

## 피부투과 기능성 펩타이드를 이용한 경피투과성 상피세포성장인자의 개발

강진선·나하나·박선욱·엄호정·이병규·신희제<sup>†</sup>

(주)프로셀테라퓨틱스 연구개발센터  
(2019년 5월 20일 접수, 2019년 6월 13일 수정, 2019년 6월 19일 채택)

### Development of Dermal Transduction Epidermal Growth Factor (EGF) Using A Skin Penetrating Functional Peptide

Jin Sun Kang, Ha Na La, Sun Uk Bak, Hyo Jung Eom, Byung Kyu Lee, and Hee Je Shin<sup>†</sup>

ProCell R&D Center, ProcellTherapeutics. Inc., #1009 Ace-Twin Tower II, 273, Digital-ro, Guro-gu, Seoul 08381, Korea  
(Received May 20, 2019; Revised June 13, 2019; Accepted June 19, 2019)

**요약:** 상피세포성장인자(epidermal growth factor, EGF)는 인간의 표피 및 진피에서 세포막 수용체와 상호 작용을 통하여 세포의 성장 및 증식을 유도하는 기능을 갖고 있다. 이 같은 EGF의 기능은 의료 및 화장품 분야에서 상처치유 의약품 및 노화방지 화장품의 주요원료로 사용되고 있다. 화장품 원료로서 EGF는 피부장벽으로 알려져 있는 피부 각질층의 투과가 잘 안되기 때문에 가지고 있는 본연의 효능을 구현하는 데 문제가 있다. 본 연구에서는 EGF의 경피투과 효율을 개선하기 위하여 피부 투과능이 확인된 거대분자 전송 도메인(macromolecule transduction domain, MTD)<sub>151</sub>이 융합된 형태로 재조합 인간 상피세포성장인자(MTD<sub>151</sub>-EGF)를 개발하였다. MTD<sub>151</sub>-EGF의 유전자가 coding된 vector로 형질전환된 대장균에서 MTD<sub>151</sub>-EGF 발현시킨 후 정제를 진행하였다. 정제된 MTD-EGF를 대상으로 세포증식시험, 세포독성시험, 생체외 피부흡수시험 그리고 인공피부를 이용한 경피투과능을 평가하였다. 99% 이상 고순도로 정제된 MTD<sub>151</sub>-EGF의 세포증식 활성은 EGF 대비 동등 이상의 수준이었으며, 세포독성은 관찰되지 않았다. 또한, 인공피부 투과모델에서 FITC로 표지된 EGF와 MTD<sub>151</sub>-EGF의 진피층까지의 투과를 공초점 현미경으로 관찰한 결과, MTD<sub>151</sub>-EGF는 EGF 대비 우수한 투과능을 보였으며, 경피흡수 시스템을 이용한 투과물질의 정량분석 결과, EGF 대비 약 16 배 이상 투과량이 많은 것으로 확인되었다. 이러한 결과들은 다양한 활성물질들의 화장품용 원료로서의 경피투과에 MTD가 기존의 물리적인 경피투과 방법을 효율적으로 개선한 대안이 될 것으로 판단된다.

**Abstract:** The epidermal growth factor (EGF) has a intrinsic function of inducing growth and proliferation of cells through interacting with cell membrane receptors in human epidermis and dermis layer. These functions of EGF are used as a main ingredient for wound healing medicines and anti-aging cosmetics. As a cosmetic ingredient, the EGF has a problem in exhibiting its natural efficacy due to the lack of the ability to penetrate through the stratum corneum, which is known as the skin barrier. In this study, a recombinant human epidermal growth factor (MTD<sub>151</sub>-EGF) fused with the macromolecule transduction domain (MTD)<sub>151</sub> with the skin penetration ability was developed to improve the skin penetration efficiency of the EGF. Expression of MTD<sub>151</sub>-EGF was performed in *E. coli* transformed with a vector encoding the MTD<sub>151</sub>-EGF gene and then purified. The purified MTD<sub>151</sub>-EGF was evaluated using cell proliferation assay, cytotoxicity test and skin penetration test by franz diffusion cell assay and artificial skin. Cell proliferation activity of MTD<sub>151</sub>-EGF purified to high purity of 99% or above was equivalent to the EGF or better, and cytotoxicity was not observed. In addition, the MTD<sub>151</sub>-EGF showed an excellent penetration efficiency compared to the EGF in the

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: [hjshin@procellrx.co.kr](mailto:hjshin@procellrx.co.kr)  
call: 02)6675-7224

skin penetration test with EGF and MTD<sub>151</sub>-EGF labeled by FITC in an artificial skin penetration model. Based on the quantitative analysis of the penetrating substance using franz diffusion cell assay, the amount of penetration was about 16 times more than that of EGF. These results can be regarded as an effective alternative to improve the existing physical transdermal penetration method related to the use of various active ingredients for cosmetics.

**Keywords:** epidermal growth factor, MTD-EGF, recombinant human EGF, macromolecule transduction domain, MTD

## 1. 서 론

상피세포성장인자는 미국의 생물학자 스탠리 코헨 박사에 의해 발견되었으며, 53개의 아미노산이 3개의 이중설파이드 결합(disulphide bond)으로 구성된 분자량 약 6,045 Da의 폴리펩티드이다[1,2]. EGF는 세포 표면에 존재하는 상피세포성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor; EGFR)에 특이적으로 결합하여 세포의 성장, 증식 및 분화를 촉진시키는 성장인자로서 섬유아세포의 세포증식 촉진, 피부 손상부위의 혈관 신생촉진 및 다른 재생 촉진인자의 분비유도, 피브로넥틴(fibronectin)의 합성촉진 등 피부 재생에 핵심적 역할을 담당한다[3,4]. 국내에서 EGF가 함유된 연고는 화상 환자들에게 피부 재생목적으로 많이 사용하고 있다[5].

EGF는 2005년 가을부터 정식으로 화장품 원료로 등록되면서 화장품 성분으로 사용되어왔으며, 식품의약품 안전처(KFDA)에서는 EGF의 화장품 원료 사용에 대한 남용을 막기 위하여 사용حد도를 마련해 고시하였다[19].

