AP 콜라겐 효소분해 펩타이드에 의한 자외선 손상으로부터 피부세포 보호 및 광노화 억제 효능

이지해¹ · 채민정¹ · 최진규² · 김완기¹ · 박미영¹

¹아모레퍼시픽 기술연구원 헬스케어연구소

²에스트라 메디컬뷰티연구소

Photo-Protective Effect of AP Collagen Peptides on UV-Induced Skin Aging

Ji-Hae Lee¹, Minjung Chae¹, Jin Kyu Choi², Wangi Kim¹, and Miyoung Park¹

¹Healthcare Research Division, AMOREPACIFIC R&D Center

²Medical Beauty Research Division, Aestura Corporation

ABSTRACT Extrinsic factors including chronic ultraviolet (UV) radiation, smoking, and other pollutants may cause skin damage and aging. Oral supplementation of collagen, a major component in the skin dermis can have a photo-protective effect and help improve skin conditions. This study examined the effects of AP collagen peptides (APCP) containing glycine-proline-hydroxyproline (GPH) on UVB radiation in both human skin fibroblast and SKH-1 hairless mice. In UVB-irradiated fibroblast, APCP and GPH improved collagen type I and transforming growth factor- β 1 gene expression in a dose-dependent manner. To evaluate the effects of APCP on skin photo-aging *in vivo*, hairless mice were exposed to UVB irradiation and administered APCP orally for 12 weeks. In the APCP-treated group, the mouse skin showed improved wrinkle indices (total wrinkle area, number of wrinkles, total length of wrinkles and mean foam factor) and histopathological changes (collagen and elastic fiber, and epidermal and dermal thickness) with a better skin barrier status (transepidermal water loss, subcutaneous hydration) and elasticity (gross elasticity, net elasticity, a portion of the visco-elasticity, and a portion of the elasticity) compared to the mouse skin of the control group. These results suggest that APCP is a potent candidate for an anti-photoaging ingredient.

Key words: collagen peptide, wrinkle, anti-photoaging, skin barrier, elasticity

서 론

피부 노화는 크게 내인성 노화와 외인성 노화로 구분한다. 특히 나이가 들에 따라 누구나 겪게 되는 내인성 노화와 달리 외인성 노화는 자외선, 추위, 스모그, 혹은 스트레스와 같은 다양한 환경적 요인에 의해 발생하며, 그중 자외선(UV, ultraviolet radiation)이 주원인으로 이를 광노화(photoaging)라 한다. UV는 파장에 따라 UVA(315~400 nm), UVB(280~315 nm), UVC(100~280 nm)로 분류되며, 오존층에서 대부분 흡수되는 UVC와 달리 지표에 도달하여 표피까지 침투하는 UVB와 진피까지 침투하는 UVA는 광노화에 중요한 역할을 한다(Bocheva 등, 2019; Amaro-Ortiz 등, 2014; Damiani와 Ullrich, 2016). 피부는 UV의 1차 표적이며 UV 자극에 의해 피부 장벽 손상, 활성산소종(reactive oxygen species) 발생, 전염증성 사이토카인 생성의 축진을 통해 피

부 DNA 손상, 단백질 및 지질의 산화적 손상 및 염증을 일으킨다(Rinnerthaler 등, 2015; Azzouz 등, 2018). 이에 따라 진피층의 콜라겐, 엘라스틴, 히아루론산, 피브릴린 등의 피부결합 조직의 생산이 감소하며, 콜라겐을 분해하는 효소인 MMPs(matrix metalloproteinases)의 생합성이 증가하여 노화 속도를 가속화하고 굵고 깊은 주름, 탄력 저하, 건조증, 색소침착 등을 유발하게 된다(Bocheva 등, 2019; Scharfetter-Kochanek 등, 2000).

콜라겐은 세포외 기질을 구성하는 주요 고분자물질 중 하나로, 주로 아미노산 glycine(Gly), proline(Pro), hydroxyproline(Hyp) 3개의 알파 체인 삼중 나선 구조(three single alpha-chains)에 이들이 다시 복합체(non-extensible triple helix)를 만들며 특징적인 거대한 3차원적 분자를 이룬다(León-López 등, 2019). 콜라겐의 종류는 28종까지 확인되었다. Type I 콜라겐은 피부, 뼈, 치아, 힘줄, 인대, 혈관 결속, 장기 등에, type II 콜라겐은 연골에, 그리고 type III 콜라겐은 피부, 근육, 혈관에 주로 존재하는 것으로 알려져 있다(Bateman 등, 1996). 돼지의 부산물, 어류의 비늘 등에서 얻어진 고분자 콜라겐은 효소, 산 등으로 분해 과정을 거쳐 콜라겐 펩타이드 혹은 콜라겐 가수분해물로서

