

Amino Acid Complex의 항노화 작용

김기호[†]·김기수·김영희·고강일·박선희·김진국·최현진·고수연·배윤주*·김용민

(주)바이올랜드 생명공학연구소, *(주)엘리드 피부과학연구소
(2006년 1월 18일 접수, 2006년 2월 11일 채택)

Anti-aging Effect of Amino Acid Complex on the Skin

Ki Ho Kim[†], Ki Soo Kim, Young Heui Kim, Kang Il Ko, Sun Hee Park, Jin Guk Kim,
Hyun Jin Chio, Su Yeon Ko, Yoon-Joo Bae*, and Yong-Min Kim

R&D Center, Bioland Ltd., 39-4, Songjeong, Byongchon, Cheonan-si, Chungnam 330-863, Korea

*Ellead Skin Research Center

(Received January 18, 2006; Accepted February 11, 2006)

요약: 피부 각질층내의 아미노산 조성비율과 유사한 조성비로 amino acid complex을 제조하고, 제조된 amino acid complex가 피부에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포 생존율, TIMP-1 발현 증가율, 보습 및 각질량 변화를 측정하였다. 연구 결과 amino acid complex는 독성이 없는 안전한 물질로 우수한 보습력 및 보습유지효과와 ascorbic acid와 유사한 TIMP-1 발현량 증가로 주름 예방 및 개선에 효과를 가지고 있으며, 각질량 감소 및 감소유지효과로 자극이 있는 AHA 대체 물질로의 가능성을 보였다. 따라서, amino acid complex는 다기능을 가진 노화방지 화장품 기능성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

Abstract: Amino acid complex was made with the composition of amino acids quite similar to that of stratum corneum on the skin. In order to evaluate the efficacy of amino acid complex on the skin as an active cosmetic ingredient, we measured cytotoxicity, TIMP-1 expression, moisturizing effect and the amount of horny substance. In cytotoxicity assay, amino acid complex did not show any cytotoxicity. In moisturizing effect test using corneometer, it showed very good moisturizing effect. In TIMP-1 mRNA assay using RT-PCR, amino acid complex showed the increase of TIMP-1 expression, suggesting that amino acid complex have anti-wrinkle effect. Therefore, amino acid complex may be useful as an active ingredient for anti-aging.

Keywords: amino acid, moisturizing, TIMP-1, anti-aging, cosmetic active ingredient

1. 서론

피부를 구성하고 있는 여러 층 가운데 외부 환경으로부터 신체를 보호하며 탄력있는 촉촉한 피부로 유지시켜 주는 가장 중요한 부분은 표피층이다. 표피층은 다시 각질층, 과립층, 유극층, 기저층으로 나뉘어지는데, 이 중 최외각에 있는 각질층(stratum corneum)은 핵이 없는 다각형의 편편한 세포로 이루어져 있으며, 케라틴이 주성분으로 아미노산, 당, 지방, 인지질, 스펅고지질, 콜레스테롤 등이 함유되어 있다[1]. 각질층(stratum corneum)은 외부 물질에 대해 선택적인 투과성을 가지고 있으며, 건조한

환경에서도 기능을 수행하기에 충분한 수분을 보유하고 있으며 피부의 탄력이나 유연성을 유지하는데도 대단히 중요한 역할을 한다[2]. 정상적인 피부의 각질층(stratum corneum)은 약 30% 정도의 수분이나 수용성 성분을 함유하고 있으나 각질층의 수분 함량이 20% 이하로 떨어지면 피부가 건조해지고 표면이 거칠어지기 시작하며 10% 이하가 되면 갈라지게 된다. 이를 예방하기 위해 피부는 수분을 함유할 수 있도록 각질층(stratum corneum) 내에 아미노산, 당류와 같은 천연보습인자(NMF, natural moisturizing factor)를 가지고 있으며 각질층의 수분 유지에도 중심적인 역할을 한다. 이러한 천연보습인자 조성물들은 각질세포(corneocyte) 안에 고농도로 존재하며, 각질층(stratum corneum) 건조중량의 20~30%를 차지하고

[†] 주 저자 (e-mail: biolandrmd@biolandkorea.com)

있다[3].

천연보습인자(NMF) 성분들 중 40%로 가장 많이 함유되어 있는 유리 아미노산(free amino acid)은[1] 케라토히알린(kerato-hyalin) 과립에서 유래되는 표피분화의 마지막 단계동안 생산되는 주요 세포 단백질인 필라그린의 분해에 의해 생성되는 대사산물이다[4-7]. 아토피 피부염(atopic dermatitis)이나 각질화의 무질서로 인해 생기는 각질화의 유전성질환인 어린선(ichthyosis)과 같이 피부 표면이 건조되는 징후를 가지는 피부병의 원인 중 하나는 각질층(stratum corneum) 안의 유리 아미노산(free amino acid)함량 감소에 따른 천연보습인자의 결핍이었다[8-10]. 또한 표피의 필라그린 생성이 감소되거나 결핍되어 있는 것도 보고되었다[11].