EGF는 피부의 상피세포에 작용하여 노화로 인하여 나타나는 피부 처짐이나 주름 현상을 완화시키는 효능이 있어 피부를 젊게 유지하는데 도움을 준다. 미국의 브라운 박사가 실시한 EGF의 효능평가 시험결과에서 시험에 참여한 50세 이상의 사람들에게 60일간 연속하여 EGF를 투여시 상피세포의 성장이 큰 폭으로 증가 된다는 것이 확인되었다. 특히, EGF를 배합한 로션은 EGF가 무첨가된 로션보다 최고 872%, 평균 284%의 높은 비율로 세포 성장 효과를 나타냈다[6].

피부재생에 유효한 EGF를 인체에 사용하기 위해서는 주사 또는 피부에 도포하는 방법으로 주로 사용할 수 있다. 하지만, 세포 성장인자를 외용제로 사용하였을 때, 낮은 피부 투과율과 피부조직에 존재하는 단백질 분해효소에 의한 분해로 인하여 국부적 효과를 달성하기가 매우 어렵다.

인체의 가장 큰 부위를 차지하고 있는 피부는 표피, 진

피 그리고 피하조직으로 구성되어 있으며, 외부 환경으로부터 신체방어, 열 조절, 증발 조절 등의 다양한 기능을 하고 있다. 특히 피부장벽을 구성하는 각질층 고유의 특성으로 인하여 피부를 통하여 전달될 수 있는 분자량은 약 500 Da 이하로 알려져 있다. 하지만 저분자 물질도 피부투과 효율이 낮으며, 성장인자와 같은 고분자량 물질들의 투과 효율은 더욱 낮은 것으로 알려져 있다. 따라서, 화장품 산업에서 피부 유효물질의 효과적인 전달을 위한 안전한 방법의 필요성은 매우 큰 실정이다.

이에 따라 피부 생리활성물질의 경피 투과율을 개선시킬 수 있는 다양한 방법들이 연구되어 왔으며, 크게 물리적, 생화학적, 그리고 화학적 방법 등으로 나눌 수 있다. 물리적 접근방법에는 주로 전기(iontophoresis 그리고 electroporation)[13], 초음파(sonophoresis)[14], 열(thermal ablation)을 이용하며, 이러한 방법들은 짧은 시간에 생리활성물질의 투과율을 증진시킬 수 있지만, 피부의 비가역적 손상을 초래할 수 있다. 생화학적 방법은 경피투과 효율을 향상시키기 위해 생리활성물질의 전구체를 이용하거나 보조 물질을 함께 처리하여 유효성분이 피부를 투과하는 동안 활성화되도록 하여 효능을 나타내게 하는 방법이다. 그리고, 화학적 접근방법은 피부 각질층의 구조적 변화, 유동성 또는 친화도를 증가시키기 위해 다양한 종류의 계면활성제, 용매 및 지방산 등이 생리활성물질을 담지하고 있도록 복합체의 형태인 담체-매개 전달시스템(carrier-mediated delivery systems)[15]을 이용하는 방법이다. 최근에는 이러한 저분자 및 거대 분자들이 피부를 투과하는 효율을 증폭시키기 위한 방법으로서, 트랜스더멀 젤(transdermal gels), 트랜스더멀 패치(transdermal patch) 및 마이크로 니들(microneedles)등을 이용한 피부 투과 방법도 사용되고 있다[7].

이에 본 연구에서는 EGF의 경피투과 효율성의 증대를 위해 펩티드계(peptide-base) 전달시스템을 적용하여 피부 투과율을 향상시키고자 하였다. 펩티드를 이용하여 유효 물질을 진피층으로 전달하기 위한 많은 연구들이 진행되어 왔다. 특히 세포막 투과를 촉진하는 단백질 전송 도메

인(protein transduction domain, PTD) 기술은 13~16개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 이용하여 유효물질을 세포막 안으로 전달하는 방식이다[8,9]. PTD는 주로 염기성 아미노산 위주의 서열로 이루어져 있으며, 중성 pH 환경에서 + 전하를 띄게 된다. 이러한 PTD의 특성상 음전하를 띄고 있는 세포막과의 친화성은 높지만, 피부의 각질투과성은 높지 않은 것으로 나타났다. 이는 피부 각질층(stratum corneum, SC)의 구조가 각질세포 brick과 각질세포 사이를 채우는 mortar 형태로 이루어져 있고, mortar는 각질형성세포로 분화되는 comeocytes와 lamellar bodies의 분비물인 세라마이드, 콜레스테롤, 그리고 지방산으로 대부분 구성되어 있어 친수성인 PTD가 이를 통과하기가 어렵기 때문이다[10,17].

이러한 펩타이드를 이용한 피부투과 전송기술은 거대분자 세포내 전송기술(macromolecule intracellular transduction technology, MITT)의 활용으로 해결할 수 있다. 세포 내 전달 효율이 향상되고, 구조 및 정전기적 특성이 PTD와는 다른 거대분자 전송 도메인(macromolecule transduction domain, MTD)을 세포막 투과가 곤란한 단백질, 핵산과 같은 거대분자들에 연결하여 세포막투과 효능을 부여한 것이다. 펩타이드, 소수성 저분자 화합물 등은 MTD와 연결 시 거대분자 대비 용이하게 세포막을 투과한다. MTD는 세포내 전송과정에서 내포작용 및 에너지는 필요로 하지 않으면서 세포막의 강직성(rigidity)과 완전성(integrity)이 영향을 미치기 때문에 세포막과 MTD의 직접적인 상호작용(direct interaction)이 세포투과에 중요 요소로 작용한다 [11,12]. 그리고 다양한 종류의 물질에 이같은 MTD를 연결하여 세포내 질환표적을 공략하고자 하는 많은 연구가 진행되어 왔다[20-25].

MTD는 기존의 세포막 투과성 펩티드인 PTD에 비하여 전송시키하고자 하는 펩타이드 및 단백질과 같은 거대분자, 일명 화물(cargo material)의 세포내 전달 효율이 높고, 세포 간 전달 (cell-to-cell delivery)의 장점을 가지고 있어 유효물질의 피부투과 및 전달이 필요한 치료제 및 화장품 등 개발에 그 활용성이 높게 평가되고 있다. 따라서 본 연구에서는 피부의 고유 특성으로 인해 피부를 통해 전달되기 어려운 EGF를 피부 내로 효율적으로 투과시키기 위해 MTD와 EGF를 연결하여 피부 투과능이 개선된 형태로 개발하고, 이의 세포증식 활성, 세포독성 및 경피투과 효율을 평가하고자 하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 거대분자 전송 도메인(MTD)의 선별

MTD의 선별 및 서열 정보는 (주)프로셀테라퓨틱스(Korea)가 보유한 다양한 MID 중 피부투과 실험을 통하여 피부 투과율이 우수한 MID-151을 선별하였다. MID-151의 아미노산 서열 및 DNA서열은 아래와 같다.

