

3-Amino Propane Phosphoric Acid (3-APPA)

: 새로운 피부 노화 억제 물질

조윤기, 변영훈*, 선보경, 황재성, 이보섭*, 김종일

(피부과학연구소, 기반기술연구소*)

((주)태평양 기술 연구원)

3-Amino Propane Phosphoric Acid (3-APPA) : A Novel Anti-Aging Substance

Y.K. Cho, Y.H. Pyun*, B.K. Sun, J.S. Hwang, B.S. Lee*, J.I. Kim

(Institute of Skin Biology, Specialty Chemical Research Institute*)

(Pacific R & D Center)

요 약

새로운 노화방지 물질로 개발한 3-APPA가 노화에 의해 야기되는 여러 변화들, 특히 세포 증식, 유전자 수준 및 단백질 수준에서의 collagen의 생합성 변화, 면역조직화학염색을 이용한 collagen 생합성의 변화등을 세포배양 및 동물실험을 통하여 측정하였다. MTT assay를 이용한 인체 피부 섬유아세포의 증식 실험에서 3-APPA는 무처리군에 비교해서 최고 2배의 섬유아세포 증식 효능을 나타내었으며, ³[H]-proline incorporation 방법을 이용한 단층세포 배양 및 3차원 dermal equivalent 섬유아세포 배양에서 무처리군 및 vitamin C 처리군에 비해 최고 1.5배의 collagen 생합성 증가를 나타내었다. 그러나 type I alpha-procollagen mRNA expression에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. H&E 염색을 이용한 hairless mice의 피부에 대한 형태학적 변화 및 type I pN procollagen antibody를 이용한 면역조직화학염색에서, 3-APPA는 collagen 생합성을 증가시키는 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 3-APPA는 섬유아세포 배양 및 hairless mouse를 이용한 실험에서 피부 섬유아세포 증식을 촉진시키며 collagen 생합성을 증가시켜 피부 노화를 억제 할 수 있는 물질임을 밝혔다.

1. 서론

피부는 노화과정을 통해 여러 가지 기능적, 구조적 변화를 겪는다(1). 우선 피부의 구조적 변화는 피부의 구성 성분인 표피, 진피 및 피하조직의 두께가 얇아진다. 또한 피부의 탄력과 인장을 담당하는 진피 조직의 extracellular matrix(ECM) 성분이 변화를 하게 된다. ECM은 크게 두가지 성분으로 구성되어 있다. 하나는 ECM 전체의 약 2-4%를 차지하는 탄력섬유인 elastic fibers이며, 또 다른 하나는 ECM 전체의 약 70-80%를 차지하는 collagens로 구성되어 있다. 진피 ECM의 거의 대부분을 차지하고 있는 collagen은 노화과정을 겪으면서 생성이 저하된다고 보고되어 있다(1,2,3,6,7,10). 이런 collagen 생성 저하는 생합성 과정에서 transcription level과 post-translation level에 관여하는 많은 factor들에 의해 조절을 받아 변화를 일으키며 또한, 광노화의 원인인 UV에 의해 collagenase와 같은 matrix metalloproteases의 발현으로 인하여 collagen의 분해가 증가되어 collagen의 함량에 변화를 주는 것으로 알려지고 있다.

노화에 의해 야기되는 피부의 기능적 변화는 피부세포 특히 진피의 주된 구성세포인 섬유아세포의 증식이 감소된다. 섬유아세포 증식의 감소는 세포간 신진대사가 원활하지 못하거나 세포간 communication의 부재, 외부 유해 인자에 대한 방어능 감소 등에 의해 야기되어 결국 피부 노화를 촉진시키는 결과가 된다.

3-Amino Propane Phosphoric Acid(3-APPA)는 기존에 알려진 neurotransmitter로서 다양한 생리활성을 가진 γ -amino butyric acid(GABA)의 유사물질이다. GABA는 인체 섬유아세포의 증식을 증가시키며 또한 collagen의 생합성도 증가시킨다고 알려져 있다(12,13). 이에 저자들은 GABA의 유사물질로서 합성한 3-APPA가 노화에 의해 야기되는 여러 현상들, 특히 세포증식능의 감소 및 collagen 생합성의 저하등에 미치는 영향을 세포배양 및 동물실험을 통하여 측정하였다.

2. 재료 및 방법

1. 섬유아세포의 분리(9)

신생아 포피 절제술에서 얻어진 피부를 수술용 가위로 지방층을 제거한 다음 2-4mm x 2-4mm 크기의 피부절편을 만들었다. 여기에 type I collagenase(Gibco BRL, U.S.A.) 용액을 가하여 37°C에서 12시간 방치한 후 collagenase 용액을 완전히 제거하였다. 진피로부터 표피를 제거한 후, 진피를 수술용 칼로 잘게 썬 후 배지를 부어 섬유아세포를 배양하였다. 본 실험에서는 3-7번째 배양한 섬유아세포를 사용하였다.

2. 섬유아세포의 배양(9)

인체 섬유아세포의 기본 배양액은 glutamine(0.48 mg/ml), penicillin(100 IU/ml), streptomycin (50 μ g/ml)과 56°C에서 30분간 보체를 불활성시킨 FBS(fetal bovine serum, Gibco BRL, U.S.A)가 10% 비율로 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's media(DMEM)(Gibco BRL, U.S.A)를 사용하였다.

