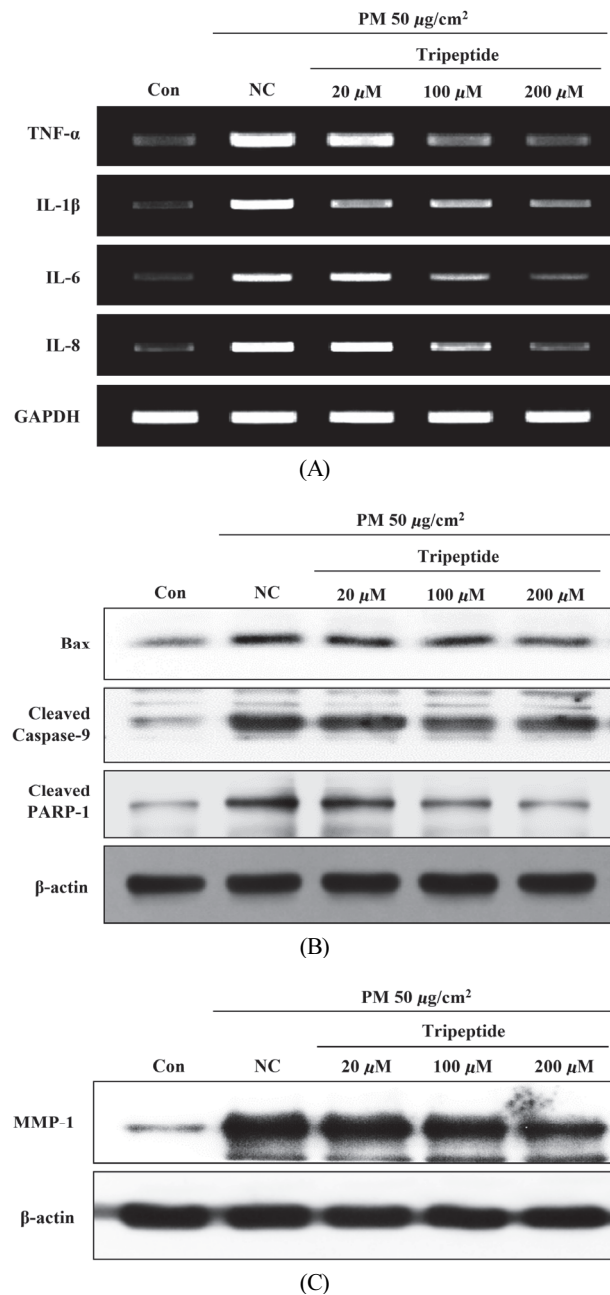


Figure 5. Inhibitory effects of Tripeptide on PM-induced inflammation, apoptosis and ECM degradation in HaCaT keratinocytes. (A) Cells were treated with various concentrations of Tripeptide with or without 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM for 2 h and mRNA levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 were analyzed by RT-PCR. Cells were treated with various concentrations of Tripeptide with or without 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM for 24 h. (B) The levels of apoptosis-related proteins, including Bax, Cleaved caspase-9 and Cleaved PARP-1, were analyzed by western blotting. (C) Expression level of MMP-1 was also analyzed by western blotting.

3.4. 피부 손상 인자 발현 억제 실험

앞서 확인 한 트리펩타이드의 AhR 기전 억제 및 항산화 효능이 PM에 의한 세포 및 조직 손상 억제 효과를 줄 수 있는지 확인하기 위해 염증 관련 인자, 세포 사멸 관련 인자 및 피부 구성 단백질 분해 인자에 대한 발현 변화를 관찰하였다.

인간각질형성세포 HaCaT에 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM을 2 h 처리하였을 때 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 IL-8의 mRNA 발현이 증가되었고, 트리펩타이드가 이를 농도 의존적으로 저해하였다(Figure 5A). 또한 인간각질세포 HaCaT에 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM을 24 h 처리하였을 때 세포 사멸 관련 인자인 Bax, Cleaved caspase-9 및 Cleaved PARP-1의 단백질 수준이 증가되었고, 트리펩타이드 처리 시 농도 의존적인 감소가 관찰되었다(Figure 5B). 동일 처리 조건에서 피부 구성 단백질 분해 효소로 알려진 MMP-1 발현 수준을 관찰했을 때에도 PM 처리에 의한 증가 및 트리펩타이드 처리에 의한 농도 의존적인 감소가 관찰되었다(Figure 5C).

이를 통해 PM 처리 시 나타나는 AhR 기전 활성화 및 ROS 증가가 염증, 세포 사멸 및 분해 효소 발현 증가를 유도할 수 있으며, 트리펩타이드가 상위 기전 억제를 통해 각질세포 사멸 및 주변 피부 조직 손상 인자들의 발현을 억제함을 확인할 수 있었다.