아미노산 서열 : AAPVAAVP

DNA 서열 : gca gcg gcg ccg gtg gca gcg gtg ccg

### 2.2. 발현벡터 제작

사람 EGF 유전자 서열은 GenBank (accession number NM\_001963)으로부터 얻었으며, mature EGF 유전자는 Gen Script (USA)로부터 대장균 발현 적합 코돈으로 치환한 서열을 합성하여 사용하였다. EGF는 제한효소 NdeI과 XhoI을 사용하여 pET17b vector에 삽입하였다. MTD<sub>151</sub>-EGF는 MTD 서열을 포함하는 프라이머를 제작하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 사용된 프라이머의 서열은 아래와 같다.

MTD<sub>151</sub>-EGF Fw: 5'-caa aca tat gaa ctc gga ctcg

MTD-EGF Rv: 5'-caa act cga gtc acg gca ccg ctg cca ccg gcg ccg ctg cgc gca gtt ccc acc act tca

PCR은 2X TOPsimple™ DyeMIX-nTaq (Enzynomics, Korea)를 사용하여 수행하였으며, agarose gel에 전기영동하여 증폭을 확인한 후, QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)을 이용하여 분리하였다. 분리된 PCR 산물은 제한효소 NdeI과 XhoI을 사용하여 pET17b vector에 삽입하였다.

### 2.3. 재조합 인간 상피세포 성장인자의 배양 및 정제

재조합 EGF 및 MTD<sub>151</sub>-EGF 발현 세포주는 제작된 발현벡터 pET17b-EGF 및 pET17b-MTD<sub>151</sub>-EGF vector를 *Escherichia coli* (*E.coli*) BL21 (DE3)에 형질전환시킨 후, 재조합 EGF 및 MTD<sub>151</sub>-EGF가 발현되는 colony를 선별하여 확보하였다.

EGF와 MTD<sub>151</sub>-EGF의 발현 및 정제는 아래에 기술한 방법으로 진행되었다. 재조합 단백질의 발현을 위하여 종 배양은 200 mL Luria-Bertani (LB)배지에 엮피실린(ampicillin, Sigma aldrich)을 최종농도가 50 mg/L가 되도록

첨가하고, MTD<sub>151</sub>-EGF의 유전자가 삽입된 플라스미드가 형질 전환된 *E. coli* BL21(DE3)의 현탁액을 0.5% (v/v)가 되도록 접종하였다. 이후, 37 °C 진탕배양기에서 200 rpm으로 16 ± 1 h 동안 배양하였다. 본 배양은 2 L erlenmeyer flask 를 이용하여 진행하였으며, 종 배양한 배양액을 3% (v/v) 되도록 접종하고 37 °C 진탕배양기에서 200 rpm으로 OD<sub>600</sub>이 0.6-0.7에 도달할 때까지 배양한 다음, isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 1 mmol/L가 되도록 첨가하고, 37 °C 진탕배양기에서 200 rpm으로 3 h 동안 추가 배양하여 재조합 단백질의 발현을 유도하였다.

배양 종료 후, 배양액을 원심분리(8000 rpm, 30 min, 4 °C)하여 *E. coli* 균체를 분리 회수하였다. 분리된 균체에 용해 완충용액(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 10 mmol/L EDTA)을 균체 g 당 20 mL을 넣어 분산시키고 초음파 세포파쇄기를 이용하여 세포파쇄를 수행하였다. 세포파쇄를 마친 세포 파쇄액을 원심분리(8,500 rpm, 30 min, 4 °C)하여 상층액을 제거한 후, 봉입체(inclusion body, IB)를 회수하였다. 분리한 봉입체에 용해화용 완충용액(8 mol/L urea, 5 mmol/L dithiothreitol (DTT), pH 12.0)에 현탁 시킨 후, 상온에서 30 min 동안 교반하여 봉입체의 완전 용해화를 유도하였다.

용해화한 시료와 재접힘(refolding) 완충용액(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 0.4 mol/L arginine)의 비율이 1 : 7 (v/v)이 되도록 첨가하여 섞어주었다. 이후 환원형 glutathione (GSH)과 산화형 glutathione (GSSH)을 1 : 4의 비율로 첨가하여 4 °C에서 16 ± 1 h 이상 재접힘을 유도하였다[16]. 재접힘이 완료된 후, 시료는 탈염 과정을 거쳐 과량의 염 및 재접힘 용액의 첨가제를 제거하였으며, 이온교환 크로마토그래피(Q-sepharose chromatography, GE healthcare, USA)에 적용하여 정제를 진행하였다. 이후, 크기배제크로마토그래피(Size exclusion chromatography, HiLoad 26/60 superdex 75 prep grade, GE healthcare, USA)를 이용하여 단위체의 형태로 재접힘된 EGF 또는 MTD<sub>151</sub>-EGF의 분리를 진행하였다. 정제된 EGF 및 MTD<sub>151</sub>-EGF는 centrifugal device (AmiconUltra, 3K, Millipore, USA)를 이용하여 1 mg/mL 농도로 농축한 다음 10 mL씩 소분하여 -80 °C 저온 냉장고에 보관하며 연구에 사용하였다.

## 2.4. 순도 및 확인시험

정제 완료된 단백질의 순도분석을 위해 우선 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-

PAGE)를 수행하였으며 환원형(reduced form)과 비환원형(non-reduced form)을 15% SDS-PAGE 겔을 이용하여 확인하였다. 이미지 정량분석 프로그램(Totallab Quant software)를 이용하여 SDS-PAGE 겔상에 나타난 모든 밴드 수치를 계산한 후, EGF 및 MTD<sub>151</sub>-EGF 각각의 단일밴드 수치를 비교하여 순도를 계산하였다.

EGF 및 MTD<sub>151</sub>-EGF의 확인시험은 15% SDS-PAGE 겔을 이용하여 환원형(reduced form)과 비환원형(non-reduced form)에 대해 western blot을 수행하여 확인하였다. 먼저, SDS-PAGE를 수행 후, PVDF membrane으로 단백질의 transfer (300 mA, 1 h)를 진행하였다. Transfer한 PVDF membrane에 5% skim milk를 넣고 1 h 동안 blocking을 진행하였으며, 1차 항체(Anti human EGF polyclonal antibody, Biovision, USA) 반응(16 h, 4 °C) 및 2차 항체(Goat anti rabbit IgG-HRP, Santa cruz biotechnology, USA) 반응(1 h, 상온)을 순차적으로 진행 후, LAS image reader기(LAS 4000, Fuji film, Japan)를 이용하여 결과를 확인하였다.