3. 3차원 dermal equivalent에서 인체 섬유아세포 배양 방법

열배로 농축된 DMEM 배지와 Ham's nutrient mixture F12 배지를 3:1로 혼합한 Type I collagen gel (新田 생물화학 연구소, 大阪, Japan)을 reconstitution buffer와 함께 섞어서 collagen 기질을 만든 다음 신생아 포피의 진피로부터 배양한 섬유아세포를 1×10^5 cell/well의 수만큼 collagen 기질과 혼합하여 24-well multi-chamber plate(Falcon 3047, U.S.A.)에 0.3 ml씩 넣고 배양기 안에 1시간 두었다가 충분히 gel형성이 되었을 때 DMEM 배양액을 각 well당 0.5 ml씩 추가하여 3차원적인 dermal equivalent를 제조하였다.

4. 섬유아세포 증식 효능 측정 방법(11)

96-well multi-chamber plate에 각 well당 5×10^3 개의 섬유아세포를 배양하였다. 3-APPA를 1% 농도에서 1/10씩 순차적으로 희석시킨 다음 3일간 배양하였다. 3일 후 배지에 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, U.S.A)을 2 mg/ml 농도로 각 well에 처리하여 4시간 incubation한 후 생성된 formazan을 DMSO를 사용하여 녹였다. 녹은 formazan은 microplate reader(EL310, BIO-TEK)을 이용하여 570 nm에서 측정하였다.

5. 섬유아세포의 collagen 합성 정도의 측정(5,8,10)

가. 단층 배양된 상태에서 교원질 합성 정도 측정

24-well multi-chamber에 인체 섬유아세포가 70-80% confluent해질 때까지 배양한 후 3-APPA를 1×10^{-3} %, 1×10^{-4} %, 1×10^{-5} % 농도로 처리하였다. 배양 3일째 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 각 well당 0.5 ml씩 갈아준 후 3-APPA와 함께 L[2,3,4,5-³H]-proline 10 μ Ci를 첨가하였다. 24시간 후 각 well에 들어있는 배지와 cell들을 긁어 모아 5%

TCA(Sigma, U.S.A) solution을 넣어 washing후 2개의 microtube에 분주하여 1개의 microtube에는 type I collagenase(1unit/1 μ l)를 넣고 37°C에서 90분간 배양하는 동안 다른 하나의 microtube는 4°C에 보관하였다. 그 후 모든 microtube에 50% TCA를 0.05 ml씩 첨가하고 4°C에서 20분간 방치한 후 각각 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 각각의 supernatant와 pellet을 scintillation tube에 넣고 4ml의 scintillation cocktail을 가하여 혼합한 후 liquid scintillation counter(LKB WALLAC RACKBETA)로 dpm(decay per minute) 값을 얻어 Whiteside 등이 제안 한 다음의 공식에 따라서 대조군과 실험군의 relative collagen biosynthesis (RCB)를 구하였다.

$$RCB = \frac{\text{collagen dpm}}{(\text{total protein dpm} - \text{collagen dpm}) \times 5.4 + \text{collagen dpm}} \times 100$$

나. 3차원 dermal equivalent에서 인체 섬유아세포의 collagen 합성 정도 측정

위에서 기술한 방법과 같이 3차원 dermal equivalent를 24-well multi-chamber plate에 만든 후 3-APPA를 1x10⁻¹%, 1x10⁻²%, 1x10⁻³% 농도로 2일간 처리하였다. 배양 3일째 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 각 well당 0.5ml씩 갈아준 후 L[2,3,4,5-³H]-proline 10 μ Ci를 추가하였다. 24시간 후 조직 균질기(tissue homogenizer)로 교원질 격자를 균질화한 후 단층배양 상태에서 시행하였던 과정과 동일하게 처리하여 상기 공식에 따라 RCB값을 구하여 3-APPA가 3차원 dermal equivalent에서 교원질 합성에 미치는 영향을 단층 배양 결과와 비교하였다.

6. RNA 분리 및 정량(1,6)

75-T plate(Falcon 3080, U.S.A.)에 섬유아세포가 약 70 - 80% confluent할 때 까지 배양하였다. 그 후 3-APPA를 1x10⁻⁴% 농도로 처리하여 2일간 배양한 후 Chomczynski와 Sacchi의 modified acid guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform 추출법을 통해 총 RNA를 분리하였다. 즉 TRIzol(BRL)용액 1ml로 세포를 처리한 뒤 200 μ l의 chloroform을 첨가하여 4°C에서 15분간 12,000 x g 로 원심분리하여 상층액을 취하였다. 여기에 동량의 isopropyl alcohol을 첨가한 뒤 10분간 상온에서 방치하여 덩어리 RNA를 침전 시키고 이를 미세 원심 분리기로 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 총 RNA를 얻었다. 이 RNA pellet을 0.1% diethylpyrocarbonate(DEPC)로 처리된 증류수로 희석한 75% 냉에탄올로 세척 후 12,000 x g에서 15분간 원심분리하여 재침전시켰다. 상층액을 진공에서 완전 건조시킨 후 DEPC 처리된 증류수로 녹여 UV spectrometer (CECIL 5000 ELEGANT TECHNOLOGY)를 사용, 260 및 280nm에서의 흡광도를 이용하여 총 RNA를 정량하였다.