또한, 아미노산(amino acid)과 같은 천연보습인자의 양은 나이에 따라서도 놀랄만하게 감소한다. 전자 현미경상으로 관찰한 결과 나이든 피부에서 케라토히알린(kerato-hyalin) 입자들의 수가 감소한 것을 볼 수 있는데, 이것은 젊은 피부와 달리 나이든 피부에서는 적은 양의 천연보습인자가 존재해 있으며, 결과적으로 profilaggrin의 합성이 줄어들음을 의미하는 것이다. 더 나아가 배리어 기능이 감소하게 되어 천연보습인자의 손실은 더욱 가속화된다[12].

정상 피부에서도 일반적으로 사용하고 있는 비누사용시 쉽게 수용성 천연보습인자 성분들의 많은 양이 각질층으로부터 씻겨나가는데[13], 실제로 최근 *in vivo* 실험에서 대부분 목욕이나 자외선에 의한 각질층 손상으로 각질층의 가장 얇은 부분에 있는 천연보습인자 성분들 중 아미노산의 양이 줄어들었음을 증명하였다[14].

이 뿐만 아니라, 각질층의 유연성은 유연한 피부를 유지하고 겉모양을 밝게 보이게 하는 데 있어서 가장 중요한 역할을 하는데, 수분은 각질층의 유연성을 위해 필수적이며 그 양은 천연보습인자와 세포간 지질의 물 보유 능력과 근본적으로 관련이 있다. 예로, 천연보습인자 결핍시에 각질층의 탄력 회복을 위해서는 물 이외의 다른 대체 물질이 없다는 것을 증명하였다. 또, 한 예로 각질층에서 지질성분의 감소보다 수용성 성분의 감소에 의해서 피부의 탄력은 급속히 저하되며 이의 회복을 위해 아미노산을 처리한 경우 놀랄만하게 피부의 탄력이 회복되었음을 보였다[15].

이처럼, 피부 조직 중 각질층내에 함유되어 있는 일정 성분 비율의 아미노산은 보습, 원활한 각질화(keratinization) 및 피부의 유연성과 탄력 등에 관여하는 매우 중요한 성분으로, 손상이나 노화 요인들로부터 부족 또는 결핍되지 않도록 하는 것은 피부 노화 예방에 있어서 매우 중요한 일이다. 이러한 각질층의 아미노산 구성 성분은 H.P. Baden 등에 의하여 아미노산 성분 및 조성비율의

Table 1. Amino Acid Composition in Stratum Corneum [16].

Amino acids	Content (%)	Amino acid	Content (%)
Lysine	4.2	Alanine	4.4
Histidine	1.5	Valine	3.0
Arginine	3.8	Methionine	1.1
Aspartic acid	7.9	Isoleucine	2.7
Threonine	3.0	Leucine	6.9
Serine	13.6	Tyrosine	3.4
Glutamic acid	12.6	Phenylalanine	3.2
Proline	3.0	Halfcystein	1.2
Glycine	24.5	-	-

분석결과가 보고되어 있으며(Table 1)[16], 그 중 함량이 가장 높은 것은 글리신으로 알려져 있다. 본 연구에서는 피부의 각질층을 이루는 아미노산 조성 및 그 비율이 가장 이상적인 것으로 같은 비율로 공급 되었을 때 각질층의 수분 함유율이 최적으로 유지되고 피부세포의 정상적인 활성화와 유연성 및 탄력 유지에 도움을 주어 피부노화 방지 효과를 나타낼 수 있다는 가정을 하고, 외부에서 피부 각질층내의 아미노산 성분비율과 유사하게 만든 조성물을 피부에 적용한 결과를 보고하고자 한다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 실험재료

Amino acid complex 제조시 사용되는 아미노산은 모두 시약급(Sigma, U.S.A.)으로 구매하여 제조하였으며 세포 생존율은 사람표피 세포인 HaCaT 세포로 MTT assay를 사용하여 측정하였다. 보습 지속력과 각질량 감소 측정은 Corneometer (CM825 Couage & Khazaka, Germany)와 visioscan (VC98 Couage & Khazaka, Germany)을 각각 사용하였으며, TIMP-1 발현량 측정은 trizol (Invitrogen, U.S.A.)을 사용하여 mRNA를 분리하였으며, All-in-one RT-PCR kit (Superbio, Korea), RT-PCR (Biorad, U.S.A.)을 사용하였다.

2.2. Amino Acid Complex의 제조

Amino acid complex는 lysine, histidine, arginine, aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, cysteine을 각질층 조성비와 유사하게 제조하였다. 용매로는 정제수를 사용하였으며, 그 외의 어떠한 첨가물도 넣지 않았다. 마지막으로 0.2 μ m 필터로 여과한 후 모든 실험에 사용하였다. Amino acid complex의 고형분은 2.0%이다.

Table 2. Lotion Formulation

No.	Material	Composition (%)	
		Control	Experimental
1	Amino acid complex	-	5.0
2	Sitosterol	1.70	1.70
3	Polyglyceryl 2-oleate	1.50	1.50
4	Ceramide	0.7	0.7
5	Ceteareth-4	1.2	1.2
6	Cholesterol	1.5	1.5
7	Dicetylphosphate	0.4	0.4
8	Glycerin	5.0	5.0
9	Sunflower oil	10.0	10.0
10	Carboxyvinylpolymer	0.2	0.2
11	Xanthan Gum	0.3	0.3
12	Water	residue	residue

2.3. 로션제형 제조

실험에 사용된 로션제형은 Table 2와 같은 조성과 비율로 호모믹서를 사용하여 제조하였다.

