

Isoquercitrin의 세포 보호 작용과 피부 흡수 증진을 위한 리포솜 제형 연구

조 나 래 · 구 현 아 · 박 수 아 · 한 셋 별 · 박 수 남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과 나노바이오화장품연구실 화장품융합기술연구소
(2012년 3월 29일 접수, 2012년 5월 17일 수정, 2012년 6월 12일 채택)

Cellular Protective Effect and Liposome Formulation for Enhanced Transdermal Delivery of Isoquercitrin

Na Rae Jo, Hyun A Gu, Su Ah Park, Seat Byeol Han, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Nanobiocosmetic laboratory, and Cosmetic R&D center,
Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongreung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea
(Received March 29, 2012; Revised May 17, 2012; Accepted June 12, 2012)

요약: 본 연구에서는 H₂O₂와 rose bengal로 처리된 HaCaT 세포에 있어서 isoquercitrin의 세포 보호 효과를 조사하였다. Isoquercitrin의 피부 전달시스템으로 에토솜 및 탄성 리포솜을 제조하고 입자크기, 포집효율 및 피부 흡수 증진 능력을 평가하였다. Isoquercitrin은 HaCaT 세포에 대해 50 μ M의 농도에서 독성을 나타내지 않았다. 5 mM의 H₂O₂ 및 25 μ M의 rose bengal로 HaCaT 세포를 처리하였을 때 isoquercitrin은 산화적 손상에 대하여 농도 의존적(6.25 ~ 50 μ M)으로 세포 보호 효과를 나타내었다. 0.03 % Isoquercitrin을 담지한 에토솜의 입자 크기는 222.85 nm, 포집효율은 82.26 %였다. 0.03 % isoquercitrin 함유 에토솜은 제조 후 2주일 동안 안정하였고, 일정한 입자 크기를 유지하였다. 피부 투과 실험 결과 에토솜은 일반 리포솜이나 에탄올 용액에서 보다 우수한 피부 투과능을 보여주었다. 0.1 % Isoquercitrin을 담지한 탄성 리포솜의 최적의 제형은 입자 크기(341.2 nm), 가변형성(59.89), 포집효율(54.3 %) 및 피부투과능 (초기 적하량 대비 54.4 %) 확인을 통해 인지질 대 계면활성제의 비율이 85 : 15인 제형이 가장 우수한 탄성 리포솜 제형임을 나타내었다.

Abstract: In this study, the cellular protective effect of isoquercitrin against H₂O₂ and rose bengal-induced HaCaT cell damage was investigated. The ethosome and elastic liposome for enhanced transdermal delivery were prepared. Particle size, loading efficiency and cumulative permeated amounts of them were evaluated. Isoquercitrin didn't show any characteristic cytotoxicity at 50 μ M. When HaCaT cells were treated with 5 mM H₂O₂ and 25 μ M rose bengal, isoquercitrin protected the cells against the oxidative damage in a concentration dependent manner (6.25 ~ 50 μ M). The size of 0.03 % isoquercitrin loaded ethosome was 222.85 nm and the loading efficiency was 82.26 %. The ethosome loaded with 0.03 % isoquercitrin was stable and maintained the constant particle size for 2 weeks after being prepared. The ethosome exhibited more enhanced skin permeability than general liposome and ethanol solution. The optimal ratio of lipid to surfactant of 0.1 % isoquercitrin loaded elastic liposomes was observed to be 89 : 5 through evaluating particle size (341.2 nm), deformability index (59.89), loading efficiency (54.3 %), and skin permeability (54.4 %).

Keywords: isoquercitrin, cellular protective effect, ethosome, elastic liposome

1. 서 론

피부노화는 다양한 내인성 및 환경적인 영향에 의한

요인들에 의해 형태학적, 화학적인 변화가 수반되면서 나타난다. 이러한 변화는 내인성 노화 과정에서도 나타나지만 광노화에 있어서는 주로 자외선에 의한 피부에서의 반응으로 나타난다[1]. 특히 피부는 신체의 최외각층에 존재하기 때문에 항상 산소와 접촉하고 있고 또한 자

[†] 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

외선에 쉽게 노출되어 피부에서는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성될 수 있다. 활성산소는 피부노화의 주요한 원인 물질로 작용한다. 피부세포 및 조직 손상을 유발하는 주요한 활성산소는 $^1\text{O}_2$ 과 $\cdot\text{OH}$ 등으로 알려져 있다. 특히 $^1\text{O}_2$ 은 수명이 짧고 반응성이 큰 분자로, 주로 광증감 반응으로 생성된다[2,3]. 또한 사람 피부 섬유아세포에서 $^1\text{O}_2$ 이 collagenase의 발현을 유발시키며 UVA로 유도된 MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)의 합성을 $^1\text{O}_2$ 이 매개할 수 있다고 보고되었다[4-6]. 콜라겐은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 가장 많은 성분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 주름생성이 수반되는 피부노화 과정 중에서 핵심이 되고 있다[7-9]. $^1\text{O}_2$ 및 $\cdot\text{OH}$ 외에도 피부에서 생성되고 피부노화에서 중요한 역할을 하는 활성산소로는 $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot\text{OR}$ 및 $\cdot\text{OOR}$ 등이 알려져 있다. 이들 활성산소종이 과도하게 생성되면 피부에 존재하는 효소 및 비효소적 항산화제가 파괴되고 이어 피부 항산화방어망이 붕괴된다. 이러한 산화적 스트레스가 계속되면 세포 및 조직이 손상되고 결과적으로 탄력감소, 주름 및 멜라닌 생성과 같은 피부노화가 가속화된다. 따라서 피부노화를 지연시키고 방지하기 위해서는 피부에서 생성된 활성산소를 효율적으로 제거하여 활성산소로부터 세포 및 조직을 보호할 수 있는 항산화제 개발이 필요하다[10-13].

피부는 다층구조를 가지며 크게 표피, 진피, 피하지방층으로 나눌 수 있다. 이 중 표피의 가장 바깥쪽에는 각질층으로 알려진 피부장벽이 존재한다. 이는 외부의 자극으로부터 피부 및 신체를 보호하는 중요한 역할을 하는 반면 활성 성분의 피부흡수에 있어 장애요인으로 작용한다. 따라서 피부노화의 지연 및 방지를 위한 효율적인 방안으로써 항산화제를 효과적으로 피부에 침투시키기 위한 방안이 필요하다.

리포솜은 활성 성분을 효율적으로 피부에 침투시킬 수 있는 전달체로 세포막 또는 각질층의 세포 간 지질과 구조적으로 유사한 지질 이중층으로 구성되어 있어 세포막과 융합하여 리포솜 내부의 활성 성분을 효과적으로 세포 내로 전달할 수 있다[14,15]. 그러나 리포솜을 이루고 있는 지질 이중층 막의 물리적 불안정성, 낮은 유화안정성, 활성 성분의 낮은 포집 효율 등의 문제점을 가지고 있다. 또한 활성물질의 피부 침투가 기대만큼 이루어지지 않아 그 효과가 제한적인 경우가 많다[16,17]. 이러한 문제점을 개선하기 위해 다양한 방안이 연구되어왔다. 특히 리포솜의 피부 흡수능을 높이기 위하여 피부 침투 시 입자 형태가 피부 각질층을 잘 투과할 수 있도록

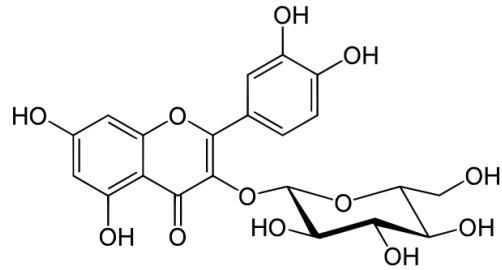


Figure 1. Chemical structure of isoquercitrin.

탄력적으로 변형이 쉬운 소포체를 만들고자 하는 시도가 이루어졌다. 이러한 예로 탄성 리포솜(elastic liposome), 에토솜(ethosome) 등이 있다[18-20].

에토솜은 피부 투과 증진제로 알려진 에탄올에 인지질을 용해시켜 만드는 베지클이다. 에탄올은 베지클 막의 유연성을 증가시켜 베지클 막의 변형을 유도하며 계면장력을 감소시켜 기존 리포솜에 비해 효과적으로 각질층을 투과할 수 있음이 보고되고 있다. 이러한 특징으로 인해 에토솜은 활성 성분의 피부 전달에 있어 효과적이고 더 깊은 곳까지 활성 물질을 전달하는 것으로 알려져 있다[17,21-24].

탄성 리포솜은 인지질과 계면활성제로 이루어진 지질 이중층 구조로 되어 있다. 계면활성제는 베지클의 지질 이중층 막을 약화시켜 베지클의 막의 변형이 쉽게 일어날 수 있도록 한다. 때문에 베지클의 이중층 막이 가변형성을 갖게 되어 외부에서 스트레스가 가해졌을 때 쉽게 변형될 수 있다[25]. 이러한 특징으로 인하여 탄성 리포솜은 기존 리포솜에 비해 각질층의 통과가 용이하며 피부 내에 활성 성분을 효과적으로 침투시킬 수 있는 것으로 알려져 있다[26].

플라보노이드는 식물계에 널리 존재하는 폴리페놀류의 물질로, 항바이러스, 항염증, 항산화 효과 등 다양한 생리활성을 갖으며 일반적으로 배당체 형태로 식물 조직에 존재한다[27]. 대표적인 플라보노이드로는 quercetin(3,3',4',5,7-penta-hydroxyflavone)이 있다. 이는 강력한 항산화 작용, 항염증, 항암, 항노화, 동맥 경화증 완화 등의 효과를 갖는 것으로 알려져 있다[28]. Isoquercitrin (quercetin 3-O- β -glucopyranoside)은 quercetin의 배당체이다(Figure 1). 이전의 연구에서 isoquercitrin은 항알러지[29], 항염증[30] 및 항산화 작용[31] 등 생물학적 활성이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 저자들의 연구실에서 수행한 최근 연구에서는 여뀌로부터 분리한 isoquercitrin 및 여뀌 추출물이 현저한 항산화 활성을 나

타내었고, UVB 조사에 의한 HaCaT 세포의 손상에 있어서도 큰 세포 보호 효과가 있음을 확인한 바 있다[32].

