

제주산 홍해삼에서 분리한 collagen의 human fibroblast cell growth에 미치는 영향

임 희 경, 조 문 제

제주대학교 의과대학 생화학교실

Abstract

Effect of collagen purified from red sea cucumber (*Stichopus japonicus*) in Jeju on growth of human fibroblast cells

Hee Kyung Lim, Moonjae Cho

Department of Biochemistry, School of Medicine and Institute of Medical Science, Jeju, Korea

Pepsin-solubilized collagen (PSC) from red sea cucumber (*Stichopus japonicus*) was purified to study the effects on human fibroblast cell line. PSC (1.92g) was purified out of 100g of sea cucumber body. SDS-PAGE analysis of purified PSC indicated that collagen from sea cucumber was $\alpha 1\beta$ type collagen type I. The PSC did not have cytotoxicity on various cell lines. The treatment of PSC to human fibroblast cells increase the mRNA of MMP-1 gene not that of MMP-2 compared to untreated control. However, in case of MMP-2, mRNA is decreased upon PSC treatment. Treatment of PSC suppressed the synthesis of collagen in vivo. Unlike to fibroblast, keratinocyte reduced the MMP-2 production upon PSC treatment. (J Med Life Sci 2010;7:22-25)

Key Words : red sea cucumber; *Stichopus japonicus*; collagen; MMP-1, MMP-2; Fibroblast

서 론

해삼 (Echinodermata: Holothuroidea)은 동양에서 예로부터 식용과 약용으로 널리 사용되어 오고 있으며 현재에는 그 수요가 증가추세이다. 이는 특히 여러 내상과 외상의 치료제로 사용되었고 또한 강장제로서 이용되기도 하였다. 최근 해삼으로부터 분리한 다당체는 항암능력이 있다고 알려졌으며¹⁾, frondanol A5는 화학요법 부작용 경감능력²⁾, 황을 함유하는 다당체는 세포의 증식에 영향을 준다고 알려지고 있다³⁾. 그러나 해삼 콜라겐의 fibroblast 세포의 성장에 미치는 영향에 관한 연구는 보고되지 않았다.

해삼의 약 70%는 콜라겐이라는 불용성 단백질로 이루어져 있다⁴⁾. 콜라겐은 동물 피부조직과 뼈의 연골조직을 이루는 대표적인 구조 단백질이다⁵⁾. 현재 많은 피부미용, 의료, 제약, 피부분야에 이르기 까지 다양한 상업적인 용도로 사용되고 있다⁶⁾. 특히 피부 재생 분야에서 콜라겐 용품의 용도가 급증하고 있다^{7, 8)}. 그러나 광우병에 의한 소유래 콜라겐에 대한 사용거부와 모슬람

국가의 종교적인 돼지 콜라겐의 사용거부는 콜라겐의 다른 출처를 요구하는 실정이다. 최근 거대 홍해삼 (*Parastichopus californicus*)으로부터 콜라겐을 분리 물리화학적 성질을 규명한 바 있다⁹⁾.

본 논문에서는 제주산 홍해삼으로부터 분리한 펩신 가용성 콜라겐 (pepsin-solubilized collagen, PSCs)의 인간 상피세포 (fibroblast cell)의 성장에 미치는 영향을 연구하였다.

실험 및 방법

1. 콜라겐의 분획

콜라겐 추출을 위하여 5배의 냉수로 홍해삼을 잘 씻은 후 disaggregating solution을 이용하여 균질화한 후 3일 동안 4℃에서 stirring 하면서 collagen fibril을 조성하였다. 3일 후 원심 분리 하여 비콜라겐성 단백질의 제거와 잔존 효소의 불활성화를 위하여 잔사에 대하여 20배에 해당하는 0.1 N NaOH를 가하여 2일 동안 교반한 다음 원심분리 (7500rpm, 1hr)하여 상층액을 제거하였다. 이어서 알칼리 처리 잔사에 대하여 산가용성 콜라겐의 제조를 위하여 10배 (w/v)에 해당하는 0.5 M acetic acid 만을, pepsin 가용성 콜라겐의 제조를 위하여 10배 (w/v)에 해당하는 0.5 M acetic acid 이외에 단백질의 1% (w/v)에 해당하는 pepsin (EC 3.4.23.1, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO)을