2.4. 세포 생존율 측정

10% FBS (fetal bovine serum, GIBCO BRL)를 함유하는 DMEM (Dulbecco's modified eagles medium)로 배양된 사람 피부 표피세포인 HaCaT를 사용하여 세포생존율을 측정하였다. 5×10^4 cell/well의 밀도로 24 well plate에 seeding 후 37°C, 5% CO₂의 조건에서 24 h 배양하였다. 10% FBS를 함유한 DMEM 배지와 FBS를 함유하지 않은 DMEM 배지를 사용하여 교체한 후, 농도별로 제조된 amino acid complex를 첨가하였다. 세포들은 3일 동안 배양 후, MTT assay에 의해 생존율을 측정하였다[17]. 배지를 뽑아낸 후 MTT 용액(0.33 mg/mL)을 각 wells에 1 mL 씩 첨가한 다음 4 h 동안 배양하였다. 형성된 Formazan은 MTT 용액을 제거하고 DMSO를 사용하여 녹인 다음 96 well plate에 200 μ L씩 옮겨 ELISA-reader (TECAN, Austria)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. TIMP-1 mRNA 발현량 측정

10% FBS를 함유하는 IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium)로 배양된 human skin fibroblast인 CRL-2076(ATCC, U.S.A.)를 사용하여 1×10^5 cell/60 ϕ dish의 밀도로 seeding 후 37°C, 5% CO₂의 조건에서 24 h 배양하였다. 2% FBS를 함유한 IMDM으로 교체한 후, 농도별로 제조된 amino acid complex를 첨가하였다. 음성대조군으로는 용매를 사용하였고, 양성 대조군으로는 아스코르브산과 EGCG (epigallocatechin gallate)를 사용하였다. 시료처리 4 h 후 음성 대조군을 제외한 모든 시료에 SNP를 처리한 다음 24 h 동안 배양 후 배지를 제

거하고 Trizol 1 mL을 사용하여 RNA를 분리하였다. UV-spectrometer를 사용하여 260 nm에서 단백질을 정량한 후 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)을 실시하였다. RT-PCR은 all-in-one RT-PCR kit를 사용하였으며, primer와 반응조건은 TIMP-1 (tissue inhibitor matrixmetaloproteinase-1)은 sense : 5'-ATCC-TGTTGTTGCTGTGGC TGATA-3', antisense : 5'-TGCTGGGTGGTAACTATTTATTTCA-3'이며, 50°C에서 30 min간 역전사 후 96°C에서 3 min간 역전사 효소를 불활성화, 94°C 1 min, 48°C 1 min, 72°C 1 min간 29 cycle로 PCR 반응시켰다. Actin은 sense : 5'-GAGACCTTC-AACACCCCAGCC-3', antisense : 5'-GGCCATCTCTTGC TCGAAGTC-3'로 50°C에서 30 min간 역전사 후 96°C에서 3 min간 역전사 효소를 불활성화, 94°C 1 min, 62°C 1 min, 72°C 1 min간 22 cycle로 PCR 반응시켰다. Agarose gel을 사용하여 전기영동을 실시 한 후 gel image analyzer (BIO-Rad Gell DOC 2000)를 이용하여 상대적인 발현양을 비교하였다.

2.6. 보습 지속력 측정과 각질량 측정을 위한 피험자 선정

인체적용시험은 피험자의 병력조사, 피부의 이학적 검사 등을 통하여 시간변화에 따른 피부수분 및 각질량 변화 측정을 위하여 피험자 선정기준에 부합되고 제외기준에 해당되지 않는 5명을 대상으로 시행하였다. 피험자들은 본 인체적용시험 연구에 대한 서면 동의서에 서명하였으며 평가 완료 전까지 피험자는 자신이 사용한 제품에 대한 정보를 알지 못하였다. 피험자 선정 및 제외 기준은 다음과 같다.

가. 피험자 선정기준

- 1) 20~55세의 여성
- 2) 임상시험부위에 현 병력 및 과거력상 아토피 피부염 혹은 다른 심한 피부질환의 병력이 없는 건강한 피부를 가진 자
- 3) 연구 기간 동안 방문 일정이 가능하고 연구 지시를 따를 수 있는 자
- 4) 시험 시작에 앞서 시험 내용 등에 대해 이해하고 서면 동의서에 서명한 자
- 5) 보습바디클렌저를 사용 안하는 자

나. 피험자 제외기준

- 1) 화장품, 의약품에 자극이나 알러지가 있는 경우
- 2) 시험에 영향을 줄 수 있는 질환을 가진 자, 가졌던 자
- 3) 최근 3개월 이내 피부과 치료를 받은 자
- 4) 최근 3개월 이내에 스킨 스케일링이나 피부관리를 받은 자

인체적용시험 기간 중에는 본 연구소에서 지급한 제품 외에 시험결과에 영향을 미칠 수 있는 비누, 클렌징을 사용한 세안 등을 일체 금하였다.

