

사과 캘러스로부터 분리된 엑소솜-유사 Nanovesicles 의 피부 장벽 및 피부 노화 방지 개선 연구

서유리[†] · 이광수 · 강용원[‡]

(주)바이오솔루션

(2021년 4월 29일 접수, 2021년 6월 3일 수정, 2021년 6월 10일 채택)

Study on Reinforcing Skin Barrier and Anti-aging of Exosome-like Nanovesicles Isolated from *Malus domestica* Fruit Callus

Yu-Ri Seo[†], Kwang-Soo Lee, and Yong-Won Kang[‡]

Biosolution Co., Ltd., 804, Seoul Technopark, 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

(Received April 29, 2021; Revised June 3, 2021; Accepted June 10, 2021)

요약: 식물 유래 exosome-like nanovesicles (plant-derived exosome-like nanovesicles, PELNs)은 다양한 생물학적 활성을 포함하고 높은 생체 적합성을 가지고 있다. 인체 내에서 PELNs은 세포 분화 및 증식 조절에 영향을 미칠 수 있어 여러 산업 분야에서 응용이 가능하다. 하지만, PELNs의 피부 생리적 기능에 대한 연구는 포유류 nanovesicles에 비해 미미한 실정이다. 본 연구에서는 사과 열매로부터 캘러스를 유도하고 exosome-like nanovesicles (Exosome-like nanovesicles isolated from *Malus domestica* (apple) fruit callus, ACELNs)를 분리하여 피부 장벽 및 피부 노화 개선에 대한 연구를 수행하였다. ACELNs의 수율은 6.42×10^9 particles/mL이였으며, 입자 사이즈는 100 ~ 200 nm 범위로 감지되었다. 인간 유래 피부세포인 HDF cells과 HaCaT cells에서 세포 증식을 유도하였으며, 세포 독성 억제 효과를 보였다. 각질형성능이 유의하게 증가했으며, mRNA levels에서 COL1A1과 FBN1 발현을 증가시켰다. 또한, UVA 조사된 HDF cells에 대한 collagen 합성을 촉진시켰다. 이러한 결과들은 ACELNs가 피부장벽 개선 및 피부노화를 방지할 수 있는 소재로서 활용하기 우수한 소재로 사료된다.

Abstract: Plant-derived exosome-like nanovesicles (PELNs) are known to include various biological activities and possess high biocompatibility. Because PELNs can influence immune responses, cell differentiation, and proliferation regulation, they can be applied in multiple industries. However, the studies on the skin physiological of exosome-like nanovesicles derived from plant callus are insignificant compared to nanovesicles derived from mammalian cells. In this study, callus was induced from apple fruit (*Malus domestica*), and exosome-like nanovesicles (ACELNs) were isolated for improving skin barrier and anti-aging. The yield of ACELNs was 6.42×10^9 particles/mL, and the particle size was ranged from 100 to 200 nm. HDF cells and HaCaT cells were concentration-dependent, increased in cell, and decreased in cytotoxicity. The cornified envelope formation was significantly increased compared to the control group. The COL1A1 expression and the FBN1 expression in HDF cells were increased. In addition, the ACELNs promoted collagen biosynthesis in UVA-irradiated HDF cells. These results might be considered as potential materials that could improve skin barrier and prevent skin aging.

Keywords: plant callus, exosome-like nanovesicles, cosmetic, skin barrier, skin aging

[†] 주 저자 (e-mail: nsx102@biosolutions.co.kr)

call: 02-6491-6667

[‡] 교신저자 (e-mail: alpower@biosolutions.co.kr)

1. 서론

피부는 인체의 최외각을 감싸는 중요한 보호 기관 중 하나로, 외부 물질로부터 인체를 보호해 주는 중요한 역할을 한다. 최근에는 자외선, 미세먼지 등 외부 물질에 대한 피부 손상을 개선하고자 하는 연구가 지속되고 있다. 자외선이 피부에 노출이 되면 protein kinase R (PKR) 활성화를 통해 광손상과 관련된 단백질 인자들의 생성을 촉진하면서 피부 노화가 발생 된다[1]. 따라서, 자외선에 대한 과도한 피부의 노출은 피부암 등 피부질환에 직접적인 영향을 끼칠 수 있다[2]. 또한, 외부 환경으로부터 피부장벽이 무너지게 되면 아토피 및 건선 등 피부 염증이 유발된다[3]. 이에 피부 개선을 위한 소재에 관심이 꾸준히 증가하고 있으며, 특히 천연물 소재에서 피부장벽 보호 및 피부 노화 방지를 위한 연구가 지속되고 있다.