## 2.5. 세포 배양 및 세포 증식 효능 측정

인간섬유아세포(normal human dermal fibroblast, NHDF)는 american type culture collection (Manassas, USA)에서 구입하여 사용하였다. NHDF의 배양은 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, USA)를 첨가한 DMEM (dulbecco's modified eagle's medium, Invitrogen, USA) 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터(incubator)에 적응시켜 계대 배양하면서 증식시험에 사용하였다.

마우스섬유아세포(BALB/3T3 clone A31)는 KCLB (Korea Cell Line Bank, Korea)로부터 구입하였으며, 10% bovine calf serum (Hyclone, USA)을 첨가한 DMEM배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에 적응시켜 계대배양하였다.

시료의 세포 증식 효능 측정은 WST-1 assay로 진행하였다. 배양된 세포를 96 well plate에 각각 5 × 10<sup>3</sup> cells/well로 접종하고 24 h 배양한 후, 세럼이 없는 DMEM 배지로 교체한 후 시료를 농도별로 희석하여 각 3회 반복 처리하고 48 h 동안 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다. WST-1 용액(Roche, Switzerland)을 배양된 세포에 10 μL씩 처리하여 4 h 반응시킨 후 microplate reader (Spectra Max, Molecular devices, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구 대비 EGF와 MTD<sub>151</sub>-EGF가 첨가된 시험구의 세포 증식량을 계산하였다.

2.6. 세포독성(Cell Cytotoxicity) 확인 실험

인간섬유아세포는 동결 보관된 세포주를 해동하여 dulbecco modified eagle medium (DMEM) complete media에 배양하고, 2회 이상 계대 배양하여 안정화 시킨 다음 실험에 사용하였다. 세포수는 trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) treatment를 수행하여 세포를 떼어낸 후, 세포 계수기(TC10 automated cell counter, Bio-Rad, USA)를 이용하여 세포수를 측정하였다.

96 well plate에 세포를  $2 \times 10^3$  cells/well이 되도록 접종하고, 0.1 mL complete media 넣어준 후, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 24 h 배양하였다. MID<sub>151</sub>-EGF는 0.01 ng/mL - 10,000 ng/mL 범위에서 10 배수로 농도를 달리하여 준비하였으며, 세포배양액을 제거하고 각 well에 complete media 50 μL씩을 첨가하였다. 이후, EGF와 MID<sub>151</sub>-EGF 희석액을 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1,000, 10,000 ng/mL이 되도록 각 well에 50 μL씩 첨가하여 인큐베이터에서 24 h 동안 배양 (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)하였다.

Lactate dehydrogenase (LDH) 측정을 위해 multichannel pipette을 이용하여 세포배양액을 새 96 well plate에 40 μL씩 옮겨 담았다. LDH substrate mix solution (Promega, USA)을 각각의 well에 40 μL씩 넣어준 후, 빛을 차단하고 상온에서 30 min간 반응시켰다. 단백질을 처리하지 않은 well에 lysis solution 10 μL를 넣어 LDH 양성 대조군으로 사용하였다. 30 min 반응 진행 후 반응 정지액을 각각의 well에 40 μL씩 넣어 반응을 정지시킨 후, microplate reader (Spectra Max, Molecular devices, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 흡광도값을 아래와 같은 계산식에 대입하여 cytotoxicity (%) 값을 환산하였다.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{Sample}}{\text{Maximum control}} \times 100$$

2.7. 경피흡수시스템(Franz Diffusion Cell Assay System)

을 이용한 인공피부 투과량 분석

인공피부는 EpiDerm™ Skin (MatTek, USA)을 구매하여 사용하였으며, EpiDerm™ 인공피부의 경우 동봉된 인공피부 전용 배지 2.5 mL을 넣고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 16 h 동안 평형화(equilibration)를 진행한 후, 피부투과 실험에 사용하였다.

EGF와 MID<sub>151</sub>-EGF를 5 mg/mL의 농도가 되도록 준비한 후, 경피흡수시스템 (microetteplus diffusion test system,

Hanson Research, USA)의 정적 확산장치(franz diffusion cell)에 EpiDerm skin을 장착하고 그 위에 준비한 단백질을 정적확산장치의 공여칸(donor chamber)에 400 μL 점적하고 경피흡수시스템을 32 °C, 400 rpm으로 유지하면서 24 h 동안 반응시켰다. 24 h 후, 정적확산장치의 수용칸(receptor chamber)의 시료를 수거하여 ELISA 정량 분석 키트(human EGF Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, USA)를 이용하여 투과된 단백질의 농도를 측정하여 정량분석을 수행하였다.

2.8. 공초점현미경(Confocal Laser Scanning Microscope)을 이용한 인공피부투과능 확인 실험

공초점 현미경을 이용한 피부투과능을 확인하기 위하여 먼저 EGF와 MID<sub>151</sub>-EGF에 형광물질인 fluorescein isothiocyanate (FITC)의 표지(labeling)를 진행하였다. 각각 50 mM Boric acid 완충용액에 1 : 20 molar ratio 비율로 FITC와 단백질을 혼합하였으며, 4 °C에서 24 h 동안 반응을 진행하였다. FITC 표지가 끝난 후 PD-10 컬럼 (GE Healthcare, USA)을 사용하여 반응하지 않고 유리된 과량의 FITC를 제거하였다. 피부투과능 시험에 사용된 인공피부는 EpiDermFT™ Skin (MatTek, USA)를 구매하여 사용하였으며, 동봉된 인공피부 전용 배지 2.5 mL을 넣고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 16 h 동안 인공피부의 평형화를 진행하고, 피부투과 실험에 사용하였다.

