



Topical Application of Selenium Can Significantly Relieve UV-induced Skin Aging in Hairless Mice

So Hee Nam¹, Seung Eun Jung¹, Yoen Kyung Lee¹, Ji Eun Kim¹, Eon Pil Lee¹, Hae Wook Choi¹,
Hong Sung Kim¹, Jae Ho Lee¹, Young Jin Jung¹, Chung Yeol Lee¹, Hong Ju Son¹,
Hyun Woong Lee², Jung Sik Cho³, Byeong-Cheol Kang⁴ and Dae Youn Hwang^{1*}

¹College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University/
PNU-Laboratory Animal Resources Center, Miryang, Korea

²Dae Jong Instrument Industry Co. Ltd., Seoul, Korea

³Multidisciplinary Technology Institute, Hoseo University, Asan, Korea

⁴Clinical Research Institute, Seoul, Korea

Ultraviolet (UV) irradiation is an environmental factor that causes skin aging, and is also a major factor leading to cumulative alterations of skin structure, function and appearance. To investigate the effects of Selenium (Sel) on UV-induced skin aging, hairless mice were treated for 4 weeks with UV irradiation and topical application of Sel. Then, the effects of Sel were measured in the skin of these mice via histological analysis and Western blotting. According to the results of wrinkle formation analysis, the topical application of Sel induced a reduction in wrinkling formation in the damaged skin of the UV-irradiated mice. Additionally, our histological analysis demonstrated that the skin thickness in the Sel-treated group was less than in the UV-irradiated group. Furthermore, in an effort to investigate the mechanisms underlying the effects of Sel, the expression levels of matrix-metalloproteinase (MMP) and MAPK protein were assessed in both groups. The application of Sel induced a reduction in MMP-1 expression levels to the levels observed in the non-irradiated group. However, the expression level of MMP-9 was increased slightly in the Sel application group as compared with the vehicle application group. Additionally, the levels of ERK phosphorylation were increased by the application of Sel, but the levels of JNK and p38 were not altered by Sel treatment. These results suggest the possibility that Sel should be considered as a skin aging-protective and therapeutic drug candidate, which functions via the regulation of MMP expression levels.

Key words: Selenium, photoaging, UV-irradiation, MMP

(Received 18 February 2010; Revised version received 9 March 2010; Accepted 12 March 2010)

피부(skin)는 외부환경과 내부장기 사이에 존재하는 막으로서 장기를 보호하는 역할을 하며, 다양한 세포형태와 구조를 갖는 복합기관이다. 피부는 표피(epidermis), 진피(dermis), 피하지방(subcutaneous layer)의 3층으로 구성되어 있으며, 가장 바깥쪽에 위치하는 표피층은 keratinocytes, melanocytes, Langerhans 세포 등이 많이 분포하는 층이다(Rittie and Fisher, 2002). 중간층에 위치하는 진피층은 fibroblast에 의해 생성된 extracellular matrix (ECM) protein에 의해 일차적으로 구성되어 있으며, 가장 아래쪽

에 위치하는 피하지방은 결합조직의 구조성분인 지방세포로 구성되어 있다(Rittie and Fisher, 2002).

피부노화(skin aging)는 유전적 요인, 환경적 요인, 호르몬의 변화, 대사과정 등 다양한 원인에 의해서 영향을 받는다. 이러한 요인 중에서 환경적 요인과 대사과정에 의한 피부노화는 최근 연구에서 매우 중요한 분야로 인식되고 있다. 환경적 요인은 UV조사, xenobiotics, 기계적인 스트레스(mechanical stress) 등이 포함되며, 대사과정의 영향에는 활성산소, 당, 알데히드와 같은 작용화합물의 생성이 포함된다(Rittie and Fisher, 2002). 이러한 요인들은 피부의 구조, 기능 그리고 상태의 변화를 유발하며, 특히 주름(wrinkling), 처짐(sagging), 이완(laxity) 등과 연관성이 깊다(Jenkins, 2002). 환경적인 요인 중에서 특별히 태양으로부터의 UV조사는 매우 중요한 피부노화 유발인자이다. UV 노출에 의해 유발되는 피부노화인 광노화(photoaging)

*Corresponding author: Dae Youn Hwang, Department of Biomaterials Science, College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University, 50 Cheonghak-ri, Samnangjin-eup, Miryang-si, Gyeongsangnam-do 627-706, Korea
Tel: +82-55-350-5388
Fax: +82-55-350-5389
E-mail: dyhwang@pusan.ac.kr

는 일반적으로 나이가 들어가면 발생하는 피부노화인 연령피부노화(chronological skin aging)와는 다른 몇 가지 차이점이 관찰된다. 연령노화 피부(chronological aged skin)는 얇고, 부드러우며, 건조하고, 흠집이 없고 탄력성이 일부소실되는 특징을 갖는다. 특히 이러한 피부는 fibroblast 수의 감소로 ECM의 퇴화가 관찰되며(Varani *et al.*, 2001), collagen과 elastin의 양이 감소한다(Braverman and Fonferko, 1982; Uitto, 1986). 이러한 영향으로 collagen I과 III에 영향을 주는 단백질 합성이 감소하고, ECM 단백질의 분해가 증가된다(Bizot-Foulon *et al.*, 1995; Rittie and Fisher, 2002). 그러나 광노화된 피부(photoaged skin)는 주름, 늘어짐, 거칠어짐, 불균등한 색소형성, 갈색점 등이 나타나며(Lavker, 1995), 특히 표피가 두꺼워지고 결합조직의 구성에 변화가 일어난다. 비록 두 가지 피부노화의 변화가 명확히 구별되지만 공통으로 나타나는 특성도 밝혀졌으며, 이러한 특성으로는 matrix-metalloproteinase (MMP)의 발현, procollagen 합성의 감소, 결합조직의 손상 등이 포함된다(Rittie and Fisher, 2002). 피부노화를 방지하고, 치료하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있으나 강력한 항산화제로서 사용되는 selenium (Sel)을 이용한 시도는 거의 없는 상황이다.

