

## 섬유아세포에서 세포 활성 촉진 및 광노화 억제 효능을 보이는 신규 헵타펩타이드

이 응 지<sup>†</sup> · 강 한 아 · 황 보 별 · 정 용 지 · 김 은 미<sup>††</sup>

\* (주)케어젠 중앙연구소

(2022년 6월 14일 접수, 2022년 6월 29일 수정, 2022년 6월 29일 채택)

### A Novel Heptapeptide that Promotes Cellular Activity and Inhibits Photoaging in Fibroblasts

Eung Ji Lee<sup>†</sup>, Hana Kang, Bo Byeol Hwang, Yong Ji Chung, and Eun Mi Kim<sup>††</sup>

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

(Received June 14, 2022; Revised June 29, 2022; Accepted June 29, 2022)

**요약:** 본 연구에서는 7 개의 아미노산으로 이루어진 헵타펩타이드의 섬유아세포 활성 증가 및 광노화 조건에서의 세포 손상 억제 효과를 확인하였다. 실험 결과 헵타펩타이드 처리 시 섬유아세포 증식 및 세포외기질(extracellular matrix, ECM) 구성 인자의 발현이 증가되었다. 그리고 자외선 A (ultraviolet A, UVA) 조사에 의해 유도된 광노화 조건에서 감소된 세포 생존율이 헵타펩타이드에 의해 증가되었고, UVA 조사에 의해 유도된 세포 사멸, 기질금속단백질분해효소-1(matrix metalloproteinases-1, MMP-1) 발현 및 세포 내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 수준이 헵타펩타이드에 의해 감소되었다. UVA 조사 시 나타나는 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/smad 기전 억제와 그에 따른 ECM 구성 인자 발현 감소 또한 헵타펩타이드에 의해 회복되었다. 또 다른 광노화 유도 조건으로 heat shock을 주었고 헵타펩타이드를 전 처리 하였을 때 heat shock에 의한 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 인산화 및 MMP-1 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다. 이 결과를 종합해 볼 때, 본 연구의 헵타펩타이드는 섬유아세포의 활성을 촉진하며, 광노화 유도 모델로 사용된 UVA 조사 및 heat shock 조건에서도 세포 내 ROS 억제 효과를 보여 세포 손상에 대한 회복 및 보호 효과를 나타내는 것으로 보인다. 이러한 진피 보호 효과를 갖는 헵타펩타이드는 향후 신규 화장품 소재로 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

**Abstract:** In this study, we investigated the effects of heptapeptide on cellular activation and inhibition of cellular damage induced by photoaging condition in NIH3T3 fibroblasts. Cell proliferation and extracellular matrix (ECM) expression were induced by heptapeptide. The reduced cell viability under photoaging condition through ultraviolet A (UVA) irradiation was increased by heptapeptide. And UVA-induced apoptosis, matrix metalloproteinases-1 (MMP-1) expression, and reactive oxygen species (ROS) level were decreased by heptapeptide. In addition, the inhibition of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/smad signaling under UVA irradiation which resulting in reduction of ECM expression was also recovered by heptapeptide. We also tested the effect of heptapeptide under another photoaging condition through heat shock, and pre-treatment of heptapeptide prevented the phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MMP-1 expression induced by heat shock. From these results, it has been shown that the heptapeptide has protective effects on fibroblasts through the up-regulation of cellular activity and through the decreasing of intracellular ROS level induced by UVA irradiation or heat shock. It is expected that the dermal protection effect of heptapeptide can be applied as a new cosmetic material in the future.

**Keywords:** heptapeptide, fibroblast, photoaging, reactive oxygen species, extracellular matrix

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

†† 교신저자 (e-mail: dmsal@caregen.co.kr)  
call: 031-420-9281

## 1. 서론

피부는 인체의 최외각을 보호하는 조직으로 유전, 세포 대사, 호르몬 등에 영향을 받아 나타나는 내인성 노화뿐만 아니라 만성 태양광 노출, 혹한 날씨, 오염원, 전리 방사선, 독소 등과 같은 환경적 원인의 외인성 노화를 복합적으로 겪게 된다[1,2]. 내인성 노화는 잔주름, 표피 두께의 감소를 특징으로 하며, 만성 태양광 노출이 주원인인 외인성 노화는 표피 두께의 증가, 깊고 굵은 주름, 과 색소 침착의 특징이 있다. 두 종류의 피부 노화 모두 진피층의 위축을 통한 주름과 탄력 감소가 나타나는 공통점을 가지고 있다[3-6]. 진피 위축 (dermal atrophy)은 collagen, elastin, fibronectin, proteoglycans (PGs), glycosaminoglycans (GAGs)와 같은 ECM 구성 단백질의 생산 감소나 MMPs 발현 증가에 따른 구성 단백질 분해 촉진에 의한 것으로, 노화에 따른 ROS 생성 증가가 주요 원인으로 꼽힌다[7-11]. 광 자극이나 체내 대사 과정에서 발생한 ROS는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38, jun N-terminal kinase (JNK)를 포함한 MAPK를 활성화 하여 activator protein 1 (AP-1)의 핵 내 이동을 유도하고 이는 MMPs의 발현 증가를 가져온다. 동시에 AP-1의 활성화는 TGF- $\beta$  수용체인 T $\beta$ RII와 하위 신호 전달 인자인 smad3의 발현을 저해하고, TGF- $\beta$ /smad 기전에 대한 음성 조절자인 smad7의 발현을 높여 결과적으로 collagen 발현 저해도 가져온다[12-16]. 뿐만 아니라 ROS는 NF- $\kappa$ B의 기전도 활성화시켜 MMPs 생성을 증가시키는 것으로도 알려져 있다[16-19]. 이렇게 노화에 따른 ECM의 감소, 특히 주요 구성 성분인 collagen type I의 감소가 진피 위축의 원인이며 이를 target으로 한 개선 소재 개발이 많이 연구되고 있는 추세이다.

주름 개선 소재로는 retinoic acid receptors (RARs)와 retinoid x receptors (RXRs)에 작용하여 type I, III, VII collagen 생산을 증가시키고 MMPs 발현을 감소시키는 retinoids가 대표적이다[20-23]. 또한 ROS에 의한 산화적 스트레스를 낮추는 항산화제인 ascorbic acid, niacinamide 등의 주름 개선 효능도 알려져 있으며 [24-26], GAGs와 collagen 생산을 증가시키는 alpha hydroxy acids (AHAs)도 주름 개선 소재로 활용되고 있다[27,28].