상업적으로 사용하기 위한 천연물의 수요가 증가되고 있지만, 식물은 지속 불가능한 자원이기 때문에 안정적인 수확이 필요한 실정이다. 이에 따라, 식물 조직 배양은 지역, 온도 등 외부 환경에 구애받지 않으며, 안정적으로 지속적인 생산이 가능하기 때문에 산업규모에서 이용 가치가 높은 기술이다[4]. 이러한 이점으로 대량 증식 및 형질전환 식물체 개발 등에 이용하여 화장품, 건강기능식품, 의약품 분야에서 연구가 활발히 이루어지고 있다.

본 연구에서는 식물 조직 배양을 통해 얻은 캘러스에서 분리된 exosome-like nanovesicles 효과에 관한 연구를 진행하였다. Exosome-like nanovesicles은 다양한 생물학적 활성을 포함하여, 표적 세포와 상호작용하면서 생리적 기능 및 병리적 기능을 수행한다[5]. 최근 연구에 따르면, 식물에서 분리된 exosome-like nanovesicles (PELNs)와 동물에서 분리된 엑소좀과 유사한 구조를 가지고 있으며, 세포 간 통신을 통해 mRNA, miRNA, 및 유전 정보를 전달하는 메신저 역할을 한다는 사실이 보고되었다[6]. 이러한 PELNs은 항염 효과, 항암 효과, 지방간 감소 효과가 있는 것으로 보고되었다[7]. 뿐만 아니라, PELNs은 흑색 종 세포에서 멜라닌 생산을 억제하여 미백효과가 있어 천연 화장품으로도 우수한 소재이다[8]. 하지만, 식물 조직배양 기술을 이용하여 캘러스를 유도하고 이에 따른 exosome-like nanovesicles의 피부 개선 효능에 대한 연구는 미미한 실정이다. 본 연구의 재료인 사과(*Malus domestica*)는 식이섬유, vitamin C, phenolics 등 다양한 생물학적 활성물질이 풍부하다[9]. 사과의 유용성분들은 항염증, 항균, 항암, 심혈 관계 개선 등

생물학적 특성과 관련 되어 있다[10]. 이러한 사과의 우수한 효능에도 불구하고 사과 열매 유래 캘러스에서 exosome-like nanovesicles를 분리하고 이에 대한 효능 연구는 보고 되지 않았다.

이에 본 연구에서는 사과 열매로부터 유도된 캘러스를 이용하여 nanovesicles를 분리하였다. 분리된 exosome-like nanovesicles (ACELNs)은 나노 입자크기 및 개수를 측정하여 nanovesicles의 정량적 분석을 진행하였다. ACELNs의 세포 독성 실험을 분석하고 각질세포 외막(comified envelope, CE) 평가를 통해 피부장벽 효과를 검증하였다. 또한 quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)을 통해 collagen type 1 (COL1A1)와 fibrillin (FBN1)유전자 발현에 대한 영향을 분석하고, ELISA 분석을 통해 collagen 생성에 대한 분석하였다. 따라서 본 연구과제를 통해 ACELNs가 피부장벽 및 피부노화 개선에 미치는 영향으로 천연 화장품 소재로서의 활용가능성을 시사하였다.