7. Dot-blot analysis를 이용한 mRNA level에서의 collagen 합성 정도 측정(1,6)

RNA용액을 완충액으로 희석하여 65°C 에서 15분간 가열한 후 96 well vacuum manifold를 이용하여 nylon membrane에 흡착시켰다. 이 때 흡착시킨 RNA의 양은 동일 RNA를 4 μ g, 2 μ g 그리고 1 μ g으로 순차적으로 희석하여 실시하였다. 흡착시킨 membrane은 실온에서 충분히 말린 다음 UV-crosslinking 시킨 후 비닐백에 넣어 봉하여 보관하거나 혹은 hybridization에 사용하였다. 본 실험에 사용된 probe DNA는 human pro-alpha 1(I) collagen cDNA(ATCC, U.S.A), GAPDH(ATCC, U.S.A)를 사용하였다. cDNA는 digoxigenin(DIG)-modified dUTP로 random priming하여 labeling하였다. 미리 42°C로 가온된 hybridization 용액 (50% formamide, 2X SSC, 0.05M sodium phosphate buffer, 1X Denhardt solution, 0.01% salmon sperm DNA)을 nylon membrane이 들어있는 비닐백에 넣고 비닐백속에 공기가 남아있지 않게 봉한 다음 42°C에서 약 1시간 동안 prehybridization을 하였다. 이후 상단을 자르고 미리 100°C에서 10분간 가열하고 냉각시킨 DIG-labeled cDNA 용액을 부가한 다음 다시 공기를 제거하고 상단을 봉하여 hybridization을 하였다. 42°C에서 24시간 동안 hybridization을 한 후 membrane을 꺼내어 25°C의 2X SSC, 0.1% SDS 용액과 65°C의 0.5X SSC, 0.1% SDS 용액의 순서로 washing한 후 alkaline phosphate로 couple된 anti-dig antibody를 붙이고 chemiluminescent CSPD^R substrate로 발색한 후 wrap으로 싸서 intensifying screen이 있는 film cassette에 넣고 암실에서 X-ray film을 넣어 감광시켰다.

8. 형태학적 관찰 및 면역조직화학염색을 이용한 collagen 합성 정도 측정(2,7)

8주된 암컷 hairless mice(Skh/hrl)의 등에 10% 3-APPA를 3주간 처리하였다. 3주 후 hairless mice의 배부를 생검하여 10% 중성 formalin용액에 고정하고 파라핀에 포매하여 4-6 μ m의 절편을 만들어 H&E 염색을 실시하였다. 또한 type I pN procollagen (SP1.D8, Hybridoma Bank; ATCC) antibody와 ABC (avidin-biotin peroxidase complex)staining kit를 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 무처치군 hairless mice에서 생검한 조직을 동시에 염색하여 3-APPA 처치한 hairless mice의 결과와 비교하였다.

9. 통계학적 유의성 검정

통계학적 유의성의 검정은 ANOVA를 이용하였으며, $p < 0.05$ 를 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

생물체는 나이를 먹으면서 늙어간다. 노화의 과정은 우리 몸의 눈, 뇌, 심장 뿐만 아니라 피부에서도 일어나는데 노화된 피부는 거칠고 건조하며 주름이 지고 탄력이 감소한다. 노화의 기전에는 두가지의 주된 이론이 있다. 그 하나는 생명체의 노화과정은 태어날 때 부터 이미 유전자 상에 정보화 되어 있고, 이 정보에 따라 생명체 노화가 진행된다는 이론(programmatic theory)이고 다른 하나는 생물이 살아있는 동안 일어나는 소모의 결과이며 주위 환경에 의해 손상이 genome, 세포, 조직에 누적되어 생명체의 전체 기능이 손상되는 이론(stochastic theory)이다. 이 두가지 가설을 chronological, endogenous, environmental factors 그리고 mechanical factors에 의하여 DNA program theory, Error catastrophe theory, Immunologic theory, Free radical theory 등 여러 가지 학설로 구분하고 있다.

피부 노화(Aging of Skin)는 노화에 미치는 요인에 따라 크게 두가지로 구분 할 수 있다. 첫째, 진성노화(True Aging, Intrinsic Aging)로 피부의 구조와 생리적 기능이 나이를 먹으면서 계속적인 감퇴를 일으키는 것이다. 둘째, 외적 노화(Extrinsic Aging)로 태양광선등 누적된 외부환경에 대한 노출에 기인하는 것이며 특히 광에 의한 피부 노화를 광노화(photoaging)라 한다. 여러 환경 요인에 의해 피부 노화의 위협요인이 증가되는 것과 더불어 고령층의 적합한 피부관리를 위하여는 피부 노화의 원인이 되는 내적 및 외적 요소를 이해하는 것이 필수적이다.

피부는 내적 및 외적 요소에 의해 여러 가지 기능적, 구조적 변화를 겪으면서 노화가 진행된다. 우선 나타나는 두드러진 변화로써 표피, 진피 및 피하지방의 두께가 얇아지며 변이된 elastin이 증가하여 피부 탄력은 감소하게 되고 피부 단백질의 cross-linking이 증가하여 피부는 거칠어진다. 또한 UV에 의한 collagenase, gelatinase 등 matrix metalloproteases의 증가는 collagen을 과다분열 시키고 UV에 영향을 받은 섬유아세포는 collagen 생합성 능력이 저하되어 주름등 노화 현상을 나타낸다. 이밖에도 세포내 신진대사가 원활하지 못하여 여러 소기관들이 제 기능을 수행하지 못하게 되고 세포들간의 communication의 부재로 외부 유해 인자에 대한 방어기능이 감소하여 신체 저항력이 낮아지게 되며 또한 세포들의 증식기능도 낮아지게 된다. 그러므로 내적, 외적 요소로부터 노화를 막아주기 위하여 피부세포의 증식을 촉진시켜 세포간 신진대사를 원활하게 하고 면역기능을 증가시켜주는 물질에 대한 연구와 collagen 생합성을 증가시켜 주름생성을 막아주고 피부탄력을 유지시켜주는 물질에 대한 연구가 폭넓게 진행되고 있다.