따라서 본 연구에서는 UV에 의해서 유도된 피부노화에 미치는 Sel의 영향을 관찰하고자 4주 동안 UV를 조사하면서 동시에 Sel을 hairless 마우스의 피부에 처리하여 주름, 피부두께, MMP 발현 등에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

동물실험설계

실험에 사용된 동물은 4주령의 hairless SKH-1 마우스로서 샘타코(오산, 한국)로부터 구입하였다. Hairless 마우스는 방사선 조사된 사료(Purina Mills Inc)를 자유급식하도록 하였으며, 12시간의 조명주기(08:00~20:00)로 specified pathogen-free상태인 부산대학교 청정실험동물센터(온도 $22\pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $50\pm 5\%$)에서 사육하였다. 또한 본 연구는 부산대학교 동물실험윤리위원회(PNU-IACAU)로부터 과학성과 윤리성에 대한 심사를 거쳐 승인(승인번호: PNU-2009-0007)을 받아 수행되었다.

Hairless 마우스를 4개 군으로 분류하여 군당 5마리의 실험동물을 임의적으로 배정하였으며, 4개군의 구성은 UV를 조사하지 않은 군(대조군), UV만 조사한 군(UV군), UV조사 후 vehicle처리한 군(UV/vehicle군), 그리고 UV조사 후 Sel처리한 군(UV/Sel군)이다. Sel처리는 sodium selenite를 Sigma(S5261, USA)로부터 구매하여 최종농도가 $0.2 \mu\text{mol}/\mu\text{L}$ 로 되도록 증류수에 녹여 제조한 후 점도를 제공하기 위하여 Fucidin(동화약품공업 주식회사)과 1:1의 비율로 혼합하여 사용하였다.

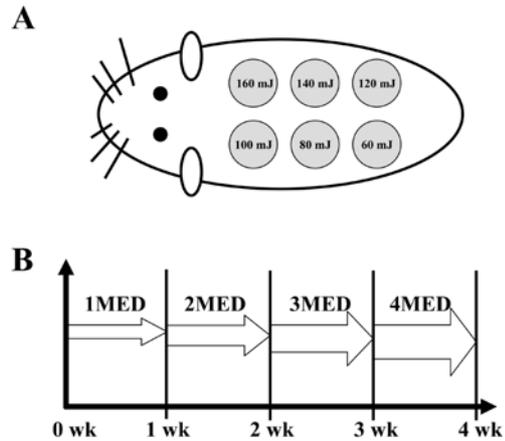


Figure 1. Schematic diagram of the irradiation site in the dorsal skin surface of hairless mice (A) and the irradiation schedule lead to induce skin aging (B). The UV dose was increased weekly by 1 MED up to 4 MED. Vehicle or Selenium was applied to the backs of hairless mice after UV irradiation.

UV조사

UV 조사장치는 (주)대중기기(서울, 한국)의 제품으로서 가로 90 cm, 세로 30 cm, 높이 50 cm의 직사각형의 상자에 자외선 조사장치의 광원으로 280-400 nm파장의 UVA, UVB, UVC를 발광하는 램프를 장착하여 사용하였다. 주름과 노화를 유발하기 위해서는 UVA와 UVB만이 조사되도록 Kodacel Sheeting 6805 Product (Kodak, USA)를 광원 앞에 부착하여 UVC를 차단시켰다. UV 램프와 마우스의 거리는 30 cm가 되도록 유지하였으며, 마우스는 아크릴로 제작된 tray에 넣어 보정한 후 조사하였다. UV는 초기 1주 동안에는 1 Minimal Erythema Dose (MED)를 조사하고, 점진적으로 2 MED (2주째), 3 MED (3주째), 4 MED (4주째)까지 조사량을 증가시켜 조사함으로써 피부노화를 유발하였다(Figure 1B). UV조사는 2일간격으로 실시하였으며, 먼저 설정된 양의 UV를 조사한 후 약 30분정도 경과하면 Sel을 마우스의 등표면에 골고루 발라주었다.

1 MED 설정

MED는 홍반을 일으킬 수 있는 최소한의 UV 조사량을 말하며, 일반적으로 자외선에 노출 정도를 알려주는 유용한 임상적인 지표로 사용된다. 이러한 MED는 자외선이 생물에 미치는 가장 중요한 효과는 아니지만, 자외선 조사의 효과를 임상적으로 판단하는 실제적이고 가장 유용한 근거로 사용되고 있다. 1 MED를 설정하기 위하여 hairless 마우스를 마취한 후 지름 1 cm의 구멍이 있는 천으로 마우스 등 표면을 덮고 60, 80, 100, 120, 140, 160 mJ까지 6개 부분을 조사하였으며(Figure 1A), 24시간 경과 후 조사부위에 홍반의 발생 여부를 육안으로 확인하였다. 그 결과, 조사량 중에서 홍반을 처음으로 나타내게 하는 조

사량을 1 MED로 설정하였다. 또한 실제 조사된 UV량은 UVx Radiometer (UVP, USA)를 사용하여 측정하였다.

피부주름 측정

UV에 의해서 유도된 피부노화의 정도는 주름형성상태를 관찰함으로써 측정하였다. 피부주름은 UV를 조사한 후 DETAX System II (MIXPAC)과 Double-Stick Disc (3M, Germany)을 사용하여 측정하였다. 실험 후 마우스 피부에 Double-Stick Disc를 붙이고, DETAX System II를 이용하여 혼합용액을 분사하여 2-3분정도 후에 완전히 굳어진 Disc를 떼어내어 주름의 정도를 관찰하였다. Disc에 생긴 주름은 Bissett 등(1990)에 의해서 제시된 scoring system에 따라 평가하였다. 이러한 평가에서 grade 0은 주름이 없는 경우, grade 1는 몇 개의 얇은 주름이 있는 경우, grade 2는 일부 주름이 있는 경우, grade 3는 몇 개의 깊은 주름이 생긴 경우로 정의하여 수행하였다 (Tsukahara et al., 2001).