펩타이드는 2 ~ 50개의 아미노산 연결체로, 높은 생체 친화성과 생산 효율로 인해 화장품 및 의약품 업계에서 활성 소재로 많은 연구 개발이 이루어지고 있으며 활성 펩타이드는 천연 단백질, 합성 라이브러리, 또는 유전자 재조

합 라이브러리에서 주로 유래된다[29,30]. 주름 개선 펩타이드는 그 작용 기전에 따라 크게 세 가지로 나눌 수 있다. 첫 번째로 직접 세포 활성을 유도하여 성장이나 ECM 구성 물질의 생성을 촉진하는 시그널 펩타이드(signal peptide)가 있다. 주름 개선 펩타이드 소재 중 가장 큰 부분을 차지하며, 팔미토일 테트라펩타이드-7(palmitoyl tetrapeptide-7), 팔미토일 펜타펩타이드-4(palmitoyl pentapeptide-4), 팔미토일 트리펩타이드-1(palmitoyl tripeptide-1) 등이 이에 해당한다. 두 번째로는 캐리어 펩타이드(carrier peptide)가 있으며, 대표적으로 ECM 형성에 관여하는 효소의 활성을 높여주는 구리 이온의 안정화를 돕고 세포로의 이동을 돕는 Gly-His-Lys 펩타이드가 있다. 마지막으로 신경 전달 물질 억제 펩타이드 (neurotransmitter-inhibiting peptide)가 있다. 신경근 접합부(neuromuscular junction)의 신경 전달 물질 분비 억제를 통해 근 수축을 막아 주름 생성을 낮추며 아세틸 헥사펩타이드-3(acetyl hexapeptide-3), 트리펩타이드-3(tripeptide-3) 등이 이에 해당한다[31-39].

본 연구자들은 선행 연구에서 자사 보유 합성 펩타이드 라이브러리 스크리닝을 통해 섬유아세포 증식 촉진 및 세포 내 ROS 억제 효과를 동시에 보이는 신규 헵타펩타이드를 발굴 하였고, 본 연구에서는 이 헵타펩타이드의 항노화 억제 활성 및 기전을 확인하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시약

펩타이드 합성 과정에서 사용한 2-CTC resin은 BeadTech (Korea)사의 제품을 사용하였고 fmc-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 대정화학 (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), phosphate buffered saline (PBS) 및 penicillin/streptomycin은 웰진(Korea)에서 구입하였다. 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), N-Acetyl-L-cysteine

(NAC), trolox 는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다. phospho-JNK, phospho-smad2, smad7, TSP-1, Bax,  $\beta$ -actin,  $\alpha$ -tubulin에 대한 항체는 Santa cruz biotechnology (USA)에서 구입하였고, phospho-Akt, phospho-Erk, phospho-p38, cleaved caspase-3 에 대한 항체는 Cell Signaling Technology (USA)에서 구입하였다. 또한 MMP1에 대한 항체 및 pro-collagen I  $\alpha$ 1 ELISA kit는 Abcam (UK)에서 구입하였으며, recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF), recombinant human transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 단백질은 R&D systems (USA)에서 구입하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 펩타이드 합성

Capacity 0.84 mmol/g인 CTC 레진을 DMF 용매를 포함한 반응기에서 팽윤 반응을 실시하였다. 위의 반응기에 2 당량 fmoc-lysine 과, 2.5 당량 DIEA 를 DMF 용매로 가한 후 2 h 동안 반응 하였다. 카이저 테스트 키트(Sigma Aldrich, USA)로 반응의 종결을 확인하고 DMF로 세척 하였다. 세척 완료 된 레진에 20% piperidine / DMF를 2 회 가하여 아미노산의 fmoc을 제거 하였다. 카이저 테스트로 반응의 종결을 확인하고 DMF로 세척 하였다. 이 후 arginine, lysine, arginine, arginine, arginine, lysine 순서로 다음 과정을 반복하였다. 2 당량 fmoc-아미노산과 2 당량 HBTU, 2 당량 HOBT, 2.5당량 DIEA 를 DMF 용매로 가한 후 2 h 동안 반응 하였다. 카이저 테스트로 반응의 종결을 확인하고 DMF로 세척 하였다. 세척 완료 된 레진에 20% piperidine / DMF를 2 회 가하여 아미노산의 fmoc을 제거 하였다. 카이저 테스트로 반응의 종결을 확인하고 DMF로 세척 하였다. 최종 합성 완료 후, cleavage solution (TFA : H<sub>2</sub>O : 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 실시 하였다. 이 후 건조를 진행하여 펩타이드 최종 생성물을 회수하였다.

합성된 펩타이드의 순도를 high-performance liquid chromatography (HPLC, U-3000, Thermo fisher scientific, USA) 분석을 통해 확인하였으며, C<sub>18</sub> (Pursuit XRs, 250 × 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

Table 1. Synthesized Heptapeptide

Name	Sequence	Purity (%)	M.W. (Da)
Heptapeptide	NH <sub>2</sub> -KRRRKRK-OH	96.6	1027.3

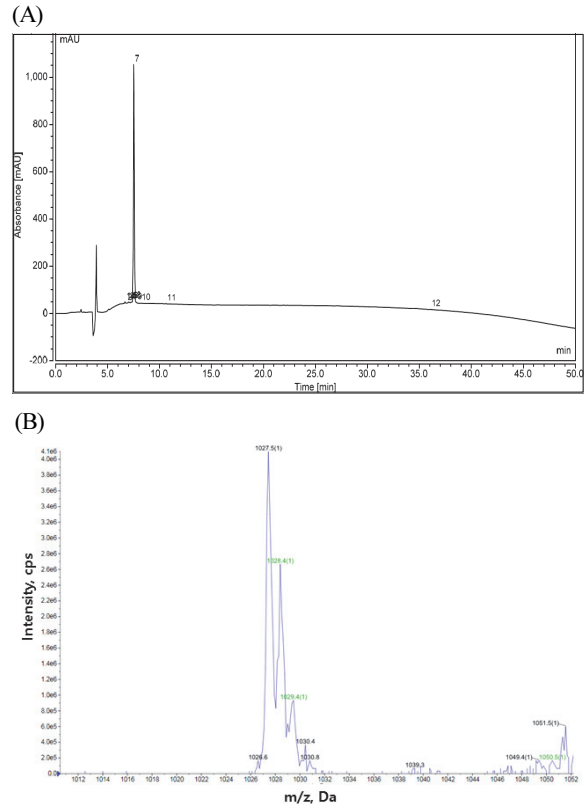


Figure 1. Analysis of synthetic heptapeptide. (A) The purity of heptapeptide was confirmed by HPLC analysis and it was more than 96%. (B) The estimated molecular weight of heptapeptide was confirmed by LC-MS/MS analysis.