저분자화시킨 것을 의미하며(Hong 등, 2019; León-López 등, 2019), 최근 피부 건강을 위한 화장품 및 건강기능식품 원료로 개발되고 있다(Agyei 등, 2016). 특히 저분자 콜라겐 펩타이드는 생물학적 이용 가능성이 낮은 고분자 콜라겐에 비해 인체 흡수율이 증가하여 더 나은 효능을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Watanabe-Kamiyama 등, 2010; Yamamoto 등, 2016).

본 연구에서는 UV 조사에 의한 광노화된 손상 피부에서 AP 콜라겐 효소분해 펩타이드의 주름, 피부 건조, 탄력 감소 등에 대한 효능 여부 및 기전을 확인하고자 하였다. 이를 위해 UV 조사에 의해 광노화가 유도된 섬유아세포와 무모 생쥐(Skh:HR-a hairless mice) 모델을 이용하였다. 따라서 본 연구를 통해 자외선에 의해 증가한 피부 주름에 대한 AP 콜라겐 효소분해 펩타이드의 효능을 *in vitro*, *in vivo* 모델을 통해 확인함으로써 피부 건강에 도움을 줄 수 있는 건강 기능성식품 개발로 연계하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

가수분해 콜라겐 펩타이드는 이미 및 이취가 없고 고유의 향미가 있는 미황색 분말로, 각 사슬당 대략 100,000 Da의 분자량을 갖는 3개의 폴리펩타이드 사슬이 삼중 나선 구조를 만들고, 이들이 다시 복합체를 만들면서 특징적인 거대한 3차원 콜라겐 분자를 만든다. 본 실험에 사용된 AP 콜라겐 효소분해 펩타이드는 실꼬리돔(*Nemipterus virgatus*)의 비늘로부터 추출한 젤라틴을 원료로 하여 얻어졌으며, 평균 분자량이 약 1,500 Da인 저분자이다. 트리펩타이드 함량이 15% 이상이며, 지표 물질로서 Gly-Pro-Hyp $3.0 \pm 20\%$ 로 설정된 가수분해 콜라겐 펩타이드 분말을 구입(Jellice Co., Sendai, Japan)하여 사용하였다.

세포배양

인간 섬유아세포(normal human fibroblast, NFDF, neonatal)는 Lonza(Rockville, MD, USA)에서 구매하여 사용하였다. 세포는 10%(v/v) fetal bovine serum(FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA)과 1% penicillin-streptomycin solution(Gibco)을 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Welgene, Seoul, Korea)에 넣은 배양 배지에 37°C, 5% CO₂ 조건의 세포배양기에서 배양하였다. 실험은 7~9계대의 섬유아세포를 사용하였다.

in vitro 실험방법

섬유아세포를 60 mm culture dish(Falcon, Lincoln Park, NJ, USA)에 5×10^5 개의 농도로 분주한 후 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양하여 배양 플레이트에 80~90%가 되도록 키웠다. 다음날 세포의 배양 배지를 제거하고 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)으로 세척한 후 DPBS

존재 하에 자외선 조사를 실시하였다. 자외선조사기(Vilber Lourmat, Marnes-la-Vallee, France)의 광원 파장은 280~320 nm(λ max: 312 nm) 범위로 세포 성장에 영향을 주지 않는 수준인 16 mJ/cm²로 조사하였다. 무혈청 high glucose DMEM(Welgene) 배양액에 녹인 AP 콜라겐 효소분해 펩타이드(AP collagen peptide, APCP; 0.1, 0.3, 1.0 µg/mL)와 glycine-proline-hydroxyproline(GPH; 0.01, 0.03 µg/mL)을 농도별로 처리하여 24시간 배양 후 cell counting kit 8(CCK-8, Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan)의 제조사 프로토콜에 따라 세포 생존율을 측정하였으며, 대조군(NC)에 대한 생존율을 백분율로 표시하여 나타내었다. 세포 생존율 측정 후 세포를 수거하여 이후 실험을 진행하였다.