FITC가 표지된 EGF와 MID<sub>151</sub>-EGF의 농도를 각각 0.2 mg/mL로 맞춘 후 인공피부에 40 μL씩 도포 하였다. 도포 후 32 °C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 24 h 동안 투과반응을 진행하였다. 24 h 후, 잔여 시료가 남지 않도록 인공피부표면을 PBS로 3회 세척 후 피부조직을 분리하여 embedding cassette에 넣었다. 인공피부조직이 들어있는 embedding cassette를 10% formalin 용액에 넣어 4 °C에서 24 h 동안 고정하고, sucrose infiltration 과정을 거친 후, 동결 절편 제작을 진행하였다. 처리한 EGF-FITC 와 MID<sub>151</sub>-EGF-FITC의 인공피부상에서의 투과된 정도는 공초점현미경(LSM 700, Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 관찰 및 촬영을 진행하였다.

2.9. 통계처리

본 연구의 활성 분석 시험, 투과능 분석 실험은 매 실험마다 세 번 반복 수행하였으며, 이때 결과 값들은 mean standard deviation (SD)으로 나타내었다. 실험군에 따른 데

이티별 통계학적 유의성은 Student's t-test를 통하여 검증하였으며,  $p$  값이 0.05 이하일 경우, 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 단백질 발현 및 정제

MTD<sub>151</sub>-EGF vector는 *E.coli* BL21(DE3)에 형질전환되었으며, IPTG를 이용하여 발현을 유도하였다. 본 대장균 발현 시스템에서 EGF와 MTD<sub>151</sub>-EGF의 발현량은 각각  $30 \pm 6$  mg/L와  $50 \pm 10$  mg/L로 확인되었다.

발현된 EGF와 MTD<sub>151</sub>-EGF는 모두 불용성 봉입체의 형태로 발현되었으며, 봉입체를 분리 후, 0.25 mg/mL의 농도에서 재접힘 과정을 거쳐 수용성 상태에서 이온교환크로마토그래피와 크기배제크로마토그래피를 순차적으로 진행하여 정제를 완료하였다. 최종 정제 완료 후, EGF와 MTD<sub>151</sub>-EGF의 생산 수율은 *E.coli* 세포 1g 당 각각 1.5 mg (9.0 mg/L)과 3.4 mg (14.4 mg/L)로 확인되었다.

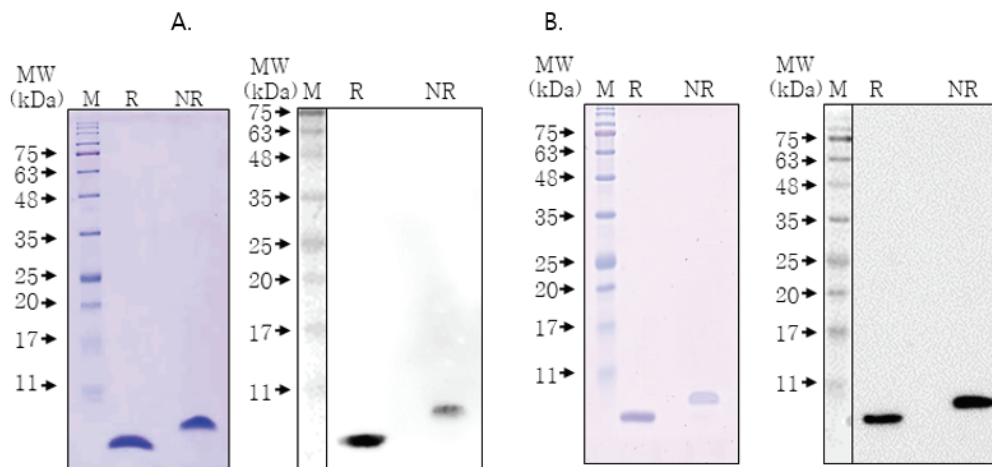
정제 완료된 EGF 및 MTD<sub>151</sub>-EGF의 순도는 SDS-PAGE 겔을 이미지 정량분석 프로그램을 이용하여 분석시 99.5%와 99.1%로 각각 확인되었으며, western blot을 이용한 확인시험 결과, 재조합 인간 EGF임을 확인하였다(Figure 1).

#### 3.2. 세포 증식 효능 측정

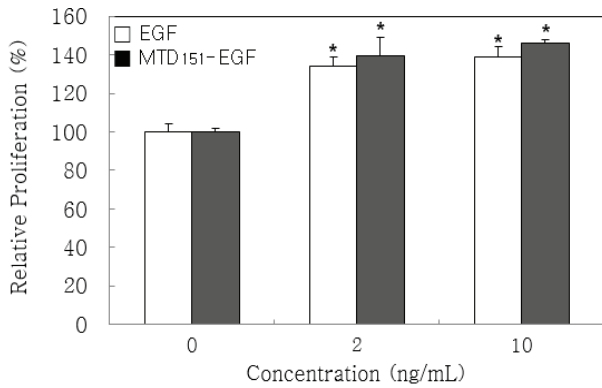
정제된 재조합 단백질 EGF 및 MTD<sub>151</sub>-EGF의 효능을 마우스섬유아세포의 증식 효과로 확인하였다. 즉, 마우스

섬유아세포에 EGF를 2 ng/mL과 10 ng/mL으로 처리한 경우 EGF를 처리하지 않은 그룹 대비 세포증식률이 각각  $134.2 \pm 5.0\%$ ,  $138.9 \pm 5.5\%$ 로 측정되었으며, 마우스섬유아세포에 동일한 농도의 MTD<sub>151</sub>-EGF를 처리한 경우, 각각  $139.4 \pm 10.0\%$ ,  $146.1 \pm 1.6\%$ 로 확인되었다. 이같이 EGF 및 MTD<sub>151</sub>-EGF의 처리 농도를 높임에 따라 마우스섬유아세포의 증식 효과도 증가됨이 확인되었지만, EGF와 MTD<sub>151</sub>-EGF 각각의 세포증식 효과는 유의한 차이를 보이지 않음을 알 수 있다(Figure 2). 이는 MTD<sub>151</sub>를 EGF에 연결시키더라도 EGF의 활성에 영향을 주지 않음을 의미한다.