SCIEX, USA) 분석을 진행하였으며 C<sub>18</sub> 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 1, Figure 1).

2.2.2. 세포 배양

실험에 사용한 NIH3T3 세포주는 ATCC (USA)에서 구입

하였고 10% heat-inactivated FBS, 1% penicillin/streptomycin을 포함한 DMEM 배지로 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>조건 하에서 배양하였다.

### 2.2.3. 세포 증식 및 생존성 확인 실험

섬유아세포의 증식에 대한 효능을 확인하기 위해 NIH3T3 세포를  $5 \times 10^3$  cells/well 밀도로 96 well plate에 분주하여 16 h 배양 하였다. Serum-free DMEM 배지 조건에서 헤파펙타이드를 농도별로 처리 한 후 72 h 동안 배양 하였다. 양성 대조군에는 100 nM bFGF를 처리하였다. 배양이 완료된 세포를 이용하여 다음과 같이 MIT assay를 진행 하였다. 4 mg/mL MIT를 각 well에 20  $\mu$ L씩 첨가하고 4 h 동안 37 °C 조건에서 배양을 진행한 후 배지를 제거하고 DMSO 500  $\mu$ L를 처리하여 포마잔(formazan)을 녹여내었다. 분광광도계(SpectraMax M2e, Molecular device, USA)를 사용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

UVA 조사 조건에서 세포 생존성을 확인하기 위해 NIH3T3 세포를  $1 \times 10^4$  cells/well 밀도로 96 well plate에 분주하여 16 h 배양 하였다. 배지를 PBS로 교체하고 UVA 6 J/cm<sup>2</sup> 조사를 진행한 후 농도 별 헤파펙타이드를 포함한 serum-free DMEM 을 처리하여 72 h 동안 배양 하였다. 양성 대조군에는 50  $\mu$ M trolox를 처리하였다. 이 후 상기 방법과 동일하게 MIT assay를 진행 하였다.

### 2.2.4. Pro-collagen Type I Alpha 1 발현 확인 실험

NIH3T3 세포를  $5 \times 10^3$  cells/well 밀도로 96 well plate에 분주하여 16 h 배양 하였다. Serum-free DMEM 배지로 교환하고 헤파펙타이드를 농도별로 72 h 동안 처리하였다. 양성 대조군에는 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1을 처리하였다. 4 °C, 13,000 rpm 조건에서 원심분리한 배지 상층액을 확보하여 pro-collagen I  $\alpha$ 1 ELISA kit 를 이용한 분석을 진행 하였다.

### 2.2.5. 세포 내 ROS 억제 확인 실험

NIH3T3 세포를  $5 \times 10^5$  cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 16 h 배양 하였다. 배지를 PBS로 교체하고 UVA 3 J/cm<sup>2</sup> 조사를 진행한 후 농도 별 헤파펙타이드를 포함한 serum-free DMEM 을 처리하여 24 h 동안 배양 하였다. 양성 대조군에는 50  $\mu$ M trolox를 처리하였다. 이 후 10  $\mu$ M DCF-DA 처리하여 차광 조건에서 30 min 배양하고 세포를 회수하였다. 유세포분석기(BD, USA)를 사용하여 FL1 값을 측정하였다.

### 2.2.6. 유전자 발현 분석(RT-PCR)

헤파펙타이드의 collagen, fibronectin, elastin 발현에 대한 영향을 관찰하기 위한 처리 조건은 다음과 같다. NIH3T3 세포를  $2 \times 10^5$  cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 16 h 배양 하였다. Serum-free DMEM 배지 조건에서 헤파펙타이드를 농도별로 처리 한 후 24 h 동안 배양 하였다. 양성 대조군에는 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1을 처리하였다.

UVA 조사 조건에서 헤파펙타이드의 collagen, fibronectin, elastin 발현에 대한 영향을 관찰하기 위한 처리 조건은 다음과 같다. NIH3T3 세포를  $5 \times 10^5$  cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 16 h 배양 하였다. 배지를 PBS로 교체하고 UVA 6 J/cm<sup>2</sup> 조사를 진행한 후 농도별 헤파펙타이드를 포함한 serum-free DMEM 을 처리하여 6 h 동안 배양 하였다. 양성 대조군에는 2.5 mM NAC를 처리하였다.

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 진행 하였다. 이 후 PCR premix (iNtRON Biotechnology, Korea) 및 각 유전자 별 프라이머(Table 2)를 이용하여 샘플 준비 후, PCR 장비(Vapo. Protect, Eppendorf, Germany)를 이용한 PCR 진행하고 전기영동을 통해 발현 양상을 확인하였다. 이미지 촬영 및 분석은 molecular imager<sup>®</sup> Gel Doc<sup>™</sup> XR System (Bio-Rad, USA)을 이용하여 진행 하였다.

### 2.2.7. 단백질 발현 분석(Western Blotting)

세포 증식 시그널 관찰을 위한 처리 조건은 다음과 같다. NIH3T3 세포를  $3 \times 10^5$  cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 16 h 배양하였다. Serum-free DMEM 배지로 교환하여 24 h 동안 배양 후 트리펙타이드를 농도별로 15 min 동안 처리하였다. 양성 대조군에는 100 nM bFGF를 처리하였다.

Table 2. Primer Sequences

Gene	Primer
COL1A1	Forward 5'- CACCCTCAAGAGCCTGAGTC -3'
	Reverse 5'- AGACGGCTGAGTAGGGAACA -3'
FN1	Forward 5'- CCAGGAACCGAGTACACCAT -3'
	Reverse 5'- ATACCCAGGTTGGGTGATGA -3'
ELN	Forward 5'- GCAAGACCTGGCTTTGGACT -3'
	Reverse 5'- GGGAGTTTCTGTTAGGGCTG -3'
GAPDH	Forward 5'- GGAGCCAAAAGGGTCATCAT -3'
	Reverse 5'- GTGATGGCATGGACTGTGGT -3'

UVA 조사 조건에서 세포 사멸 관련 인자 및 MMP-1의 관찰을 위한 처리 조건은 다음과 같다. NIH3T3 세포를  $5 \times 10^5$  cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 16 h 배양 하였다. 배지를 PBS로 교체하고 UVA  $6 \text{ J/cm}^2$  조사를 진행한 후 농도별 헵타펩타이드를 포함한 serum-free DMEM 을 처리하여 24 h 동안 배양 하였다. 양성 대조군에는 2.5 mM NAC를 처리하였다.