3-Amino Propane Phosphoric Acid(3-APPA)는 기존에 알려진 neurotransmitter로서 anti-convulsion 기능 및 anti-cytotoxicagonist 기능등 여러 생리적 기능을 가진 γ -aminobutyric acid(GABA)(13)의 유사물질로서 저자등이 피부 노화와 관련된 생리활성을 가진 물질을 검색하면서 합성한 물질이다. GABA가 가지는 생리활성 기능 중 인체 섬유아세포의 증식 및 교원지질 섬유 생합성을 증가시킨다는 A. Scutt 및 W. Harvey 등의 보고(12)에 의해 저자등이 합성한

3-APPA가 피부 노화와 관련된 여러 가지 변화, 특히 섬유아세포의 세포 증식, 유전자와 단백질 수준에서의 collagen 생합성의 변화등 세포 배양을 이용한 3-APPA의 피부 노화억제 효과 측정과 hairless mice를 이용한 면역조직화학염색 방법으로 collagen 생합성의 변화를 측정하여 3-APPA가 가지는 피부 노화 억제 효과를 측정하였다.

노화에 의해 야기되는 피부의 기능적 변화중 피부세포 특히, 진피의 주된 구성세포인 섬유아세포의 증식이 감소되어 결국 세포들의 노화가 촉진된다. 우선 3-APPA의 인체 섬유아세포 증식효과를 측정하였다(Figure 1). 3-APPA를 1/10씩 순차적으로 희석, 처리하여 무처리군과 vitamin C를 처리한 군과 비교하였다. Vitamin C는 생체 여러 효소들, 특히 collagen 생합성에 관여하는 proline hydroxylase의 co-factor로서 세포증식 및 collagen 생합성 실험에서 positive control로 많이 이용되는 생리활성 물질이다(14). 3-APPA는 $1 \times 10^{-3}\%$, $1 \times 10^{-4}\%$, $1 \times 10^{-5}\%$ 농도에서 무처리군에 비교해서 각각 1.8배, 2.1배, 1.3배의 세포 증식 효능을 보였고, 또한 동일농도에서 vitamin C 처리군과 비교시 최고 1.5배의 높은 세포 증식 효능을 보였다.

진피 ECM의 거의 대부분을 차지하고 있는 collagen은 노화과정을 겪으면서 생성이 저하된다. 이는 collagen 생합성 과정중 유전자 수준 및 단백질 수준에서의 변화와 증가된 collagenase의 발현으로 인한 collagen의 분해 증가로 주름의 생성등 피부 노화를 촉진시킨다. 이에 저자들은 단층 세포배양 및 3차원 dermal equivalent 배양에서 3-APPA가 collagen 생합성에 미치는 영향을 측정하였다. 3차원 dermal equivalent 배양은 실지 사람의 피부와 유사한 피부상태를 *in vitro* system으로 만든것이다. 단층세포배양에서 간과될 수 있는 3-APPA의 collagen 생합성 효능을 3차원 dermal equivalent 배양에서 확인할 목적과 동물실험모델에서 대두되는 사람피부와 차이점(16,17)때문에 나타나는 효능의 차이를 확인할 목적으로 3차원 dermal equivalent 배양을 실시하였다. collagen 생합성 효능을 측정할 목적에서 실시하였다. 먼저 단층세포배양에서 3-APPA를 $1 \times 10^{-3}\%$, $1 \times 10^{-4}\%$, $1 \times 10^{-5}\%$ 농도로 처리하였다(Figure 2). $1 \times 10^{-4}\%$ 농도에서 control과 vitamin C와 비교시 최고 1.5배의 높은 collagen 생합성 증가를 나타내었고 $1 \times 10^{-5}\%$ 농도에서 무처리군과 비교시 약 1.3배의 collagen 생합성 증가가 나타났다. 3-APPA를 $1 \times 10^{-1}\%$, $1 \times 10^{-2}\%$, $1 \times 10^{-3}\%$ 농도로 처리하여 3차원 dermal equivalent 배양에서 collagen 생합성에 미치는 영향을 측정하였다(Figure 3). $1 \times 10^{-1}\%$ 농도에서 무처리군 및 vitamin C 처리한 군과 비교시 최고 1.2배의 collagen 생합성 증가효능을 나타내었다.

3-APPA가 type I alpha-procollagen mRNA 발현에 미치는 영향을 측정하였다(Figure 4). 3-APPA를 $1 \times 10^{-4}\%$ 농도로 75T plate에 처리하였다. 실험결과 3-APPA를 처리한 군은 무처리군과 비교시 3-APPA는 유전자 수준의 type I alpha-procollagen mRNA 발현에는 변화가 없었다.

일반적으로 많은 노화억제 물질들이 *in vitro* 조건에서는 노화억제 효능을 보이지만 *in vivo* 조건에서는 효능을 보이지 않는 경우가 많다. 반대로 *in vitro* 조건에서는 노화억제 효능을 나타내지 않지만 *in vivo* 조건에서는 효능을 보이는 경우도 있다. Retinoic acid가 대표적인 경우이다. *in vitro* 조건에서는 collagen 생합성을 저해하지만 *in vivo* 조건에서는 collagen 생합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(14). 이는 *in vitro* 조건에 비해서 *in vivo* 조건은 다른 많은 주위 인자들,

