

세포독성검사방법을 리용하여 콜라겐펩티드-동착화합물의 안전성을 평가하기 위한 연구

편정민, 김성직

세포박단백질인 콜라겐을 부분물작용분해하여 얻은 콜라겐펩티드는 콜라겐단백질보다 잘 흡수되며 항산화활성과 같은 유익한 생물활성을 가지는것[1, 9]으로 하여 건강식품 및 화장품의 첨가제로 널리 리용하고있다.

Cu^{2+} 은 셀룰로플라즈민, 수퍼록시드디스무타제, 리질옥시다제, 티로시나제 등 여러가지 산화환원효소들에 도움인자로 들어있다. 몸안에 Cu^{2+} 이 부족하면 철대사가 장애되어 Cu^{2+} 결핍성빈혈이 생기게 되며 또한 항산화능력이 떨어지고 콜라겐 및 엘라스틴합성이 지장받으며 머리카락이 희여지고 피부에 흰 얼룩이 생기는 등 여러가지 증상들이 나타나게 된다.[3, 8]

류산동과 같은 무기염을 리용하여 Cu^{2+} 결핍성증상들을 해소[2]할수 있지만 무기 Cu^{2+} 이 체내에 축적되면 히드록실라디칼이 생겨나 독성이 나타난다.[4, 5, 9]

동을 유기화하면 동의 독성을 낮출수 있다는데로부터 아미노산-동착화합물, 펩티드-동착화합물과 같은 유기동착화합물을 식료품, 먹이 및 화장품의 첨가제로 리용하기 위한 연구들[6, 7]이 널리 진행되고있다.

우리는 사람간염성줄기세포에 대한 콜라겐펩티드-동착화합물의 증식억제력을 측정하고 그로부터 콜라겐펩티드-동착화합물의 안전성을 평가하였다.

재료와 방법

1) 재료와 기구, 시약

실험에 리용한 콜라겐펩티드-동착화합물은 탈지한 돼지가죽에 5배량의 0.8mol/L HCl 용액을 첨가하고 환류냉각하면서 3h동안 가열분해한 다음 강염기성음이온교환수지(《Ambelite IRA-400》)로 중화하여 얻은 콜라겐펩티드(평균펩티드길이 4.7)와 Cu^{2+} 을 반응시켜 제조[5]하였다. 콜라겐펩티드-동착화합물중의 Cu^{2+} 농도는 0.01mol/L, 콜라겐펩티드농도는 4%(40.4mg/mL)였다.

기구로는 자외가시선분광광도계(《SCAN DROP-200》), 무균조작대(《Jouan MSC 12》, 무진급수 100이하), 탄산가스배양함(《Galaxy B》, 25~50°C), 세포배양병(T15~T75), 생물현미경(《OLYMPUS》), 원심분리기(《HITACHI》), 분석천평(《AGE-120》), 마이크로피펫, 24공판을 리용하였다.

실험에 리용된 DMEM배지, 소태아혈청(BSA), 트립신용액(1 : 250), 콜라게나제(360U/mg), MTT(3-(4,5-디메틸-2-티아조일)-2,5-디페닐-2H-테트라졸리움브로미드), 디메틸설폭시드(DMSO, 《Sigma》), 린산완충용액(DPBS), 에틸알콜(98%), 레몬산나트륨($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), 초산에틸에스테르($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) 등 시약들은 모두 분석순이었다.

2) 실험방법

2~3대의 사람간엽성줄기세포부유액 10mL를 원심분리(2 000r/min, 5min)하여 간엽성줄기세포를 얻은 후 무균조작대에서 3×10^4 개/공판의 밀도로 24공판에 접종하였다. 혈청 10%와 각이한 농도의 콜라겐펩티드-동착화합물 혹은 류산동($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)을 첨가한 DMEM배지들을 넣고 탄산가스배양함에서 배양(37°C, 3일)한 후 5mg/mL MTT 0.2mL를 넣고 6h동안 배양하였다. 다음 MTT가 포함된 배양액을 피펫으로 흡입하여 버리고 0.2mL의 DMSO를 넣어 포르마잔(사립체의 호박산수소효소에 의하여 MTT로부터 형성된 람자색의 비수용성물질)을 추출하고 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조구에는 시험물질을 넣지 않고 공백구에는 세포를 접종하지 않았다.

세포증식억제률(%)은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$I = 100 - \frac{(A_{시} - A_{공})}{(A_{대} - A_{공})} \times 100$$

여기서 I 는 세포증식억제률(%), $A_{시}$ 와 $A_{대}$, $A_{공}$ 은 각각 시험구와 대조구, 공백구의 흡광도이다.