본 연구에서는 여쭌 성분인 isoquercitrin의 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과를 알아보기 위하여 HaCaT 세포에 광증감제인 rose bengal 처리를 통해 $^1\text{O}_2$ 을 발생 시키거나 H_2O_2 를 처리하여 산화적 손상을 유도하여 이에 대한 세포 보호 효과가 있는지를 확인하였다. 또한 isoquercitrin의 피부 흡수능 증진을 위해 이를 담지한 탄성 리포솜과 에토솜을 제조하고 이들 제형의 입자 크기, 안정성, 포집효율 및 피부 흡수능 향상에 대한 연구를 수행하였다. 이 연구들을 통해 isoquercitrin이 산화적 스트레스 조건에서 세포 보호 효과를 나타냄을 확인하고 isoquercitrin을 효과적으로 피부로 전달하기 위한 제형으로써 탄성 리포솜과 에토솜의 피부 투과 능력을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 기기 및 시약

실험에 사용한 인지질인 L- α -phosphatidylcholine (egg PC, ~ 60%) 및 isoquercitrin은 sigma (USA)사의 제품을 사용하였고, 에탄올과 클로로포름 등의 용매는 시판 특급시약을 사용하였다. 자외선 조사에 사용한 CL-1000 Ultraviolet Crosslinker는 UVP사(USA) 제품을 사용하였다. 리포솜 제형 제조 시에 회전 증발기 (Buchi, Switzerland)와 초음파 파쇄기(Branson, USA)를 사용하였고, 제형의 입자 크기는 ELS-Z (Otsuka, Japan)를 사용하여 측정하였다. 피부 투과 실험에 사용한 Franz diffusion cell은 PermeGear (USA)사의 9 mm Franz diffusion cell (receptor volume 5 mL)과 V6A Stirrer 모델을 사용하였다. 리포솜 제형에 포집된 isoquercitrin의 포집 효율과 피부 투과 양을 측정하기 위해 사용한 HPLC (high performance liquid chromatography)는 Shimadzu (Japan)사의 제품을 사용하였다. HPLC는 SHIMADZU (Japan)의 LC-20AT pump와 SPD-M20A UV-vis detector으로 구성되어 있으며, 컬럼은 Shimadzu (Japan)의 Shim-pack (VP-ODS) C18 analytical column (5 μm , 250 \times 4.6 mm)을 사용하였다. 리포솜의 가변형성 측정을 위하여 Mini Extuder (Avanti[®] Polar lipids)와 Syring pump (KDS330, Revodix Korea)의 제품을 사용하였다.

2.2. 세포 보호 효과 측정

2.2.1. 세포 배양

사람 각질형성 세포주인 HaCaT 세포는 Dr. Fusenig (German Cancer Research Center, DKFZ)로부터 분양 받아 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)는 10% fetal bovine serum (PAA, Austria), 1% penicillin-streptomycin (PAA, Austria)을 혼합하여 사용하였고, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

2.2.2. H_2O_2 처리

96 well plate에 1×10^4 cells/well로 부착시킨 HaCaT 세포에 정상배지 혹은 농도별 isoquercitrin이 함유된 배지를 넣고 1 h 배양 후, 5 mM H_2O_2 를 함유한 배지를 처리하여 30 min 동안 배양하였다.

2.2.3. Rose Bengal 처리

96 well plate에 1×10^4 cells/well로 부착시킨 HaCaT 세포에 정상배지 혹은 농도별 isoquercitrin이 함유된 배지를 넣고 1 h 배양 후, 25 μM rose bengal 를 함유한 배지를 처리하여 15 min 광조사 하였다.

2.2.4. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) assay로 측정하였다. 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용하여 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 방법으로 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다.

HaCaT 세포를 96 well plate에서 24 h 동안 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 조건으로 항온 배양한 후, 각 농도별로 isoquercitrin을 처리한 세포에 5 mM H_2O_2 , 25 μM rose bengal을 처리 하였다. 시료 처리 후, 24 h 동안 배양한 세포를 PBS로 세척하고 MTT 용액(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 첨가하여 3 h 동안 반응시킨 후, 생성된 formazan을 DMSO에 녹여 570 nm에서 측정하였다.

아무것도 처리를 하지 않은 비조사군을 음성대조군으로 하여 100% 기준으로 잡아 상대적인 세포 생존율을 구하였다. 시료를 처리하지 않은 조사군을 양성대조군으로 하였으며, 세포의 생존율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포생존율 (\%)} = \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.3. 제형 제조

2.3.1. 에토솜 제조

에토솜의 제조는 얇은 막 수화 방법을 사용하였다[33-35]. Egg PC (2 %, w/v)와 isoquercitrin (0.01 ~ 0.05 %, w/v)을 50 mL 둥근 바닥 플라스크에 넣고 클로로포름 10 mL와 메탄올 5 mL를 넣어 녹인다. 그 후에 회전 증발기(rotary evaporator)를 이용해서 유기 용매를 증발시킨다. 유기용매가 증발되면서 플라스크 벽면에 생긴 얇은 막에 20 % 에탄올 용액을 넣고 지질 전이 온도 이상에서 500 rpm으로 교반하며 수화시킨다. 이렇게 얻어진 에토솜이 좀 더 균일한 크기의 소포체가 되도록 해 주기 위해서 glass bead를 넣고 초음파 파쇄기를 30 min 간 가해준다.

2.3.2. 탄성 리포솜 제조

탄성 리포솜의 제조는 에토솜 제형 제조와 동일한 방법인 얇은 막 수화법에 의하여 다음과 같이 제조하였다. 50 mL 둥근 바닥 플라스크에 0.1 % isoquercitrin을 넣은 후, egg PC와 Tego[®]care 450을 각 다른 비율(100 : 0, 95 : 5, 90 : 10, 85 : 15, 80 : 20)로 넣어 10 mL의 클로로포름과 5 mL 메탄올에 용해시킨다. 유기용매는 회전 증발기를 이용하여 제거하고, 이때 플라스크 벽면에 지질막이 형성된다. 생성된 얇은 지질막을 phosphate buffer (1.6 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 9.6 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, pH 7.4) 10 mL로 수화하여 탄성 리포솜을 형성시킨다. 이렇게 얻어진 탄성 리포솜의 입자 크기를 균일하게 하기 위하여 glass bead를 넣고 30 min 동안 초음파 파쇄기를 가해주었다. 탄성 리포솜에 포집되지 않은 isoquercitrin은 1.2 μm 필터를 이용하여 제거하였으며, 탄성 리포솜 제형의 최종 지질 농도는 0.5 % (w/v)이고, isoquercitrin의 농도는 0.1 % (w/v)로 하였다.

2.4. 입자 크기 측정

용액 중에 분산된 입자는 크기에 따라 브라운 운동을 하는데 이때 광을 조사하게 되면 큰 입자는 느리게 작은 입자는 빠르게 움직임을 나타낸다. 이때 이 움직임을 광전자상관법으로 해석함으로써 Einstein-stokes식을 이용하여 입자의 크기가 구해지게 된다. 용매 중에 있는 리포솜 제형의 크기는 빛의 산란강도를 이용하여 입자크기를 분석하는 입도분석기 Otsuka ELS-Z를 이용하여 측정하였다. He-Ne laser를 이용하여 측정하였으며 입자크기는 누적분석법을 이용하였다. 또한 입경분포 해석방법은

Contin을 이용하여 입경분포를 구하였다.

2.5. 포집효율 측정

2.5.1. 에토솜 포집효율 측정

완성된 에토솜 현탁액에서 1 mL를 취해 1.2 μm syringe filter (Minisart CA 26 mm)를 이용하여 포집되지 않은 isoquercitrin을 제거한다. 그 후 에탄올을 이용하여 에토솜의 막을 파괴시킨다. 에탄올을 회전 증발기를 이용하여 증발시킨 후 다시 1 mL의 에탄올을 넣어준다. 이렇게 준비된 시료를 HPLC를 이용해 isoquercitrin의 농도를 측정하였다. HPLC를 이용해 나온 값을 다음에 나타난 식 (1)에 대입하여 에토솜의 포집효율을 계산하였다.

$$\text{Loading efficiency (\%)} = \{(C_0 - C_F) / C_0\} \times 100 \quad (1)$$

C_F : 1.2 μm syringe filter를 통과하지 못한 isoquercitrin 농도

C_0 : 처음 넣어준 isoquercitrin 농도

2.5.2. 탄성 리포솜 포집효율 측정

완성된 탄성 리포솜 현탁액 일정량을 취하고 1.2 μm syringe filter를 이용하여 탄성 리포솜 내 포집되지 않은 isoquercitrin을 제거한다. 그 후 에탄올을 이용하여 탄성 리포솜의 막을 파괴시킨 다음 에탄올은 회전 증발기를 이용하여 증발시키고 다시 1 mL의 에탄올을 넣어준다. HPLC를 이용해 탄성 리포솜에 포집된 isoquercitrin을 정량하였다. 또한 농도별 isoquercitrin의 검량선을 작성하여 탄성 리포솜에 포집된 isoquercitrin의 농도를 산출하였고, 탄성 리포솜의 포집효율은 다음에 나타난 식 (2)에 의해 계산하였다.

$$\text{Loading efficiency (\%)} = \{(T - I) / T\} \times 100 \quad (2)$$

T : 처음 넣어준 isoquercitrin 농도

I : 1.2 μm syringe filter를 통과하지 못한 isoquercitrin 농도

2.6. 탄성 리포솜의 가변형성 측정

제조된 탄성 리포솜의 가변형성 평가를 위해 mini extruder를 사용하여 탄성 리포솜이 인공 투과장벽을 통과하는 정도를 측정하였다. 탄성 리포솜 현탁액을 0.2 MPa의 압력을 1 min 간 가했을 때 0.08 μm 크기의 기공을