처리가 끝난 세포는 PBS 세척 후 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 세포에서 RNA를 추출하였다. BioAnalyzer 2100(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)으로 RNA 정량 후, 1 µg RNA와 Superscript III kit(Invitrogen)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이를 Taqman universal PCR master mix primer와 혼합한 후 7500 fast real-time PCR machine을 이용하여 유전자의 발현 변화를 측정하고, 각 유전자의 발현량을 GAPDH 유전자 발현량으로 보정하였다. PCR과 관련된 시약과 장치는 모두 Applied Biosystems(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 제품을 사용하였으며, PCR 방법은 제조사 제공 프로토콜을 따랐다. 유전자 발현평가를 위한 primer는 GAPDH(Hs02786624_g1), COL1A(Hs00164004_m1), transforming growth factor(TGF)β1(Hs00998133_m1)을 사용하였다.

실험동물 및 사육관리

생후 8주령 된 25~30 g의 특정 미생물 부재(specific pathogen free, SPF) 암컷 hairless mouse(Skh:HR-a)를 Charles River Laboratories(Wilmington, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 동물 입수 후 검역과 일주일간의 순화 기간을 거쳤으며, 시험 당일 평균 체중을 기준으로 8마리씩 3그룹(8마리/그룹)으로 군 분리를 실시하였다.

실험동물의 사육환경은 온도($23 \pm 2^\circ\text{C}$), 습도($55 \pm 10\%$), 그리고 12시간 명암주기를 유지하였다. 사료는 마우스 전용 사료(Purina, St. Louis, MO, USA)를, 음수는 자외선 소독한 상수도수를 자유 급여하였다. 실험동물 사육관리는 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals'를 기준으로 하였으며, 본 연구는 건강기능식품 기능성 원료 개발을 위해(주)에스트라 Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)의 승인을(IACUC16-047) 받아 진행하였다.

UV 조사 광노화 유도 마우스 모델에서 피부 손상 개선효능

시험군은 NC군(normal control group), UV군(UV-irradiated control group) 및 UV/APCP군(UV-irradiated

and 300 mg/kg/day APCP group) 3개로 나누어 실험하였다. APCP 일일 투여량은 자외선에 의한 피부 손상으로부터 피부 보습에 효능을 보인 동물모델을 이용한 결과 및 인체적용시험의 1일 섭취량(1,000~1,500 mg/day)을 참고하여 결정하였다(Kim 등, 2009). 광노화 유도를 위해 매주 주 3회 동일한 시간에 UVB 램프(UV 800, Waldmann, Villingen-Schwenningen, Germany) 챔버에 각 해당 시험군을 넣어 자외선을 조사하였다. 첫째 주는 1 minimal erythema dose(MED, 55~60 mJ/cm²)를, 둘째 주는 2 MED, 셋째 주는 3 MED, 넷째 주부터 실험 종료 시까지 4 MED를 조사하였다. 정확한 자외선량으로 노출시키기 위해 자외선 측정기(VLS-3W, Vilber Lourmat, France)를 이용하여 광량을 측정하였다. 동물의 피부 채취 시 UV 손상에 의한 직접적인 영향을 받지 않도록 피부 채취 3일 전부터 UV 조사를 실시하지 않았다. 실험 기간 12주 중 총 UV 노출량은 118 MED였다. NC 및 UV군은 vehicle로서 saline을, UV/APCP군은 APCP를 12주 동안 경구 투여하였으며, 12주 후 sodium pentobarbital(Entobar, Hanlim Pharm Co., Yongin, Korea)을 복강 내 투여하여 부검하였다. 광노화 개선 효과 확인을 위해 실험 종료 후 피부를 육안 관찰하고 등 부위에 실리콘 폴리머(Silflo impression material, Flexico, Potters Bar, UK)를 이용하여 피부 주형(replica)을 채취하였다. 채취한 피부 주형은 Visioline[®] VL 650 device(Courage & Khazaka Electronics, Koln, Germany)를 이용하여 주름 분석을 실시하였다. 탄력 개선 효과의 판정을 위해 Cuto-meter SEM575(C&K)를 이용하여 피부 탄력을 측정하였다. 피부의 보습 능력을 판정하기 위해 등 부위 피부에 수분증발량측정기(VapoMeter, SWL4102, Delfin Technologies, Kuopio, Finland)와 수분측정기(moisture meter, Delfin Technologies)를 이용하여 각각 경표피수분손실량(transepidermal water loss, TEWL)과 피부 수분량(subcutaneous(SC)-hydration)을 측정하였다. 측정 환경 조건은 온도 25.5±0.5°C, 상대 습도 60±5%였다. 지속적인 UVB 노출에 의한 피부 조직병리학적 변화 관찰을 위해 희생된 동물의 등 쪽 피부를 떼어 10% 중성 포르말린에 고정하고 일반적인 조직 처리 과정을 거친 후 파라핀 포매하여 4 µm 절편을 준비하였다. Hematoxylin & eosin(H&E), Masson-Trichrome, Herovici stain을 실시하여 각각 피부 일반 병리, 진피의 교원섬유 및 탄성섬유의 상태를 관찰하였다.