이 값들로부터 콜라겐펩티드-동착화합물과 류산동이 사람간엽성줄기세포의 증식을 50% 억제하는 농도인 IC_{50} 값들을 각각 계산하여 콜라겐펩티드-동착화합물과 류산동의 세포독성을 비교하였다.

콜라겐펩티드-동착화합물의 안전성은 콜라겐펩티드-동착화합물이 사람간엽성줄기세포의 증식을 실제상 억제하지 않는다고 보는 IC_5 즉 무해농도를 구하고 이것을 음료수중 Cu^{2+} 의 최대허용농도로 세계보건기구에서 규정한 한계값[2]인 1mg/L와 비교하는 방법으로 평가하였다.

결과 및 논의

1) 콜라겐펩티드-동착화합물과 류산동의 세포독성비교

콜라겐펩티드-동착화합물(펩티드농도 40.4mg/mL, Cu^{2+} 농도 0.01mol/L)과 류산동(0.1mol/L)을 DMEM배지에 각이한 농도로 첨가하고 2~3대의 사람간엽성줄기세포를 접종하여 37°C의 탄산가스배양함에서 3일동안 배양하였다. 대조구에서는 간엽성줄기세포들이 조밀하게 있고 방추모양이었지만 콜라겐펩티드-동착화합물이나 류산동의 첨가농도가 높아짐에 따라 세포밀도가 성글어지고 모양은 점차 방추모양으로부터 타원모양으로 변화되었다. 이것은 콜라겐펩티드-동착화합물이나 류산동에 의하여 사람간엽성줄기세포들의 증식이 억제된다는것을 보여준다.

콜라겐펩티드-동착화합물 혹은 류산동이 사람간엽성줄기세포의 증식을 50% 억제하는 농도 IC_{50} 을 구하기 위하여 배양 3일후에 MTT법으로 세포증식억제률을 구한 결과는 표 1, 2와 같다.

표 1과 2에서 보는바와 같이 사람간엽성줄기세포의 증식을 50% 억제하는 콜라겐펩티드-동착화합물원액(40.4mg/mL)과 CuSO_4 원액(0.1mol/L)의 IC_{50} 은 각각 9.89, 0.04%였다. 다시말하여 배양액에 콜라겐펩티드-동착화합물이 4.0mg/mL로 들어있을 때(콜라겐펩티드와 착화합물을 이룬 Cu^{2+} 농도는 9.89×10^{-4} mol/L 또는 62.8mg/L), 또한 CuSO_4 이 4×10^{-5} mol/L (2.5mg/L)로 들어있을 때 사람간엽성줄기세포의 증식이 50% 억제되었다.

표 1. 콜라겐펩티드—동착화합물의 세포증식억제물

첨가농도/%	ΔA_{570}	세포증식억제물/%
0(대조)	0.422	0
8	0.244	42.2
10	0.209	50.5
12	0.189	55.2
14	0.174	58.8
16	0.146	65.4

콜라겐펩티드—동착화합물원액농도 40.4mg/mL

표 2. CuSO_4 의 세포증식억제물

첨가농도/%	ΔA_{570}	세포증식억제물/%
0(대조)	0.422	0
0.01	0.242	42.7
0.05	0.201	52.4
0.10	0.198	53.1
0.15	0.176	58.3
0.20	0.166	60.7

CuSO_4 원액농도 0.1mol/L

Cu^{2+} 이 콜라겐펩티드와 착화합물을 형성하였을 때와 무기이온상태로 있을 때 사람간엽성줄기세포의 증식을 50% 억제하는 농도는 약 25배 차이난다. 즉 Cu^{2+} 이 콜라겐펩티드와 착화합물을 형성하면 세포독성이 25배나 작아지고 그만큼 안전성이 높아진다.

2) 콜라겐펩티드—동착화합물의 안전성

콜라겐펩티드—동착화합물이 얼마만한 농도에서부터 세포에 대하여 안전하겠는가를 평가하기 위하여 무해농도 IC_5 를 구하였다. 콜라겐펩티드—동착화합물의 IC_5 값을 구하기 위한 분석결과는 표 3과 같다.