2.6.1. 보습 지속 효과 측정

5명의 피험자를 대상으로 아침에 비누 및 일체의 세정제를 사용하지 않고 샤워를 한 뒤 연구소를 방문하여, 양쪽 팔꿈치 부위를 흐르는 물로만 세정하도록 하였다. 위치를 고정하고 양쪽 팔꿈치에 1.5×1.5 cm의 사각형을 그렸다. 세정 후 항온항습실(온도 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $45 \pm 5\%$)에서 30 min간 대기한 뒤 양쪽 팔꿈치를 Corneometer (CM825 Courage & Khazaka, Germany)로 정전용량(capacitance)을 5회 측정하고, 최대 최소를 제외한 3개의 측정치의 평균을 구하였다[18-21]. 같은 로션 제형에 amino acid complex가 5% 함유되어 있는 시험제품을 오른쪽 팔꿈치에, 함유되어 있지 않은 대조제품을 왼쪽 팔꿈치에 2 mg/cm^2 의 용량으로 도포하고 충분히 흡수되도록 하였다. 1일, 2일, 3일 경과 후 0일과 동일한 방법으로 대기한 후 Corneometer로 시험부위를 측정하고 시료를 도포하였다. 마지막 시료도포가 끝나고 2일 경과 뒤 6일에 시험부위를 측정하였다. 측정결과를 이용하여 시험 제품의 시험 전 후 차를 구하고 유의차를 paired t-test를 이용하여 유의차 5%로 검증하였다. 무도포 시험 부위와 각각의 시험 제품을 도포한 부위와는 independent t-test를 이용하여 통계적 유의차 5%로 검증하였다.

2.6.2. Visioscan을 이용한 각질량 측정

각질량 측정은 보습측정을 하고 난 후 바로 Visioscan (VC98 Courage & Khazaka, Germany)으로 영상을 촬영하고[22,23], 각질량의 변화를 Visioscan software 2000으로 분석하였으며, 그 결과는 desquamation score를 통해 나타내었다. 통계처리는 보습 측정시와 같은 방법을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포 생존율에 미치는 영향

Amino acid complex의 세포 생존율은 MTT assay를 사용하여 측정하였다. MTT assay는 살아있는 세포의 수를 측정함으로써 세포 증식이나 독성에 많이 사용되는 실험법으로 살아있는 세포는 미토콘드리아내에서 수용성이고 노란색의 염인 MTT (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)가 숙신산탈수소효소에 의해 수용용성인 파란색의 formazan 유도체로 환원되는 원리를 이용하는 것이다[17]. FBS가 10% 함유되어 있는 배지를 사용한 경우 적용 농도에서 독성이 없음을 확

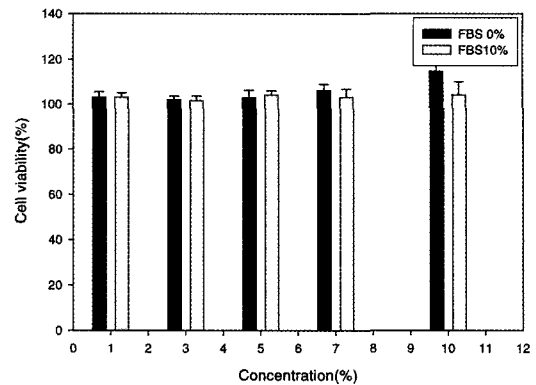


Figure 1. Cell viability of amino acid complex to HaCaT cells. The data were expressed as mean values (\pm standard deviations) of five experiment.

인할 수 있었고, 그 결과를 Figure 1에 나타내었다. 적용 농도는 1%(v/v), 3%(v/v), 5%(v/v), 7%(v/v), 10%(v/v)로 각각의 세포 생존율은 105%, 103%, 104%, 102.6%, 103.5%로 amino acid complex를 고농도로 처리한 경우에서도 생존율에 영향을 미치지 않았다. FBS를 0% 함유되어 있는 배지를 사용한 경우 세포의 생존율은 적용한 모든 농도에서 100% 이상의 생존율을 보여 독성을 관찰할 수 없었다. 특히, FBS가 0% 함유되어 있는 열악한 환경에서 amino acid complex 10%(v/v) 처리한 경우에 FBS가 10% 함유되어 있는 좋은 환경에서의 세포들보다 오히려 약 15% 정도의 세포 생존 증가율을 보였다. 이는 정상피부가 아닌 경우 적정 농도 처리시에 세포 생존율 증가로 인해 정상피부로 빨리 회복될 수 있음을 시사하였다.