피부조직 관찰

각 실험군에서 적출한 피부조직은 10% formalin용액에 48시간 정도 고정된 뒤, 카세트에 들어갈 만한 적당한 크기로 절단하여 카세트에 넣고 labeling을 했다. 그리고 이들 조직은 조직처리기(Thermo Shandon Ltd./Thermo Fisher Scientific, England)를 이용하여 alcohol 70, 80, 90, 95, 100%에 각각 1~2시간정도 처리한 후 xylene으로 4시간 처리하고, paraffin에서 4시간 처리하였다. 고정된 조직은 Paraffin Embedding Station (LEICA MICROSYSTEMS NUSSLOCH GMBH, Germany)을 사용하여 embedding한 후 냉동실에서 하루정도 보관하고 Rotary Microtome (LEICA MICROSYSTEMS NUSSLOCH GMBH, Germany)을 사용하여 block을 박절하였다. 박절된 조직은 H&E staining을 실시하기 위하여 xylene에 3분씩 3번, alcohol 100%에 각각 2분, 1분, alcohol 95, 80, 70%에 각 1분 30초 담근 후에 물로 1분 세척하고, hematoxylin에 1분, 10% scott's tap water에 1분, eosin에 3분 동안 처리과정을 거쳐 염색을 실시하였다. 염색된 조직은 다시 alcohol 70, 80, 95, 100, 100%에 순서대로 처리하여 dehydration한 후 xylene에 3분씩 3번 처리하였다. 슬라이드를 건조 후 kanadabalsam과 xylene를 이용하여 permounting을 실시한 후 현미경을 이용하여 표피/내피의 두께, lipid pore 등을 관찰하였다. 피부의 두께는 H&E staining된 슬라이드 3개를 선정하여 각 슬라이드에 피부조직의 5부분을 임의로 선택한 후 각 군에서 동일한 위치를 측정하여 평균값을 계산하여 제시하였다.

단백질 분석

피부조직 내 MMP-1/9 발현의 변화를 관찰하기 위하여

조직 100 mg을 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, 17081)을 첨가하여 분쇄한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하고, SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology, 21071)을 이용하여 단백질을 정량하여 western blot에 사용하였다. 4-20% SDS-PAGE gel에 50 μ g의 단백질을 전기영동 한 후 ECL membrane (Amersham Life Science, RPN2020D)에 전이하고, 3% skim milk에서 2시간동안 블로킹하였다. 각 membrane은 다음과 같은 anti-MMP-1/8 antibody (H-300, SantaCruz Biotechnology), anti-MMP-9 antibody (H-129, SantaCruz Biotechnology), anti-ERK (sc-94, Santa Cruz Biotechnology), anti-p-ERK (sc-7383, Santa Cruz Biotechnology), anti-JNK (#9252, Cell Signaling Technology), anti-p-JNK (#9251, Cell Signaling Technology), anti-p38 (#9212, Cell Signaling Technology), anti-p-p38 (#9211, Cell Signaling Technology), anti-actin antibody (Sigma, A5316)로 4°C에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary antibody를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, RPN2108)를 이용하여 develop하였다.

통계분석

대조군과 다른 실험군간의 실험결과에 대한 유의성은 t-test를 이용하여 분석하였고, UV/vehicle군과 UV/Sel군 간의 실험 결과에 대한 유의성은 One way ANOVA를 이용하여 분석하였다. 분석된 결과는 P -value < 0.05를 유의성있는 값으로 인정하였으며, 실험 결과는 means \pm SD로 제시하였다.

결 과

1 MED 설정

Hairless 마우스에게 UV를 조사하기 전에, 이들 마우스에서 홍반을 일으킬 수 있는 최소한의 농도인 1 MED를 결정하고자 60~160 mJ까지 6가지 조사량을 설정하여 UV 조사량에 따른 홍반발생 정도를 관찰하였다. 그 결과, 최초로 홍반이 발생하기 시작하는 UV조사량은 약 120 mJ인 것으로 관찰되었다. 따라서 결정된 1 MED의 양으로 마우스에 조사를 시작하여 매주 1 MED씩 증가시키면서 피부노화를 유발하였다.

Sel이 UV조사로 유발된 피부주름 형성에 미치는 영향

UV에 의해 유발된 피부주름 형성에 미치는 Sel의 영향을 분석하기 위하여 hairless 마우스의 등표면에 4주 동안 UV조사와 Sel을 처치한 후 주름형성을 분석하였다. 그 결과, UV만을 조사한 마우스는 대조군에 비하여 주름의 생성이 매우 증가한 것으로 관찰되었다. 그리고 UV와 동시

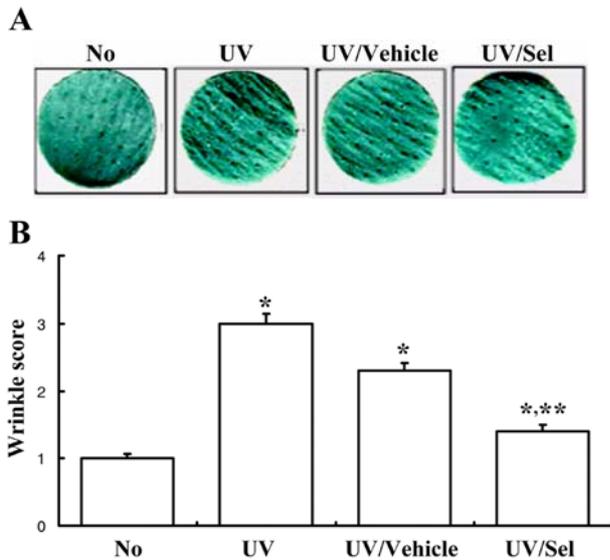


Figure 2. Inhibition of UV-induced wrinkle formation by Sel in the hairless mice. Wrinkle formation was measured by replica grading at final week. The level of wrinkle were assessed according to the scoring system suggested by Bissette *et al.* (1990) (grad 0: no wrinkles, grade 1: a few shallow wrinkles, grade 2: some wrinkles, grade 3: several deep wrinkles). The values of data represented mean \pm SD of three experiments. * P <0.05 is the significance level compared to the control (No irradiation) group, ** P <0.05 is the significance level compared to the vehicle applied group.