갖는 polycarbonate membrane을 통과하여 나온 리포솜 현탁액의 양을 측정하고 membrane을 통과한 리포솜 입자크기를 측정하였다. 탄성 리포솜 막의 탄성 값은 $J_{flux} \times (r_v/r_p)^2$ 에 비례한다.

$$\text{Elasticity} = J_{flux} \times (r_v/r_p)^2 \quad (3)$$

J_{flux} : membrane을 통과한 리포솜의 양

r_v : extrusion 후 리포솜 입자크기

r_p : membrane의 기공 크기

2.7. In Vitro 피부 투과 실험(Franz Diffusion Cell)

에토솜과 탄성 리포솜이 isoquercitrin의 피부 투과 증진에 어떠한 효과를 주는지 확인하기 위해 Franz diffusion cell을 이용하여 피부 투과 실험을 진행하였다. 피부 투과 실험에 사용한 쥐의 피부는 경추탈골로 치사시킨 ICR outbred albino mice (8주령, 암컷)의 등에서 적출하여 사용하였다. 적출한 피부는 피하지방과 조직을 제거한 후 사용하였다. Receptor chamber에 receptor phase (HCO-60 : Ethanol : PBS = 2 : 20 : 78 (w/w/w %)) 5 mL를 채운 후 각질층이 위로 향하도록 donor와 receptor phase 사이에 피부를 고정시켰다. 실험이 진행되는 동안 항온수조를 이용해 온도를 37 ± 1 °C로 유지하였다. 각 시료 0.2 mL를 donor를 통하여 피부 표면에 가한 후 시간에 따라 매 회 0.5 mL의 receptor phase를 sampling port를 통하여 채취하였다. 채취 직후 동량의 receptor phase를 receptor chamber에 보충하였다. 채취한 시료 속 isoquercitrin의 양은 HPLC를 이용하여 측정하였다. 24 h 후 각질층과 피부에 남아있는 isoquercitrin의 양을 측정하기 위해 쥐의 피부를 PBS로 3회에 걸쳐 세척하였다. 세척 후 receptor phase와 닿지 않은 부분을 잘라내고 남은 부분에 대해 tape stripping법을 이용해 각질층에 남아있는 isoquercitrin의 양을 따로 측정하였다. 각질층에 남아있는 isoquercitrin의 양을 측정하기 위해 테이프를 이용하여 피부의 각질층 부분을 3회 벗겨내었으며 이렇게 얻어진 테이프에 10 mL의 에탄올을 넣고 1 h 동안 초음파 세척기를 이용하여 isoquercitrin을 추출하였다. 그 후 회전 증발기를 이용하여 에탄올을 증발시키고 추출된 isoquercitrin을 0.5 mL의 receptor phase에 녹여내었다. Tape stripping법을 거친 후 각질층이 제거된 피부는 수술용 가위를 이용해 세척하였고 세척한 피부의 처리는 Tape와 동일하게 진행하였다. 이렇게 얻어진 시료 속 isoquercitrin의 양은 HPLC

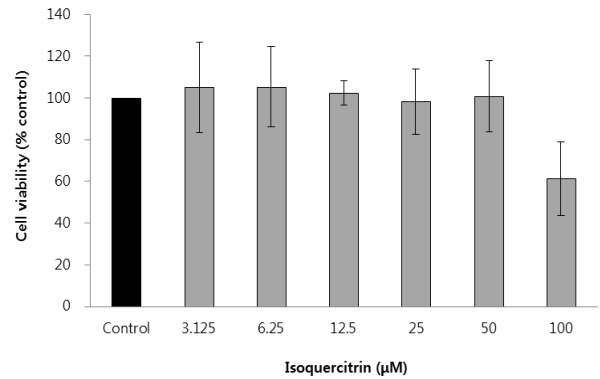


Figure 2. Cell viability of isoquercitrin by MTT assay.

를 이용하여 측정하였다.

2.8. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5 % 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

3. 결 과

3.1. Isoquercitrin의 H₂O₂ 처리에 따른 HaCaT 세포 보호 효과

3.1.1. Isoquercitrin의 세포 독성

Isoquercitrin의 세포 독성에 미치는 농도를 조사하고, 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해 MTT assay를 시행하였다. HaCaT 세포에 대한 isoquercitrin의 세포 독성을 측정한 결과 50 μM 농도에서 세포 생존율이 거의 100 %로 나타났으나, 100 μM 농도에서는 세포 생존율이 60 % 정도로 세포독성을 나타냈다(Figure 2). 본 연구에서는 isoquercitrin의 세포보호 효과를 측정하기 위해 isoquercitrin의 농도를 100 % 정도의 세포생존율을 나타내는 최고 농도를 50 μM로 설정하였다.

3.1.2. H₂O₂ 농도별 처리에 따른 HaCaT 세포의 생존율

자외선에 의해 발생되어 산화적 손상을 유발하는 활성산소인 H₂O₂를 HaCaT 세포를 대상으로 농도별로 (1, 5, 10, 15, 20 mM) 처리하고 세포 생존율에 미치는 영향을 관찰하였다. 1 mM의 H₂O₂를 처리한 경우는 H₂O₂를 처리하지 않은 경우에 비해 60 % 정도의 세포 생존율을 나타내었다. 5 mM인 경우 세포 생존율은 50 %를 나타내었고, 10 mM은 30 %, 15 mM은 20 % 그리고 20 mM에

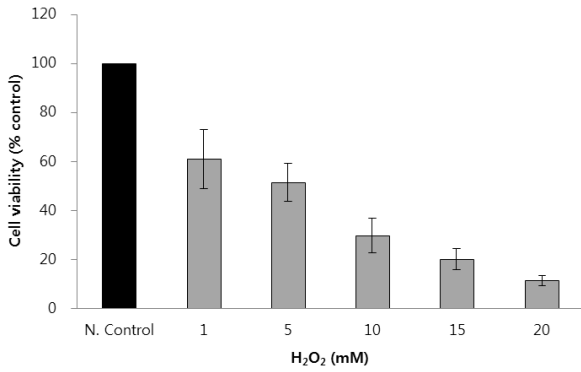


Figure 3. Cell viability on H₂O₂-induced cell damage in HaCaT cell system. HaCaT cells were treated with 1, 5, 10, 15, 20 mM H₂O₂ and stained with MTT to show survival cells compared to non-treated group.

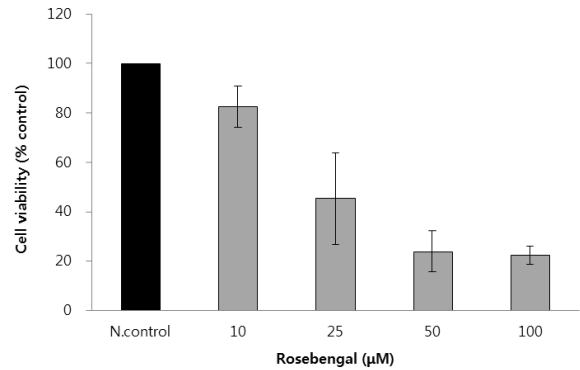


Figure 5. Cell viability on ¹O₂-induced cell damage in HaCaT cell system. HaCaT cells were treated with 10, 25, 50, 100 μM rose bengal and stained with MTT to show survival cells compared to non-treated group.

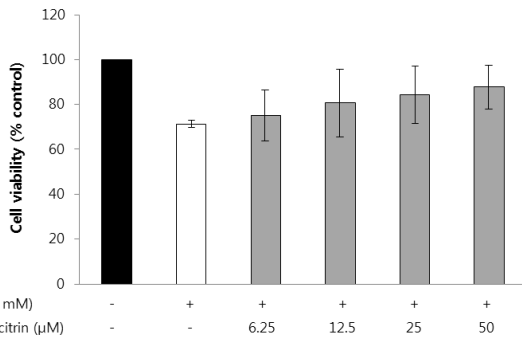


Figure 4. Cellular protective effect (cell viability) of isoquercitrin on H₂O₂-induced cell damage in HaCaT cell system. HaCaT cells were treated with 5 mM H₂O₂ and stained with MTT to show survival cells compared to non-treated group.

서는 15 %의 생존율을 나타내었다(Figure 3). 본 연구에서는 H₂O₂으로부터 세포보호 효과를 측정하기 위한 H₂O₂의 농도는 50 % 정도의 세포 생존율을 나타낸 5 mM를 이용하였다.

3.1.3. H₂O₂로 유도된 세포 손상에 대한 Isoquercitrin의 보호 작용

농도별 isoquercitrin을 처리한 후에 HaCaT 세포에 5 mM H₂O₂를 함유한 배지를 처리한 후, 30 min 배양하여 PBS로 세척하였다. 24 h 배양한 세포의 생존율을 MTT assay를 통해 측정하였다. 5 mM H₂O₂를 처리한 세포 생존율은 H₂O₂를 처리하지 않은 대조군에 비하여 70 %의 생존율을 나타내었다. H₂O₂ 처리 전 HaCaT 세

포에 6.25, 12.5, 25 및 50 μM의 isoquercitrin을 처리한 경우 세포 생존율은 72, 80, 85 및 90 %로, isoquercitrin은 농도 의존적으로 H₂O₂ 처리에 의한 세포의 사멸을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다(Figure 4).

3.2. Isoquercitrin의 Rose Bengal 처리에 따른 HaCaT 세포 보호 효과

3.2.1. Rose Bengal 농도별 처리에 따른 HaCaT 세포의 생존율

HaCaT 세포를 대상으로, 광산화에 있어서 주요한 활성산소인 ¹O₂을 발생시키는 rose bengal을 농도별(10, 25, 50, 100 μM)로 처리하고 세포 생존율을 측정하였다. 10 μM의 rose bengal을 처리한 경우는 rose bengal을 처리하지 않은 경우에 비해 85 % 정도의 세포 생존율을 나타내었다. 25 μM 인 경우 세포 생존율은 50 %를 나타내었고, 50 μM은 25 %, 100 μM은 22 %의 생존율을 나타내었다(Figure 5). 본 연구에서는 ¹O₂으로 유도된 세포 손상으로부터 세포 보호 효과를 측정하기 위한 rose bengal의 농도는 50 %의 세포 생존율을 나타낸 25 μM을 이용하였다.