3.2. TIMP-1 mRNA 발현량

Amino acid complex의 TIMP-1 발현율을 측정하였다. MMPs는 피부의 진피내에 있는 하나 또는 둘 이상의 세포외기질(extracellular matrix, ECM)을 절단한다[24]. 그 중, MMP-1은 섬유아세포, 마크로파지, 내피세포, 케라티노사이트와 같은 세포에서 생산되며[25], collagen type I과 III의 Gly⁷⁷⁵-Leu⁷⁷⁶에 높은 친화성을 가지고 있어 콜라겐 분해의 첫 단계를 유발한다[26]. 피부 진피를 구성하고 있는 콜라겐 중 대부분을 차지하는 type I을 절단하여 피부 주름 생성에 관여하는 MMP-1에 대한 저해 효소인 TIMP-1의 mRNA 발현량을 측정함으로써 피부 주름 생성 억제에 대한 효과를 알아보았다. Human skin fibroblast를 배양 후 trizol을 사용하여 RNA를 분리, 정량 후 RT-PCR을 실시하였고, 그 결과는 전기 영동으로 알아보았다. 음성 대조군으로는 물을 사용하였고, 양성 대조군으로는 주름 개선에 효과가 있는 시료로 아스코르브산 $150 \mu\text{M}$, EGCG ((-)-epigallocatechin-3-gallate) $25 \mu\text{M}$ 의 농도로

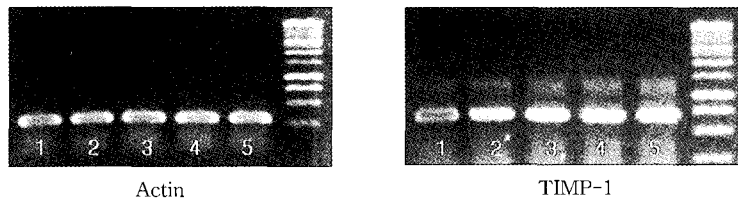


Figure 2. The effect of amino acid complex on the expression of TIMP-1 mRNA in the human skin fibroblast cells. The cells were incubated with control (water, lane 1), amino acid complex 5% (lane 2), amino acid complex 7% (lane 3), ascorbic acid 150 μ M (lane 4) and EGCG 25 μ M (lane 5) for 3 days. RT-PCR for TIMP-1 gene was performed on RNA extracts.

제조하여 사용하였다. 실험 결과 amino acid complex는 각각의 적용 농도에서 TIMP-1의 mRNA 발현율을 증가시켰다. 5% 적용시에 139.5%의 증가율을, 7% 적용시에는 177.25%의 증가율을 보였으며 이 결과는 Figure 2에 나타내었다. 양성 대조군으로 사용된 아스코르브산은 180.9%로 amino acid complex 7% 적용시와 비슷한 발현 증가율을 보여 주름생성 억제 효과가 있음을 보여 주었고, EGCG는 201.9%로 가장 좋은 효과를 보였다.

3.3. 보습 지속 효과 측정

Amino acid complex의 보습 효과는 Corneometer를 사용하여 측정하였다. 보습 측정을 위한 지원자는 5명이었으며, 평균나이는 29.2세이었다. 실험을 위한 시료로 amino acid complex를 5% 함유한 로션제형을 실험군으로 하고, 함유하지 않은 로션 제형을 대조군으로 하여 사용하였다. 실험군은 오른쪽 팔꿈치에 2 mg/cm²의 용량으로 도포하고 충분히 흡수되도록 하였다. 도포는 0일, 1일, 2일, 3일 하였으며 도포하기 전 Corneometer를 사용하여 측정하고, 4일, 5일은 도포하지 않고 6일째 측정하였다. 양쪽 팔꿈치에 해당하는 실험군 도포부위와 대조군의 도포 부위를 일변화에 따라 측정된 결과를 Table 3과 Figure 3에 나타내었다. 시험제품 도포 부위는 대조군과 비교하여 볼 때 사용 전에 비하여 제품 도포 3일 동안 통계적으로 유의한 수준(p < 0.05)의 우수한 보습 효과를 나타냈다. 또한 제품 사용을 중단하고 3일 뒤 역시 사용 전에 비해 통계적으로 유의한 수준(p < 0.05)의 보습개선효과를 나타내었다.

Amino acid complex는 우수한 보습효과를 보였으며, 도포를 중단하고 3일 후에도 보습효과가 지속됨을 관찰할 수 있었다. 따라서 단순도포에 의한 필름형성으로 인한 경피피부 손실 방지가 아니라 amino acid complex가 경피 수분 손실에 의해 부족해진 NMF 성분의 보충 또는 뭉쳐지거나 분리된 케라틴 섬유의 배열에 영향을 미쳐 보습능을 회복시키거나 유지하는 것으로 생각된다.

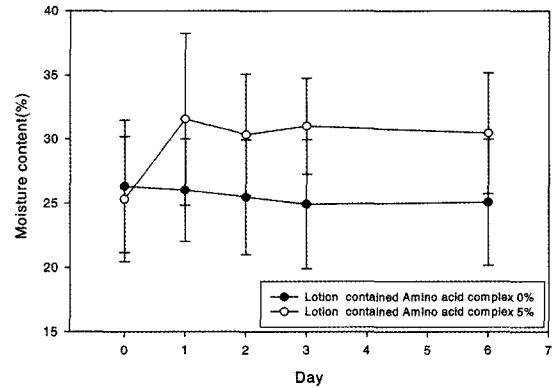


Figure 3. The moisturizing effects of the lotion formulations on the skin.