Address for correspondence : Moonjae Cho
Department of Biochemistry, School of Medicine and Institute of Medical Science, Cheju National University, 66 jeju daehakno, 690-756, Jeju, Korea
E-mail : moonjcho@cheju.ac.kr

가하여 3일 동안 교반한 후 원심분리 (7500rpm, 1hr)하여 콜라겐이 가용화되어 있는 산가용성 분획 및 pepsin 가용성 분획을 회수하였다. 이어서 산가용성 콜라겐 추출용액 및 pepsin 가용성 콜라겐 추출용액에 NaCl 용액 (최종 0.8 M)을 가하여 염석 및 원심분리 (7500rpm, 1hr)하여 정제를 시도하였다. 침전물은 다시 0.5 M acetic acid에 가용화 시킨 후 염을 제거하기 위하여 0.02 M Na_2HPO_4 buffer에 투석 및 원심분리(7500rpm, 1hr)하였다. 분리된 산가용성 콜라겐 및 pepsin 가용성 콜라겐은 동결건조하여 실험을 위한 산가용성 콜라겐 시료 및 pepsin 가용성 콜라겐 시료로 사용하였다.

2. 세포배양

Fibroblast (사람 섬유아세포)는 제주대학병원에서 얻은 7살 남아의 포경수술로 인해 적출된 피부조직을 이용하여 분리하였다. 적출한 조직을 collagenase를 이용하여 표피와 진피로 분리한 후, Trypsin을 이용하여 진피에서 섬유아세포를 분리하여 형태를 확인하였다. 확인된 섬유아세포는 DMEM배지에서 10% FBS (fetal bovine serum), 1% penicillin-streptomycin을 가하여 100 ϕ dish에서 배양기 내부 공기 5% CO_2 농도에서 37°C에서 배양하였다. HaCaT (Human keratinocyte), HeLa (Human cervical cancer) 세포의 경우 DMEM배지에서 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 가하여 배양하였고, MCF-7 (Human breast cancer) 세포의 경우 RPMI-1640 배지에서 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 가하여 배양하였다.

3. 세포독성 확인

96 well plate에 1×10^5 cells/ μl 의 세포를 180 μl 씩 seeding 하여 16시간 동안 배양한 후, 홍해삼 펩신 가용성 콜라겐 (PSC)을 농도별로 처리하여 2일간 배양하였다. MTT 용액 (5mg/ml)은 20 μl 씩 첨가하고 4시간 동안 배양한 후, 상등액을 제거하였고, DMSO를 150 μl 씩 첨가하여 570nm에서 Sunrise microplate reader (Tecan, Salzburg, Austria)로 흡광도를 측정하였다.

4. 홍해삼 콜라겐 생리활성

4.1 RNA 분리

세포 (1×10^6 cells/ml)를 60 ϕ dish에 분주하고 16시간 배양한 후, PSC를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 후에 TRIzol (Invitrogen)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 세포에 TRIzol을 첨가하여 균질화한 후, 클로로포름을 첨가하여 원심분리하였다. 상층액에 동량의 이소프로판올을 첨가하여 원심분리시켜 RNA를 침전시키고 75%의 DEPC 처리된 에탄올로 세척한 후, 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에 녹였다. 260nm의 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, A260/A280nm의 비율이 1.7~1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다. 모든 실험은 RNase-free한 조건하에서 이루어졌다.

4.2 RT-PCR

1 μg 의 total RNA를 oligo(dT)18 primer, dNTP (0.5 μM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 M-MuLV reverse transcriptase (2U)로 70°C 5min, 25°C 5min, 42°C 60min, 그리고 70°C에서 15min heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase Chain Reaction (PCR)은 합성된 cDNA로부터 MMP-1, MMP-2, Collagen type I, GAPDH를 증폭시키기 위하여 1 μl cDNA, 4 μM 의 5'과 3' primer, 10 \times buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μM dNTP, 25mM MgCl_2 , 1 unit Taq polymerase (Promega, USA)를 섞고 distilled water로 전체를 25 μl 로 맞추는 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR 수행에 사용한 primer sequences는 각각 MMP-1 forward primer, 5'-GATCATCGGGACAACCTCTCT-3', MMP-1 reverse primer, 5'-TCCGGGTAGAAGGGA TTT GTG-3', MMP-2 forward primer, 5'-TG GCAAGTACGG CTTCTG-3', MMP-2 reverse primer, 5'-TTCTTGTCGC GGT CGTAG-3', Type I collagen forward primer, 5'-CTGGCAAA GAAG GCGGCAAA-3', Type I collagen reverse primer, 5'-CT CACCACGATCAC CACTCT-3', GAPDH forward primer, 5'-G AAGGTGAAGGTCGGAG TC-3', GAPDH reverse primer, 5'-G AAGATGGT GATGGGATTC-3'였다. 이때 PCR 조건은 94°C/45초, 60°C/45초, 72°C/60초, 30 회이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다.