특히 cytokine에 의해 collagen 생합성이 감소되거나 혹은 증가되기 때문이다. 이에 저자들은 *in vitro* 조건에 이어 *in vivo* 조건에서의 3-APPA가 collagen 생합성에 미치는 영향을 측정하였다. 우선 3-APPA가 hairless mice의 형태학적 변화에 미치는 영향을 측정하였다(Figure 5). 10% APPA를 처리한 hairless mice와 아무것도 처리하지 않은 hairless mice의 형태학적인 변화를 H&E 염색을 이용하여 관찰하였다. 표피의 두께 변화를 관찰한 결과 무처리군과 별다른 차이를 나타내지 않음을 확인 하였다. 다음으로 3-APPA가 type 1 pN procollagen 생합성에 미치는 영향을 측정하였다(Figure 6). 10% APPA를 처리한 hairless mice와 아무것도 처리하지 않은 hairless mice의 type I pN procollagen 생합성에 미치는 영향을 면역조직화학염색을 이용하여 측정하였다. 면역조직화학염색 결과 3-APPA를 처리한 mice는 처리하지 않은 mice와 비교해서 type I pN procollagen이 많이 염색된 것을 보았다. 이는 3-APPA에 의해 collagen 생합성이 증가되었음을 보여준다. 결국 3-APPA는 *in vitro* 및 *in vivo* 조건에서 모두 collagen 생합성을 증가시키는 것으로 나타났다.

3-APPA가 가지는 세포증식 촉진 및 collagen 생합성 증가 기작은 collagen 생합성을 증가시키는 것으로 알려진 retinoic acid의 작용과는 다른 것으로 사료된다. retinoic acid의 경우 최근 보고에 의하면 UV에 의한 collagenase 발현 증가를 저하시켜 collagen의 분해를 막아주어 상대적으로 collagen 생합성을 증가시켜준다(15). 또 retinoic acid는 표피의 keratinocyte에 작용하여 keratinocyte에서 발현된 cytokine류들이 collagen 생합성을 증가시켜 주는 것으로 알려져 있으며 조직학적으로 표피세포의 증식을 유도하여 표피두께를 증가시키는 것으로 알려져 있다(Figure 5). 3-APPA는 조직학적 관찰에서 hairless mice의 표피세포 증식에 영향을 미치지 않으며 표피두께에도 변화를 주지 않는 것으로 나타났다(Figure 5). 이는 3-APPA가 표피의 keratinocyte에는 영향을 미치지 않고 직접 진피세포에 영향을 주어 진피의 섬유아세포 증식을 유도하며 collagen 생합성을 증가시키거나 혹은 표피세포의 증식과는 무관한 표피 및 진피의 cytokine의 발현에 영향을 미쳐 발현된 cytokine이 진피의 collagen 생합성을 증가시키는 것으로 사료된다.

그러므로 저자 등의 3-APPA에 관한 연구는 3-APPA에 의해 유도되는 표피 및 진피의 cytokine류가 collagen 생합성에 미치는 영향에 관하여 계속 연구를 진행해 나갈 것이다. 또한 3-APPA가 진피의 섬유아세포에 직접 영향을 주어 collagen의 transcription 및 post-translation 과정에 관여하는 효소들의 활성화에 미치는 영향 등도 계속 연구해 나갈 것이다.

4. 결론

새로운 노화방지 물질로 개발한 3-APPA가 노화에 의해 야기되는 여러 변화들, 특히 세포 증식의 변화, 유전자 수준에서의 collagen의 생합성 변화, 단백질 수준에서의 collagen의 생합성 변

화, hairless mice에서 조직면역화학염색을 이용한 collagen 생합성의 변화등 세포배양 및 동물실험을 통하여 3-APPA가 collagen 생합성에 미치는 영향을 측정하였으며 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT assay를 이용한 인체 피부 섬유아세포의 증식 실험에서 3-APPA는 무처리군에 비교해서 최고 2배의 섬유아세포 증식 효능을 나타내었다.
2. ^3H -proline incorporation 방법을 이용한 단층세포 배양에서 collagen 생합성능을 측정된 결과 3-APPA는 무처리군 및 vitamin C 처리한 군에 비교해서 최고 1.5배의 collagen 생합성 증가를 나타내었다.
3. ^3H -proline incorporation 방법을 이용한 3차원 dermal equivalent 섬유아세포 배양에서 collagen 생합성능을 측정된 결과 3-APPA는 무처리군 및 vitamin C 처리한 군에 비교해서 최고 1.2배의 collagen 생합성 증가를 나타내었다.
4. Dot-blot 방법을 이용한 type I alpha-procollagen mRNA level 분석에서 3-APPA는 type I alpha-procollagen mRNA expression에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.
5. H&E 염색을 이용한 hairless mice의 형태학적 변화를 분석한 결과 3-APPA는 무처리군과 비교시 표피의 두께변화에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.
6. Type I pN procollagen antibody를 이용한 면역조직화학염색 방법에서 3-APPA는 무처리군에 비교하여 collagen 생합성을 증가시키는 것으로 나타났다.

이상의 결과에서 저자들은 3-APPA가 피부 섬유아세포의 증식능을 촉진시키며 또한 collagen 생합성을 증가시켜 피부 노화에 의한 생리적 활성 저하를 억제시킬 수 있는 피부 노화 억제 물질임을 밝혔다.