통계처리

실험 결과에 대한 통계 분석은 MINITAB 18.1(Minitab, LLC, State College, PA, USA)을 이용하여 정규성 검정 후 one-way ANOVA를 이용하여 UV군과의 통계학적 유의성을 검정하였다. *In vitro* 실험 결과는 각 실험군의 평균±표준편차로, *in vivo* 실험 결과는 평균±표준오차로 표시하였으며, 각 군의 유의성은 $P<0.05$ 수준으로 검정하였다.

결과 및 고찰

AP 콜라겐 효소분해 펩타이드와 GPH에 의한 type I 콜라겐과 TGFβ1 유전자 발현량 증가

피부의 진피층은 대부분 콜라겐으로 이루어져 있는데 이는 세포 구조와 형태를 유지하여 피부의 탄력과 주름에 큰 영향을 준다(Fisher 등, 2002). 피부 콜라겐은 대부분 type I 콜라겐과 type III 콜라겐으로 구성되어 있으며, 그중 type I 콜라겐이 대략 85%를 차지하고 있다(Ricard-Blum, 2011). Type I 콜라겐의 감소와 변이는 피부의 탄력을 저하시키는 데 영향을 주며, 노화와 자외선 같은 외부적인 자극에 의해서 생성이 감소하게 된다(Varani 등, 2006; Jariashvili 등, 2012). 이처럼 UVB 자극에 의해 피부 탄력과 주름에 직접적인 영향을 주는 type I 콜라겐의 생성량 변화와 AP 콜라겐 효소분해 펩타이드의 처리가 세포에 미치는 영향에 대해 알아보았다.

UV와 AP 콜라겐 효소분해 펩타이드의 농도(0.1, 0.3, 1.0 µg/mL)에 따른 섬유아세포 생존율을 확인한 결과, 16 mJ/cm² UV와 1 µg/mL 이하의 농도에서 AP 콜라겐 효소분해 펩타이드는 세포에 대한 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1A). UVB 처리에 의해 type I 콜라겐의 유전자(COL1A, collagen type I alpha) 발현이 유의적으로 감소하였고, 0.1, 0.3, 1.0 µg/mL의 AP 콜라겐 효소분해 펩타이드 처리에 의해서 농도 의존적으로 회복되는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 피부, 특히 진피층에서 type I 콜라겐 발현 합성을 조절하는 주요 인자로 알려진 TGFβ1의 유전자 발현량을 비교하였다. UVB 노출에 의해 TGFβ1의 유전자 발현이 유의적으로 감소하였고, AP 콜라겐 효소분해 펩타이드 0.1, 0.3, 1.0 µg/mL에 의해 농도 의존적으로 회복되는 것을 확인하였다. 이 실험에 사용된 AP 콜라겐 효소분해 펩타이드는 3%의 GPH를 지표 성분으로 포함하고 있어 GPH의 type I 콜라겐의 생성량에 미치는 영향에 대해 알아보았다(Fig. 1C). UVB에 의해서 유의적으로 감소한 type I 콜라겐의 유전자 발현량이 GPH 0.01, 0.03 µg/mL에 의해 농도 의존적으로 회복하는 것을 확인하였다. UVB에 의해 감소한 TGFβ1의 유전자 발현량도 GPH 0.01, 0.03 µg/mL에 의해 농도 의존적으로 회복하는 것을 확인하였다. 기존 연구에서도 콜라겐 펩타이드는 섬유아세포에서 농도 의존적으로 procollagen 합성이 증가하는 유사한 효능을 확인한 바 있으며(Kim 등, 2009), 특히 본 연구에서 AP 콜라겐 효소분해 펩타이드 중 GPH가 콜라겐 발현의 증가에 주요한 효능을 갖는 것으로 확인되었다.