3.2.2. ¹O₂으로 유도된 세포 손상에 대한 Isoquercitrin의 보호 작용

HaCaT 세포에 isoquercitrin을 농도별로 처리한 후에 25 μM의 rose bengal을 함유한 배지를 넣고 15 min 동안 광조사한 후 세포를 PBS로 세척하였다. 24 h 동안 세포를 배양하고 세포의 생존율을 MTT assay로 측정하였다. 25 μM rose bengal을 첨가한 경우는 rose bengal을 처리하지 않은 대조군 대비 세포 생존율은 50 %를 나타

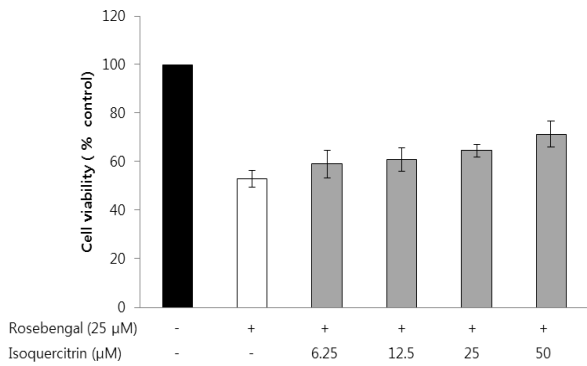


Figure 6. Cellular protective effect of isoquercitrin on 1O_2 -induced cell damage in HaCaT cell system. HaCaT cell was treated with 25 μ M rose bengal and stained with MTT to show cell viability compared to non-treated group.

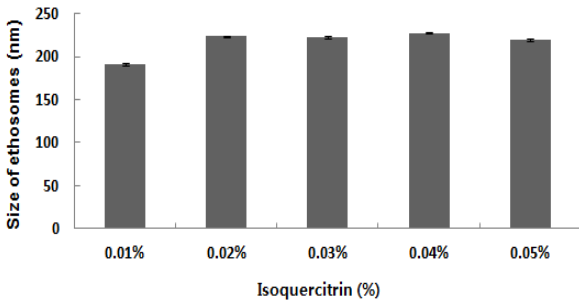


Figure 7. Size of ethosomal vesicles with different concentration of isoquercitrin in a system composed of 2 % lecithin and 20 % ethanol.

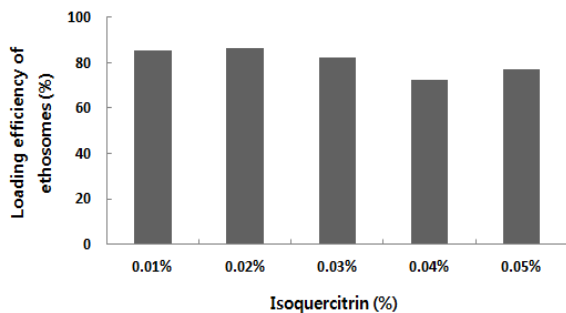


Figure 8. Loading efficiency of ethosome treated with different concentration of isoquercitrin in a system composed of 2 % lecithin and 20 % ethanol.

내었다. Rose bengal을 첨가하기 전에 HaCaT 세포에 6.25, 12.5, 25 및 50 μ M의 isoquercitrin을 첨가한 경우 세포 생존율은 각각 60, 62, 65 및 70 %를 나타내었다. 따라서 isoquercitrin은 농도 의존적으로 1O_2 으로 유도된 세포 손

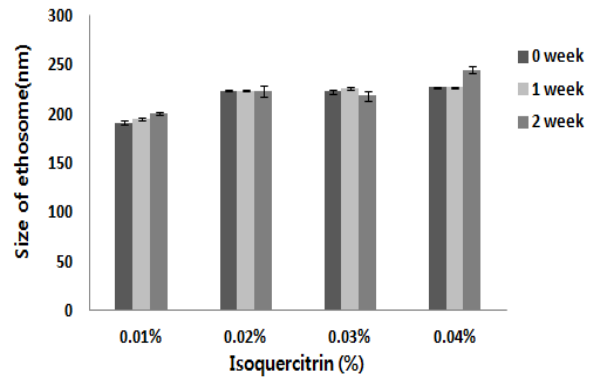


Figure 9. Size of ethosome containing isoquercitrin (0.01, 0.02, 0.03, 0.04 %) during 2 weeks.

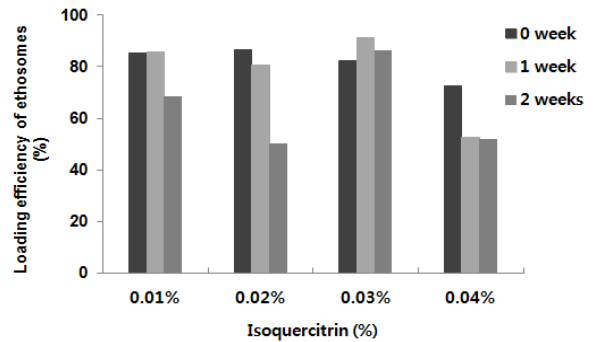


Figure 10. Loading efficiency of ethosome containing isoquercitrin (0.01, 0.02, 0.03, 0.04 %) during 2 weeks.

상에 대하여 세포를 보호하는 효과가 있음을 보여 주었다(Figure 6).

3.3. Isoquercitrin을 담지한 에토솜 제조 및 특성 조사

3.3.1. 에토솜의 입자 크기 및 포집 효율

본 연구에 앞서 저자들은 에탄올 농도에 따른 에토솜을 제조하고 이들의 입자 크기 및 안정성 실험을 수행한 바 있다. 실험결과 20 % 에탄올을 함유한 경우 안정한 나노 입자를 형성함을 확인하였다(data not shown). 이를 바탕으로 본 연구에서는 다양한 농도의 isoquercitrin을 첨가한 20 % 에탄올 함유 에토솜을 제조하였다. 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 및 0.05 %의 isoquercitrin이 함유된 에토솜을 제조하였을 때 모든 입자 크기가 250 nm 보다 작은 단분산 형태를 띠는 것을 확인하였다(Figure 7). 또한 포집 효율에서는 0.03 % 농도 이하에서 포집 효율이 높고 0.04 % 이상의 농도에서 함량이 높아질수록 포집 효율이 감소하는 것을 확인하였다(Figure 8). Isoquercitrin의 안

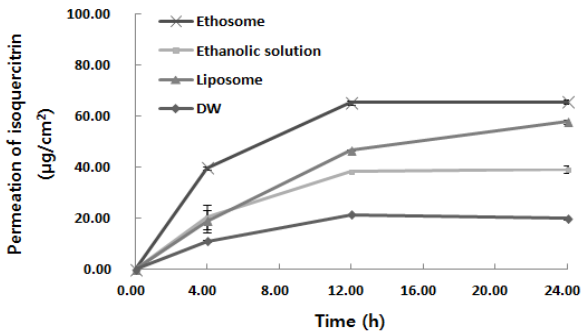


Figure 11. Comparative cumulative amount of isoquercitrin permeated from ethosome, liposome, hydroethanolic solution, and distilled water (DW) solution with time during 24 h via mice dorsal skin.

정성을 확인하기 위하여 1주일 간격으로 2주 동안 입자 크기와 포집 효율을 측정하였다. 결과적으로 0.04 %의 isoquercitrin 농도 이상에서는 시간이 경과함에 따라 입자 크기가 커지거나 불안정한 다분상 형태가 나타남을 확인하였다(Figure 9). 포집 효율에서 0.03 %의 isoquercitrin 농도를 제외한 다른 농도에서 포집 효율이 줄어드는 경향을 나타내었다(Figure 10). 0.03% Isoquercitrin을 담지한 에토솜은 222.85 ± 0.85 nm 입자크기와 82.26 % 포집효율을 나타내었다. 따라서 0.03 % isoquercitrin을 함유한 에토솜은 입자 크기와 포집효율에 큰 변화가 없었고 안정함을 확인하였다.

3.3.2. 에토솜의 *In Vitro* 피부 투과 실험(Franz Diffusion Cell)

0.03 % Isoquercitrin을 담지한 에토솜이 2주 동안 평균적으로 222.4 ± 3.06 nm의 균일한 입자 크기와 82.26 %의 높은 포집효율을 나타내었다. 따라서 0.03 % isoquercitrin을 담지한 20 % 에토솜을 제조하고 이를 피부 투과 실험에 사용하였다. 대조군으로는 0.03 % isoquercitrin을 담지한 리포솜과 0.03 % isoquercitrin을 녹인 에탄올 용액 그리고 0.03 % isoquercitrin을 증류수에 녹인 용액을 사용하였다. 시간에 따라 피부에 누적 투과된 isoquercitrin의 양은 24 h 동안 에토솜 및 대조군으로 사용한 에탄올 용액에서 모두 시간-의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다(Figure 11). 24 h 후의 피부 누적 투과량(Transdermal)은 에토솜이 65.48 ± 0.95 µg/cm²로 가장 높고, 그 다음 리포솜(57.69 ± 0.91 µg/cm²), 에탄올 용액(39.1 ± 1.26 µg/cm²), 증류수(19.80 ± 0.34 µg/cm²) 순으로 나타났다. 그리고 24 h 후 각질층에 남아있는 iso-

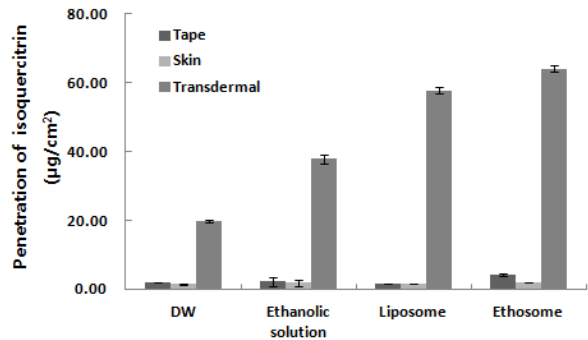


Figure 12. Penetrated amount of isoquercitrin measured from ethosome, liposome, hydroethanolic solution and distilled water (DW) solution after 24 h via mice dorsal skin (tape : stratum corneum, skin : epidermis without stratum corneum and dermis, transdermal : permeated through skin).