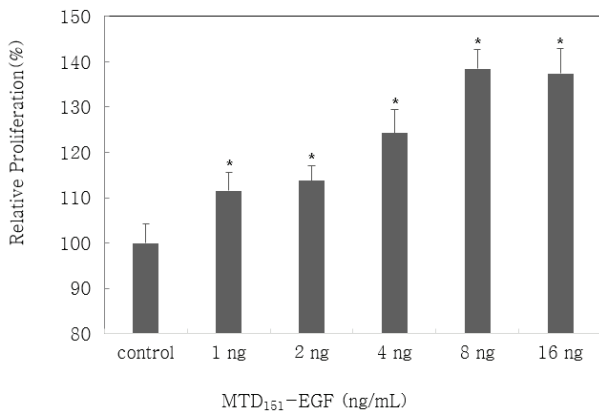
MTD<sub>151</sub>-EGF의 마우스 섬유아세포 증식효능이 인간섬유아세포에서도 동일하게 활성이 나타나는지 확인하기 위해 인간섬유아세포에 대한 증식효능을 관찰하였다. 결과적으로 MTD<sub>151</sub>-EGF의 인간섬유아세포에서의 증식 효능은 농도 의존적으로 세포 증식효과를 나타내는 것으로 확인되었다. MTD<sub>151</sub>-EGF를 농도별(1, 2, 4, 8, 16 ng/mL)로 처리하여 인간섬유아세포의 증식률을 확인한 결과 대조군 대비 각각 111.5, 113.7, 124.2, 138.4, 137.4%로 세포 증식률이 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 8 ng/mL 이상의 농도에서는 더 이상 세포의 증식이 증가하지 않음을 알 수 있다. 이는 MTD<sub>151</sub>-EGF의 인간섬유아세포에 대한 증식효능이 8 ng/mL에서 포화점에 도달하여 더 이상의 농도로 처리하여도 추가적인 세포증식을 유도하지 못함을 의미한다(Figure 3).



**Figure 1.** Purity and identity test of purified EGF(A) & MTD<sub>151</sub>-EGF(B). M, molecular weight marker; R, reduced form; NR, Non-reduced form.



**Figure 2.** Cell proliferation activity of EGF and MTD<sub>151</sub>-EGF on mouse fibroblast (BALB/3T3 Clone A31). Fibroblast were treated with various concentrations of EGF and MTD-EGF for 48 h and cell proliferation was measured by WST-1 reagent. Each values represents mean ( $\pm$  standard deviation, SD) of three independent experiments (Significant as compared to control, \* $p < 0.05$ ).

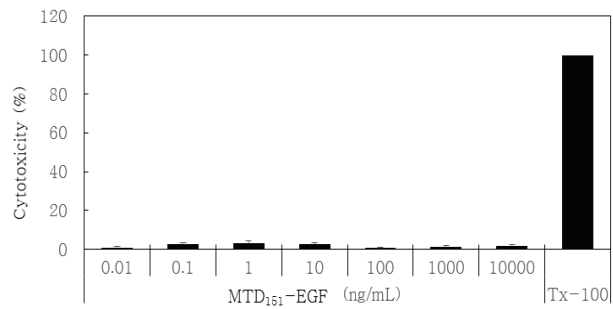


**Figure 3.** Cell proliferation activity of MTD<sub>151</sub>-EGF on NHDF. Cells were treated with various concentrations of MTD<sub>151</sub>EGF for 72 h and cell proliferation was measured by WST-1 reagent. Each values represents mean ( $\pm$  standard deviation, SD) of three independent experiments(Significant as compared to control, \* $p < 0.05$ ).

### 3.3. 세포 독성(Cell Cytotoxicity) 실험

MTD<sub>151</sub>-EGF의 세포독성을 확인하고자, 인간섬유아세포에 MTD<sub>151</sub>-EGF를 0.01~10,000 ng/mL 범위에서 10배로 농도를 증가시켜 처리하고 24 h 배양 후, 배양액으로 분비된 LDH 양을 측정된 결과, MTD<sub>151</sub>-EGF의 10  $\mu$ g/mL의 농도까지 세포독성이 관찰되지 않았다(Figure 4).

MTD<sub>151</sub>-EGF를 처리하지 않은 세포에 Triton-x100을 처



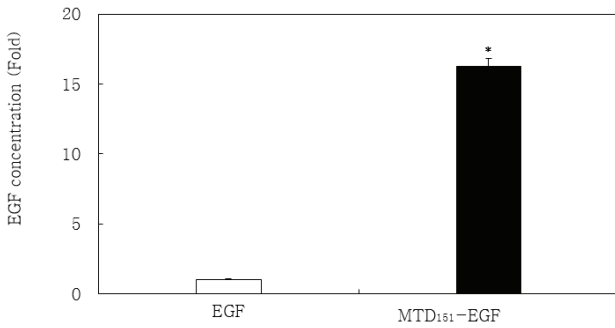
**Figure 4.** LDH assay result of MTD<sub>151</sub>-EGF on NHDF. Cells were treated with various concentrations of MTD<sub>151</sub>-EGF for 24 h and cytotoxicity(%) was measured using LDH assay reagent. Each values represents mean ( $\pm$  standard deviation, SD) of three independent experiments.

리하여 LDH 양성 대조군으로 사용하였으며, 양성대조군에서 측정된 LDH 값을 100으로 하여 MTD<sub>151</sub>-EGF 처리군에서 측정된 LDH 값을 상대 비교하였다. 분석 결과 MTD<sub>151</sub>-EGF는 최대활성을 나타내는 10 ng/mL의 농도보다 1,000배 이상의 농도에서도 세포독성은 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 이는 MTD<sub>151</sub>을 단백질과 같은 고분자량 화장품 원료에 적용하여 사용하더라도 실사용범위인 1~2ppm 범위에서는 피부세포에 안전하다는 것을 의미한다.

EGF의 의약품 원료 및 화장품용 향장원료로서의 이용시 안전성에 대한 우려가 존재하고 있지만, 동물을 이용한 정맥(intravenous) 또는 피하지방층(subcutaneous)으로의 투여를 통한 기존의 많은 안전성시험 결과에서 30~150  $\mu$ g/kg/day/4weeks 투여시에도 중양이 유도되지 않음이 확인되었으며, 사람의 피부 말초조직에 적용하였을 경우에도 10  $\mu$ g/g으로 투여시 안전하다는 연구가 보고되었다[18]. 또한 방사선 유발성 피부염 예방을 위해 EGF가 함유된 크림을 대상으로 수행된 임상시험에서 피부염 예방에 효과적이며, 독성은 거의 관찰되지 않았음이 보고된 바 있다[26]. 따라서, 본연구에서 세포독성 시험결과와 기 연구 보고되었던 EGF의 안전성 자료를 바탕으로 화장품 원료로서 EGF를 안전성이 확인된 적정 농도 이하로 사용할 경우, 중대한 안전성 문제가 발생할 가능성은 매우 낮은 것으로 판단된다.