피부 주름 측정

반복적인 자외선 노출은 TGF 억제제를 통해 진피의 주된 성분인 type I 및 III 콜라겐 합성을 감소시키며, 활성산소종 발생에 의해 AP-1 활성화 등으로 MMPs, 특히 MMP-1, -3, -9를 활성화해 진피 내 결합 조직의 분해를 촉진한다

Fig. 1. Effect of APCP on the viability (A), COL1A and TGFβ1 mRNA level (B), and effect of GPH on COL1A and TGFβ1 mRNA level (C) in UVB-irradiated fibroblast cell. Values are expressed as mean±SD. Significant differences: # $P<0.05$ and ## $P<0.01$ as compared with normal control; * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ as compared with UV-irradiated control.

(Brennan 등, 2003; Russo와 Halliday, 2006), 그 결과 광노화에 의한 굵고 깊은 주름 및 잔주름 발생, 탄력 감소, 피부 건조증 등을 증가시킨다(Niu 등, 2014).

실험 기간 중 UV에 지속해서 노출된 마우스의 등 피부를 육안 관찰 시 NC군보다 UV군은 발적, 부종, 거칠기, 피부 주름 증가가 확인하였으며, AP 콜라겐 효소분해 펩타이드 투여군은 UV 광노화군보다 전반적으로 개선된 피부 상태를 보였다(Fig. 2A). 피부 주름 생성 정도를 객관적으로 평가하기 위하여 replica를 채취하고 Visioline®으로 분석한 결과(Houser 등, 2017), 주름의 전체 면적, 전체 수, 전체 길이, 물리학적 형태 인자(mean foam factor, 모든 주름의 너비와 길이의 평균) 모두 UV군에서 NC군 대비 유의적으로 증가하였고, AP 콜라겐 효소분해 펩타이드 투여군에서 UV군보다 각각 56.79%(주름 전체 면적), 61.86%(주름 전체 수), 60.71%(주름 전체 길이), 21.95%(주름 물리학적 형태) 감소하였고, 통계적으로 유의함을 확인하였다(Fig. 2B).

피부 조직의 병리학적 관찰

자외선에 지속해서 노출된 피부는 노출되면 활성산소 생성, 염증반응, 세포사멸 등의 반응이 일어나고, 지속적인 자극과 이로 인한 여러 신호전달 체계의 활성화는 세포 과증식, MMPs 발현 증가에 의한 진피 내 교원질(collagen) 및 탄성섬유(elastin fiber)의 변성, 종양 등의 발생을 초래한다(Matsumura와 Ananthaswamy, 2004; Dhital 등, 2017).

피부의 진피 조직 속에는 피부 탄력과 관련된 교원섬유(collagen fiber)와 탄성섬유가 그물망 구조를 하고 있으며(Lee 등, 1999), 광자극을 받은 피부는 과증식에 의해 표피층이 두꺼워지고 진피층도 섬유 모세포와 염증세포가 증가하며 교원섬유의 무질서한 배열과 탄성섬유증(fibroelastosis)으로 인해 두꺼워진다(Seite 등, 2006).

본 실험에서 피부 조직병리학적 검사 시(Fig. 3A), UV군에서 광자극에 의한 표피 및 진피 두께 증가를 확인할 수 있었다. UV로부터 발생한 광노화 반응 중 교원섬유의 양과 형태를 관찰하기 위해 Masson's trichrome staining을 진행하였다(Song 등, 2013). 이를 통해 UV 노출에 의한 진피 교원섬유의 배열이 불규칙적이고 교원섬유도 감소함을 확인할 수 있었으며, AP 콜라겐 효소분해 펩타이드 투여에 의해 교원섬유 감소가 억제되었다. 광노화 중 탄성섬유의 양과 형태를 관찰하기 위해 Herovici staining을 진행하였다(Bae 등, 2012). 이를 통해 UV 노출에 의한 진피 탄성섬유의 파괴 및 엉킨 탄성섬유증을 확인할 수 있었으며, AP 콜라겐 효소분해 펩타이드 투여군에서는 변성된 탄성섬유가 비교적 적게 관찰되었다. 일반적으로 내인성 노화에 따라 표피 두께는 감소하지만, UV 노출에 의한 외인성 광노화 경우는 증가한다. 광노화된 피부는 진피세포 증식(섬유아세포 증식, 염증성 세포의 침윤 등)이 일어난다(Rabe 등, 2006). 피부 조직병리학적 이미지를 분석한 결과(Fig. 3B) UV 노출로 일어난 과증식이 AP 콜라겐 효소분해 펩타이드

Fig. 2. Effect of APCP on UVB-induced wrinkle formation. Skin replica image (A) and wrinkle parameters (B) were analyzed by Visioline[®] VL 650. Values are expressed as mean±SEM. Significant differences: ^{##} $P<0.01$ as compared with normal control group; ^{*} $P<0.05$ and ^{**} $P<0.01$ as compared with the UV-irradiated control.