4. 결론

본 연구에서는 3 개의 아미노산으로 이루어진 트리펩타이드의 PM에 의한 피부 손상 억제 효과를 확인 해 보았다. 본 연구의 트리펩타이드는 PM 내 포함된 PAHs에 의한 AhR 수용체 활성화를 억제하여, AhR / ARNT 복합체의 XRE 결합에 이은 CYP1A1 및 COX-2 발현을 억제하는 것으로 확인되었다. 또한 상기 AhR 활성화 기전을 통해 발생한 ROS 뿐만 아니라 PM 내 유기화합물 및 금속에 의한 직접적인 ROS 발생, 그리고 미토콘드리아 손상에 의한 ROS 발생에 대해서도 트리펩타이드가 항산화 효과를 나타내어 TNF- α , IL-1 β , IL-6 및 IL-8과 같은 염증성 사이토카인의 발현 및 MMP-1과 같은 피부 구성 단백질 분해 효소의 발현도 억제하는 것으로 관찰되었다. 이러한 항산화 효과는 PM 처리에 의해 증가된 세포 사멸 인자들의 발현도 약화시키는 것으로 관찰되었다(Figure 6).

본 연구의 트리펩타이드는 트립토판과 티로신과 같은 방향족 아미노산으로 이루어져 소수성을 띌 수 있고 이들

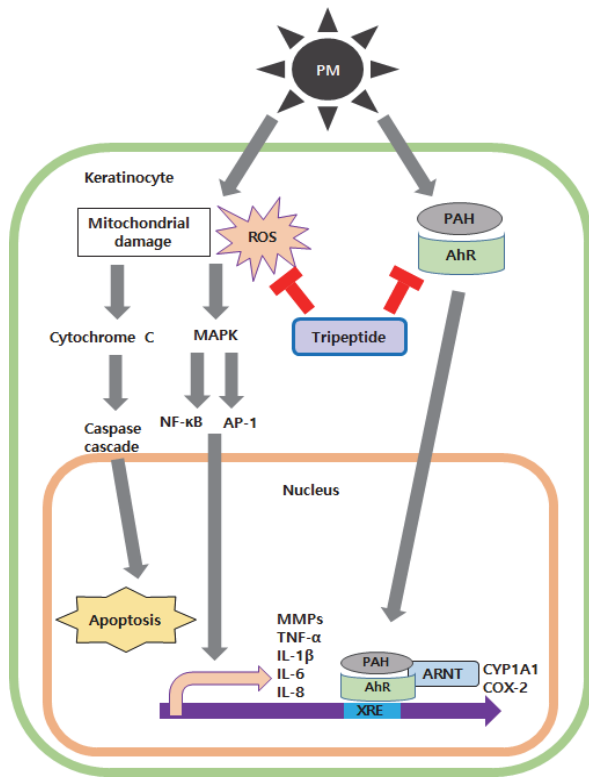


Figure 6. Schematic diagram showing the mechanism of action of Tripeptide. PM; Particulate matter, PAH; Polycyclic aromatic hydrocarbon, AhR; Aryl hydrocarbon receptor, ARNT; Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, XRE; xenobiotic response element, ROS; reactive oxygen species.

은 세포 투과에 도움을 주는 잔기로 알려져 있다[24]. 따라서 트리펩타이드의 상기 AhR 기전 억제가 세포 투과 후 AhR에 직접 결합하여 경쟁적 저해제로 작용할 수 있을 것으로 보고 이를 추가 분석 예정이다. 또한 세포 내 ROS 증가가 NF-κB 및 MAPK 활성을 유도하여 염증 관련 인자나 MMPs의 발현을 증가시키는 것으로 알려짐에 따라 트리펩타이드의 항산화 작용을 통한 상기 효능을 추가 검증하기 위해 NF-κB 및 MAPK 활성에 대한 영향을 관찰할 예정이다[25].

이를 통해 미세먼지 노출에 의한 피부 손상을 억제할 수 있는 소재로써 본 연구의 트리펩타이드를 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. D. Yang, X. Yang, F. Deng, and X. Guo, Ambient air

pollution and biomarkers of health effect, *Adv Exp. Med. Biol.*, **1017**, 59 (2017).

2. P. E. Schwarze, J. Ovreik, M. Låg, M. Refsnes, P. Nafstad, R.B. Hetland, and E. Dybing, Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies, *Hum. Exp. Toxicol.*, **25**(10), 559 (2006).

3. U. Franck, S. Odeh, A. Wiedensohler, B. Wehner, and O. Herbarth, The effect of particle size on cardiovascular disorders—the smaller the worse, *Sci. Total Environ.*, **409**(20), 4217 (2011).

4. M. Fuentes, H. R. Song, S. K. Ghosh, D. M. Holland, and J. M. Davis, Spatial association between speciated fine particles and mortality, *Biometrics*, **62**(3), 855 (2006).