에 피부에 Sel을 처리한 마우스에서는 증가된 주름이 유의적으로 감소하는 효과가 있었다. 그러나 vehicle을 처리한 그룹에서는 약간의 개선은 있었으나 Sel 처리그룹에 비하여 적은 것으로 관찰되었다(Figure 2). 이러한 결과는 Sel은 UV에 의해서 유발된 주름을 유의적으로 감소시켜 주는 효과가 있음을 제시하고 있다.

Sel이 UV조사로 유도된 피부두께에 미치는 영향

Sel이 표피와 진피의 두께에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 각 그룹의 실험동물로부터 피부조직을 채취하여 조직학적 분석을 실시하였다. 그 결과, UV를 조사한 그룹에서는 표피와 진피의 두께가 유의적으로 증가하였으며, 지방층에 lipid pore의 형성이 증가됨을 관찰하였다. 그러나 Sel을 처리한 그룹에서는 피부의 두께가 크게 감소되고, lipid pore의 수도 유의적으로 감소하는 것으로 관찰되었다(Figure 3). 이러한 결과는 UV에 의해 유도된 피부두께 증가는 Sel처리에 의해 개선될 수 있음을 보여주고 있다.

Sel이 UV조사된 피부의 MMP발현에 미치는 영향

MMP의 발현은 UV조사, oxidative stress, cytokine 등 다양한 자극에 의해 증가하는 것으로 알려져 있다(Fisher *et al.*, 1996). 따라서 UV조사된 피부에서 Sel이 MMP발

현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 각 그룹의 피부조직을 이용하여 MMP-1과 MMP-9 단백질의 발현양을 western blot을 이용하여 관찰하였다. 그 결과, MMP-1의 경우, UV 조사그룹은 대조군에 비하여 발현양이 2배 가까이 증가되었으나 Sel을 처리하면 발현양이 유의적으로 감소하였으며, 측정된 감소량은 대조군보다 낮게 측정되었다(Figure 4A). 또한 실제 조직을 구성하는 세포내에서도 유사한 결과가 관찰되는지 확인하기 위하여 면역염색을 실시하였으며, 그 결과는 매우 유사한 양상으로 관찰됨을 확인하였다(Figure 4Ba-d). 또한 MMP-9의 경우, UV 조사군의 발현양은 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다. Sel처리군에서는 UV조사군에 비해 MMP-9의 발현이 약간 감소되는 것으로 확인되었으나, 이러한 발현양은 UV/Vehicle군과 비교해서는 유의적으로 증가되었다(Figure 4A). 그러나 면역염색에서는 표피와 진피에서 MMP-9의 발현양이 크게 감소하는 것으로 관찰되었으며, 근육 등 다른 부위에서 발현이 증가하는 것을 확인하였다(Figure 4Be-h). 따라서 이러한 결과는 UV조사에 의해서 유도된 MMP-1과 MMP-9의 발현양은 Sel에 의해 감소될 수 있음을 보여주고 있다.

Sel이 UV조사된 피부의 MAPK 전달과정에 미치는 영향

MAPK 전달과정은 다양한 세포내 자극에 대한 변화로서 잘 알려져 있다. 피부조직에서 UV에 의한 광노화에 과정에서 MAPK 전달과정에 미치는 Sel의 영향을 관찰하기 위하여 MAPK의 주요 3가지 단백질인 ERK, JNK, p38의 발현양을 조사하였다. 그 결과, total ERK는 UV에 의해 증가하였으며, UV/vehicle의 처리에는 별다른 영향이 없었으나 UV/Sel은 발현양의 감소를 유도하였다. 한편 p-ERK는 UV그룹에서 증가하지만 UV/vehicle 그룹에서는 오히려 감소하고, UV/Sel그룹에서는 발현양이 증가하였다. Total JNK는 UV를 조사한 그룹에서 발현이 증가하였으나 인산화 정도는 거의 비슷하게 나타났다. p-38에서는 UV조사에 의해 발현양이 감소하는 특성을 나타내었으나 인산화에는 특별한 영향을 미치지 못하는 것으로 관찰되었다(Figure 5). 이러한 결과는 Sel은 ERK의 인산화를 오히려 촉진시키는 역할을 하지만 JNK와 p-38에는 별다른 영향을 미치지 못함을 제시하고 있다.

고 찰

Sel은 인간의 생체대사를 위해서 필수적으로 요구되는 미량원소로서(Wilber, 1980), 결핍은 다양한 질병의 원인으로 작용한다. Sel의 결핍이 선천적인 심근증 태아의 출산을 유발하는 원인으로 작용할 수 있음은 중국의 Keshan 지방에서 관찰되었고, 근육 괴열증을 나타내는 환자는 장