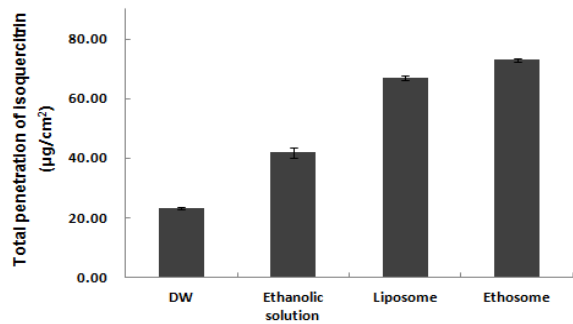


Figure 13. Total penetrated amount of isoquercitrin measured from ethosome, liposome, hydroethanolic solution and distilled water (DW) solution after 24 h via mice dorsal skin.

quercitrin의 양(Tape)은 에토솜(4.18 ± 1.49 µg/cm²) > 에탄올 용액(2.31 ± 1.3 µg/cm²) > 증류수 (1.98 ± 0.05 µg/cm²) > 리포솜(1.53 ± 0.06 µg/cm²) 순으로 나타났고, 각질층을 제거한 피부에 남아있는 isoquercitrin의 양(Skin)은 에토솜 (1.92 ± 0.46 µg/cm²) > 에탄올 용액 (1.82 ± 0.81 µg/cm²) > 리포솜(1.50 ± 0.04 µg/cm²) > 증류수(1.44 ± 0.08 µg/cm²) 순으로 나타났다(Figure 12). 피부 투과 실험에 사용한 isoquercitrin의 양은 모든 제형에서 94.31 µg/cm²이었고, isoquercitrin의 총 피부 투과량은 에토솜 (72.96 ± 0.99 µg/cm²) > 리포솜(66.93 ± 0.75 µg/cm²) > 에탄올 용액(41.98 ± 1.75 µg/cm²) > 증류수(23.22 ± 0.47 µg/cm²) 순으로 나타났다(Figure 13). 에토솜의 투과 효율은 77.37 %로 나타났고 에탄올

Table 1. Composition and Size of Elastic Liposomal Formulations Before and After Extrusion through Polycarbonate Membrane with a Pore Size of 80 nm

Formulation code	PC ^{a)} : S ^{b)}	Isoquercitrin	Size before extrusion (nm)	Size after extrusion (nm)
ELI ^{c)} -1	100 : 0	10.0	195.75 ± 15.75	182.15 ± 3.45
ELI ^{c)} -2	95 : 5	10.0	290.85 ± 1.35	261.15 ± 0.45
ELI ^{c)} -3	90 : 10	10.0	303.05 ± 1.15	343.65 ± 11.15
ELI ^{c)} -4	85 : 15	10.0	341.2 ± 1.5	340.75 ± 13.95
ELI ^{c)} -5	80 : 20	10.0	251.65 ± 17.65	193.85 ± 7.05

a) PC : Egg phosphatidylcholine, b) S : Tego[®]care 450, c) ELI : Isoquercitrin loaded elastic liposomal formulation Values represent Mean ± SD (n = 3)

Table 2. Deformability Index Value of Elastic Liposomal Formulation

Formulation code	Deformability index
ELI-1	16.51 ± 0.63
ELI-2	34.05 ± 0.12
ELI-3	59.47 ± 3.86
ELI-4	59.89 ± 4.86
ELI-5	18.65 ± 1.35

용액, 리포솜, 증류수에서 투과 효율은 각각 70.97, 44.51, 24.62 %로 나타났다. 따라서 피부에 투과된 양과 시간을 살펴보았을 경우 0.03 % isoquercitrin을 함유한 에토솜이 리포솜에 비하여 빠르고 좀 더 많은 양을 피부로 전달할 수 있음을 확인하였다.

3.4. Isoquercitrin을 담지한 탄성 리포솜

3.4.1. 탄성 리포솜의 입자 크기

탄성 리포솜의 구성 성분과 조성, 평균 입자크기는 Table 1에 나타내었다. 탄성 리포솜은 egg PC와 Tego[®]care 450 (계면활성제)의 비율을 달리하여 얇은 막 수화법으로 제조하였다. 제조된 리포솜 현탁액은 mini extruder를 이용하여 압출시켜서 제조하였다. Isoquercitrin이 함유된 탄성 리포솜(ELI-)은 계면활성제의 농도가 0 ~ 15 % (w/w %)로 증가할수록 입자크기가 195.75 nm에서 341.2 nm로 증가하는 경향을 나타내었다. 실험에 사용된 Tego[®]care 450은 비이온성 계면활성제로 negative zeta potential을 갖고 있다. 이러한 negative zeta potential은 지질 이중층 사이의 반발력을 증가시켜 입자 크기를 증가시키는 것으로 판단된다[36]. 하지만 계면활성제의 농도가 20 % (w/w %)인 ELI-5의 입자 크기는

251.65 nm로 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 것은 계면활성제의 비율이 일정 농도 이상으로 증가하게 되면 탄성 리포솜 외에도 마이셀이 형성되어 평균 입자 크기가 작게 측정되기 때문으로 판단된다.

3.4.2. 탄성 리포솜의 가변형성

계면활성제 첨가로 인한 지질막의 불안정성은 지질막의 유동성을 증가시키며 이러한 것은 탄성 리포솜이 일반 리포솜보다 비교적 입자 크기가 큼에도 불구하고 쉽게 각질층을 통과할 수 있게 한다[37]. 따라서 본 연구에서는 egg PC와 Tego[®]care 450(계면활성제)의 비율을 달리하여 탄성 리포솜 제형의 가변형성 지수를 측정하였다(Table 2). ELI-1과 ELI-4를 비교해 볼 때, 계면활성제가 포함되지 않은 ELI-1 (182.15 nm)에 비해 계면활성제 함량이 15 %인 ELI-4 (340.75 nm)의 입자크기가 훨씬 더 크음을 알 수 있다. 하지만 가변형성 지수를 비교해보면, ELI-1은 16.51, ELI-4은 59.89로 계면활성제의 함량이 많은 ELI-4의 가변형성 지수가 훨씬 크음을 확인할 수 있다. 이는 계면활성제 함량이 증가하게 되면 지질막의 유동성이 증가하여 탄성 리포솜의 가변형성이 증가하게 됨을 나타낸다[37]. 그러나 계면활성제의 비율이 20 % ELI-5의 경우 가변형성이 급격히 감소함을 알 수 있다. 이는 계면활성제의 비율이 일정 이상으로 증가하게 되면 용액 내에 탄성 리포솜 뿐만 아니라 마이셀이 형성되기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 ELI-5의 경우에 마이셀 형성으로 인하여 가변형성 지수가 크게 감소하는 알 수 있다[38]. 이러한 결과로 보아 isoquercitrin을 담지한 탄성 리포솜의 가변형성 지수는 계면활성제의 농도에 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다.

3.4.3. 탄성 리포솜에 있어서 Isoquercitrin의 포집효율 탄성 리포솜에 포집된 isoquercitrin의 포집효율을

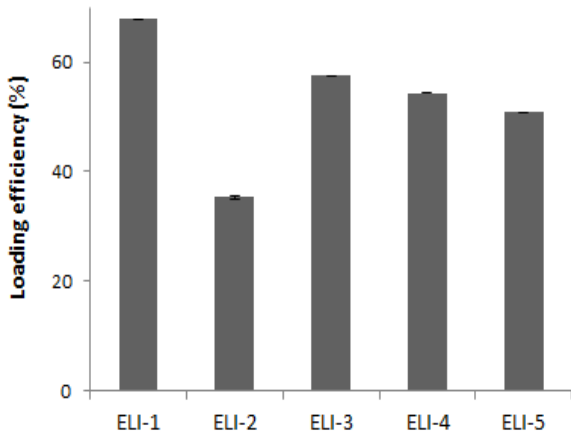


Figure 14. Loading efficiency of elastic liposomal formulations containing isoquercitrin.

Figure 14에 나타내었다. 탄성 리포솜에 포집된 isoquercitrin의 양을 측정하기 위해서 HPLC를 이용하였다. 계면활성제가 포함되지 않은 ELI-1의 경우는 67.8%의 포집효율을 나타내었다. ELI-3과 ELI-4의 포집효율은 각각 57.50, 54.30%로 확인되었는데, 이는 ELI-3과 ELI-4의 물리적 특성(입자크기, 가변형성 지수, 포집효율)이 매우 유사함을 나타낸다. 한편 계면활성제가 포함된 ELI-2, 3, 4, 5의 경우 ELI-1보다 낮은 포집효율을 나타내었다. 이는 계면활성제의 농도가 증가하게 되면 탄성 리포솜과 혼합된 마이셀이 공존하게 되어 포집효율이 감소한다는 보고와 일치한다. 이는 계면활성제의 농도가 일정 이상이 되면 탄성 리포솜의 포집효율을 감소시켜 유용한 피부전달 시스템으로서 이용될 수 없음을 나타낸다[39].

3.4.4. 탄성 리포솜의 *In Vitro* 피부 투과 실험(Franz Diffusion Cell)

Franz diffusion cell을 이용하여 isoquercitrin을 포집한 탄성 리포솜의 피부 투과 능력을 평가하였다. 실험에서는 우수한 보습효과를 갖으며 피부 자극이 적은 1,3-butylene glycol을 대조군으로 사용하였다. 계면활성제가 포함되지 않은 ELI-1, 높은 가변형성 지수를 나타냈을 뿐만 아니라 입자크기, 가변형성 지수, 포집효율 등의 물리적 특성이 유사한 ELI-3, ELI-4을 이용하여 최적화된 비율의 제형을 찾고자 하였다.