Table 3. Moisture Content (%) of Lotion Formulation Measured by Corneometer CM825

Time (day)	Moisture content (%)	
	Control*	Experimental**
Before application	26.32 ± 5.15	25.32 ± 4.87
1	26.01 ± 3.99	31.54 ± 6.69
2	25.48 ± 4.46	30.34 ± 4.76
3	24.94 ± 5.01	31.00 ± 3.75
6	25.08 ± 4.91	30.46 ± 4.72

* Control : lotion + amino acid complex 0%

** Experimental : lotion + amino acid complex 5%

3.4. 각질량 변화 측정

Amino acid complex의 각질량 변화 측정은 보습 측정 후 즉시 Visioscan을 사용하여 측정하였다. 보습 측정과 같이 시료 도포 전(0일) 1, 2, 3, 6일 경과 뒤 시료처리 후의 변화를 desquamation score로 나타내었으며, 결과는 Table 4 및 Figure 4, 5에 나타내었다. 시험제형의 도포 전과 후 1, 2, 3일 모두에서 대조제형과 비교하여 현저하게 각질량 감소효과를 나타내었으며, 시험제품 사용을 중단하고 3일 경과 뒤에서는 각질량이 도포시보다 늘어났으나 대조군과 비교하여 볼 때 각질 감소효과가 유지됨을

Table 4. Desquamation Score on the Skin before and after the Treatments of the Lotion Formulations

Time (day)	Desquamation score		
	Control*	Experimental**	
Before application	2.76 ± 0.72	3.69	1.71
1	2.88 ± 0.87	1.22	0.38
2	3.34 ± 0.79	1.05	0.61
3	3.49 ± 1.29	1.11	0.47
6	3.19 ± 1.42	2.32	0.85

* Control : lotion + amino acid complex 0%
 ** Experimental : lotion + amino acid complex 5%

보였다. Desquamation score 변화는 통계적으로 유의한 수준($p < 0.05$)의 차이를 관찰할 수 있었다. 각질량은 적용 후 1일 후 약 70% 정도 줄어 가장 많은 감소 효과를 보였으며, 적용 기간 동안 비슷한 수준의 효과를 유지하였으나 도포중단 3일 후인 6일째에는 도포시보다 각질량이 다소 늘어 도포 전보다 약 30%의 감소효과를 보였다. 그러나, 도포전보다는 좋은 효과를 보여 묵은 각질의 제거로 피부결을 곱고 부드럽게 정리해주며, 피부색 개선효과 효과도 예상된다. Figure 5에서 보여 주듯이 시험 기간 동안 대조제형을 처리한 도포부위는 별 다른 변화를 보이지 않았다. 시험제형을 처리한 경우에는 피험자들마다 약간의 차이는 보였지만 과다 각질이 생성되어 있는 피험자의 경우 놀랄만한 개선효과를 보였으나, 정상적이

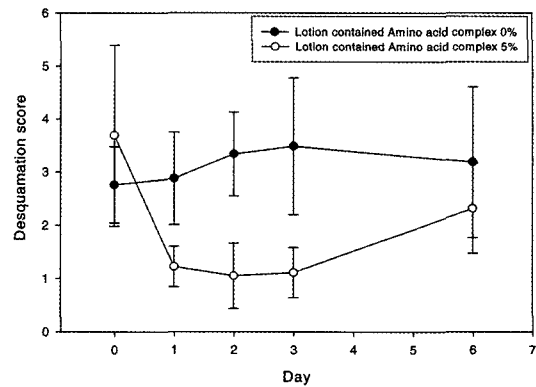


Figure 4. The results of daily effect of the lotion formulations on the decrease of horny substance in the skin to be treated.

거나 적은 양의 각질을 가진 피험자의 경우에는 큰 변화를 보이지 않았다. 한편, 각질 제거 및 어린선 등의 여러 각화 이상의 피부 질환에 치료 효과를 위해 일반적으로 사용되고 있는 AHA는 K. Y. Shin 등의 연구에서 농도를 달리한 AHA를 24 h 국소 도포시 농도에 비례하여 경표피수분손실(TEWL)의 증가를 보고하였고[27], J. Y. Lee 등의 연구에서도 홍반지수(E-index)와 경피수분손실(TEWL)이 도포일수에 비례하여 증가함을 보고하였다[28]. 또한, tape stripping 후 Hilltop chamber을 이용한 자상 검사에