Abstract

The novel synthetic procedure of 3-Amino Propane Phosphoric Acid (3-APPA) was developed, and its applicability to the skin as a cosmetic retinoic acidw material was

examined in terms of its efficacy. We have measured the effect of 3-APPA on cell proliferetinoic acidtion and collagen synthesis in normal human dermal fibroblasts culture. And we have performed the immunohistological study by using the type I pN collagen antibody (SP1.D8) on the skin of hairless mice. The addition of 3-APPA in culture system containing DMEM supplemented with 10% FBS showed about 2-fold increasing of cell proliferetinoic acidtion, as measured by MTT assay. And 3-APPA increased about 1.5 folding collagen synthesis in monolayer and three-dimensional (collagen gel) cell culture, as measured by 3[H]-proline incorporetinoic acidtion method. But 3-APPA has no effect on collagen mRNA expression. For the *in vivo* analysis, hairless mice were treated with 10% 3-APPA daily 3 weeks. The result showed that collagen synthesis was increased, as measured by immunohistological observation and didn't show skin irritation by 3-APPA

참고문헌

1. P. Autio, J. Risteli, K. Haukipuro, L. Risteli, A. Oikarinen "Collagen Synthesis in Human Skin in vivo: Modulation by aging, UV B Irradiation and Localization" *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 10:212-216, 1994
2. Lorretinoic acidine H, Kligman, Michele Gebre, Robert Alper, Nicholas A. Keflides "Collagen Metabolism in UV Irradiated Hairless Mouse Skin and Its Correlation to Histochemical Observations" *J Invest Dermatol* 93:210-214, 1989
3. Jeffrey C. Geesin, Douglas Darr, Russel Kaufman, Sheldon R. Pinnell "Ascorbic Acid Specfically Increases Type I And Type III Procollagen Messenger RNA Levels in Human Skin Fibroblasts." *J Invest Dermatol* 90:420-424, 1988
4. 조광현, 이동윤, 은희철, 박경찬, 윤재일 "실험실에서 제조된 인체 표피에서 표피 단백질항원 및 기저막 구성 성분의 발현" *대한피부과학회지* 34(2):264-272, 1996
5. R. F. Diegelmann, G. R. Bryson, L. C. Flood, M. F. Graham "A Microassay to Quantitate Collagen Synthesis by Cells in Culture" *Analytical Biochemistry* 186:296-300, 1990
6. H. S. Talwar, C. E. M. Griffiths, G. J. Fisher, T. A. Hamilton, J. J. Voohees "Reduced Type I and Type III Procollagens in Photodamaged Adult Human Skin" *J Invest Dermatol* 105:285-290, 1995
7. C. Griffiths, T. Hamilton, J. J. Voohees "Restoration of Collagen Formation in Photo-Damaged Human Skin by tretinoin(Retinoic Acid)" *N Engl J Med* 329:530-535, 1993

8. 김인산, 조준선 “섬유아세포의 증식과 collagen 합성에 대한 Prostaglandin E₂의 조절작용” *한국생화학회지* 23(1):40-52, 1990
9. 서기범, 윤소영, 이우재, 이증훈, 박장규 “헬륨-네온 레이저 조사가 단층과 교원질 격자에 배양한 인체 섬유아세포의 증식과 교원질 합성에 미치는 영향” *대한피부과학회지* 34(2):279-288, 1996
10. K. J. Johnston, A. I. Oikarinen, N. J. Lowe, J. G. Clark, J. Uitto “UV Radiation-Induced Connective Tissue Changes In The Skin Of Hairless Mice” *J Invest Dermatol* 82:587-590, 1984.
11. Tim Mosmann “Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays” *J Immunological Methods* 65:55-63, 1983.
12. A. Scutt, S. Meghji, W. Harvey “Stimulation of Human Fibroblast Collagen Synthesis *in vitro* By γ -Aminobutyric acid” *Biochemical Pharmacology* 36(8):1333-1335, 1987.
13. Fariello R. G. et al, *Neurology* 32:241-245, 1982.
14. J. Uitto, D. R. Olsen, M. J. Fazio “Extracellular Matrix of the Skin:50 Years of Progress” *J Invest Dermatol* 92(4):61S-77S, 1989.
15. G. J. Fisher, S. C. Datta, H. S. Talwar, S. W. Kang, J. J. Voorhees “Molecular Basis of Sun-Induced Premature Skin Aging and Retinoid Antagonism” *Nature* 379:335-339,1996
16. S. M. Edwards, T. A. Donnelly, R. M. Sayre, L. A. Rheins “Quantitative *in vitro* Assessment of Phototoxicity Using A Human Skin Model, Skin^{2TM}” *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 10:111-117, 1994
17. Frank Lobasso R, Thomas J. Stephens “Use of A Reconstituted Human Skin Model for Predicting The Inflammation Potential of Wound Care Products: *J. Toxicol. -Cut. & Ocular Toxicol.*, 12(4):363-370, 1993