투여군에서는 완화되었으며, 표피 및 진피 두께가 UV군보다 각각 30.94, 5.97% 감소하였고 통계적으로도 유의하였다.

홍반 및 피부 수분 측정

홍반은 진피 혈관이 확장되는 반응으로 UVB는 진피 상부

층까지 도달하여 급속한 화상이나 홍반을 일으킬 수 있다 (Trevithick 등, 1992). 즉 UV 노출은 피부가 붉어지면서 화끈거리는 현상이 시작되고 피부 곳곳에 울긋불긋한 흔적이 남을 수 있으며, 이는 피부 광노화를 악화시키게 된다. 본 연구에서 홍반을 측정한 결과, UV 노출에 의해 홍반이 증가함을 확인하였다. AP 콜라겐 효소분해 펩타이드 투여

Fig. 3. Effect of APCP on UVB-induced skin deformation. Skin histological image (bar=200 μm) (A), and epidermal and dermal thickness (B). Values are expressed as mean±SEM. Significant differences: ^{##} $P<0.01$ as compared with normal control group; ^{*} $P<0.05$ and ^{**} $P<0.01$ as compared with the UV-irradiated control.

에 의해 홍반 지수가 13.89% 완화되었으나, 통계적으로 유의하지는 않았다(data not shown). 피부 각질층은 피부 내 수분을 흡수하고 유지하며, 외부 수분 투과에 대한 장벽기능을 하고 이를 통해 피부가 부드럽고 유연하게 유지되도록 한다(Blanken 등, 1989). UV에 의한 피부 장벽 손상은 피부 표면 수분량 감소와 피부 건조, 거친 피부 등을 유발하는 것으로 알려져 있다(Haratake 등, 1997; Jiang 등, 2007). TEWL 증가는 각질층의 수분 손실을 의미하며, 각질층 장벽기능을 평가하는 데 이용된다(Sparr 등, 2012). 본 연구에서는 UV 노출에 의해 피부 장벽이 손상되고 TEWL이 증가하며, 이에 따라 표피 수분함량이 유의적으로 감소하였다(Fig. 4). AP 콜라겐 효소분해 펩타이드 투여군에서는 피부 장벽 손상이 완화되어 UV군보다 TEWL이 15.9% 감소하였고 각

질 수분량이 13.6% 증가하였으며, 각각 통계적으로도 유의하였다.

피부 탄력 측정

콜라겐은 진피층의 가장 중요한 구조 단백질이다. 피부 콜라겐의 80~90%는 type I 콜라겐으로 UV에 의한 피부 자극 방어에 중요한 역할을 하며, 보습 유지, 주름 형성 방지, 탄력 유지에 필요하다(Shin 등, 2019). 피부 탄력의 결과는 다양한 지표로 평가할 수 있으며, 특히 주요 지표인 R2(Ua/Uf, gross elasticity), R5(Ur/Ue, net elasticity), R6(Uv/Ue, portion of the visco-elasticity), R7(Ur/Uf, portion of the elasticity)을 분석하였다(Fig. 5A). R2, R5, R7 지표는 1에 가까울수록, R6 지표는 0에 가까울수록 피부 탄력성

Fig. 4. Effect of APCP on UVB-induced decrease of skin hydration. TEWL (A) and subcutaneous hydration (B). Values are expressed as mean±SEM. Significant differences: ^{##} $P<0.01$ as compared with normal control group; ^{*} $P<0.05$ as compared with the UV-irradiated control.

Fig. 5. Effect of APCP on UVB-induced decrease of skin elasticity. Skin deformation curve obtained with a cutometer (A) and skin elasticity (B). Values are expressed as mean±SEM. Significant differences: [#] $P<0.05$ and ^{##} $P<0.01$ as compared with normal control group; ^{*} $P<0.05$ as compared with UV-irradiated control. R2 (Ua/Uf), gross elasticity; The higher the value, the more elastic the curve. R5 (Ur/Ue), net elasticity; The higher the value, the more elastic the skin. R6 (Uv/Ue), portion of the visco-elasticity on the elastic part of the curve; The smaller the value, the higher the distensibility of the elastine fibres. R7 (Ur/Uf), portion of the elasticity compared to the complete curve; The higher the value, the more elastic the skin.