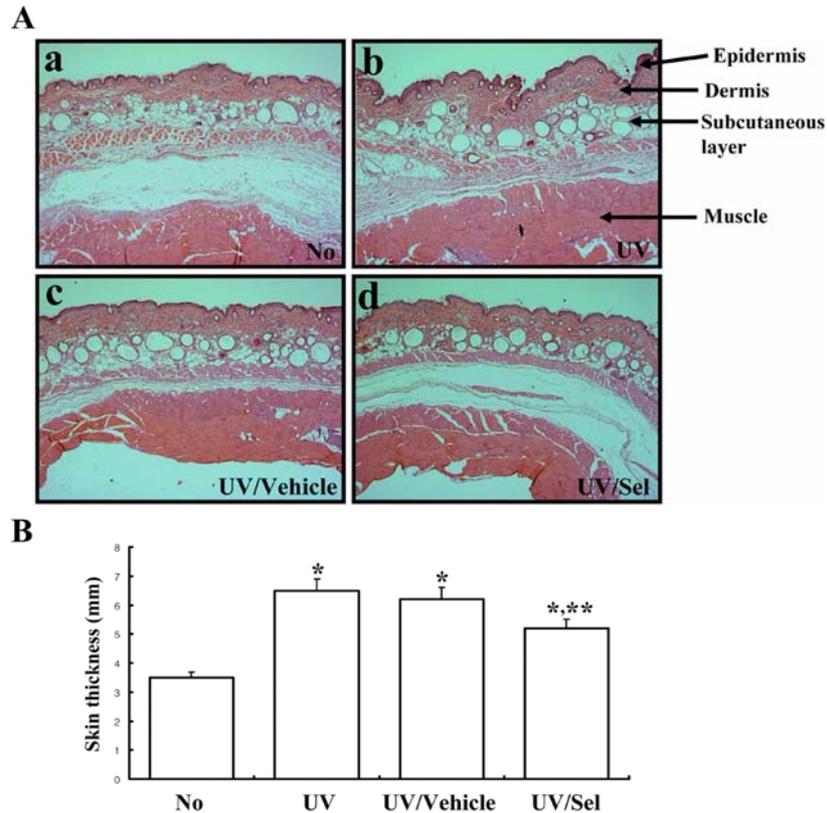


Figure 3. Inhibition of UV-induced skin thickness by Sel in hairless mice. The dorsal skin of hairless mice was prepared into histological slide and skin thickness were measured the wide from epidermis to dermis. Cellular morphology was viewed at 20x magnification and the values of data represented mean±SD of three experiments. * $P < 0.05$ is the significance level compared to the control (No irradiation) group, ** $P < 0.05$ is the significance level compared to the vehicle applied group.

기간동안 Sel이 공급되지 않은 아버지에게 의한 영향으로 유발됨이 확인되었다(van Rij *et al.*, 1979). 하지만 Sel부족은 부분적으로 vitamin E에 의해 보상되어 질 수도 있다(Schwarz and Folz, 1957). 자연계상태에서 존재하는 Sel은 크게 두 가지형태로 존재한다. 하나는 유기물형태(e.g. selenomethionine, selenocysteine)이며, 다른 하나는 무기물형태(e.g. selenite, selenate, selenide)로 존재한다(Birringer *et al.*, 2002). 일반적으로 Sel 합성물은 selenoenzyme의 기능수행에 필수적인 selenocysteine (Sec) 아미노산 형태이며, 단백질로 삽입되기 전에 무기물로 분해된다(Carlson *et al.*, 2004). 이러한 Selenoenzyme에 존재하는 Sel은 일반적인 효소에 존재하는 황 (S)보다 매우 nucleophilic하며, 특히 selenol은 생리적 pH에서 쉽게 이온화되기 때문에 높은 활성을 나타낸다(Stadtman, 1996). 최근에 Sel을 이용한 이용하여 식품, 건강기능식품 등의 다양한 제품을 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 본 연구에서는 Sel이 피부노화방지에 미치는 영향을 연구하고자 하였으며, 이러한 시도는 새로운 노화방지 치료제 개발에 매우 중요한 기초를 제시할 것으로 사료된다.

Sel은 glutathione peroxidases, thyroid hormone deiodinases, thioredoxin reductases와 같은 포유동물의 필수효소로 알려지기 전까지 분자적인 조절물질로서의 기능에 대한 정보는 많지 않았다. 최근 Sel은 인간의 건강증진연구(Kohrle *et al.*, 2000; Rayman, 2000), selenium 생화학(Birringer *et al.*, 2002), selenoprotein 생합성(Hatfield and Gladyshev, 2002) 등의 분야에서 중요한 기능을 수행하는 것으로 제시되고 있다. 또한 Sel은 인체에 다양한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 먼저, Sel은 cytotoxic lymphocytes와 NK 세포의 수를 증가시키거나 면역반응에 의한 산화적 스트레스를 제거하는 등의 다양한 면역반응과 연관된다(Beck *et al.*, 1994; Kiremidjian-Schumacher *et al.*, 2000). 또한 Sel이 포함된 Selenoprotein들은 LDL hydroperoxides 혹은 LDL oxidation을 방지함으로써 심혈관질환을 억제하는 효과가 있다(Steinberg, 1997; Sevanian and Hodis, 1997). 그밖에 여러 연구에서는 Sel의 부족은 암발병을 증가시키고 암에 의한 사망률을 증가시키는 원인이 된다. 특히 Sel은 p53 단백질의 발현을 증가시키고(Smith *et al.*, 2004), DNA 손상을 보호하는 역할을 한다(Karunasinghe *et al.*, 2004; Kowalska *et al.*, 2005). 그러나 Sel이 피부