5. Cell proliferation assay

Cell proliferation 효과는 roche (11 647 229 001)사의 제품을 사용하여 측정하였다. 0.5×10^6 cell/ml의 fibroblast 세포를 96 well plate에 180 μl 씩 seeding하고 16시간 동안 배양한 후 PSC를 농도별로 처리하였다. 그리고 BrdU를 20 μl /well로 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 배지를 제거한 후 FixDenant 200 μl /well 넣고 30분간 상온에서 incubation하고 FixDenant solution 제거한 후 anti-BrdU POD solution 100 μl /well 넣고 상온에서 100분간 incubation하였다. 100분 후 antibody solution 제거한 후 washing solution 200 μl /well로 washing을 3회 하고, substrate solution 100 μl /well 처리한 후 발색반응을 한 후 stop solution (1M H_2SO_4)을 25 μl /well로 처리하고 450nm와 690nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 홍해삼 콜라겐 분리

산가용성 콜라겐과 산불용성 콜라겐, 펩신가용성 콜라겐과 펩신불용성 콜라겐을 분리하였을 때 산가용성 콜라겐 (0.24g)은 거의 분리가 되지 않았다. 펩신을 이용한 콜라겐 분리에서는 펩신가용성에 많은 양의 콜라겐 (1.92g)이 분리된 것을 확인 할 수 있어 해삼에서의 콜라겐 분리에는 펩신의 사용이 중요한 것으로 사료되어졌다 (Table 1).

Table 1. Pepsin effect in purification of collagen from sea cucumber.

	Collagen / Sea cucumber 100 g
Acid soluble	0.24 g
Acid insoluble	2.208 g
Pepsin soluble	1.92 g
Pepsin insoluble	0.2352 g

2. 콜라겐 패턴분석

홍해삼으로부터 분리된 콜라겐을 전기영동으로 패턴 분석한 결과 rat와 calf의 collagen type I과 비교하였을 때 거의 유사한 패턴을 보였으나, pepsin에 의해 말단잔기가 잘리면서 사이즈가 약간 작아진 것을 확인할 수 있었고, type I의 α , β , γ 밴드가 전반적으로 사이즈가 약간 작게 나타난 것을 확인할 수 있었다 (Fig.1). 이는 Liu 등이 발표한 결과와 유사하며 이들은 해삼의 PSC는 $\alpha1\beta$ 의 제1형 콜라겐 (collagen type I) 으로 정의하였다¹⁰.

3. 세포독성 확인

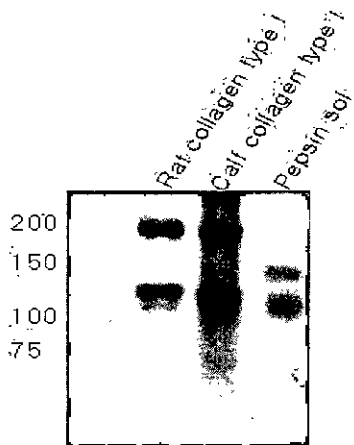


Figure 1. SDS-PAGE analysis of purified sea cucumber PSC. Purified PSC in indicated time points were analyzed by 6.5% SDS-PAGE and visualized by coomassie blue staining.

각 세포주에 콜라겐을 농도 별로 처리하여 48시간이 경과한 후 MTT 방법으로 세포의 독성을 측정한 결과, 정상세포주인 fibroblast (p3)과 Keratinocyte HaCaT, HeLa, MCF-7 세포 모두에 독성을 보이지 않았다(Fig.2).