이 높음을 의미한다(Akhtar 등, 2011). 본 연구에서는 UV 노출에 의해 피부 탄력 주요 지표(R2, R5, R6, R7) 모두 유의적으로 악화되었으며, AP 콜라겐 효소분해 펩타이드 투여군에서는 주요 탄력 지표 모든 항목 값이 유의적으로 회복됨을 확인하였다(Fig. 5B).

요 약

태양광선에 포함된 자외선에 의한 광노화는 내인성 노화에 비해 굵고 깊은 주름과 많은 잔주름이 발생하며, 피부에 불규칙적인 색소침착과 함께 피부가 매우 거칠고, 건조해지며 탄력성이 감소하여 피부가 처지는 특징이 있다. 특히 노화된 피부의 진피 내 교원질량의 감소는 섬유아세포에서 교원질 합성이 감소하거나 MMPs와 같은 효소에 의한 교원질 분해가 증가한 경우에 발생하며, 지속적인 자외선 노출이 주원인

으로 알려져 있다. 피부를 구성하는 주요 성분인 콜라겐 펩타이드의 보충은 피부 노화 증상을 완화하는 데 도움이 될 수 있다. 본 실험에서는 실크리듬(*N. virgatus*)의 비늘에서 유래한 AP 콜라겐 효소분해 펩타이드가 실제 *in vitro*와 *in vivo* 실험에서 UV 광노화에 의한 주름, 건조, 탄력 저하 현상을 완화하는지 확인하고자 하였다. 섬유아세포에 UVB 조사 후 감소한 type I 콜라겐과 TGFβ1의 유전자 발현이 AP 콜라겐 효소분해 펩타이드뿐 아니라 지표 성분인 GPH에 의해서도 회복되는 것을 확인하였다. 12주간 진행된 무모 생쥐를 이용한 *in vivo* 실험에서 AP 콜라겐 효소분해 펩타이드 섭취군은 UV 노출에 의한 주름 형성(총 주름의 면적, 수, 길이, 물리학적 형태인자), 진피 내 교원섬유/탄력섬유의 변성 및 감소, 피부 표피 및 진피의 두께 증가, 탄력 저하, 피부 장벽 손상에 따른 수분량 감소에 의한 건조 등의 피부 변화를 완화하는 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과를 통해

AP 콜라겐 효소분해 펩타이드의 섭취는 자외선에 의한 피부 손상으로부터 주름과 보습에 대한 피부 건강 개선 효능을 갖는 기능성식품 소재로 이용 가능성이 높음을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