탄성 리포솜은 수분 기울기(hydration gradient)에 의해 유효 물질을 효과적으로 피부에 전달한다고 알려져 있으므로[40], 샘플 투여 부위를 밀폐하지 않은 상태(non-occluded condition)로 실시하였다. 일정 피부 면적

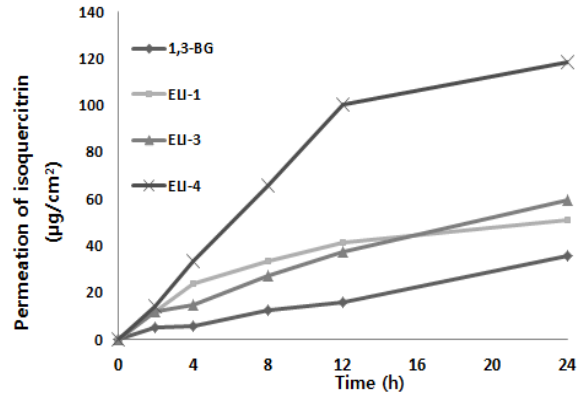
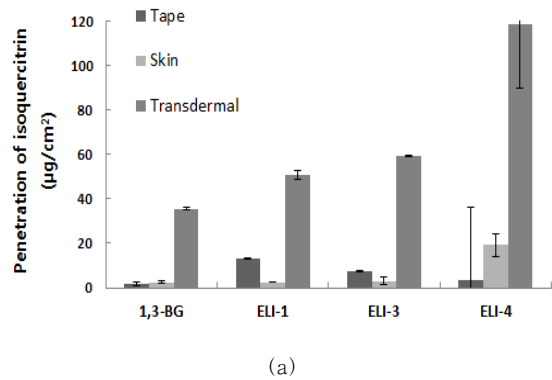
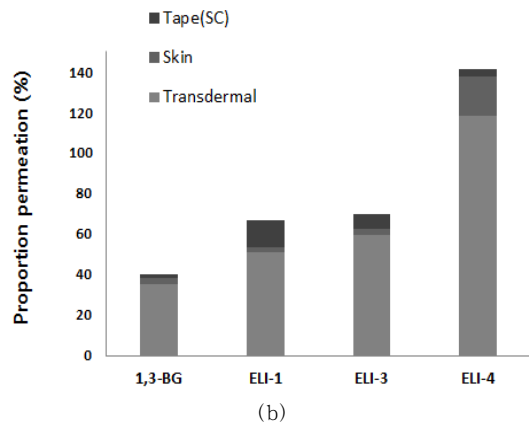


Figure 15. *In vitro* skin permeation profiles of 1,3-butylene glycol solution and ELI-1, ELI-3, ELI-4 containing iso quercitrin through ICR albino mouse skin. Mean ± SD (n = 3).



(a)



(b)

Figure 16. Proportions of permeated amount of 1,3-butylene glycol solution (isoquercitrin) and ELI-1, ELI-3, ELI-4 containing isoquercitrin through ICR albino mouse skin after 24 h incubation (Tape : stratum corneum, Skin : epidermis + dermis without stratum corneums, Transdermal : receptor chamber).

(0.6362 cm²)에 대한 시간별 isoquercitrin의 투과량은 Figure 15에 나타내었다. Isoquercitrin을 담지한 네 실험 제형 모두 시간 의존적으로 피부 투과량이 증가함을 알 수 있었다. 1,3-butylene glycol과 ELI-1의 24 h 후의 누적 투과량의 경우 35.51, 50.82 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 초기 적하량 314.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 에 대하여 각각 11.29, 16.17 %의 투과율을 보여주었다. 특히 ELI-4의 경우 시간 의존적으로 피부 투과량이 급격히 증가하여 24 h 후의 누적 투과량은 118.48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었고, 이를 초기 적하량에 대하여 환산하면 37.69 %의 투과율을 나타내었다. 또한 ELI-4와 유사한 물리적 특성을 나타내었던 ELI-3의 경우 24 h 후의 누적 투과량은 59.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 초기 적하량 대비 18.87 %의 투과율을 나타내었다. ELI-3의 경우 extrusion 전후에 입자 크기가 303.05에서 343.65 nm로 증가했음을 알 수 있는데 이러한 입자 크기의 증가는 ELI-3의 지질막이 불안정하다는 것을 나타낸다. 이러한 지질막의 불안정성은 ELI-3의 피부 투과율이 유사한 물리적 특성을 갖는 ELI-4에 비해 월등히 낮은 이유를 설명해준다. Figure 16에는 24 h 후 각질층에 존재하는 isoquercitrin (Tape), 각질층을 제외한 표피와 진피에 존재하는 isoquercitrin (Skin), 그리고 피부를 통과하여 receptor phase에 존재하는 isoquercitrin (Transdermal)의 함량을 나타내었다. 각질층에 존재하는 isoquercitrin의 함량(Tape)은 1,3-butylene glycol 용액과 ELI-1의 경우 각각 0.59, 4.19 %로 나타났으며, ELI-3과 ELI-4의 경우 각각 2.38, 1.12 %로 비교적 적은 양의 isoquercitrin이 각질층에 남아있는 것으로 확인되었다. 각질층을 제외한 피부(표피 및 진피)로 투과된 isoquercitrin의 함량(Skin)은, 1,3-butylene glycol과 ELI-1, ELI-3, ELI-4에서 각각 2.49, 2.59, 3.13, 19.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 초기 적하량에 대한 isoquercitrin의 투과율로 환산할 경우 각각 0.79, 0.82, 1.0, 6.15 %로 최적화된 비율인 ELI-4가 표피와 진피에 존재하는 isoquercitrin의 양이 더 많은 것으로 나타났다. 피부를 통과하여 receptor phase에 존재하는 isoquercitrin (Transdermal)의 함량 비율은 1,3-butylene glycol과 ELI-1, ELI-3, ELI-4가 각각 11.29, 16.17, 18.87, 37.69 %로 ELI-4의 투과량이 매우 크게 나타났음을 확인할 수 있다. 이를 종합해 보면 피부에 투과된 isoquercitrin 총 함량을 비교해 보면 ELI-4 (54.40 %) > ELI-3 (22.25 %) > ELI-1 (21.18 %) > 1,3-butylene glycol (12.68 %)로 확인되었다. 특히 계면활성제 첨가로 인한 가변형성 증가로 인하여 ELI-4가 ELI-1보다 약 31.72 % 더 많이 isoquercitrin을 피부로 전달하였음을 확인할 수 있다.

4. 고 찰

일반적으로 플라보노이드는 benz- γ -pyrone의 구조를 갖는 페놀성 화합물로 식물계에 널리 분포되어 있다. 항산화제로서 플라보노이드는 다른 항산화제들과는 달리 그 종류가 다양하다. 지용성, 수용성, 그리고 그 중간 정도의 극성을 갖는 다양한 구조를 가질 수 있다. 천연에 존재하는 플라보노이드는 대부분은 플라보노이드 기본 골격에 당이 결합된 배당체 형태로 존재한다.

최근 플라보노이드는 천연 항산화제로서, 기능성 화장품 소재로서 그 가능성이 커지면서 화장품에 응용하고자 하는 연구들이 다양하게 이루어지고 있다. 하지만 천연의 플라보노이드 배당체는 수용성 또는 난용성의 구조적 특성 때문에 화장품에의 응용은 매우 제한적이다. 다시 말하면, 플라보노이드 배당체는 피부 침투가 매우 어렵고 또한 세포막 침투가 용이하지 않기 때문에 피부에서 또는 세포 수준에서 항산화 효과나 다른 생리 활성을 나타내기가 쉽지 않을 것으로 예측된다.

피부에서 활성산소가 생성되는 주요 원인은 광증감제 분자에 의한 태양 자외선의 흡수로 시작되는 광증감 반응으로 알려져 있다. 이 반응의 주 생성물은 $^1\text{O}_2$ 을 비롯하여 $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ 등을 포함한다. 본 연구에서는 HaCaT 세포 배양액에 광증감제 rose bengal을 첨가 후 광조사하여 생성된 $^1\text{O}_2$ 과 또 다른 활성산소인 H_2O_2 처리에 의한 세포의 산화적 손상에 대한 isoquercitrin의 세포 보호 효과를 조사하였다.

Isoquercitrin은 플라보노이드 배당체이기 때문에 피부나 세포막 침투가 쉽지 않아 산화적 손상 반응에 대한 보호 효과가 거의 없을 것으로 예상된다. 하지만, 광증감제인 rose bengal에 의해 생성된 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 HaCaT 세포의 산화적 손상에 대하여 플라보노이드 배당체인 isoquercitrin은 배양액에 첨가했을 때 큰 세포 보호 효과를 나타내었다. 또 다른 활성산소인 H_2O_2 를 처리한 실험에서도 isoquercitrin은 대조군보다 HaCaT 세포의 생존율을 높이는 우수한 세포 보호 효과를 나타내었다.

피부의 최외각층인 각질층은 피부 투과성 장벽과 항산화 장벽 기능을 모두 가지고 있다. 이러한 각질층은 지질이 고갈된 각질 세포와 특징적인 라멜라 막으로 구성된 지질이 풍부한 세포외 매트릭스로 구성되어 있다. 이들 지질 구성 성분들은 세라마이드, 콜레스테롤과 자유 지방산들이다. 각질층은 외부 환경과 접하고 있어 공해, 태양자외선, 미생물 등의 산화적 스트레스 요인의 공격에 직접적으로 노출되어 있다. 하지만, 산화적 손상을 막기

위해서, 사람 피부는 효소적 그리고 비효소적 항산화제로 이루어진 항산화 방어망인 항산화 장벽을 구축하고 있다. 하지만 계속된 산화적 스트레스에 의한 활성산소(ROS)/항산화 방어망(항산화 장벽) 사이의 불균형은 핵산(DNA 등), 지질 및 단백질을 포함하는 생체 분자의 산화를 야기시킨다. 생체 분자의 산화적 변형은 피부 장벽의 핵심 성분들의 구조적 혹은 기능적 완전성(integrity)에 손실을 가져올 수 있다. 따라서 자외선으로 유도되는 산화적 손상으로부터 피부 장벽기능을 보호하고 피부노화를 억제시키기 위해서는 항산화제 사용을 통한 항산화 방어시스템의 구축이 필요하다.