UVA 조사 조건에서 TGF 수용체 하위 시그널 관찰을 위한 처리 조건은 다음과 같다. NIH3T3 세포를  $5 \times 10^5$  cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 16 h 배양 하였다. 배지를 PBS로 교체하고 UVA  $6 \text{ J/cm}^2$  조사를 진행한 후 농도 별 헵타펩타이드를 포함한 serum-free DMEM 을 처리하여 5 h 동안 배양 하였다. 양성 대조군에는 2.5 mM NAC를 처리하였다.

Heat shock 조건에서 MAPK 인산화 관찰을 위한 처리 조건은 다음과 같다. NIH3T3 세포를  $5 \times 10^5$  cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 16 h 배양 하였다. Serum-free DMEM 배지 조건에서 헵타펩타이드를 농도별로 처리 한 후 24 h 동안 배양 하였다. 양성 대조군에는 2.5 mM NAC를 처리하였다. 이 후  $44^\circ\text{C}$  항온수조에서 30 min 동안 heat shock을 준 다음, serum-free DMEM 배지 조건에서 15 min 간 배양 하였다.

Heat shock 조건에서 MMP-1의 관찰을 위한 처리 조건은 다음과 같다. NIH3T3 세포를  $5 \times 10^5$  cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 16 h 배양 하였다. Serum-free DMEM 배지 조건에서 헵타펩타이드를 농도별로 처리 한 후 24 h 동안 배양 하였다. 양성 대조군에는 2.5 mM NAC를 처리하였다. 이 후  $44^\circ\text{C}$  항온수조에서 30 min 간 heat shock을 준 다음, serum-free DMEM 배지 조건에서 8 h 배양 하였다.

배양 종료 후 세포를 회수하고 lysis buffer로 세포를 용해한 후 BCA kit을 이용한 단백질 정량을 진행하였다. 각 처리군의 단백질 양을 맞춰 샘플 준비 후 SDS-PAGE 및 PVDF membrane으로의 transfer 진행하였다. 0.5% Tween 20을 포함한 PBS에 녹인 5% 탈지분유로 이 후 blocking 및 각 단백질에 대한 항체 부착 과정을 진행하였다. 항체에 부착된 HRP를 western detection reagent 와 반응한 후 Amersham™ ImageQuant™ 800 (Cytiva, USA) 으로 이미지 분석을 진행하였다.

### 2.2.8. 통계

본 연구에서 시행된 실험은 총 3 회 이상 반복되었고 데이터의 통계적 유의성 검정은 student's *t*-test로 시행 되었다. 결과 값들은 mean ± standard deviation (SD)으로 나타

내었고 *p* value 0.05 미만인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 간주 하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 헵타펩타이드의 섬유아세포 활성 촉진 효과 확인

헵타펩타이드가 섬유아세포의 증식을 높일 수 있는지 확인하기 위해 10, 50, 100  $\mu\text{M}$  펩타이드 처리 후 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 농도 의존적인 증가 경향이 관찰되었고 고농도에서 최대 29 %의 증식 촉진이 이루어 지는 것을 확인할 수 있었다(Figure 2A). 추가로, 세포 증식 기전 관련 인자인 protein kinase B (PKB, Akt) 및 extracellular signal-regulated kinase (Erk) 의 인산화를 관찰 하기 위해 western blotting을 수행하였다. 그 결과 펩타이드 처리군 전체에서 유의한 인산화 증가가 확인되었다(Figure 2B).

다음으로 헵타펩타이드가 섬유아세포에 작용하여 ECM 구성 단백질의 발현을 촉진하는지 확인하기 위해 농도 별 펩타이드 처리 후 collagen type I alpha 1 (COL1A1), fibronectin (FN1), elastin (ELN) 의 mRNA 발현 수준을 RT-PCR로 관찰하였고, 세 유전자의 발현이 헵타펩타이드 처리에 의해 유의하게 증가되는 결과를 확인할 수 있었다 (Figure 2C). 또한 collagen type I alpha 1 의 단백질 발현 수준을 ELISA로 관찰하였다. 그 결과 농도 의존적인 증가 경향이 관찰되었고 100  $\mu\text{M}$  처리 시 약 24 %의 발현 증가가 이루어짐을 확인할 수 있었다(Figure 2D). 이상의 결과에서 본 연구의 헵타펩타이드가 섬유아세포의 증식 및 ECM 구성 단백질의 생산 촉진 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

### 3.2. 헵타펩타이드의 UVA 손상으로부터의 섬유아세포 회복 효과 확인

진피층에 도달하여 섬유아세포 손상을 유도하며 광노화를 일으키는 것으로 알려진 UVA를 섬유아세포에 직접 조사하여 세포 손상을 유도하고 이에 대해 헵타펩타이드가 완화 효과를 나타내는지 실험 하였다.

UVA 조사 후 헵타펩타이드를 농도별로 처리하고 MTT assay를 진행하여 세포 생존율을 관찰하였다. 그 결과 UVA 조사에 의해 세포 생존율이 약 40 %로 감소되었고 헵타펩타이드가 이를 농도 의존적으로 회복시켜 고농도에서 약 44 %의 증가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3A).

또한 UVA 조사 후 헵타펩타이드를 농도별로 처리하고

western blotting을 진행하여 세포 사멸 관련 인자 및 MMP-1의 발현 양상을 관찰하였다. 그 결과 UVA 조사에 의해 크게 증가된 세포 사멸 인자인 *bax* 및 *cleaved caspase-3*의 단백질 수준이 헵타펩타이드 처리에 의해 유의하게 감소되었다(Figure 3B). 또한 UVA 조사에 의해 증가된 MMP-1 단백질 수준도 헵타펩타이드 처리에 의해 감소 경향을 나타내었다(Figure 3C).