4. 홍해삼 콜라겐 생리활성

배양접시에 섬유아세포를 배양한 후 지시된 농도의 PSC를 처리하여 세포이동에 관여하는 유전자의 발현을 RT-PCR로 관찰하였다. Figure 3에서 보는 바와 같이 MMP-1은 처리하지 않은 대조군에 비하여 처리한 군에서 발현이 증가 하였으나, MMP-2의 경우는 반대의 양상을 보였다. 콜라겐은 외부의 콜라

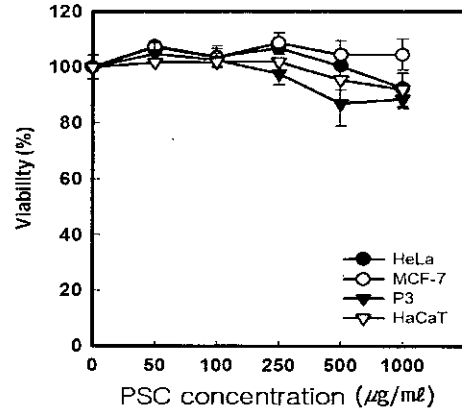


Figure-2. Cytotoxicity of PSC from sea cucumber. Cells were seeded in 96 well plate with concentration of 1×10^5 cell/ml and cultured 16 hr then treated with indicated concentration of PSC. After 48 hr incubation, check the viability with MTT assay.

겐 처리가 세포의 콜라겐 합성을 억제하는 것으로 나타났다. 섬유아세포와는 달리 각질세포 (keratinocyte)는 MMP-2는 PSC 처리에 따라 농도 의존적으로 줄어드는 반면 MMP-1의 발현에는 변화가 없었다. 각질세포가 피부 재생과정 중 이동에 관여하는 것으로 알려졌으며 MMP-1은 이동에 관여함으로 섬유아세포처럼 줄지 않는 것으로 사료되어진다.

홍해삼 PSC가 섬유아세포의 성장에 미치는 효과를 알아보기 위하여 BrdU를 이용하여 세포의 증식을 측정하였다. PSC를 일부는 세포 배양액에 처리하고 일부는 세포 배양 접시에 코팅을 하여 48 시간동안 배양하여 세포의 증식을 DNA에 끼어들어간 BrdU의 양을 측정하여 조사하였다. 그 결과 Figure 4에서 보는 바와 같이 낮은 농도를 배양액에 처리한 결과 성장이 증가하는 현상을 보이나 고농도에서는 영향을 주지 못하였다.

세포의 기질 (Extracellular matrix, ECM) 의 주요 구성성분인 콜라겐은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질이다. 콜라겐은 피부, 건 (tendon), 뼈 및 치아의 유기 물질의 대부분을 형성하는데, 특히 뼈와 피부 (진피)에 그 함유량이 높다. 콜라겐의 주된 기능으로는 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포의 접착의 지탱, 세포 분할과 분화 (유기체의 성장 혹은 상처 치유 시)의 유도등이 알려져 있다¹¹.

ECM 분자의 물질대사와 관련된 신호 경로들은 광 또는 자연 노화에 의해 변화된다. 이들 신호경로들은 cytokines 와 전사인자 (transcription factor)의 조절에 의해 ECM 구성 성분들과 연관된 다수의 유전자들의 발현에 영향을 준다. 특히, 자연 또는 광 노화된 피부의 세포간질 성분의 분해증가는 AP-1과 TGF- β 1의 생성의 변화에 기인 한다¹². TGF- β 1은 fibroblasts를 자극하여 다양한 세포간질 구성성분 (Collagen type I 그리고 III, fibronectin (FN), 그리고 proteoglycan)의 생산을 자극하고, 그들의 분해효소 생성을 억제하며, 이들 효소에 대한 억제제를 증가시키는 것으로 알려져 있다¹³.

본 실험의 결과는 미용 및 의료용 콜라겐의 원료로서 해삼 콜라겐의 사용이 가능할 것이라는 결론을 얻었다.