5. J. Krutmann, W. Liu, L. Li, X. Pan, M. Crawford, G. Sore, and S. Seite, Pollution and skin: from epidemiological and mechanistic studies to clinical implications, *J. Dermatol. Sci.*, **76**(3), 163 (2014).

6. A. Vierkötter, T. Schikowski, U. Ranft, D. Sugiri, M. Matsui, U. Krämer, and J. Krutmann, Airborne particle exposure and extrinsic skin aging, *J Invest Dermatol.*, **130**(12), 2719 (2010).

7. K. E. Kim, D. Cho, and H. J. Park, Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases, *Life Sci.*, **152**, 126 (2016).

8. D. S. Hieda, L. Anastacio da Costa Carvalho, B. Vaz de Mello, E. A. Oliveira, S. Romano de Assis, J. Wu, L. Du-Thumm, C. L. Viana da Silva, D. A. Roubicek, S. S. Maria-Engler, and S. Berlanga de Moraes Barros, Air particulate matter induces skin barrier dysfunction and water transport alteration on a reconstructed human epidermis model, *J Invest Dermatol.*, **140**(12), 2343 (2020).

9. A. J. Ghio, M. S. Carraway, and M. C. Madden, Composition of air pollution particles and oxidative stress in cells, tissues, and living systems, *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.*, **15**(1), 1 (2012).

10. Y. Kumagai, T. Arimoto, M. Shinyashiki, N. Shimojo, Y. Nakai, T. Yoshikawa, and M. Sagai, Generation of reactive oxygen species during interaction of diesel

- exhaust particle components with NADPH-cytochrome P450 reductase and involvement of the bioactivation in the DNA damage, *Free Radic. Biol. Med.*, **22**(3), 479 (1997).
11. A. J. Ghio, J. Stonehuerner, R. J. Pritchard, C. A. Piantadosi, D. R. Quigley, K. L. Dreher, and D. L. Costa, Humic-like substances in air pollution particulates correlate with concentrations of transition metals and oxidant generation, *Inhal. Toxicol.*, **8**(5), 479 (1996).
 12. T. Xia, P. Korge, J.N. Weiss, N. Li, M.I. Venkatesen, C. Sioutas, and A. Nel, Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity, *Environ. Health Perspect.*, **112**(14), 1347 (2004).
 13. N. Li, M. Hao, R. F. Phalen, W .C. Hinds, and A. E. Nel, Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects, *Clin. Immunol.*, **109**(3), 250 (2003).
 14. G. Tsuji, M. Takahara, H. Uchi, S. Takeuchi, C. Mitoma, Y. Moroi, and M. Furue, An environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway, *J. Dermatol. Sci.*, **62**(1), 42 (2011).
 15. J. H. Epstein, Photocarcinogenesis, skin cancer, and aging, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **9**(4), 487 (1983).
 16. R. Speeckaert, M. van Gele, M. M. Speeckaert, J. Lambert, and N. van Geel, The biology of hyperpigmentation syndromes, *Pigment Cell Melanoma Res.*, **27**(4), 512 (2014).
 17. M. B. C. Maymone, H. H. Neamah, E. A. Secemsky, and N. A. Vashi, Correlating the dermatology life quality index and skin discoloration impact evaluation questionnaire tools in disorders of hyperpigmentation, *J. Dermatol.*, **45**(3), 361 (2018).
 18. T. Pillaiyar, M. Manickam, and V. Namasivayam, Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **32**(1), 403 (2017).
 19. M. L. W. Juhasz and M. K. Levin, The role of systemic treatments for skin lightening, *J. Cosmet. Dermatol.*, **17**(6), 1144 (2018).
 20. L. Zhang and T. J. Falla, Cosmeceuticals and peptides, *Clin. Dermatol.*, **27**(5), 485 (2009).
 21. B. Reddy, T. Jow, and B. M. Hantash, Bioactive oligopeptides in dermatology: Part I, *Exp. Dermatol.*, **21**(8), 563 (2012).
 22. A. Kobayashi, K. Sogawa, and Y. Fujii-Kuriyama, Cooperative interaction between AhR.Amt and Sp1 for the drug-inducible expression of CYP1A1 gene, *J. Biol. Chem.*, **271**(21), 12310 (1996).
 23. J. Wang, J. Huang, L. Wang, C. Chen, D. Yang, M. Jin, C. Bai, and Y. Song, Urban particulate matter triggers lung inflammation via the ROS-MAPK-NF- κ B signaling pathway, *J. Thorac. Dis.*, **9**(11), 4398 (2017)
 24. D. Kalafatovic and E. Giralt, Cell-penetrating peptides: design strategies beyond primary structure and amphipathicity, *Molecules*, **22**(11), 1929 (2017).
 25. J. Zhang, X. Wang, V. Vikash, Q. Ye, D. Wu, Y. Liu, and W. Dong, ROS and ROS-mediated cellular signaling, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016** article ID: 4350965 (2016).