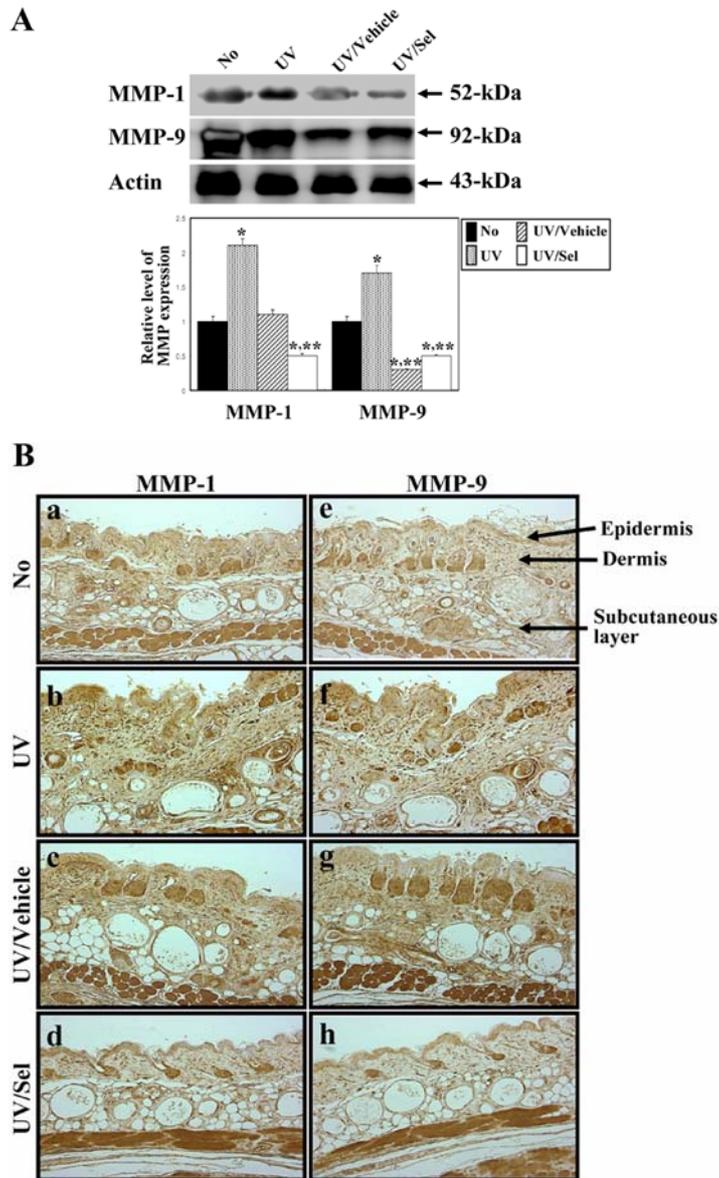


Figure 4. Effect of Selenium (Sel) on UV-induced MMP expression using Western blot (A) and immunohistochemical staining (B). Total cell lysate were prepared from skin tissues of control, UV-irradiation, UV/Vehicle and UV/Sel group, as described in Materials and Methods. Fifty micrograms of protein per sample were immunoblotted with antibodies for each protein. Three samples were assayed in triplicate using Western blotting. The values are the mean±SD. **P*<0.05 is the significance level compared to the control (No irradiation) group, ***P*<0.05 is the significance level compared to the vehicle applied group.

에 미치는 영향에 대한 연구는 매우 적다. Kashanian 등 (2008)은 Sel이 UV에 의해 유도된 DNA 손상을 제거하는 효과가 있음을 보고하였고, Cesarini 등(2003)은 hairless 마우스를 이용하여 Sel이 포함된 antioxidant complex를 투여함으로써 피부암을 유발할 수 있는 DNA손상을 감소 시킴을 확인하였다. 그러나 최근까지도 UV에 의해 유도된 피부노화에 미치는 Sel의 영향을 평가한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 Sel이 피부노화를 개선하는 효능에 대하여 연구를 수행하였다. 본 연구에서 피부노화를 유발하기 위해 사용된 1 MED (120 mJ)은 이전

에 보고된 1 MED값 130 mJ과 매우 유사한 것으로 확인되었다(Park *et al.*, 2006). 피부주름을 개선하는 물질에 대한 연구는 광범위하게 진행되고 있으며, 최근에 *Eupenicillium shearii*로부터 추출된 물질은 주름개선효과가 좋은 것으로 보고되었다(Park *et al.*, 2006). 본 연구에서 사용된 Sel도 주름을 개선시켜주는 효능이 우수한 것으로 확인되어 향후 치료제 등의 개발에 중요한 잠재적인 물질이 될 수 있을 것으로 사료된다.

MMP는 Zn-결합 proteolytic enzyme으로서 다양한 생리적 상태와 병리적 상태에서 extracellular matrix의 분해

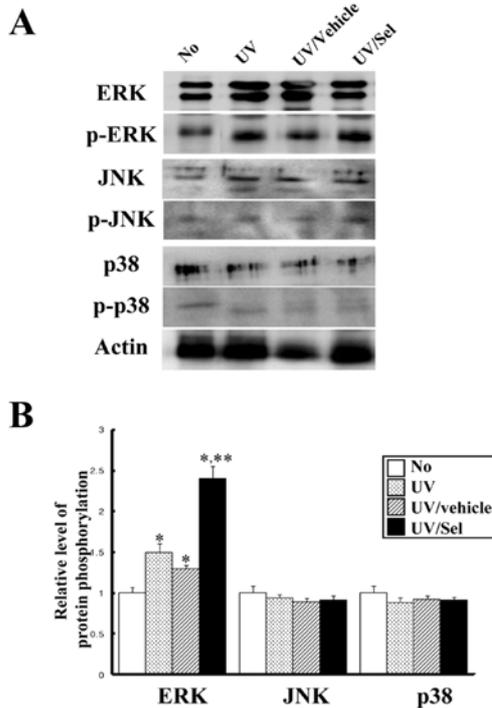


Figure 5. Effect of selenium (Sel) on UV-induced MAPK protein expression using Western blot. Total cell lysate were prepared from skin tissues of control, UV-irradiation, UV/Vehicle and UV/Sel group, as described in Materials and Methods. Fifty micrograms of protein per sample were immunoblotted with antibodies for each protein. Three samples were assayed in triplicate using Western blotting. The values are the mean±SD. * $P < 0.05$ is the significance level compared to the control (No irradiation) group, ** $P < 0.05$ is the significance level compared to the vehicle applied group.

와 리모델링에 관여한다(Fini *et al.*, 1992). 대부분의 metalloproteinases는 corneal cell에서 생산되며, proenzyme의 형태로 분비된 후 extracellular compartment에서 활성화된다(Martisian, 1990; Stetler-Stevenson *et al.*, 1989). 모든 MMP는 유사한 구조를 갖고 있으나 이들 효소가 절단할 수 있는 ECM substrate는 매우 상이하다(Azar *et al.*, 1996). 이러한 특징 때문에 MMP는 피부조직의 손상의 정도를 나타내는 중요한 지표로 사용되고 있다. 지금까지 MMP-2와 MMP-9은 UV에 노출된 hairless 마우스에서 증가되는 대표적인 gelatinase로 알려져 왔다. MMP-9은 UV에 조사에 의해서 강하게 발현이 유도되는 단백질이며(Fortino *et al.*, 2007), 항산화능을 갖는 Pothomorphe umbellata 등의 효능을 측정하기 위해 선정되는 대표적인 지표단백질이다. 이들 단백질의 효능을 관측하기 위하여 이전에는 gelatin zymography을 이용한 연구가 많았으나 최근에는 유전자수준 혹은 단백질 수준에서 발현조절을 관찰하는 연구가 많이 진행되고 있어(Popke *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2009) 본 연구에서도 항체를 이용한 단백질수준의 변화를 관찰하였다. 또한 MMP-1은 일반적으로 인간