앞서 언급한 바와 같이 isoquercitrin은 플라보노이드 배당체임에도 불구하고 피부 노화의 원인 물질로서 중요한 활성산소종인 1O_2 및 H_2O_2 에 의한 세포의 산화적 손상에 있어서 현저한 세포 보호 활성을 나타내었다. 따라서 isoquercitrin은 산화적 스트레스로부터 각질층의 항산화 장벽 기능을 유지하기 위한 항산화 방어시스템 구축에 있어서 적절한 항산화제로서 역할을 할 수도 있을 것으로 사료된다.

산화적 손상으로부터 피부 장벽의 보호와 항산화 장벽기능의 유지 그리고 표피 및 진피 층에서 나타나는 산화적 스트레스에 의한 세포 외 매트릭스의 파괴 등 다양한 노화 과정을 억제하고 지연시키기 위해서는 적절한 항산화제의 개발뿐만 아니라 실질적으로 이 물질들을 피부에 침투 시킬 수 있는 피부 흡수 증진시스템의 개발 또한 매우 중요하다고 생각된다. 대표적인 피부 흡수 증진시스템인 리포솜은 생체 친화성이 있으면서 활성 성분을 담지하여 피부 흡수를 용이하게 하기 때문에 이에 대한 연구들이 많이 이루어지고 있다. 최근에는 전형적인 리포솜 제형의 물리적 안정성, 유향 안정성, 포집 효율 및 피부 흡수 증진 등을 개선한 새로운 제형의 리포솜 개발이 활발히 이루어지고 있다. 본 연구에서는 활성은 크나 피부 침투가 용이하지 않은 플라보노이드 배당체인 isoquercitrin을 기능성 화장품 소재로서 이용하기 위해 기존 리포솜의 단점을 보완시킨 제형인 에토솜 및 탄성 리포솜에 isoquercitrin을 포집시키고 이들의 입자크기, 안정성, 포집효율, 가변형성(탄성 리포솜), 피부 흡수능을 관찰하여 화장품에의 응용 가능성을 검토하였다.

다양한 농도의 isoquercitrin을 첨가한 20 % 에탄올 함유 에토솜을 제조하여 이들의 입자 크기, 안정성, 포집효율, 피부 투과능을 실험하였다. 제조된 0.03 % isoquercitrin 함유 에토솜의 경우 입자 크기가 224.4 nm로 단분산 형태의 안정한 입도 분포를 나타내었고 포집효율

은 82.26 %임을 확인하였다. 0.03 % isoquercitrin을 담지한 에토솜을 제외한 다른 농도의 제형들은 제조 후 이주일 동안 입자 분포가 불안정한 다분산 형태를 취하였고 포집효율 또한 감소하는 형태를 띠었다. 따라서 이주일 동안 일정한 입자 크기와 안정한 단분산 형태를 유지한 0.03 % isoquercitrin 담지 에토솜을 피부 투과 실험에 사용하였다. Isoquercitrin의 피부 투과능의 비교는 피부의 각질층(Tape), Skin (각질층 제외한 표피+진피), 그리고 transdermal (피부를 통과한 receptor phase에 존재)에 존재하는 isoquercitrin의 양과 초기 적하량($94.31 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)을 통해 비교하였다. Isoquercitrin의 누적 피부 투과량(transdermal)은 에토솜 ($65.48 \pm 0.95 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) > 리포솜 ($57.69 \pm 0.91 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) > 에탄올 용액($39.1 \pm 1.26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) > 증류수($19.80 \pm 0.34 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 순으로 나타났다. 에토솜의 경우 초기 적하량 대비 피부를 완전히 투과한 transdermal에 존재하는 isoquercitrin의 양이 69.43 %에 달해 isoquercitrin의 피부 전달에 있어서 우수한 제형임을 확인하였다.

본 연구에서 탄성 리포솜은 인지질과 계면활성제인 Tego[®]care 450을 사용하여 얇은 막 수화법으로 제조하였다. 제조된 탄성 리포솜 중 (ELI-1 ~ ELI-5)에서 인지질 및 계면활성제 비율이 90 : 10인 ELI-3과 85 : 15인 ELI-4가 높은 가변형성 지수를 나타내고 입자 크기, 포집효율 등의 물리적 특성이 우수하게 나타났다. 탄성 리포솜 ELI-3는 입자크기가 $303.05 \pm 1.15 \text{ nm}$, 가변형성 지수는 59.47 ± 3.86 를 나타내었으며 ELI-4는 $341.2 \pm 1.5 \text{ nm}$ 의 입자크기와 59.89 ± 4.86 의 높은 가변형성 지수를 나타내었다. Franz diffusion cell을 이용하여 isoquercitrin을 담지한 탄성 리포솜의 피부 투과 능력을 평가하였다. 실험에서는 대조군으로 계면활성제가 없는 일반 리포솜인 ELI-1, 1,3-butylene glycol을 사용하였고 유사한 물리적 특성을 나타낸 탄성 리포솜 ELI-3와 ELI-4를 실험군으로 사용하여 최적화된 제형을 찾고자 하였다. Isoquercitrin의 누적 투과량(Transdermal)을 비교하였을 때, ELI-4 ($118.48 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) > ELI-3 ($59.33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) > ELI-1 ($50.82 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) > 1,3-butylene glycol ($35.51 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 용액 순으로 나타났다. 특히 인지질과 계면활성제의 비율이 85 : 15인 ELI-4의 경우 대조군인 1,3-butylene glycol과 ELI-1과 비교할 때 각각 약 3배, 2배 높은 누적 피부 투과율을 보였으며, 초기 적하량 대비 피부를 완전히 통과한 Transdermal에 존재하는 isoquercitrin의 비율이 37.69 %에 달했다. 이상의 결과들을 통해 Tego[®]care 450을 이용하고 isoquercitrin을 함유한

Table 3. Permeated Amount and Proportion of Ethosome and ELI-4 containing Isoquercitrin through ICR Albino Mouse Skin after 24 h Incubation (Tape : Stratum Corneum, Skin : Epidermis + Dermis without Stratum Corneum, Transdermal : Receptor Chamber)

	Early dropping amounts ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Tape		Skin		Transdermal		Total	
		($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%
Ethosome	94.31	4.18	4.43	1.92	2.04	65.4	69.34	72.9	77.37
Elastic liposomo	314.37	3.23	1.12	19.33	6.15	118.48	37.69	171.03	54.4

탄성 리포솜은 유효성분의 안정화 및 유효성분의 피부 전달에 있어서 적합한 시스템이 될 수 있음을 알았다.

Isoquercitrin을 담지한 에토솜 및 탄성 리포솜의 초기 적하량 대비 피부 투과능의 비교는 Table 3에 나타내었다. Isoquercitrin은 quercetin의 배당체로 피부의 각질층을 통과하는데 있어 어려움이 있는 물질이다. 그럼에도 불구하고 isoquercitrin을 담지한 두 제형 모두 대조군에 비해 피부를 완전히 투과한 transdermal에 존재하는 isoquercitrin의 비율이 가장 높았다. 초기 적하량 대비 더 많은 양의 isoquercitrin을 투과시킨 제형은 0.03 % isoquercitrin을 담지한 에토솜으로 탄성 리포솜보다 효율적인 투과율을 보였다. 그러나 탄성 리포솜 초기 적하량 ($314.37 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)은 에토솜의 초기 적하량($94.31 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)보다 약 3.33배 가량 더 많았고 피부에 투과된 isoquercitrin의 총 양은 탄성 리포솜($171.03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)이 에토솜($72.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)보다 2.34배 더 높은 것을 확인하였다. 따라서 에토솜의 경우 초기 담지량을 증가시킬 수 있는 방안과 탄성 리포솜의 경우 실질적인 피부 투과 효율을 증가시킬 수 있는 방안이 요구된다.

결론적으로 저자들은 본 연구를 통하여 isoquercitrin이 산화적 스트레스에 의한 손상으로부터 세포를 보호하는 활성이 있음을 알았다. 또한 피부 흡수 시스템인 isoquercitrin을 담지한 에토솜 제형(0.03 % isoquercitrin 및 20 % 에탄올 함유) 및 탄성 리포솜 제형(ELI-4)은 피부의 진피층 아래까지 isoquercitrin을 효율적으로 전달함을 확인하였다. 따라서 isoquercitrin이 자외선 등의 산화적 스트레스로부터 피부 항산화 장벽 기능을 유지 또는 복원시켜서 피부노화를 억제하기 위한 항산화 방어시스템을 구축하는데 저자들이 개발한 에토솜 및 탄성 리포솜이 효율적인 시스템으로 사용될 수 있음을 알았다.

앞으로 저자들이 본 연구에서 개발한 isoquercitrin 함유 에토솜 및 탄성 리포솜을 이용하여 인공 피부 세포 모델이나 인체 시험 등을 통하여 실질적으로 피부노화 개선 효능이 있는지를 확인하는 연구를 진행할 필요가 있

다고 사료된다.

5. 결 론

1) Isoquercitrin은 $50 \mu\text{M}$ 의 농도 이하에서 HaCaT 세포에 대한 세포독성은 나타나지 않았다.

2) Isoquercitrin은 $50 \mu\text{M}$ 의 농도에서 5 mM H_2O_2 를 처리한 HaCaT 세포의 생존생존율을 양성 대조군 70에서 85 %까지 증가시켰다. 따라서 H_2O_2 에 대한 세포 보호 활성이 우수함을 나타낸다.

3) Isoquercitrin은 $50 \mu\text{M}$ 의 농도에서 25 μM 의 rose bengal을 처리한 HaCaT 세포의 생존율을 양성 대조군 약 50에서 70 %까지 증가시켰다. 이는 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 산화적 손상에 대한 isoquercitrin의 우수한 세포 보호 활성을 나타낸다.