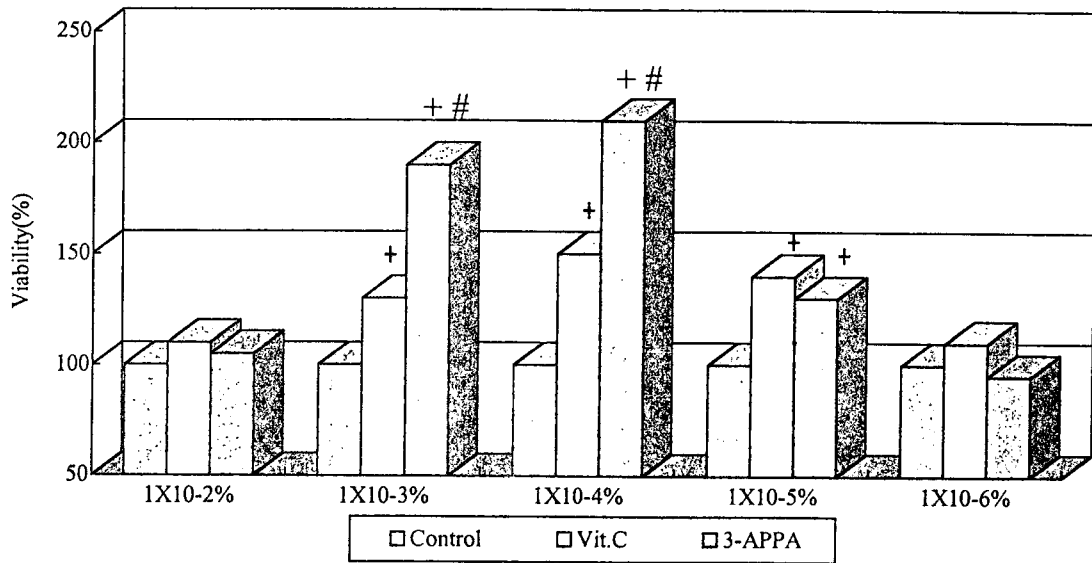


Fig 1. Effect of 3-APPA on cell proliferation.
 3-APPA increased cell proliferation 2-fold compared with control.
 (n=8, +p<0.05 vs control, #p<0.05 vs Vit.C)

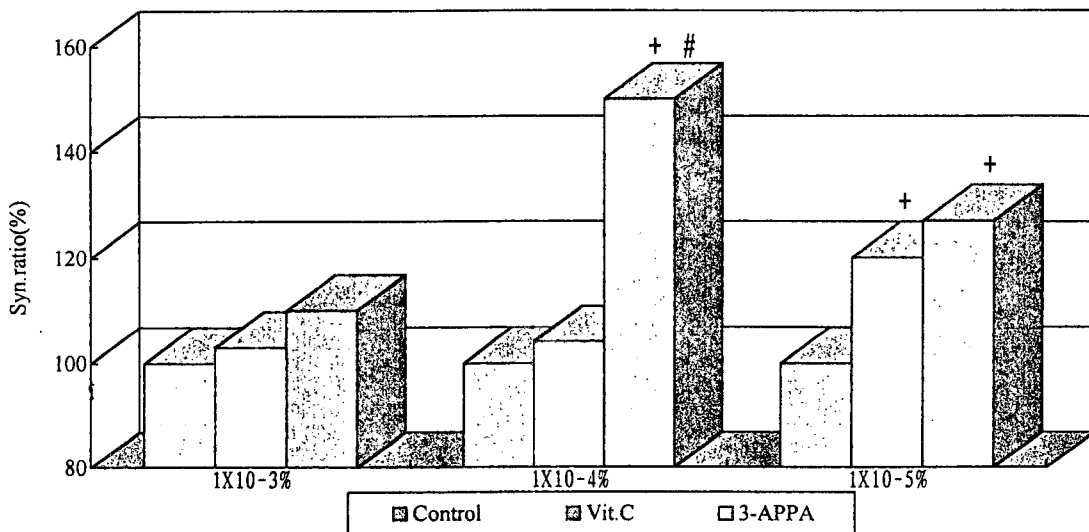


Fig 2. Effect of 3-APPA on collagen synthesis in monolayer culture. 3-APPA increased collagen synthesis 1.5 fold compared with control and Vit. C. (n=9, +p<0.05 vs control, #p<0.05 vs Vit.C)

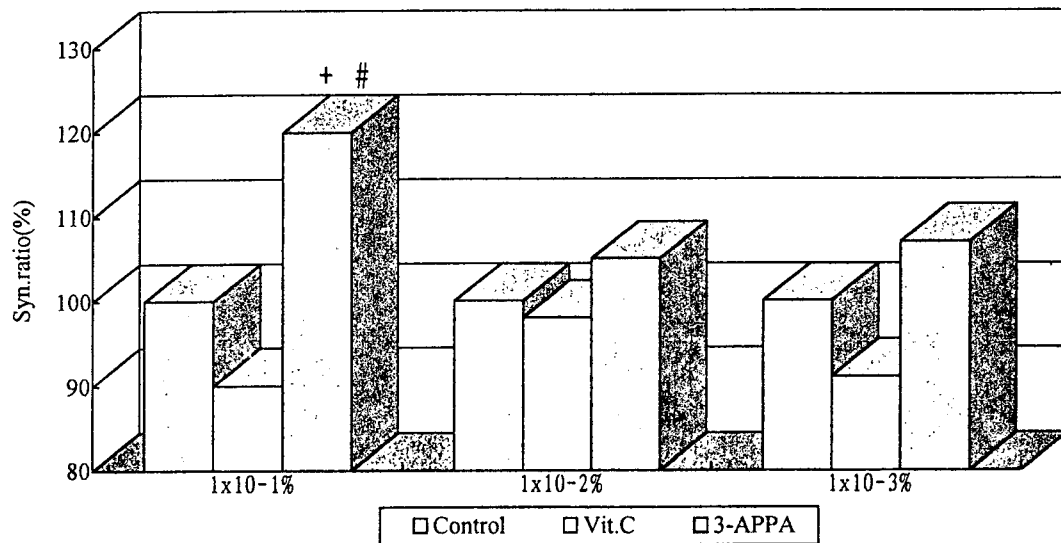


Fig 3. Effect of 3-APPA on collagen synthesis in 3-D culture.
 3-APPA increased collagen synthesis 1.2 fold compared with control and Vit.C (n=9, +p<0.05 vs control, #p<0.05 vs Vit.C)