의 피부노화 과정에서 진피 collagen을 분해하는 주요 인자이다(Visse and Nagase, 2003; Brennan *et al.*, 2003). 그러나 실험동물에서 이들 단백질의 중요성에 대한 연구들이 최근에 주목을 받고 있다. 초기연구에서는 UV조사가 IL-1 α 와 IL-1 β 와 같은 cytokine의 분비를 증가시키고 이렇게 증가된 cytokine들이 발현을 조절하는 중요한 단백질로 MMP-1이 제시되었다(Wlaschek *et al.*, 1994). 그러나 최근연구에서 UV조사에 의해 유도된 다양한 증상을 억제하는 효능을 지닌 홍삼추출물 등의 처리 효능을 관찰하는 지표단백질로 MMP-1이 사용되었다 (Kang *et al.*, 2009). 또한 중요한 redox 조절인자인 oxidoreductase thioredoxin-1가 UVA, UVB 그리고 IRA에 의해 유도되는 MMP-1과 collagenase의 발현을 조절하는 기전이 알려져 중요성이 부각되고 있다 (Buechner *et al.*, 2008)

따라서 본 연구에서는 Sel이 MMP-1과 MMP-9의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 western blot을 실시하였다. MMP-1단백질은 UV에 의해서 발현이 증가하지만 Sel처리에 의해서 유의적으로 감소하는 특징을 나타내었고, MMP-9은 UV조사군에 비하여는 감소하지만 vehicle 처리군에 비해서는 약간 증가하는 특성을 나타내었다. 이러한 결과는 MMP-1과 MMP-9은 Sel에 대한 반응성에 차이가 있으며, 특히 MMP-1에 좀더 효과적으로 작용하는 것으로 사료된다.

또한, 인간의 피부조직을 이용한 eicosapentaenoic acid의 영향에 대한 연구에서는 MAPK 신호전달과정 중 JNK와 p-38의 인산화를 효과적으로 차단하는 효과가 있으나 ERK의 인산화에는 영향이 없었다(Kim *et al.*, 2006). 그러나 본 연구에서는 hairless 마우스를 이용하여 Sel의 영향을 분석하였으며, eicosapentaenoic acid가 MAPK 신호전달에 미치는 영향과는 다르게, ERK 인산화를 촉진시켰으나 JNK와 p38의 인산화에는 영향을 미치지 못하는 것으로 관찰되었다. 그러나 UV에 의한 total 단백질의 발현은 일부 증가하는 현상이 관찰되었다.

이상의 결과를 종합하면, 본 논문에서는 Sel이 UV조사된 피부노화에 미치는 영향을 연구하기 위하여 hairless 마우스에 UV와 Sel을 4주 동안 처리하였다. 그 결과, Sel은 UV조사의 의해 유도된 피부노화를 효과적으로 감소시키는 효과가 관찰되었으며, 이러한 효과는 MMP-1의 작용억제를 통해서 이루어질 수 있는 가능성이 있음을 제시할 수 있다. 이러한 효능을 바탕으로 향후 Sel을 피부노화의 치료제 등에 활용한다면 우수한 치료후보로서 가능성이 매우 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