2. 실험방법

2.1. 실험재료

실험에 사용한 사과 열매(*Malus domestica*)는 능금농협(Korea)에서 분양받아 사용하였다. 사과 열매는 흐르는 물에 세척한 후 70% 에탄올에서 1 min 동안 1 차 살균하였다. 1% sodium hypochlorite에서 10 min 동안 2 차 살균 후 멸균 증류수로 3 회 반복 세척하였다. 살균된 열매 조직을 0.5 cm² 크기로 자른 뒤 4.5 mg/L NAA (α -Naphthaleneacetic Acid, NAA) (Duchefa, Netherlands)와 2.5 mg/L BA (6- benzylaminopurine, BA) (Duchefa, Netherlands)가 포함된 MS (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture, MS) (Duchefa, Netherlands)배지에서 배양하였다. 배지의 pH는 5.8으로 조정하였으며, 외부 온도를 27 \pm 3 $^{\circ}$ C로 조정하여 암실에서 배양하였다. 그 후 동일한 배지 조성의 50 mL를 함유한 삼각 플라스크에 유도된 사과 캘러스 4 g을 접종하였고, 알루미늄 호일로 밀봉한 후 교반기(J-MBB2, JISICO, Korea)에서 90 rpm 속도로 배양하였다. 총 3 ~ 4 주간 배양을 진행하였다.

2.2. 사과 캘러스 유래 Exosome-like Nanovesicles 분리 및 나노 입자 분석

액상 배지에서 배양된 사과 캘러스에 homogenizer (T50D, IKA, Germany)를 사용하여 세포 분쇄를 하였다. 분쇄물을

microfluidizer (MN600P-300, Picomax, Korea)의 팽압을 이용하여 세포벽 파쇄를 수행하였다. 세포벽 파쇄는 3 회 반복하였다. 식물의 세포벽이 파쇄되고 원심분리를 통해 10,000 g에서 30 min 동안 진행하여 세포벽 잔해물을 제거하였다. 수득된 상등액은 0.45 μm 멸균 필터로 여과하여 잔존 세포 잔해를 추가적으로 제거하였다. 여과된 상등액을 MWCO (molecular weight cut off) 필터로 한외여과(ultrafiltration, Pellicon[®] 2 and 3 Mini Holder, Merck, Germany)하여 ACELNs로 분리 및 농축하였다. 추가적으로 불순물을 제거하기 위해 0.2 μm 제균 필터로 제균 여과하였다. 최종 분리된 ACELNs는 200 배 희석하여 NTA (Nanosight, NS300, Malvern, Nederland)를 이용하여 크기와 농도를 정량화하기 위해 나노 입자 분석을 수행하였다.

2.3. 세포 증식 및 독성 평가

ACELNs에 대한 세포 증식 및 독성을 확인하기 위하여 CCK-8 kit (SC893, Dojindo, Japan)와 lactate dehydrogenase assay (LDH assay, PN575, Dojindo, Japan)의 제조업체 프로토콜에 따라 수행하였다. 본 실험에는 각질형성세포주 (human keratinocyte HaCaT cell line, HaCaT)와 피부 섬유아세포 (human dermal fibroblast, HDF)를 각각 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum, FBS-22A, Capricorn, Germany)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, WELGENE, Korea)와 growth supplement kit (LSGS Kit, S-003-K, GIBCO, USA)가 함유된 medium 106 (M-106-500, GIBCO, USA) 배지에서 배양하였다. 본 실험에 사용된 HaCaT cells과 HDF cells은 한림대학교 생명과학과 분자면역학연구소(Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 세포 증식 및 독성 실험을 하기 위하여 HaCaT cells과 HDF cells을 96 well plate에 각각 5×10^4 cells/mL과 1×10^5 cells/mL씩 분주하고 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 동안 배양하였다. 시료를 농도 별로 처리한 후 48 h 동안 배양하였다. 그 후, 세포 배양 상등액을 일부 취하여 LDH assay를 사용하여 반응시키고, spectrophotometer (Synergy HTX Multi Mode Reader, BioTek Instruments, Inc., USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 처리군의 세포증식율은 시료를 처리하지 않은 음성대조군에 대한 세포증식율을 백분율로 나타내었다. 나머지 plate에 CCK-8 kit를 사용하여 반응시키고, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성은 세포막의 손상으로 인해 발생하는 LDH의 양을 측정하는 분석으로, lysis buffer을 처리한 음성대조군에 대한 시료 처리군의 세포 독

성을 백분율로 나타내었다.