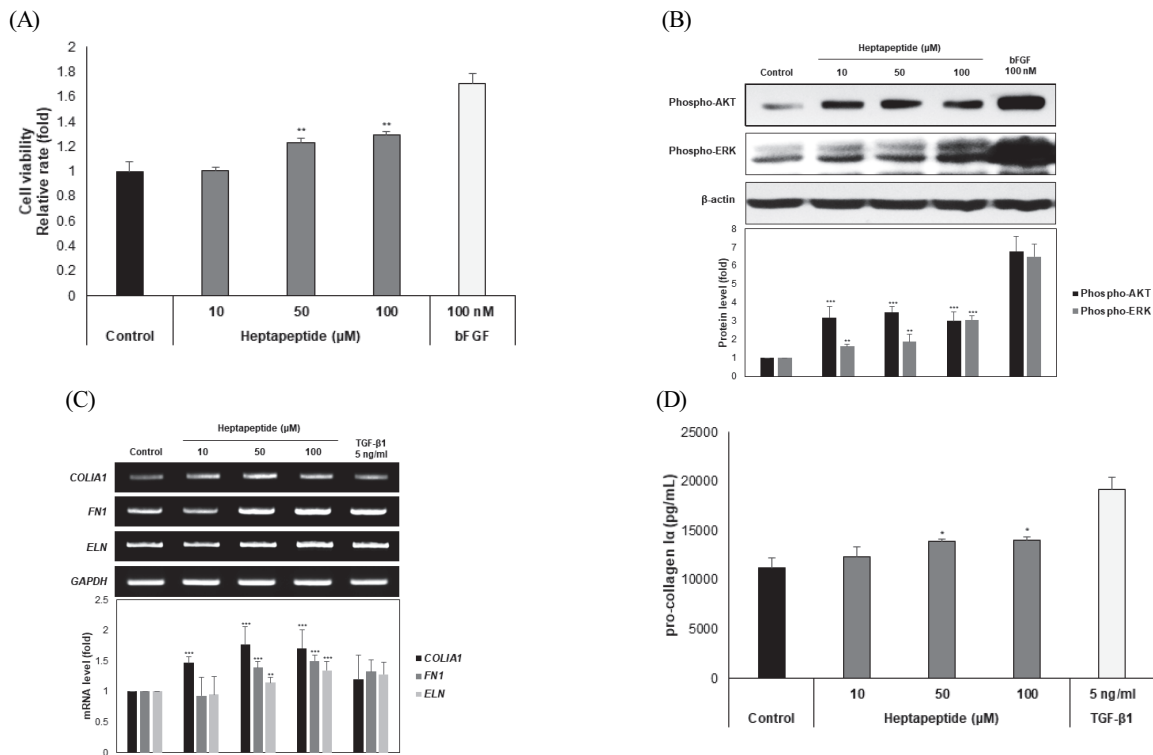
다음으로 UVA 조사에 의한 섬유아세포 내 ROS 증가를 헵타펩타이드가 감소시킬 수 있는지 관찰하였고, UVA 조사 시 약 2.6 배 증가된 세포 내 ROS 수준이 헵타펩타이드 처리에 의해 농도 의존적으로 감소되어 최대 약 15%의 감소율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3D).

이상의 결과에서 본 연구의 헵타펩타이드가 섬유아세포 활성 촉진 효과와 더불어 세포 내 ROS 억제 효과를 나타냄으로써 UVA 조사에 의한 섬유아세포 손상을 완화할 수 있음을 알 수 있었다.

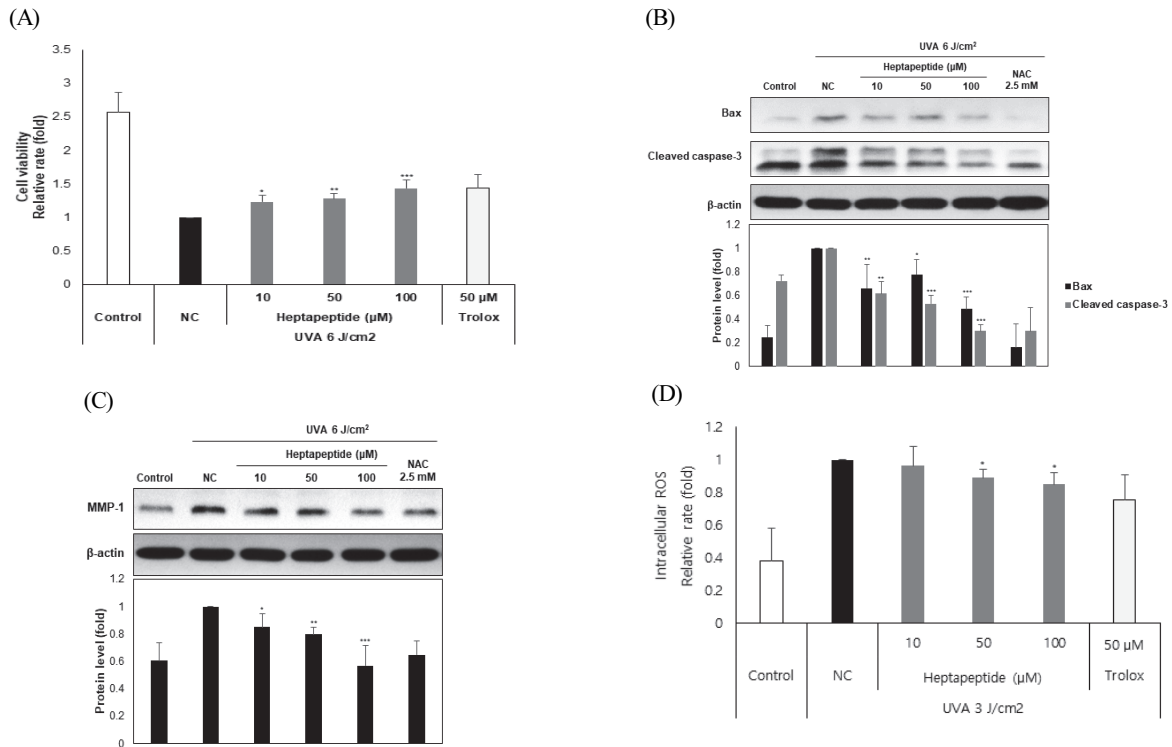
### 3.3. 헵타펩타이드의 TGF- $\beta$ 수용체 기전 회복 효과 확인

UVA 조사에 의한 TGF- $\beta$  수용체 하위 신호 감소가 헵타펩타이드에 의해 회복될 수 있는지 확인하기 위해 UVA 조사 후 헵타펩타이드를 농도별로 처리하고 TGF- $\beta$  수용체의 신호 전달 인자인 *smad2*의 인산화 수준 및 TGF- $\beta$  /*smad* 기전 저해 인자인 *smad7*의 발현 수준을 western blotting으로 확인하였다. 그 결과 UVA 조사에 의해 감소된 *smad2*의 인산화가 헵타펩타이드 처리에 의해 농도 의존적으로 증가되었고, UVA 조사에 의해 증가된 *smad7*의 단백질 발현은 헵타펩타이드 처리에 의해 감소 경향을 나타내었다(Figure 4A).