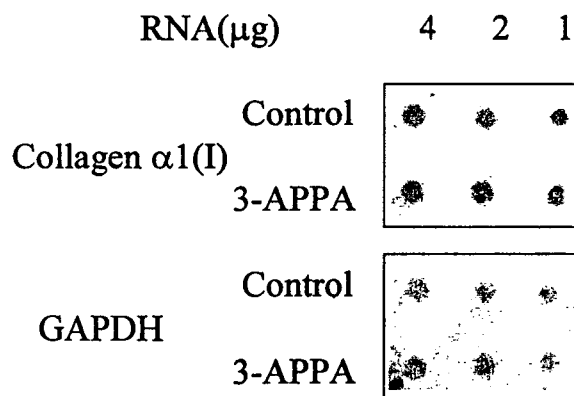


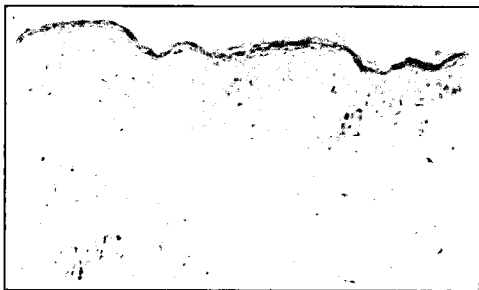
Fig 4. Effect of 3-APPA on type I procollagen mRNA expression.
 3-APPA had no effect on type I procollagen mRNA expression compared with control.



3-APPA



Vehicle



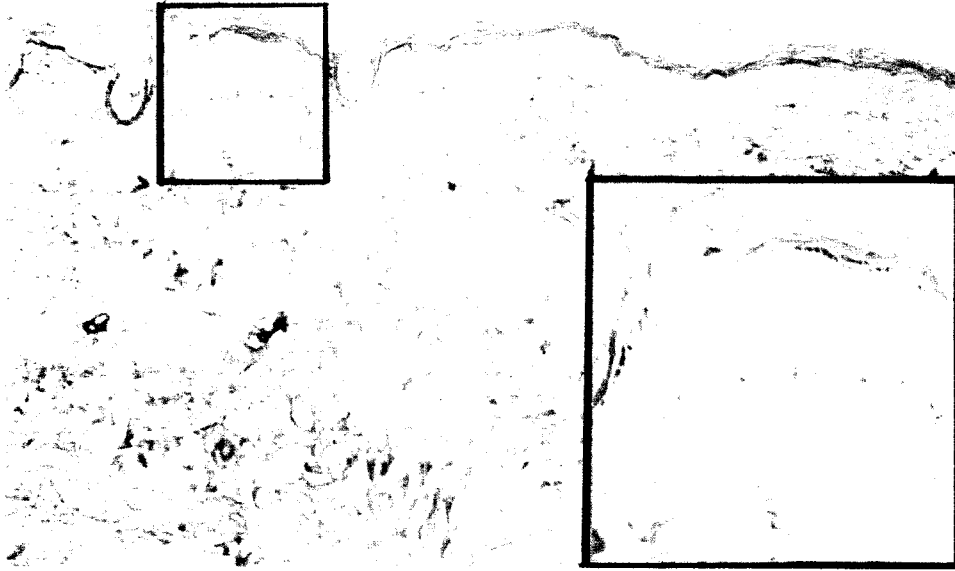
Retin-A



Not-treated

Fig5 . Effect of 3-APPA on epidermal thickness.

3-APPA treated hairless mice skin did not show any change in epidermal thickness. (H&E staining, x 200)



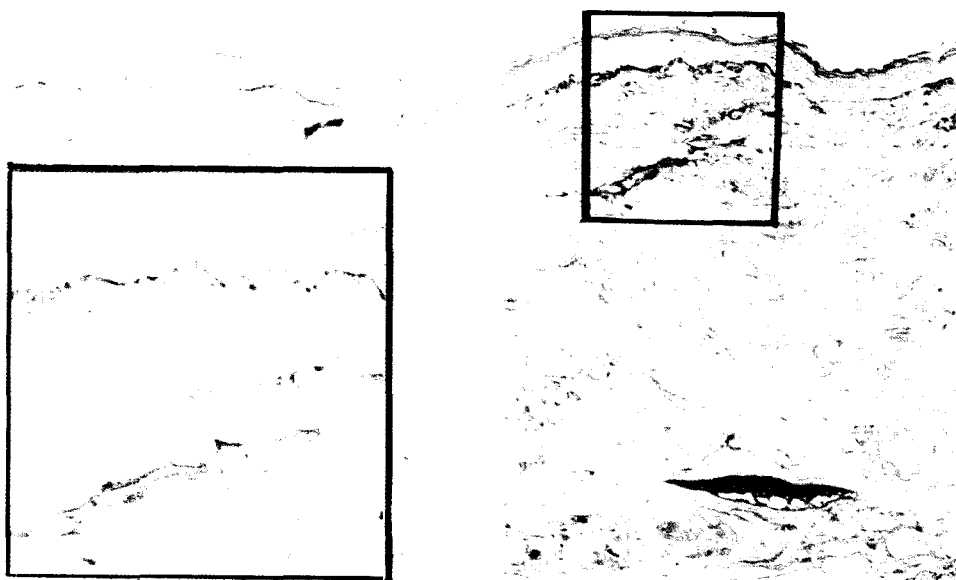
Not-treated



Retin-A



Vehicle



3-APPA

Fig 6. Effect of 3-APPA on collagen I immunostaining.

3-APPA treated hairless mice skin showed high type I pN collagen antibody staining within the dermis compared with control and vehicle. (ABC staining, x 200)