2.4. 각질세포 외막 평가

각질 분화 유도능을 측정하기 위하여 각질세포 외막 (cornified envelope, CE) 평가를 수행하였다. HaCaT cells을 6 well plate에 1.5×10^5 cells/mL로 분주하고 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 동안 배양하였다. 세포가 100% confluence 상태가 되면, 배지에 시료를 처리하고 6 일 간 배양하였다. 이 때, ACELNs는 3 일마다 재처리 하였다. 6 일 후 DPBS (PBS-1A, Capricorn, Germany)로 세척한 후, 2% SDS solution을 150 μL /well 처리하였다. 5 min 동안 ice에서 반응시킨 후, 세포들을 scraper로 수득하여 5 s 동안 sonication하였다. 일부를 취해 BCA protein assay kit (21071, iNtRON biotechnology, Korea)를 이용하여 단백질 정량하였고 평가시 기준으로 잡는데 이용하였다. 나머지는 원심분리를 13,000 rpm에서 20 min 동안 분리한 pellet에 20 mM DTT in 2% SDS solution을 100 μL 씩 각각 첨가하였다. 90 °C에서 20 min 동안 끓여 주었다. 96 well plate에 옮긴 후, spectrophotometer를 이용하여 310 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

피부 노화에 중요한 영향을 미치는 세포 외 기질의 구성 인자인 COL1A1와 FN1 유전자 발현정도를 평가하고자 하였다. 동일한 농도의 HDF cells를 24 well plate에 분주하고 24 h 배양하였다. 그 후 ACELNs를 처리하고 48 h 동안 배양하였다. 상등액을 제거하고 TaKaRa MiniBEST Universal RNA extraction kit (9767, TaKaRa, Japan)를 이용하여 제조업체 프로토콜에 따라 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA의 순도를 위해 A260/280 ratio를 측정하였으며, 260 nm 측정값을 통해 RNA를 정량 하였다. cDNA 합성을 위해 정량한 RNA와 amfiRivert cDNA Synthesis Platinum Master Mix (R5600-200, GenDEPOT, USA)를 섞어 사용한다. 60 °C에서 1 min 동안 RNA denaturation, 25 °C에서 5 min 동안 annealing, 42 °C에서 60 min 동안 extend, 85 °C에서 1 min 동안 reverse transcriptase inactivation시켰다. 합성된 cDNA를 증폭하기 위해 cDNA, primer 그리고 LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master Mix (04887352001, Roche, Swiss)를 혼합하였고, LightCycler[®] 480 System을 이용하여 quantitative PCR (qPCR)을 진행하였다. 사용한 유전자의 primer의 서열은 Table 1과 같다.

Table 1. Forward and Reverse Primer PCR Sequence for qRT-PCR

Genes		Primer sequence (5' to 3')
COL1A1	Forward	CTGGGGCAAGACAGTGATTGAA
	Reverse	CAACGTCGAAGCCGAATTCCT
FBN1	Forward	TATCACCCAGTTCACCACTGAG
	Reverse	AAAGAAGAAGCCAGTGGCTGGA
GADPH	Forward	CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG
	Reverse	AGTGGTCGTTGAGGGCAATGC

2.6. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ACELNs에 대한 collagen의 단백질 생성량을 분석하기 위해 COL1A1 kit (DY6220-05, R&D Systems, Inc., USA)의 제조업체 프로토콜에 따라 평가하였다. HDF cells을 96 well plate에 1×10^5 cells/mL씩 분주하였다. ACELNs를 처리한 뒤 48 h 동안 추가 배양을 진행하였다. 그 후, 배양 상층액을 제거하고 PBS로 채우고나서 UVA 조사를 사용하여 5 J/cm^2 세기로 조사하였다. UVA조사 직후에 PBS를 FBS를 포함하는 배지로 교체하였고 24 h 후에 배양 상층액을 일부 취하였다. 배양 상층액은 collagen 생성량을 측정하는데 이용하였다.