### 3.4. 경피흡수시스템을 이용한 인공피부 투과량 분석

경피흡수시스템을 이용한 인공피부투과 실험에서 24 h 경과 후 EGF와 MTD<sub>151</sub>-EGF의 시험군의 수용칸으로 투과된 시료를 전량 회수하였다. EGF와 MTD<sub>151</sub>-EGF의 투과량을 비교하기 위하여 각각의 시료를 EGF 정량분석용



**Figure 5.** Quantitative analysis result of EGF and MTD<sub>151</sub>-EGF using EGF ELISA kit. Each values represents mean ( $\pm$  standard deviation, SD) of three independent experiments (Significant as compared to control, \* $p < 0.05$ ).

ELISA assay kit를 이용하여 분석을 진행한 결과 MTD<sub>151</sub>-EGF는 EGF 대비 상대적으로 16.2배 높은 투과율을 보이는 것으로 측정되었다(Figure 5).

EGF 대비 MTD<sub>151</sub>-EGF의 인공피부에서의 이 같은 높은 투과율은 피부투과성 MTD<sub>151</sub>의 기능성에 기인한다고 판단할 수 있다. 즉 MTD<sub>151</sub>은 EGF 외에도 이와 유사한 타 성장인자를 효과적으로 피부 진피층까지 전달할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

3.5. 공초점 현미경을 이용한 인공피부 투과능

FITC로 표지한 EGF와 MTD<sub>151</sub>-EGF를 인공피부에 24 h 동안 점적한 후 시험조직을 절편으로 만들어 공초점 현미경으로 촬영한 사진에서 MTD<sub>151</sub>-EGF-FITC는 EGF-FITC 보다 인공피부의 진피층에서 더 강한 형광세기(Fluorescence intensity)를 보여주고 있다. 따라서, 동일한 농도에서

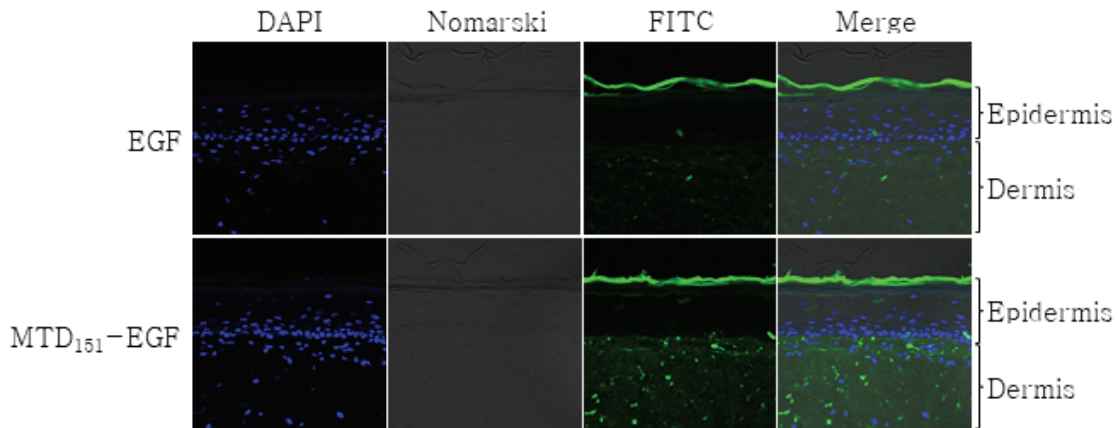
MTD<sub>151</sub>-EGF-FITC가 EGF-FITC보다 더 많은 양이 표피를 투과하여 진피까지 전달된 것을 제시하고 있다(Figure 6).

인공피부를 이용한 EGF와 MTD<sub>151</sub>-EGF의 투과능 시험에서 표피층에서의 형광세기가 진피층에서의 형광세기에 비해 상대적으로 약한 결과를 보여주고 있다. 이는 사람의 피부를 모사하여 제조된 인공피부가 실제 인간 피부의 다당류, 콜라겐 단백질 그리고 지질 등과 같은 다양한 조성물 및 조직구성세포의 치밀도에 있어서 차이에 기인한 것으로 판단된다. 이러한 차이에 의해 MTD<sub>151</sub>-EGF의 흡수, 투과 그리고 조직내의 포집 정도에서 차이가 발생하는 것으로 판단된다[10,17].

4. 결 론

본 연구에서는 화장품용 원료로써 매우 유효한 EGF에 거대분자 세포내 전송 도메인 (MID)를 도입하여 EGF의 피부투과 효율을 증가시켜 EGF의 효능을 최대화 시킬 수 있는 방법을 개발하고자 하였다. 피부투과능이 검증된 MTD<sub>151</sub>를 활용한 경피투과형 재조합 인간 상피세포 성장인자의 개발과정에서 고도의 분리, 정제 기술을 활용하여 순도 99% 이상의 활성형 재조합단백질 MTD<sub>151</sub>-EGF을 확보하였다. 이 같은 고순도의 활성형 재조합단백질 제조기술은 향후 단백질 기반 기능성화장품 원료뿐만 아니라 단백질신약개발 분야에서도 충분히 활용이 가능한 기술인 것으로 사료된다.

인간 섬유아세포의 증식효능 분석을 통하여 MTD<sub>151</sub>-EGF가 EGF와 비교하여 동등 이상 그리고 농도 의존적 증식활성을 가짐을 확인할 수 있었다. 이는 MTD<sub>151</sub>가 EGF의



**Figure 6.** Confocal laser scanning microscope image of EGF and MTD<sub>151</sub>-EGF.



C 말단에 연결되어도 EGF의 3차 구조와 활성 영향을 주지 않음을 제시하고 있다. 따라서 MTD<sub>151</sub>은 피부투과 소재 개발시 핵심물질 활용 폭을 넓힐 수 있다.

인간의 피부 모사 인공피부를 이용한 MTD<sub>151</sub>-EGF의 피부 투과능 연구에서 MTD<sub>151</sub>-EGF는 EGF와 비교하여 효과적으로 진피층까지 침투함을 공초점현미경 촬영에서 확인할 수 있었다. 또한, 경피흡수시스템을 이용한 인공피부 투과량 분석에서 MTD<sub>151</sub>-EGF는 EGF와 비교하여 인공피부 투과능이 약 16배 이상 높은 것으로 나타났다. 이 같은 연구를 통해 확인된 중요한 사실은 피부투과 MTD<sub>151</sub>의 화장품 소재로의 적용을 통하여 피부각질의 물리적 손상없이 EGF와 같은 고분자 기능성물질을 진피로 손쉽게 전달할 수 있음을 알 수 있다.