- Azar, D.T., Hahn, T.W., Jain, S., Yeh, Y.C. and Stetler-Stevenson, W.G. (1996) Matrix metalloproteinases are expressed during wound healing after excimer laser keratectomy. *Cornea*. 15, 18-23.
- Beck, M.A., Kolbeck, P.C., Shi, Q., Rohr, L.H., Morris, V.C. and Levander, O.A. (1994) Increased virulence of a human enterovirus (coxsackievirus B3) in selenium-deficient mice. *J. Infect. Dis.* 170(2), 351-357.
- Birringer, M., Pilawa, S. and Flohe, L. (2002) Trends in selenium biochemistry. *Nat. Prod. Rep.* 19, 693-718.
- Bissett, D.L., Chatterjee, R. and Hannon, D.P. (1990) Photoprotective effect of topical anti-inflammatory agents against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 7(4), 153-158.
- Bizot-Foulon, V., Bouchard, B., Homerbeck, W., Duberter, L. and Bertaux, B. (1995) Uncoordinated expressions of type I and III collagens, collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 along in vitro proliferative life span of human skin fibroblast. *Cell Biol. Int.* 19, 129-135.
- Braverman, I.M. and Fonferko, E. (1982) Studies in cutaneous aging. I. The elastic fiber network. *J. Invest. Dermatol.* 78, 434-443.
- Brennan, M., Bhatti, H., Nerusu, K.C., Bhagavayhula, N., Kang, S., Fisher, G.J., Varani, J. and Voorhees, J.J. (2003) Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochem. Photobiol.* 78, 43-48.
- Buechner, N., Schroeder, P., Jakob, S., Kunze, K., Maresch, T., Calles, C., Krutmann, J. and Haendeler, J. (2008) Changes of MMP-1 and collagen type I α 1 by UVA, UVB and IRA are differentially regulated by Trx-1. *Exp. Gerontol.* 43(7), 633-637.
- Carlson, B.A., Novoselov, S.V., Kumaraswamy, E., Lee, B.J., Anver, M.R., Gladyshev, V.N. and Hatfield, D.L. (2004) Specific excision of the selenocysteine tRNA^{[Ser]Sec} (Trsp) gene in mouse liver demonstrates an essential role of selenoproteins in liver function. *J. Biol. Chem.* 279, 8011-8017.
- Csarini, J.P., Michel, L., Maurette, J.M., Adhoute, H. and Bjot, M. (2003) Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 19(4), 182-189.
- Choi, H.K., Kim, D.H., Kim, J.W., Ngadiran, S., Sarmidi, M.R. and Park, C.S. (2010) Labisia pumila extract protects skin cells from photoaging caused by UVB irradiation. *J. Biosci. Bioeng.* 109(3), 291-296.
- Fini, M.E., Girard, M.T. and Matsubara, M. (1992) Collagenolytic/gelatinolytic enzymes in corneal wound healing. *Acta Ophthalmol.* 70 (Suppl 202), 26-33.
- Fisher, G.J., Datta, S.C., Talwar, H.S., Wang, Z.Q., Varani, J., Kang, S. and Voorhees, J.J. (1996) Molecular basis of sun-induced premature skin aging and retinoid antagonism. *Nature* 379, 335-339.
- Fortino, V., Maioli, E., Torricelli, C., Davis, P. and Valacchi, G. (2007) Cutaneous MMPs are differently modulated by environmental stressors in old and young mice. *Toxicol. Lett.* 173(2), 73-79.
- Hatfield, D.L. and Gladyshev, V.N. (2002) How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol. Cell Biol.* 22, 3565-3576.
- Jenkins, G. (2002) Molecular mechanisms of skin aging. *Mech. Aging Dev.* 123, 801-810.
- Kang, T.H., Park, H.M., Kim, Y.B., Kim, H., Kim, N., Do, J.H., Kang, C., Cho, Y. and Kim, S.Y. (2009) Effects of red ginseng extract on UVB irradiation-induced skin aging in hairless mice. *J. Ethnopharmacol.* 123(3), 446-451.
- Karunasinghe, N., Ryan, J., Tuckey, J., Masters, J., Jamieson, M., Clarke, L.C., Marshall, J.R. and Ferguson, L.R. (2004) DNA stability and serum selenium levels in a high-risk group for prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13(3), 391-397.
- Kashanian, S., Gholivand, M.B., Ahmadi, F. and Ravan, H. (2008) Interaction of diazinon with DNA and the protective role of selenium in DNA damage. *DNA Cell Biol.* 27(6), 325-332.
- Kim, H.H., Cho, S., Lee, S., Kim, K.H., Cho, K.H., Eun, H.C. and Chung, J.H. (2006) Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin in vivo. *J. Lipid Res.* 47(5), 921-930.
- Kiremidjian-Schumacher, L., Roy, M., Glickman, R., Schneider, K., Rothstein, S., Cooper, J., Hochster, H., Kim, M. and Newman, R. (2000) Selenium and immunocompetence in patients with head and neck cancer. *Biol. Trace Elem. Res.* 73(2), 97-111.
- Kohrle, J., Brigelius-Flohe, R., Bock, A., Gartner, R., Meyer, O. and Flohe, L. (2000) Selenium in biology: facts and medical perspectives. *Biol. Chem.* 381, 849-864.
- Kowalska, E., Narod, S.A., Huzarski, T., Zajaczk, S., Huzarska, J., Gorski, B. and Lubinski, J. (2005) Increased rates of chromosome breakage in BRCA1 carriers are normalized by oral selenium supplementation. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14(5), 1302-1306.
- Lavker, R.M. (1995) *Cutaneous aging: chronologic versus photoaging*, Gilchrist, B. ed., pp. 123-135, Blackwell Science, Cambridge, MA.
- Martisian, L.M. (1990) Metalloproteinase and their inhibitors in matrix remodelling. *Trends Genet.* 6, 121-125.
- Park, C.H., Lee, M.J., Kim, J.P., Yoo, I.D. and Chung, J.H. (2006) Prevention of UV radiation-induced premature skin aging in hairless mice by the novel compound Melanocin A. *Photochem. Photobiol.* 82(2), 574-578.
- Rayman, M.P. (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet* 356, 233-241.
- Rittie, L. and Fisher, G.J. (2002) UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Aging Res. Rev.* 1, 705-720.
- Ropke, C.D., da Silva, V.V., Kera, C.Z., Miranda, D.V., de Almeida, R.L., Sawada, T.C. and Barros, S.B. (2006) In vitro and in vivo inhibition of skin matrix metalloproteinases by Pothomorphe umbellata root extract. *Photochem. Photobiol.* 82(2), 439-442.
- Schwarz, K. and Foltz, C.M. (1957) Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Nutrition. J. Am. Chem. Soc.* 15, 255-264.
- Sevanian, A. and Hodis, H. (1997) Antioxidants and atherosclerosis: an overview. *Biofactors* 6(4), 385-390.
- Smith, M.L., Lancia, J.K., Mercer, T.I. and Ip, C. (2004) Selenium compounds regulate p53 by common and distinctive mechanisms. *Anticancer Res.* 24(3a), 1401-1408.
- Stadman, T.C. (1996) Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 83-100.
- Steinberg, D. (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 272(34), 20963-20966.
- Stetler-Stevenson, W.G., Karutzsch, H.C. and Wachter, M.P. (1989) The activation of human Type IV collagenase. *J. Biol. Chem.* 264, 1353-1356.
- Tsukahara, K., Moriwaki, S., Fujimura, T. and Takema, Y. (2001) Inhibitory effect of an extract of Sanguisorba officinalis L. on ultraviolet-B-induced photodamage of rat skin. *Biol. Pharm. Bull.* 24(9), 998-1003.
- Uitto, J. (1986) Connective tissue biochemistry of the aging dermis. *Dermatol. Clin.* 4, 433-446.
- van Rij, A.M., Thomson, C.D., McKenzie, J.M. and Robinson, M.F. (1979) Selenium deficiency in total parenteral nutrition.

- Am. J. Clin. Nutr.* 32, 2085-2086.
- Varani, J., Spearman, D., Perone, P., Fligiel, S.E.G., Datta, S., Wang, Z.Q., Shao, Y., Kang, S., Fisher, G.J. and Voorhees, J.J. (2001) Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am. J. Pathol.* 158, 931-942
- Visse, R. and Nagase, H. (2003) Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase: structure, function and biochemistry. *Circ. Res* 92, 827-839.
- Wilber, C.G. (1980) Toxicology of selenium: a review. *Clin. Toxicol.* 17, 171-230.
- Wlaschek, M., Heinen, G., Poswig, A., Schwarz, A., Krieg, T. and Scharffetter-Kochanek, K. (1994) UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase/MMP-1 by interrelated loops of interleukin-1 and interleukin-6. *Photochem. Photobiol.* 59, 550 - 556.