2.7. 통계처리

모든 실험 분석 값은 3 회 반복실험을 통하여 평균값과 표준 편차 (mean \pm SD)로 나타내었다. 통계적으로 유의한 차이는 95% 신뢰구간에서 student's *t*-test 방법으로 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 사과 캘러스 유래 Exosome-like Nanovesicles (ACELNs) 분리

일부 물질을 microfluidizer에 통과했을 시 세포벽이 붕괴되면서 나노 입자가 생성된다[11]. 본 연구를 통해 통과 횟수에 따라 세포벽이 점차 붕괴되면서 ACELNs를 정제할 수 있었다(Figure 1). 또한, 한외여과 장치를 이용하여 오염된 단백질과 핵산을 제거하였다. 이는 일반적으로 PELNs를 분리 및 정제 하기위해 사용하는 원심분리 방법에 비해 신속하고 용이하게 사용될 수 있다[12]. ACELNs를 정량화하기 위해 Nanosight 기기로 나노 입자를 추적 분석을 수행했다. ACELNs의 수율은 6.42×10^9 particles/mL이었으며, 직경은 100 ~ 200 nm 범위로 감지되었으며 소포 크기는 다양했다(Figure 2). 대부분의 ACELNs의 평균 직경은 139.4

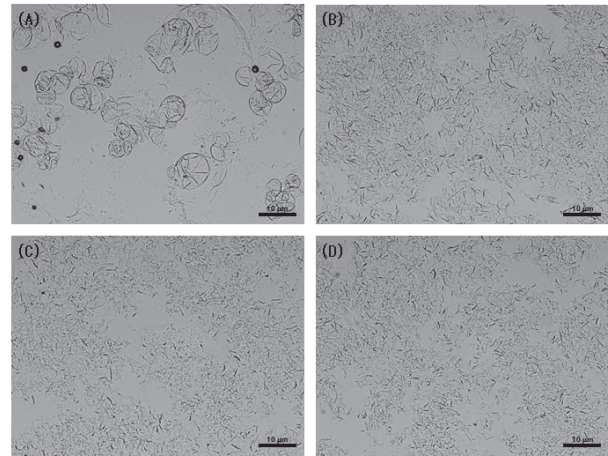


Figure 1. Microscope images of cell lysis by microfluidizer: (A) for 0 cycle, (B) 1 cycle, (C) 2 cycles, and (D) 3 cycles at 1,000 bar.

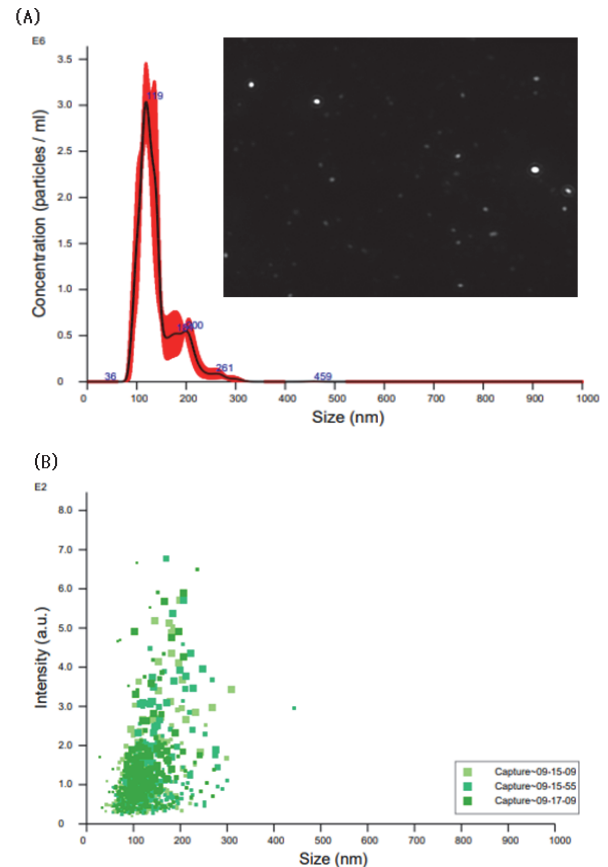


Figure 2. Nanoparticle tracking analysis of exosome-like nanovesicles isolated from *Malus domestica* (apple) fruit callus (ACELNs). (A) Representative graph shows particle concentration and their size measurements. (B) The scattering distributions are presented from three consecutive 30 s runs for nanoparticles.

nm 이며, mode 값은 118.8 nm 이었다. 일반적으로, 대부분의 PELNs는 50 ~ 300 nm 범위의 직경을 갖고 있는 것으로 알려져 있다[13].