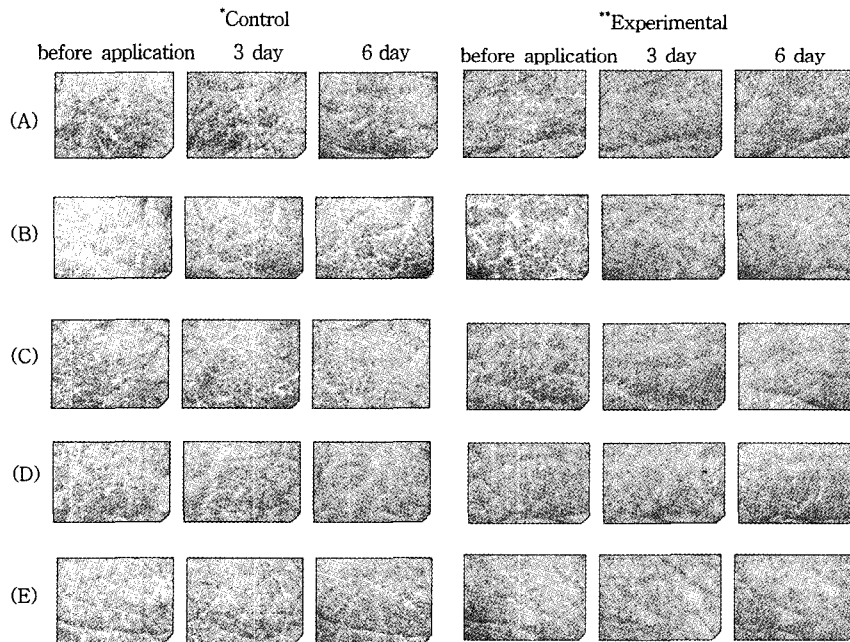


Figure 5. The visioscan profiles of daily horny substance changes in the volunteers' skin to be treated with the lotion.

* Control : lotion + amino acid complex 0%,
 ** Experimental : lotion + amino acid complex 5%

의한 자극을 측정된 결과 민감성 피부는 건강한 피부보다 시간이 지남에 따라 수치의 큰 차이를 보였다[29]. 이렇듯 AHA는 피부자극의 문제점을 가지고 있으나 amino acid complex는 고농도 처리시에도 자극이 없어 민감한 피부에 적용하기 좋은 결과라 할 수 있다.

4. 결 론

피부 각질층의 아미노산 조성비와 유사하게 제조한 amino acid complex가 피부에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 임상실험을 통한 보습과 각질량 감소효과, TIMP-1의 mRNA 발현량과 세포 생존율 실험을 실시하였다. 사람 표피세포를 이용하여 FBS 함량에 따른 세포 생존율을 실험한 결과 FBS가 0%와 10% 함유되어 있는 배지를 사용하여 세포 생존율을 측정된 결과 amino acid complex를 처리한 전 농도에서 독성을 보이지 않았다. 또한, FBS가 0% 함유되어 있는 열악한 환경에서 amino acid complex 10% 처리시 FBS가 10% 함유되어 있는 좋은 환경에서의 세포들보다 오히려 약 15% 정도의 세포 생존율을 증가를 보였다. RT-PCR을 이용한 주름 생성에 관여하는 MMP-1을 저해하는 TIMP-1의 mRNA 발현량을 측정된 결과 7% 농도에서 177.2%의 발현 증가율을 보여 주름 개선 효과가 있는 ascorbic acid 150 μ M의 농도에서 180.9% 로 비슷한 발현량 증가율을 보였다. 5명의 지원자에게 amino acid complex가 5% 함유된 로션제형과 함유되지 않은 로션제형을 0일, 1일, 2일, 3일 도포한 후 보습 효능을 Corneometer로, 각질량 감소효과를 Visioscan을 사용하여 측정된 결과 도포 3일 동안 우수한 보습력과 약 70%의 각질 감소효과를 나타내었으며, 4일, 5일은 도포하지 않고 6일째 측정시에도 도포시와 유사한 보습력을 유지하였으며, 도포전보다 약 30%의 각질 감소효과를 나타내었다. 이 결과들을 종합하여 볼 때 amino acid complex는 독성이 없는 안전한 물질로 우수한 보습력과 TIMP-1 발현량 증가로 주름 예방 및 개선에 효과를 가지고 있으며, 각질량 감소효과로 자극이 있는 AHA 대체 물질로 가능성을 보였다. 따라서, amino acid complex는 다기능을 가진 노화방지 화장품 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. A. V. Rawling and C. R. Harding, Moisturizing and skin barrier function, *Dermatol. Ther.*, **17**, 43 (2004).
2. A. V. Rawlings and P. J. Matts, Stratum corneum moisturization at the molecular level: An update in relation to the dry skin cycle, *Dermatol. Founda-*
3. S. J. Trianse, The search for the ideal moisturizer, *Cosmetics Perfumery*, **89**, 57 (1974).
4. C. Katagiri, J. Sato, J. Nomura, and M. Denda, Changes in environmental humidity affect the water-holding property of the stratum corneum and its free amino acid content, and the expression of filaggrin in the epidermis of hairless mice, *J. Dermatol. Sci.*, **31**, 29 (2003).
5. I. R. Scott, C. R. Harding, and J. G. Barrett, Histidine-rich proteins of the keratohyalin granules: source of free amino acids, urocanic acid and pyrrolidone carbonic acid in the stratum corneum, *Biochem Biophys. Acta*, **719**, 110 (1982).
6. I. Horii, K. Kawasaki, J. Koyama, K. Okazaki, and M. Seiji, Histidine-rich proteins as a possible origin of free amino acids of stratum corneum, *Curr. Probl. Dermatol.*, **11**, 301 (1983).
7. R. D. Ball, G. K. Walker, and I. A. Bernstein, Histidine-rich proteins as molecular markers of epidermal differentiation, *J. Biol. Chem.*, **253**, 5861 (1987).
8. M. Takahashi and Z. Ikezawa, Dry skin in atopic dermatitis and patients on hemodialysis. In: M. Loden, H. Maiback, editors Dry skin and moisturizers: Chemistry and Function. Boca Raton: CRC Press, 135-146 (2000).
9. M. Tanaka, M. Okada, Y. X. Zhen, N. Inamura, T. Kitana, S. Shirai, K. Sakamoto, T. Inamura, and H. Tagami, Decreased hydration state of the stratum corneum and reduced amino acid content of the skin surface in patients with seasonal allergic rhinitis, *Br. J. Dermatol.*, **139**, 628 (1998).
10. V. P. Sybert, B. A. Dale, and K. A. Holbrook. Ichthyosis vulgaris: identification of a defect in synthesis of filaggrin correlated with an absence of keratohyalin granules, *J. Invest. Dermatol.*, **184**, 191 (1985).
11. T. Seguchi, C. Y. Cui, S. Kusuda, M. Takahashi, K. Aisu, and T. Tezuka, Decreased expression of filaggrin in atopic skin, *Arch. Dermatol. Res.*, **288**, 442 (1996).
12. R. Ghadially and B. E. Brown, Sequeiramartin The aged epidermal permeability barrier-structural, functional and lipid biochemical abnormalities in human and a senescent murine model, *J. Clin. Invest.*, **95**,