표 3. 콜라겐펩티드—동착화합물의 IC_5 값을 구하기 위한 분석결과

첨가농도/%	ΔA_{570}	세포증식억제물/%
0(대조)	0.422	0
0.5	0.428	-1.42
1.0	0.411	2.61
1.5	0.401	4.98
2.0	0.399	5.45
2.5	0.398	5.69

콜라겐펩티드—동착화합물원액농도 40.4mg/mL

표 3에서 보는바와 같이 콜라겐펩티드—동착화합물의 첨가농도가 0.5%일 때 세포증식억제률이 부의값으로 나왔는데 이것은 이 농도에서 세포증식이 약간 촉진된다는것을 보여주며 그것은 주로 콜라겐펩티드에 의한것이라고 볼수 있다. 콜라겐펩티드—동착화합물의 농도에 따르는 세포증식억제률사이의 그래프를 그리고 회귀직선을 얻어 무해농도 IC_5 를 구하면 1.53%이다. 콜라겐펩티드—동착화합물원액의 농도를 고려하면 콜라겐펩티드—동착화합물의 무해농도 IC_5 는 0.62mg/mL이

며 펩티드와 착화합물을 이룬 Cu^{2+} 의 농도로는 $1.53 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ (9.7mg/L)이다. 이 값은 세계보건기구가 음료수에서 Cu^{2+} 의 허용함량[2]으로 정한 1.0mg/L의 약 10배이며 이것은 콜라겐펩티드—동착화합물을 아주 안전한 Cu^{2+} 원천으로 리용할수 있다는것을 보여준다.

이상에서 본바와 같이 류산동은 사람간엽성줄기세포에 대하여 높은 독성을 나타내었는데 그 원인은 Cu^{2+} 이 히드록실라디칼과 같은 활성산소를 발생[3, 4]시키기때문이라고 볼수 있다. 콜라겐펩티드—동착화합물은 류산동보다 세포독성이 25배나 낮고 안전성이 훨씬 높는데 그 원인은 콜라겐펩티드가 Cu^{2+} 과 착화합물을 형성함으로써 히드록실라디칼과 같은 활성산소발생을 억제[1, 8]하기때문이라고 볼수 있다.

맺는 말

사람간엽성줄기세포의 증식을 50% 억제하는 콜라겐펩티드-동착화합물의 농도 IC_{50} 은 4.0mg/mL(해당 Cu^{2+} 농도는 62.8mg/L)로서 콜라겐펩티드-동착화합물의 세포독성이 무기 Cu^{2+} (IC_{50} 이 2.5mg/L)보다 25배 낮다.

사람간엽성줄기세포에 대한 콜라겐펩티드-동착화합물의 무해농도 IC_5 는 0.62mg/mL(해당 Cu^{2+} 농도는 9.7mg/L)로서 음료수에서 Cu^{2+} 의 허용농도 1.0mg/L의 약 10배이며 이것은 콜라겐펩티드-동착화합물을 안전한 Cu^{2+} 원천으로 리용할수 있다는것을 보여준다.

참고 문헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 63, 6, 133, 주체106(2017).
- [2] 김상태; 외국과학기술통보(환경보호), 2, 8, 1995.
- [3] Fumiko Hayakawa et al.; Biosci. Biotechnol. Biochem., 68, 9, 1825, 2004.
- [4] Kazuo Nakagawa et al.; Journal of Health Science, 53, 5, 591, 2007.
- [5] Laura Habasescu et al.; Rev. Roum. Chim., 58, 6, 501, 2013.
- [6] Lijuan Zhang et al.; Clinics in Dermatology, 27, 485, 2009.
- [7] Loren Pickart et al.; Journal of Aging Research and Clinical Practice, 1, 1, 13, 2012.
- [8] Yong-Liang Zhuang et al.; Food Technol. Biotechnol., 48, 2, 222, 2010.
- [9] Yuki Uzawa et al.; Health, 3, 3, 129, 2011.

주체107(2018)년 7월 5일 원고접수

Safety Estimation of Collagen Peptide-Copper Complex by Using Cytotoxicity Test

Phyon Jong Min, Kim Song Jik

The concentration (IC_{50}) of collagen peptide-copper complex inhibiting 50% against human mesenchymal stem cell proliferation is 4.0mg/mL and the corresponding Cu^{2+} concentration is 62.8mg/L. This indicates that collagen peptide-copper complex is 25 times less in cytotoxicity than inorganic Cu^{2+} .

Non-inhibiting concentration IC_5 of collagen peptide-copper complex against human mesenchymal stem cells is 0.62mg/mL and the corresponding Cu^{2+} concentration is 9.7mg/L, which is about 10 times of the limit concentration of Cu^{2+} in drinking water. This indicates that collagen peptide-copper complex can be used as safe Cu^{2+} source.

Key words: collagen peptide-copper complex, safety, cell reproduction, inhibiting rate