3.2. 피부 유래 세포 증식 및 독성 억제 효과

피부 유래 세포인 HDF cells과 HaCaT cells에 대한 CCK-8 assay와 LDH assay를 수행하여 ACELNs의 세포 증식과 독성 억제 효과를 검증하였다. ACELNs는 각 세포에 10 ~ 200 µg/mL 이하에서 농도의존적으로 처리하였다. 세포 증식율은 HaCaT cells과 HDF cells에서 시료를 처리함에 따라 농도의존적으로 증가하였다(Figure 3A, B). HaCaT cells에서 대조군에 비해 약 29% 향상된 세포 증식율을 보였으며, HDF cells에서 대조군에 비해 약 25% 향상된 세포 증식율을 보였다. 세포에 대한 독성은 HaCaT cells과 HDF cells에서 시료를 처리함에 따라 농도의존적으로 유의하게 감소시켰다(Figure 3C, D). 위의 실험 결과를 통해 ACELNs가 피부 유래 세포인 HDF cells과 HaCaT cells에 대한 세포 독성이 나타나지 않으며, 세포 증식을 유의하게 증가시키는 것으로 확인할 수 있었다.

3.3. 각질세포 외막 형성능 평가

Keratinocyte는 분화의 정도에 따라 표피의 기저층부터

각질층까지 분화가 이루어지게 된다. 각질세포 외막(CE)과 각질세포 지질 외막(cornified lipid envelope, CLE)이 서로 공유결합으로 연결되어 있어서 피부 장벽 기능에 영향을 준다[14]. 따라서 각질세포 외막 형성능 평가를 통해 ACELNs의 각질세포 분화 유도효과를 검증하였다. 양성대조군으로 각질 세포 분화의 조절인자인 칼슘 이온을 처리하였다. 분화가 유도되지 않는 대조군에 비해 ACELNs를 처리한 HaCaT cells에서 약 36%의 각질세포 외막 형성능을 보였다(Figure 4). 이는 ACELNs가 HaCaT cells의 분화를 촉진하여 각질 형성

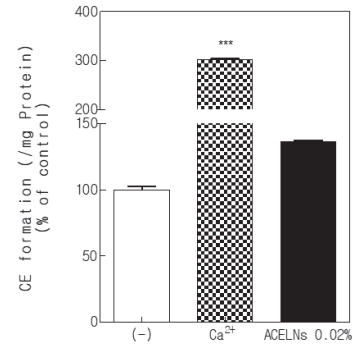


Figure 4. Cornified envelope (CE) formation increasing rate by ACELNs treatment in HaCaT cells. *** $p < 0.001$ versus a control group.