현재 다양한 기능성물질의 효능 극대화를 위해 화장품 업계에서는 다양한 방법으로 화장품용 활성성분의 피부 전달을 위한 연구를 끊임없이 진행하고 있다. 본 연구는 아직까지 화장품업계에서 난제로 남아있는 고기능성 원료의 각질투과를 위한 획기적이고 효과적인 물질전송 방법을 제안하며, 나아가 피부투과 펩타이드인 MTD<sub>151</sub>은 다양한 화장품용 기능성물질에 적용범위를 넓혀서 사용시 대상물질의 피부투과 효율을 극대화 시킬 수 있는 좋은 도구가 될 것으로 판단된다.

Reference

1. G. Carpenter and S. Cohen, Receptors and Recognition Series B, ed. R. J. Lefkowitz, 13, 43, Chapman and Hall, London (1981).
2. G. Carpenter and S. Cohen, Epidermal growth factor, *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 193 (1979).
3. D. I. Kim, H. J. Han and S. H. Park, The effect of epidermal growth factor on cell proliferation and its related signal pathways in pig hepatocytes, *J. Exp. Biomed. Sci.*, **12**, 249 (2006).
4. C. D. Andl, T. Mizushima, H. Nakagawa, K. Oyama, H. Harada, K. Chruma, M. Herlyn and A. K. Rustgi, Epidermal growth factor receptor mediates increased cell proliferation, migration, and aggregation in esophageal keratinocytes *in vitro* and *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, **278**(3), 1824 (2003).
5. B. C. Park, J. H. Lee, T. G. Kim, and Y. H. Kim,

The accelerated epithelization of recombinant epidermal growth factor on partial-thickness skin wounds, *Journal of Korean Burn Society*, **13**(2), 101 (2010).

6. U. S. Patent, 5618544 (1994).
7. M. R. Prausnitz and R. Langer, Transdermal drug delivery, *Nat. Biotech.*, **26**(11), 1261 (2008).
8. A. Eguchi, T. Akuta, H. Okuyama, T. Senda, H. Yokoi, H. Inokuchi, S. Fujita, T. Hayakawa, K. Takeda, M. Hasegawa, and M. Nakanishi, Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells, *J. Biol. Chem.*, **276**(28), 26204 (2001).
9. N. Ye, Y. Lin, J. Pan, S. Liu and P. Rao, PTD mediated protein transduction technology and its application in medical field, *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, **28**(2), 401(2011).
10. Z. Nemes and P. M. Steinert, Bricks and mortar of the epidermal barrier, *Experimental and Molecular medicine*, **31**(1), 5, (1999).
11. Korea, WO2008093982 (2008).
12. Korea, WO2013077680 (2013).
13. R. Vanbever and V. Preat, *In vivo* efficacy and safety of skin electroporation, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **35**(1), 77 (1999)
14. T. Hikima, S. Ohsumi, K. Shirouzu, and K. Tojo, Mechanisms of Synergistic Skin Penetration by sonophoresis and iontophoresis, *Biol. Pharm. Bull.*, **32**(5), 905 (2009).
15. H. Kalluri and A. K. Banga, Transdermal delivery of proteins, *AAPS PharmSciTech*, **12**(1), 431 (2011).
16. R. Bhagam, K. Nagaiah, P. Parvathi and L. Narasu, Simple two steps purification of rh-epidermal growth factor expressed in *E.coli*, *Res. J. Pharm. Sci. Biotech*, **1**(2), 35 (2011).
17. G. K. Menon, New insights into skin structure: scratching the surface, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**(Suppl. 1), S3 (2002).
18. B. A. Jorge, G. C. Jorge, L. S. Pedro, G. L. Tania, C. S. Maria D, L. M. Ernesto, G. N. Gerardo and H. M. Luis, Epidermal growth factor in clinical practice

- a review of its biological actions, clinical indications and safety implications, *Int Wound J.*, **6**(5), 331 (2009).
19. Ministry of Food and Drug Safety, Notice No 2006-6, Regulations for the designation of raw materials for cosmetics (2006).
  20. J. H. Lim, J. H. Kim, J. S. Kang and D. W. Jo, Partial somatic to stem cell transformations induced by cell-permeable reprogramming factors, *Sci Rep*, **4**, 4361 (2014).
  21. J. H. Lim, T. Duong, G. W. Lee, B. L. Seong, W. El-Rifai, H. E. Ruley and D. W. Jo, The effect of intracellular protein delivery on the anti-tumor activity of recombinant human endostatin, *Biomaterials*, **34**(26), 6261 (2013).
  22. J. H. Lim, J. E. Kim, T. Duong, G. W. Lee, J. H. Kim, J. N. Yoon, J. T. Kim, H. C. Kim, H. E. Ruley, W. El-Rifai and D. W. Jo, Antitumor activity of cell-permeable p18(INK4c) with enhanced membrane and tissue penetration, *Mol. Ther.*, **20**(8), 1540 (2012).
  23. J. H. Lim, T. Duong, N. Do, P. Do, J. T. Kim, H. C. Kim, W. El-Rifai, H. E. Ruley and D. W. Jo, Antitumor activity of cell-permeable RUNX3 protein in gastric cancer cells, *Clin. Cancer Res.*, **19**(3), 680 (2012).
  24. J. H. Lim, G. Y. Jang, S. E. Kang, G. W. Lee, T. T. Nga do, T. L. Phuong do, H. C. Kim, W. El-Rifai, H. E. Ruley and D. W. Jo, Cell-permeable NM23 blocks the maintenance and progression of established pulmonary metastasis, *Cancer Res.*, **71**(23), 7216 (2011).
  25. D. J. Jeon, S. W. Kim, M. Chetana, D. W. Jo, H. E. Ruley, S. Y. Lin, D. Rabah, J. P. Kinet and H. S. Shin, Observational fear learning involves affective pain system and Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channels in ACC., *Nat. Neurosci.*, **13**(4), 482 (2010).
  26. H. C. Kang, S. D. Ahn, D. H. Choi, M. K. Kang, W. K. Chung, and H. G. Wu, The safety and efficacy of EGF-based cream for the prevention of radiotherapy-induced skin injury: results from a multicenter observational study, *Radiat Oncol J*, **32**(3), 156 (2014).