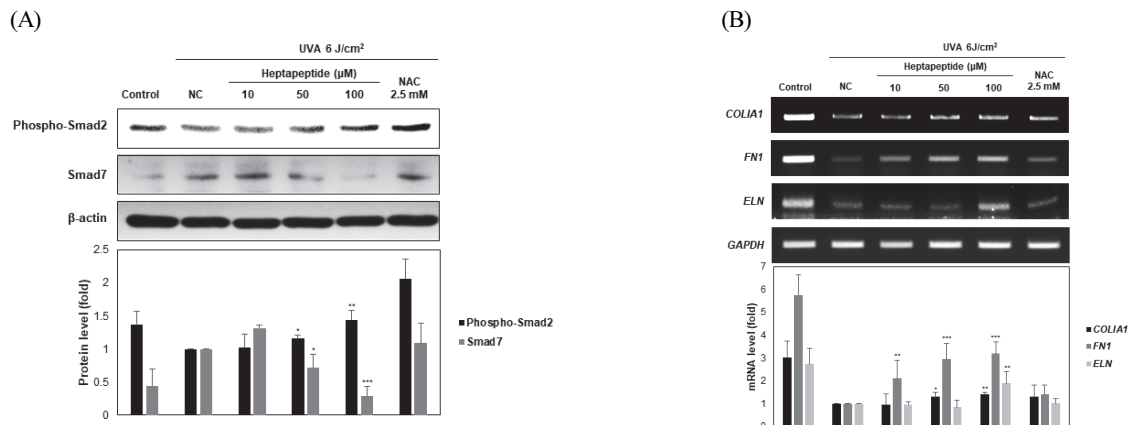
이 후 헵타펩타이드의 TGF- $\beta$  수용체 하위 신호 회복 효과를 추가 검증하기 위해 UVA 조사 후 헵타펩타이드를 농도별로 처리하고 ECM 구성 인자인 collagen I  $\alpha 1$ , fibronectin, elastin의 mRNA 발현 수준을 RT-PCR로 확인하



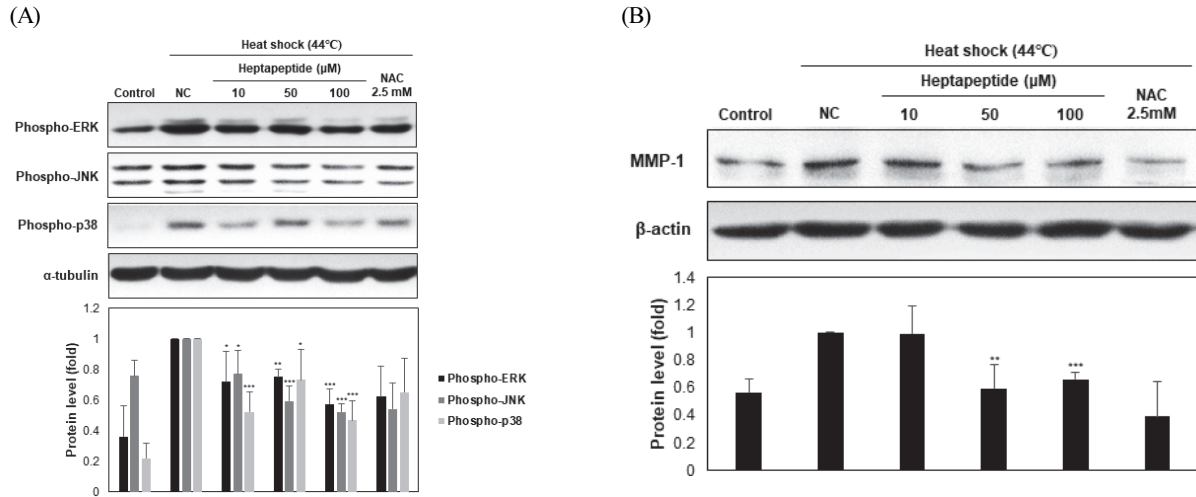
**Figure 2.** Effects of heptapeptide on NIH3T3 fibroblast proliferation and ECM production. (A) Cells were treated with various concentrations of heptapeptide for 72 h and cell viability was measured by MTT assay. (B) Cells were treated with various concentrations of heptapeptide for 15 min and the levels of phospho-AKT and phospho-ERK were analyzed by western blotting. (C) Cells were treated with various concentrations of heptapeptide for 24 h and the expressions of COL1A1, FN1 and ELN genes were analyzed by RT-PCR. (D) Cells were treated with various concentrations of heptapeptide for 72 h and pro-collagen type I  $\alpha 1$  protein level was analyzed by ELISA. The results were expressed as the mean  $\pm$  SD from the three independent experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figure 3.** Inhibitory effects of heptapeptide on UVA-induced damage in NIH3T3 fibroblasts. (A) Cells were treated with various concentrations of heptapeptide for 72 h immediately after UVA exposure. Cell viability was measured by MTT assay. (B)(C) Cells were treated with various concentrations of heptapeptide for 24 h immediately after UVA exposure. Protein levels of bax, cleaved caspase-3 and MMP-1 were analyzed by western blotting. (D) Cells were treated with various concentrations of heptapeptide for 24 h immediately after UVA exposure. DCF-DA-stained cells were analyzed by flow cytometry. The results were expressed as the mean ± SD from the three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 4.** Recovery effects of heptapeptide on TGFβ signaling pathway inhibited by UVA irradiation in NIH3T3 fibroblasts. (A) Cells were treated with various concentrations of heptapeptide for 5 h immediately after UVA exposure. Protein levels of phospho-smad2 and smad7 were analyzed by western blotting. (B) Cells were treated with various concentrations of heptapeptide for 6 h immediately after UVA exposure. The expressions of COL1A1, FN1 and ELN genes were analyzed by RT-PCR. The results were expressed as the mean ± SD from the three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 5.** Protecting effects of heptapeptide on heat shock-induced damage in NIH3T3 fibroblasts. (A) Cells were treated with various concentrations of heptapeptide for 24 h followed by 44 °C, 30 min heat shock. After 15 min incubation in serum-free DMEM, cells were harvested and protein levels of phospho-ERK, phospho-JNK and phospho-p38 were analyzed by western blotting. (B) Cells were treated with various concentrations of heptapeptide for 24 h followed by 44 °C, 30 min heat shock. After 8 h incubation in serum-free DMEM, cells were harvested and MMP-1 protein level was analyzed by western blotting.

였다. 그 결과 UVA 조사에 의해 크게 감소된 COL1A1, FN1, ELN의 발현이 헵타펩타이드 처리에 의해 유의한 수준으로 회복됨을 관찰할 수 있었다(Figure 4B).