- 2281 (1995).
13. I. R. Scott and C. R. Harding, A filaggrin analogue to increase NMF synthesis (abstract), *Dermatol.*, 773 (1993)
 14. P. J. Caspers, G. W. Lucassen, E. A. Carter, H. A. Bruining, and G. J. Puppels, *In vivo* confocal Raman microspectroscopy of the skin; noninvasive determination of molecular concentration profiles, *J. Invest. Dermatol.*, **116**, 434 (2001).
 15. Y. Jokura, S. Ishikawa, H. Tokuda, and G. Imokawa, Molecular analysis of elastic properties of the stratum corneum by solid-state ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 806 (1995).
 16. H. P. Baden, L. A. Goldsmith, and B. Fleming, A comparative study of the physicochemical properties of human keratinized tissues, *Biochem. Biophys. Acta*, **322**, 269 (1973).
 17. Y. P. Keepers, P. E. Pazio, G. T. Peters, J. A. Otte, B. Winograd, and H. M. Pinedo, Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium(MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing, *Eur. J. Cancer*, **27**, 897 (1991).
 18. S. H. LEE, J. Chung, S. K. Ahn, J. S. Kang, and O. K. Kwon, Comparative measurement of skin surface hydration using a Hydrometer and Corneometer, *Kor. J. Dermatol.*, **32**(4), 599 (1994).
 19. S. A. Wissing and R. H. Muller, The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity-in vivo study, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **56**, 67 (2003).
 20. G. Kampf, M. Muscatiello, D. Hantschel, and M. Rudolf, Dermal tolerance and effect on skin hydration of a new ethanol-based hand gel, *J. Hospital. Infection*, **52**, 297 (2002).
 21. P. G. Sator, J. B. Schmidt, and H. Honigsmann, Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **48**(3), 352 (2003).
 22. M. F. Boeniger, Comparison of three methods for determining removal of stratum corneum using adhesive tape strips, The international conference on occupational and environmental exposures of skin to chemicals : science & policy, Sep. 8-11 (2002).
 23. L. Petit, L. Fogouang, I. Uhoda, S. Smitz, C. Pierard-Franchimont, and G. E. Pierard, Regional variability in mottled subclinical melanoderma in the elderly, *Exp. Gerontol.*, **38**, 327 (2003).
 24. K. Sylvie, W. Wen-Rou, S. Gabriel, and K. Irene. Effects of UVR and UVR-induced cytokines on production of extracellular matrix proteins and proteases by dermal fibroblasts cultured in collagen gels, *Photochem. Photobiol.*, **79**(1), 86 (2004).
 25. E. A. Bauer, G. P. Stricklin, J. J. Jeffrey, and A. Z. Eisen, Collagenase production by human skin fibroblast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64**, 232 (1975).
 26. E. J. Miller, E. D. Harris, E. Chung, J. E. Finch, and W. T. Butler, Cleavage of type II and III collagens with mammalian collagenase: site of cleavage and primary structure at the NH₂-terminal portion of the smaller fragment released from both collagen, *Biochem.*, **15**, 787 (1991).
 27. K. Y. Shin, C. W. Park, and C. H. Lee, Cutaneous irritation to alpha hydroxy acid in normal human skin, *Kor. J. Dermatol.*, **36**(6), 1012 (1998).
 28. J. Y. Lee, C. W. Park, and C. H. Lee, Cutaneous irritation due to repeated topical application of alpha hydroxy acid, *Kor. J. Dermatol.*, **38**(12), 1598 (2000).
 29. W. J. Lee, Y. H. Jang, D. W. Kim, S. J. Lee, G. Y. Na, and S. L. Chung, Comparison of results of lactic acid sting tests between sensitive skin and nonsensitive skin after tape stripping, *Kor. J. Dermatol.*, **42**(5), 527 (2004).