- Ageyi D, Ongkudon CM, Wei CY, Chan AS, Danquah MK. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food Bioprod Process*. 2016. 98:244-256.
- Akhtar N, Zaman SU, Khan BA, Amir MN, Ebrahimzadeh MA. Calendula extract: effects on mechanical parameters of human skin. *Acta Pol Pharm*. 2011. 68:693-701.
- Amaro-Ortiz A, Yan B, D'Orazio JA. Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation. *Molecules*. 2014. 19:6202-6219.
- Azzouz D, Khan MA, Swezey N, Palaniyar N. Two-in-one: UV radiation simultaneously induces apoptosis and NETosis. *Cell Death Discovery*. 2018. 4:51. <http://doi.org/10.1038/s41420-018-0048-3>
- Bae IS, Shim MJ, Park MS, Kim YC. Morphological and histological changes in photoaged hairless mice induced by *Phellodendrin cortex* water extract application. *J Biomed Res*. 2012. 13:35-46.
- Bateman JF, Lamande SR, Ramshaw JAM. Collagen superfamily. In: Comper WD, editor. *Extracellular Matrix*. 2nd ed. Harwood Academic Publishers GmbH, Amsterdam, Netherlands. 1996. p 22-67.
- Blanken R, Vilsteren MJT, Tupker RA, Coenraads PJ. Effect of mineral oil and linoleic-acid-containing emulsions on the skin vapour loss of sodium-lauryl-sulphate-induced irritant skin reactions. *Contact Dermatitis*. 1989. 20:93-97.
- Bocheva G, Slominski RM, Slominski AT. Neuroendocrine aspects of skin aging. *Int J Mol Sci*. 2019. 20:2798. <http://doi.org/10.3390/ijms20112798>
- Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang S, Fisher GJ, et al. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochem Photobiol*. 2003. 78:43-48.
- Damiani E, Ullrich SE. Understanding the connection between platelet-activating factor, a UV-induced lipid mediator of inflammation, immune suppression and skin cancer. *Prog Lipid Res*. 2016. 63:14-27.
- Dhital B, Durlak P, Rathod P, Gul-E-Noor F, Wang Z, Sun C, et al. Ultraviolet radiation reduces desmosine cross-links in elastin. *Biochem Biophys Rep*. 2017. 10:172-177.
- Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*. 2002. 138:1462-1470.
- Haratake A, Uchida Y, Schmuth M, Tanno O, Yasuda R, Epstein JH, et al. UVB-induced alterations in permeability barrier function: roles for epidermal hyperproliferation and thymocyte-mediated response. *J Invest Dermatol*. 1997. 108:769-775.
- Hong H, Fan H, Chalamiah M, Wu J. Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): current progress, challenges, and future perspectives. *Food Chem*. 2019. 301:125222. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125222>
- Houser T, Zerweck C, Grove G, Wickett R. Shadow analysis via the C+K visioline: a technical note. *Skin Res Technol*. 2017. 23:447-451.
- Jariashvili K, Madhan B, Brodsky B, Kuchava A, Namicheishvili L, Metreveli N. UV damage of collagen: insights from model collagen peptides. *Biopolymers*. 2012. 97:189-198.
- Jiang SJ, Chu AW, Lu ZF, Pan MH, Che DF, Zhou XZ. Ultraviolet B-induced alterations of the skin barrier and epidermal calcium gradient. *Exp Dermatol*. 2007. 16:985-992.
- Kim JK, Lee JH, Yang MS, Seo DB, Lee SJ. Beneficial effect of collagen peptide supplement on anti-aging against photo-damage. *Korean J Food Sci Technol*. 2009. 41:441-445.
- Lee KK, Kim JH, Cho JJ, Choi JD. Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity, and their anti-inflammatory effects. *Int J Cosmet Sci*. 1999. 21:71-82.
- León-López A, Morales-Peñaloza A, Martínez-Juárez VM, Vargas-Torres A, Zeugolis DI, Aguirre-Álvarez G. Hydrolyzed collagen—Sources and applications. *Molecules*. 2019. 24:4031. <http://doi.org/10.3390/molecules24224031>
- Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004. 195:298-308.
- Niu T, Tian Y, Ren Q, Wei L, Li X, Cai Q. Red light interferes in UVA-induced photoaging of human skin fibroblast cells. *Photochem Photobiol*. 2014. 90:1349-1358.
- Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJS, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol*. 2006. 55:1-19.
- Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011. 3:a004978. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*. 2015. 5:545-589.
- Russo PAJ, Halliday GM. Inhibition of nitric oxide and reactive oxygen species production improves the ability of a sunscreen to protect from sunburn, immunosuppression and photocarcinogenesis. *Br J Dermatol*. 2006. 155:408-415.
- Scharffetter-Kochanek K, Brenneisen P, Wenk J, Herrmann G, Ma W, Kuhr L, et al. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol*. 2000. 35:307-316.
- Seite S, Zucchi H, Septier D, Igondjo-Tchen S, Senni K, Godeau G. Elastin changes during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2006. 20:980-987.
- Shin JW, Kwon SH, Choi JY, Na JI, Huh CH, Choi HR, et al. Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches. *Int J Mol Sci*. 2019. 20:2126. <http://doi.org/10.3390/ijms20092126>
- Song JH, Gae EY, Choi G, Hyun JW, Lee MY, Lee HW, et al. Protective effect of mango (*Mangifera indica* L.) against UVB-induced skin aging in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2013. 29:84-89.
- Sparr E, Millicamps D, Isoir M, Burnier V, Larsson A, Cabane B. Controlling the hydration of the skin through the application of occluding barrier creams. *J R Soc Interface*. 2012. 10:20120788. <http://doi.org/10.1098/rsif.2012.0788>
- Trevithick JR, Xiong H, Lee S, Shum DT, Sanford SE, Karlik SJ, et al. Topical tocopherol acetate reduces post-UVB, sunburn-associated erythema, edema, and skin sensitivity in hairless mice. *Arch Biochem Biophys*. 1992. 296:575-582.
- Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligel SEG, Kang S, Fisher GJ, et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol*. 2006. 168:1861-1868.
- Watanabe-Kamiyama M, Shimizu M, Kamiyama S, Taguchi Y, Sone H, Morimatsu F, et al. Absorption and effectiveness

of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *J Agric Food Chem.* 2010. 58:835-841.
Yamamoto S, Deguchi K, Onuma M, Numata N, Sakai Y.

Absorption and urinary excretion of peptides after collagen tripeptide ingestion in humans. *Biol Pharm Bull.* 2016. 39: 428-434.