이상의 결과에서 본 연구의 헵타펩타이드가 자외선 자극에 의해 감소된 TGF- $\beta$  수용체 기전의 활성을 회복시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

### 3.4. 헵타펩타이드의 열 손상으로부터의 섬유아세포 보호 효과 확인

태양광에 포함된 적외선도 피부 온도를 높여 피부세포의 열 손상을 야기하고 콜라겐 분해를 촉진하여 피부 노화를 유도할 수 있는 것으로 알려져 있다[40]. Heat shock 조건에서 MAPK 활성화가 유도되고 이 후 MMPs 발현이 증가된다는 이전 보고[41,42]를 바탕으로, 열 노화에 대한 헵타펩타이드의 보호 효과를 확인하기 위해 펩타이드 전 처리 후 heat shock을 주고 MAPK 인산화 변화 및 MMP-1 발현을 확인 하였다. 그 결과 heat shock에 의해 증가된 MAPK의 인산화 수준이 헵타펩타이드 처리에 의해 감소되었고(Figure 5A), heat shock에 의해 증가된 MMP-1 발현도 헵타펩타이드 처리에 의해 유의한 감소를 나타냈다(Figure 5B).

이상의 결과에서 본 연구의 헵타펩타이드가 열 손상에 대한 섬유아세포 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 7 개의 아미노산으로 이루어진 헵타펩타이드의 섬유아세포 활성 촉진 효과를 확인 해 보았고, UVA 및 heat shock에 의한 세포 손상을 개선하거나 세포 보호 효과를 나타내는지 확인 해 보았다. 본 연구의 헵타펩타이드는 섬유아세포 증식과 ECM 구성 인자의 발현 촉진 효과를 나타내었다. 그리고 세포 내 ROS 억제 효과를 나타내어 UVA 에 의해 유도된 세포 사멸 및 MMP-1 발현 증가를 억제하고 UVA에 의해 저해된 TGF- $\beta$ /smad 기전의 활성을 촉진하였다. 또한 heat shock 조건에서 MAPK 인산화 및 MMP-1의 발현 증가를 헵타펩타이드가 억제할 수 있는 것으로 확인되었다.

본 연구의 헵타펩타이드는 라이신(lysine) 3 개, 아르기닌(arginine) 4 개로 이루어져 있고 이전 연구에 따르면 라이신의 경우 금속 킬레이트화 반응(metal chelating activity)을 나타내고, 아르기닌의 경우 라디칼 소거능(radical scavenging activity)을 나타내어 항산화 효과를 보이는 것으로 확인되었다[43-44]. 본 연구의 헵타펩타이드가 나타내는 세포 내 ROS 억제 효능이 상기 반응에 의한 것인지 확인 예정이며, 또한 섬유아세포 활성 촉진과 관련된 성장인자 수용체의 작용제(agonist) 역할도 보이는지 확인 예정이다.



이상의 결과를 통해 피부의 내인성 노화뿐만 아니라 광노화를 보호 및 개선할 수 있는 소재로써 본 연구의 헵타펩타이드가 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## References

1. E. Low, G. Alimohammadiha, L.A. Smith, L.F. Costello, S.A. Przyborski, T. von Zglinicki, and S. Miwa, How good is the evidence that cellular senescence causes skin ageing?, *Ageing Res. Rev.*, **71**, 101456 (2021).
2. R. Ganceviciene, A.I. Liakou, A. Theodoridis, E. Makrantonaki, and C.C. Zouboulis, Skin anti-aging strategies, *Dermatoendocrinol.*, **4**(3), 308 (2012).
3. M. El-Domyati, S. Attia, F. Saleh, D. Brown, D.E. Birk, F. Gasparro, H. Ahmad, and J. Uitto, Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin, *Exp. Dermatol.*, **11**(5), 398 (2002).
4. E. Makrantonaki and C. C. Zouboulis, Characteristics and pathomechanisms of endogenously aged skin, *Dermatology*, **214**(4), 352 (2007).
5. C. M. Lapière, The ageing dermis: the main cause for the appearance of 'old' skin, *Br. J. Dermatol.*, **122**(Suppl 35), 5 (1990).
6. A. C. Mora Huertas, C. E. Schmelzer, W. Hoehenwarter, F. Heyroth, and A. Heinz, Molecular-level insights into aging processes of skin elastin, *Biochimie.*, **128-129**, 163 (2016).
7. T. Quan, Z. Qin, W. Xia, Y. Shao, J. J. Voorhees, and G.J. Fisher, Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **14**(1), 20 (2009).
8. J. Varani, M. K. Dame, L. Rittie, S. E. Fligiel, S. Kang, G. J. Fisher, and J.J. Voorhees, Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation, *Am. J. Pathol.*, **168**(6), 1861 (2006).
9. T. Quan, Y. Shao, T. He, J. J. Voorhees, and G. J. Fisher, Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mediates collagen loss in chronologically aged human skin, *J. Invest. Dermatol.*, **130**(2), 415 (2010).
10. J. Varani, D. Spearman, P. Perone, S. E. Fligiel, S. C. Datta, Z. Q. Wang, Y. Shao, S. Kang, G.J. Fisher, and J. J. Voorhees, Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro, *Am. J. Pathol.*, **158**(3), 931 (2001).
11. G. J. Fisher, Z. Q. Wang, S. C. Datta, J. Varani, S. Kang, and J. J. Voorhees. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light, *N. Engl. J. Med.*, **337**(20), 1419 (1997).
12. L. Rittié and G. J. Fisher, UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **1**(4), 705 (2002).
13. A. Kammeyer and R. M. Luiten, Oxidation events and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, **21**, 16 (2015).
14. J. W. Shin, S. H. Kwon, J. Y. Choi, J. I. Na, C. H. Huh, H. R. Choi, and K. C. Park, Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(9), 2126 (2019).
15. T. Quan, T. He, J. J. Voorhees, and G. J. Fisher, Ultraviolet irradiation induces Smad7 via induction of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **280**(9), 8079 (2005).
16. K. J. Gromkowska-Kepka, A. Puścion-Jakubik, R. Markiewicz-Żukowska, and K. Socha, The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging - review of *in vitro* studies, *J. Cosmet. Dermatol.*, **20**(11), 3427 (2021).
17. N. Bigot, G. Beauchef, M. Hervieu, T. Oddos, M. Demoor, K. Boumediene, and P. Galéra, NF-κB accumulation associated with COL1A1 transactivators defects during chronological aging represses type I collagen expression through a -112/-61-bp region of the COL1A1 promoter in human skin fibroblasts, *J. Invest. Dermatol.*, **132**(10), 2360 (2012).
18. K. Tanaka, K. Asamitsu, H. Uranishi, A. Iddamalagoda, K. Ito, H. Kojima, and T. Okamoto, Protecting skin photoaging by NF-kappaB inhibitor, *Curr. Drug Metab.*, **11**(5), 431 (2010).
19. Y. J. Choi, K. M. Moon, K. W. Chung, J. W. Jeong, D. Park, D. H. Kim, B. P. Yu, and H. Y. Chung, The underlying mechanism of proinflammatory NF-κB activation by the mTORC2/Akt/IKKα pathway during