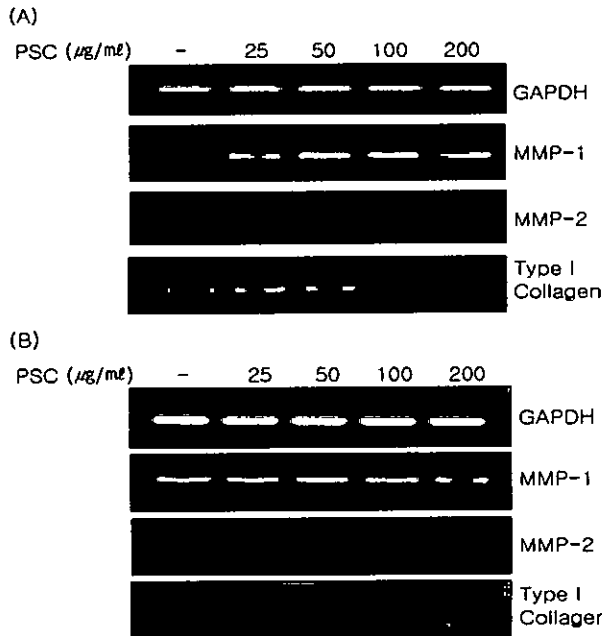


Figure 3. PSC regulate genes involved in migration of cells. Fibroblast (A) and HaCaT cells (B) were cultured on the plate coated with PSCs. The cDNA was purified and RT-PCR was performed by using specific primers as described in methods.

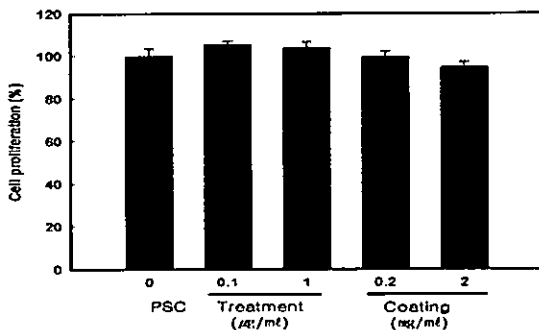


Figure 4. PSC induces proliferation of fibroblast cells. The proliferation was assayed with BrdU incorporation assay. Cells were cultured as described in methods and treated PSC with indicated concentration or seeded on pre-coated with PSC with indicated concentration solution. Incorporation of BrdU was measured after 48 hr.

감사의 글

이 논문은 지식경제부 지역연계기술 개발사업 “제주특산 홍해삼을 이용한 가공식품 개발 및 품질고도화 연구” (개발기간 : 2008. 12. 01~2010. 09. 30) 과제의 일환으로 이루어졌습니다.

참 고 문 헌

- 1) Lu Y, Zhang BY, Dong Q, Wang BL, Sun XB. The effects of *Stichopusjaponicus* acid mucopolysaccharide on the apoptosis of the human hepatocellular carcinomacell line HepG2. *Am J Med Sci*. 2010; 339:141-4
- 2) Janakiram NB, Mohammed A, Zhang Y, Choi CI, Woodward C, Collin P, Steele VE, Rao CV. Chemopreventive effects of Frondanol A5, a Cucumaria frondosa extract, against rat colon carcinogenesis and inhibition of human colon cancer cell growth. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3:82-91
- 3) Zhang Y, Song S, Song D, Liang H, Wang W, Ji A. Proliferative effects on neural stem/progenitor cells of a sulfated polysaccharide purified from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *J Biosci Bioeng*. 2010;109:67-72
- 4) Saito M, Kunisaki N, Urano N. Collagan as the major edible component of sea cucumber. *Food Chem Toxicol*. 2002;67:1319-29
- 5) Ogawa M, Portier RJ, Moody MW, Bell J, Schexnayder MA, Losso JN. Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chem*. 2004;88:495-01
- 6) Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chem*. 2005;89:363-72
- 7) Sorensen JC. Living skin equivalents and their application in wound healing. *Clin Podiatr Med Surg*. 1998;15:129-37
- 8) Machens HG, Berger AC, Mailaender P. Bioartificial skin. *Cells Tissues Organs*. 2000;167:88-94
- 9) Cui FX, Xue CH, Li ZJ, Zhang YQ, Dong P, Fu XY, Gao X. Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Food Chem*. 2007;100:1120-5
- 10) Liu Z, Oliveira AC, Su YC. Purification and characterization of pepsin-solubilized collagen from skin and connective tissue of giant Red SeaCucumber (*Parastichopus californicus*). *J Agric Food Chem*. 2010;58: 1270-1274
- 11) Perlsh JS, Lemlich G, Fleischmajer R. Identification of Collagen Fibrils in Scleroderma Skin. *J Invest Dermatol*. 1988;90:48-54
- 12) Rittié L, Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev*. 2002;1:705-20
- 13) Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:597-41