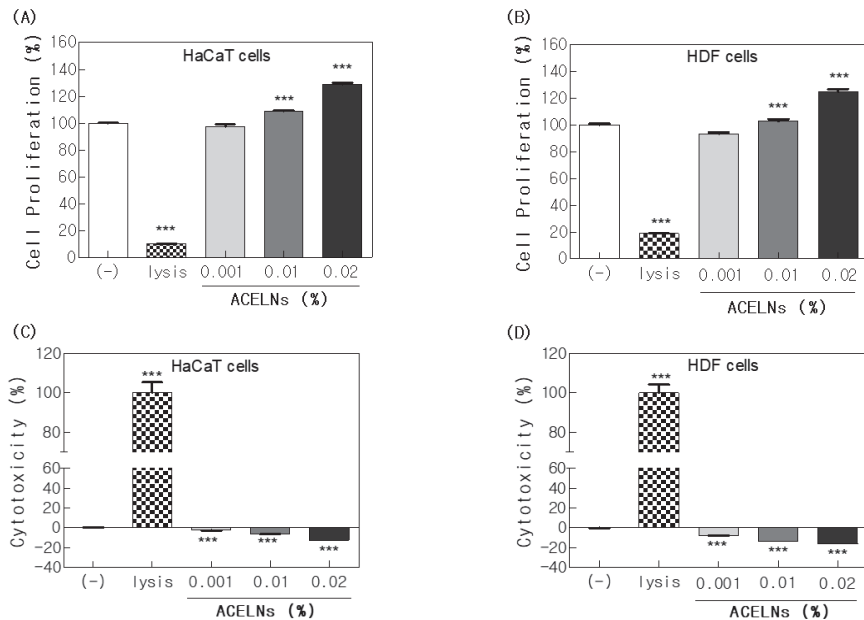


Figure 3. Effect of ACELNs on the cell proliferation and inhibition of cytotoxicity. Cell proliferation of (A) HaCaT cells, and (B) HDF cells measured by the CCK-8 assay after treatment with different concentrations (0.001, 0.01, 0.02% ACELNs) for 48 h. Inhibition of cytotoxicity of (C) HaCaT cells, and (D) HDF cells measured by LDH assay. *** $p < 0.001$ versus a control group.

하는데 도움을 줄 수 있음을 확인하였다.

3.4. 유전자 발현에 따른 피부 항노화 효과

Collagen과 fibrillin은 피부 탄력 및 노화에 관여하는 세포 외 기질 구성인자로 유전자 발현을 통해 피부 노화에 관한 효능을 평가하였다. ACELNs의 처리에 따른 COL1A1과 FBNI 유전자 발현은 세포독성이 없는 농도에서 qRT-PCR을 측정하였다(Figure 5). COL1A1 발현은 ACELNs를 처리하지 않은 대조군에 비해 약 17% 증가하였으며, FBNI 발현은 대조군에 비해 약 67% 증가하였다. 위의 결과는 ACELNs가 COL1A1과 FBNI의 발현을 증가시켜 피부 탄력을 개선하여 피부 항노화에 효과가 있는 것으로 사료된다.

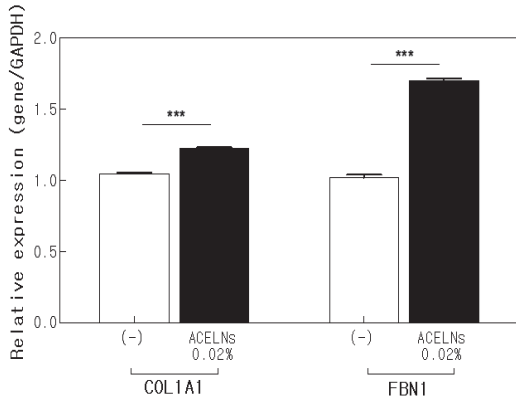


Figure 5. The expression levels of collagen type 1 (COL1A1), and fibrillin (FBNI) in HDF cells by qRT-PCR. *** $p < 0.001$ versus a control group.

3.5. UVA에 조사된 피부 유래 세포의 단백질 생성량 분석

다른 기관과 달리 피부는 자외선과 직접적으로 접촉하기 때문에 피부 노화를 촉진시킨다[15]. 따라서 ACELNs 처리에 따라 자외선 조사에 의한 피부 노화에 미치는 효과를 확인하기 위하여 UVA를 조사 시와 조사하지 않았을 때의 collagen 생성량을 분석하였다. 두 가지 조건에서 대조군에 비하여 ACELNs를 처리했을 시 collagen 함량이 증가되었다(Figure 6A). 특히, UVA를 조사했을 시 대조군(472.89 ng/mL)에 비교하여 ACELNs 처리 군(658.74 ng/mL)이 약 39% 증가되었다. 또한, UVA 조사된 HDF cells에서 ACELNs의 처리에 따라 세포 독성이 감소되었다(Figure 6B). 이는 ACELNs가 자외선이 조사된 HDF cells에서 collagen 생성에 영향을 주어 항노화 효과가 있음을 증명하였다.