4) 피부 흡수 시스템으로서 0.03 % isoquercitrin 함유 에토솜은 입자 크기 $222.4 \pm 3.06 \text{ nm}$, 포집효율 82.26 %로 제조 후 2주까지 안정한 입자 크기를 유지하였다.

5) 0.03 % Isoquercitrin 함유 에토솜은 일반 리포솜, 에탄올 용액, 증류수 용액보다 높은 피부 투과능을 나타내었다. 피부 투과 능력은 에토솜 > 리포솜 > 에탄올 용액 > 증류수 용액 순으로 나타났다.

6) 0.1 % Isoquercitrin을 함유한 탄성 리포솜의 물리적 특성을 측정된 결과 인지질과 계면활성제 비율이 각각 90 : 10, 85 : 15인 ELI-3와 ELI-4가 가장 우수한 제형으로 나타났다. ELI-3는 입자크기가 $303.05 \pm 1.15 \text{ nm}$, 가변형성지수는 59.47 ± 3.86 , 포집효율은 57.5 %를 나타내었으며 ELI-4는 $341.2 \pm 1.5 \text{ nm}$ 의 입자크기, $59.89 \pm 4.86 \text{ nm}$ 의 높은 가변형성 지수, 54.3 %의 포집효율을 나타내었다.

7) 0.1 % Isoquercitrin을 함유한 탄성 리포솜(ELI-4, ELI-3) 일반 리포솜(ELI-1), 1,3-butylene glycol 용액보다 isoquercitrin의 높은 피부 투과능을 나타내었다. 피부 투과 능력은 ELI-4 > ELI-3 > ELI-1 > 1,3-butylene

glycol 용액 순으로 나타났다. 특히 인지질과 계면활성제의 비율이 85 : 15인 ELI-4 탄성 리포솜은 isoquercitrin의 피부 침투능을 월등히 증진시킴을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 : A103017).

참 고 문 헌

- H. C. Wulf, J. Sandby-Moller, T. Kobayasi, and R. Gniadecki, Skin aging and natural photoprotection, *Micron*, **35**(3), 185 (2004).
- J. Pincemail, Free radicals and antioxidants in human diseases. In analysis of free radicals in biology systems, ed. A. E. Favier, J. Cadet, B. Kalyanaraman, M. Fontecave, and J.-L. Pierre, 83, Birkhauser Verlag Basel, Switzerland (1995).
- J. R. Kanofsky, H. Hoogland, R. Wever, and S. J. Weiss, Singlet oxygen production by human eosinophils. *J. Biol. Chem.*, **263**, 9692 (1988).
- A. Oikarinen, J. Karvonen, J. Uitto, and M. Hanuksela, Connective tissue alterations in skin exposed to natural and therapeutic UV-radiation. *Photodermatology*, **2**, 15 (1985).
- A. Oikarinen and M. Kallioinen, A biochemical and immunohistochemical study of collagen in sun-exposed and protected skin. *Photodermatology*, **6**, 24 (1989).
- L. H. Kilgman, UVA induced biochemical changes in hairless mouse skin collagen: A contrast to UVB effects. *Biological responses to Ultraviolet A Radiation*, ed. F. Urbach, 209 Valdemar, Overland Park (1992).
- K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissues of skin: Its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy. *Adv. Pharmacol.*, **38**, 639 (1997)
- K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.*, **331**, 304 (1993).
- M. Wlaschek, K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Singlet oxygen may mediate the ultraviolet a induced synthesis of interstitial collagenase. *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194 (1995).
- L. Packer, Ultraviolet radiation (UVA, UVB) and skin antioxidants. In: Free radical damage and its control, eds. C. A. Rice-Evans and R. H. Burdon, *Elsevier Science B.V.*, 239 (1994).
- K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissue of skin: Its prevention and therapy. In: Antioxidants in disease mechanisms and therapy, eds. H. Sies, *Advances Pharmacology* (1997).
- J. J. Thiele, C. O. Barland, R. Ghadially, and P. M. Elias, Permeability and antioxidant Barriers in aged epidermis, Skin Aging (B. A. Gilchrest, J. Krutman, eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65 (2006).
- S. N. Park, Skin aging and antioxidants, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**(1), 75 (1997).
- M. Choe, K. C. Han, and H. S. Kim, Incorporation efficiency and stability of antioxidant nutrients entrapped in liposome, *Kor. J. Gerontol.*, **11**(1), 21 (2001).
- G. E. El Maghraby, B. W. Carry, and A. C. Williams, Liposome and skin: From drug delivery to model membrane, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **34**(4-5), 203 (2008).
- M. M. A. Elsayed, O. Y. Abdallah, V. F. Naggar, and N. M. Khalafallah, Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery, *Int. J. Pharm.*, **332**(1-2), 60 (2007).
- E. Touitou, N. Dayan, L. Bergelson, B. Godin, and M. Eliaz, Ethosomes - novel vesicular carriers for enhanced delivery: Characterization and skin penetration properties, *J. Control. Release*, **65**(3), 403 (2000).
- V. M. Knepp, R. S. Hinz, F. C. Szoka, and R. H. Guy, Controlled drug release from a novel liposomal delivery system. I. Investigation of transdermal potential, *J. Control. Release*, **5**(3), 211 (1988).
- V. M. Knepp, F. C. Szoka, and R. H. Guy, Controlled drug release from a novel liposomal delivery

- system. II. Transdermal delivery characteristics Original Research Article. *J. Control. Release*, **12**(1), 25 (1990).
20. H. J. Gwak and B. S. Jin, Preparation and Characterization of EGCG Entrapped ethosome, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **18**(2), 130 (2007).
 21. E. Touito, B. Godin, and C. Weiss, Enhanced delivery of drugs into and across the skin by ethosomal carriers, *Drug Dev. Res.*, **50**, 406 (2000).
 22. E. Touito, V. M. Meidan, and E. Horwitz, Methods for quantitative determination of drug localized in the skin, *J. Control. Release*, **56**, 7 (1998).
 23. V. Dubey, D. Mishra, T. Dutta, M. Nahar, D. K. Saraf, and N. K. Jain, Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes, *J. Control. Release*, **123**, 148 (2007).
 24. V. Dubey, D. Mishra, and N. K. Jain, Melatonin loaded ethanolic liposomes: Physicochemical characterization and enhanced transdermal delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **67**, 398 (2007).
 25. P. L. Honeywell-Nguyen, H. W. Wouter Groenink, A. M. de Graaff, and J. A. Bouwstra, The *in vivo* transport of elastic vesicles into human skin: Effects of occlusion, volume and duration of application, *J. Controlled Release*, **90**, 243 (2003).
 26. G. Ceve, A. Schatzlein, and H. Richardsen, Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semipermeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements, *Biochim. Biophys. Acta*, **1546**, 21 (2002).
 27. Q. Chang, Z. Zuo, M. S. S. Chow, and W. K. Ho, Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **59**(3), 549 (2005).
 28. C. G. Silva, R. J. Raulino, D. M. Cerqueira, S. C. Mannarino, M. D. Pereira, A. D. Panek, J. F. M. Silva, F. S. Menezes, and E. C. A. Eleutherio, *In vitro* and *in vivo* determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and Hyptis fasciculata, *Phytomedicine*, **16**, 761 (2009).
 29. H. Inaba, M. Tagashira, D. Honma, T. Kanda, Y. Kou, Y. Ohtake, and A. Amano, Identification of hop polyphenolic components which inhibit prostaglandin E2 production by gingival epithelial cells stimulated with periodontal pathogen, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 527 (2008).
 30. A. P. Rogerio, A. Kanashiro, C. Fontanari, E. V. G. da Silva, Y. M. Lucisano-Valim, E. G. Soares, and L. H. Faccioli, Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma, *Inflamm. Res.*, **56**(10), 402 (2007).
 31. D. Zielinska, W. Wiczowski, and M. K. Piskula, Determination of the relative contribution of quercetin and its glucosides to the antioxidant capacity of onion by cyclic voltammetry and spectrophotometric methods, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 3524 (2008).
 32. J. E. Kim, H. J. Lee, M. S. Lim, M. A. Park, and S. N. Park, Cellular protective effect and liposome formulation for enhanced transdermal delivery of *persicaria hydropiper* L. Extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Kroea*, **38**(1), 15 (2012).
 33. Y. P. Fang, Y. H. Tsai, P. C. Wu, and Y. B. Huang, Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy, *Int. J. Pharm.*, **356**, 144 (2008).
 34. D. Paolino, G. Lucania, D. Mardente, F. Alhaique, and M. Fresta, Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: *in vitro* percutaneous permeation through human skin and *in vivo* anti-inflammatory activity on human volunteers, *J. Control. Release*, **106**, 99 (2005).
 35. Y. P. Fang, Y. B. Huang, P. C. Wu, and Y. H. Tsai, Topical delivery of 5-aminolevulinic acid-encapsulated ethosomes in a hyperproliferative skin animal model using the CLSM technique to evaluate the penetration behavior, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **73**, 391 (2009).
 36. B. Mohamed, S. Khaled, and A. O. Abdullah, Influence of the flexible liposomes on the skin deposition of a hydrophilic model drug, carboxyfluorescein: Dependency on their composition, *The Scientific World Journal*, **2012**, 9 (2012).
 37. A. Gillet, F. Lecomte, P. Hubert, E. Ducat, B.

- Evrard, and G. Piel, Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **79**, 43 (2011).
38. S. Jain, N. Jain, D. Bhadra, A. K. Tiwary, and N. K. Jain, Transdermal delivery of an analgesic agent using elastic liposomes: Preparation, characterization and performance evaluation, *Curr. Drug Delivery*, **2**, 223 (2005).
39. S. D. Maurya, S. Aggarwal, V. K. Tilak, R. C. Dhakar, A. Singh, and G. Maurya, Enhanced transdermal delivery of indinavir sulfate via transfersome, *Pharmacie Globale*, **1**(06) (2010).
40. G. Cevc and G. Blume, Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force, *Biochim. Biophys. Acta*, **1104**, 226 (1992).