- skin aging, *Oncotarget*, **7**(33), 52685 (2016).
20. H. J. Kim, N. J. Bogdan, L. J. D'Agostaro, L. I. Gold, and G. F. Bryce, Effect of topical retinoic acids on the levels of collagen mRNA during the repair of UVB-induced dermal damage in the hairless mouse and the possible role of TGF-beta as a mediator, *J. Invest. Dermatol.*, **98**(3), 359 (1992).
  21. L. H. Kligman, C. H. Duo, and A. M. Kligman, Topical retinoic acid enhances the repair of ultraviolet damaged dermal connective tissue, *Connect. Tissue Res.*, **12**(2), 139 (1984).
  22. J. J. Leyden, Treatment of photodamaged skin with topical tretinoin: an update, *Plast. Reconstr. Surg.*, **102**(5), 1667 (1998).
  23. C. E. Griffiths, A. N. Russman, G. Majmudar, R. S. Singer, T. A. Hamilton, and J. J. Voorhees, Restoration of collagen formation in photodamaged human skin by tretinoin (retinoic acid), *N. Engl. J. Med.*, **329**(8), 530 (1993).
  24. R. M. Colven and S. R. Pinnell, Topical vitamin C in aging, *Clin. Dermatol.*, **14**(2), 227 (1996).
  25. P. C. Chiu, C. C. Chan, H. M. Lin, and H. C. Chiu, The clinical anti-aging effects of topical kinetin and niacinamide in Asians: a randomized, double-blind, placebo-controlled, split-face comparative trial, *J. Cosmet. Dermatol.*, **6**(4), 243 (2007).
  26. D. L. Bissett, K. Miyamoto, P. Sun, J. Li, and C. A. Berge, Topical niacinamide reduces yellowing, wrinkling, red blotchiness, and hyperpigmented spots in aging facial skin, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **26**(5), 231 (2004).
  27. C. M. Ditre, T. D. Griffin, G. F. Murphy, H. Sueki, B. Telegan, W. C. Johnson, R. J. Yu, and E. J. Van Scott, Effects of alpha-hydroxy acids on photoaged skin: a pilot clinical, histologic, and ultrastructural study, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **34**(2 Pt 1), 187 (1996).
  28. P. K. Thibault, J. Wlodarczyk, and A. Wenck, A double-blind randomized clinical trial on the effectiveness of a daily glycolic acid 5% formulation in the treatment of photoaging, *Dermatol. Surg.*, **24**(5), 573 (1998).
  29. P. Ledwoń, F. Errante, A. M. Papini, P. Rovero, and R. Latajka, Peptides as active ingredients: A challenge for cosmeceutical industry, *Chem. Biodivers.*, **18**(2), e2000833 (2021).
  30. K. Sato, M. Viswanathan, R. B. Kent, and C. R. Wood, Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **17**(6), 638 (2006).
  31. H. Husein E. Hadmed and R. F. Castillo, Cosmeceuticals: peptides, proteins, and growth factors, *J. Cosmet. Dermatol.*, **15**(4), 514 (2016).
  32. D. I. S. P. Resende, M. S. Ferreira, J. M. Sousa-Lobo, E. Sousa, and I. F. Almeida, Usage of synthetic peptides in cosmetics for sensitive skin, *Pharmaceuticals(Basel)*, **14**(8), 702 (2021).
  33. L. Zhang and T. J. Falla, Cosmeceuticals and peptides, *Clin. Dermatol.*, **27**(5), 485 (2009).
  34. Y. L. Choi, E. J. Park, E. Kim, D. H. Na, and Y. H. Shin, Dermal stability and *in vitro* skin permeation of collagen pentapeptides (KTTKS and palmitoyl-KTTKS), *Biomol. Ther (Seoul)*, **22**(4), 321 (2014).
  35. L. Pickart, J. M. Vasquez-Soltero, and A. Margolina, GHK Peptide as a Natural Modulator of Multiple Cellular Pathways in Skin Regeneration, *Biomed. Res. Int.*, **2015**, 648108 (2015).
  36. C. Blanes-Mira, J. Clemente, G. Jodas, A. Gil, G. Fernández-Ballester, B. Ponsati, L. Gutierrez, E. Pérez-Payá, and A. Ferrer-Montiel, A synthetic hexapeptide (Argireline) with antiwrinkle activity, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **24**(5), 303 (2002).
  37. B. Y. Reddy, T. Jow, and B. M. Hantash, Bioactive oligopeptides in dermatology: Part II, *Exp. Dermatol.*, **21**(8), 569 (2012).
  38. F. Errante, P. Ledwoń, R. Latajka, P. Rovero, and A. M. Papini, Cosmeceutical Peptides in the Framework of Sustainable Wellness Economy, *Front. Chem.*, **8**, 572923 (2020).
  39. M. S. Ferreira, M. C. Magalhães, J. M. Sousa-Lobo, and I. F. Almeida, Trending Anti-Aging Peptides, *Cosmetics*, **7**(4), 91 (2020).
  40. G. Park and M.S. Oh, Acceleration of heat shock-induced collagen breakdown in human dermal fibroblasts with knockdown of NF-E2-related factor 2, *BMB Rep.*, **48**(8),

- 467 (2015).
41. R. Z. Lin, Z. W. Hu, J. H. Chin, and B. B. Hoffman, Heat shock activates c-Src tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase in NIH3T3 fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **272**(49), 31196 (1997).
  42. C. H. Park, M. J. Lee, J. Ahn, S. Kim, H. H. Kim, K. H. Kim, H. C. Eun, and J. H. Chung, Heat shock-induced matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 are mediated through ERK and JNK activation and via an autocrine interleukin-6 loop, *J. Invest. Dermatol.*, **123**(6), 1012 (2004).
  43. P. Xu, Y. Zheng, X. Zhu, S. Li, and C. Zhou, L-lysine and L-arginine inhibit the oxidation of lipids and proteins of emulsion sausage by chelating iron ion and scavenging radical, *Asian-Australas J. Anim. Sci.*, **31**(6), 905 (2018).
  44. R. H. Böger, S. M. Bode-Böger, A. Mügge, S. Kienke, R. Brandes, A. Dwenger, and J.C. Frölich, Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production, *Atherosclerosis*. **117**(2), 273 (1995).