4. 결론

PELNs는 나노 입자 크기, 낮은 독성, 생체적합성이 우수하여 효율적으로 세포 간 상호작용을 통해 치료효과를 보일 수 있어, 화장품, 건강기능식품, 의약품 등에 응용이 가능하다[6]. PELNs를 활용하기 위해서는 충분한 양을 생산할 수 있으며, 일정한 품질을 지니고 있어야 한다. 최근 연구에 따르면, 식물 세포 배양 배지에서 exosome-like nanovesicles를 분리하였고, 이는 단백질, 2 차 대사산물, 지질 성분들을 포함하고 있다고 보고하였다[16]. 사과 열매는 다양한 생물학적 활성물질을 함유하고 있어 여러 산업분야에서 활용할 수 있는 소재이다. 다양한 활성물질이 함유하고 있

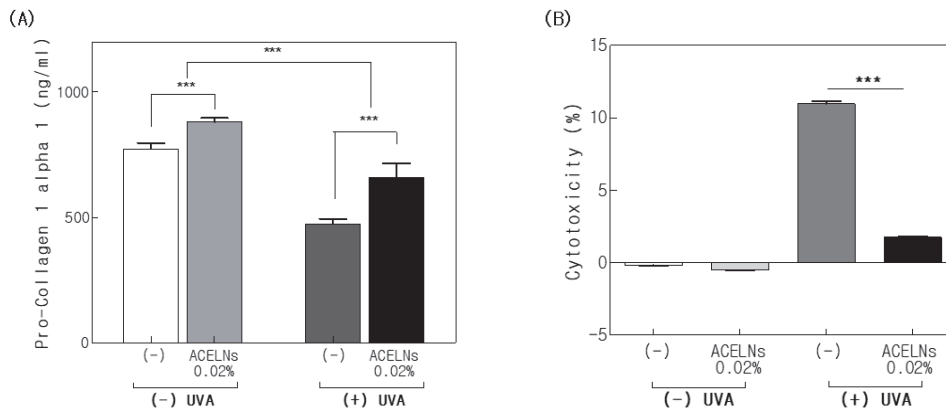


Figure 6. The effect of ACELNs on collagen biosynthesis in UVA-irradiated HDF cells. (A) The concentrations of collagen were measured via ELISA assay. (B) Protective effects of ACELNs on cytotoxicity of HDF cells against UVA-irradiated cell damage. *** $p < 0.001$ versus a control group.

음에도 불구하고, 사과 열매 유래 exosome-like nanovesicles에 대한 피부 효능 연구는 보고되지 않았다. 본 연구에서는 사과 껍질로부터 ACELNs를 분리하였고, *in vitro*에서의 피부 장벽 및 피부 노화 관련 효능을 확인하였다. 인체 유래 진피 섬유아세포인 HDF cells과 각질형성세포인 HaCaT cells에 대한 세포 증식 평가에서 농도 의존적으로 세포 증식율이 향상되었고, 세포 독성 평가에서 농도 의존적으로 세포 독성을 감소시켰다. 각질세포 외막 형성능 평가를 통해, 분화되지 않은 대조군보다 ACELNs를 처리한 실험군에서 향상된 각질세포 외막 형성능을 보였다. 이는 피부 표피의 분화를 유도함으로써 각질 형성에 도움을 줄 수 있음을 시사하였다. 또한, ACELNs를 처리했을 시 피부 탄력 인자인 COL1A1과 FBN1의 발현을 증가시킴으로써 피부에 탄력을 주고 피부 노화를 방지하는 효능이 있는 것을 확인하였다. UVA가 조사된 HDF cells에서 collagen의 합성을 촉진시켜 collagen 생성량이 대조군에 비해 약 39% 증가되었다. 이와 같은 결과들을 통해 ACELNs는 피부장벽을 개선할 수 있으며, 피부 노화 완화에 우수한 효능이 있는 것으로 판단되었다. 현재 ACELNs를 비롯하여 다양한 PELNs의 효능에 관한 연구는 이루어지고 있다. 하지만, PELNs의 유전자 조절 mechanism과 PELNs의 biomarker 등 아직 증명되지 않은 부분이 존재하기 때문에, 추가적인 연구가 지속되어야 한다.

References

1. K. S. Lee, S. Shin, E. Cho, W. K. Im, S. H. Jeon, Y. Kim, D. Park, M. Fréchet, H. Chajra, and E. Jung, nc886, a non-coding RNA, inhibits UVB-induced MMP-9 and COX-2 expression via the PKR pathway in human keratinocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, **512**(4), 647 (2019).
2. B. K. Armstrong and A. Kricger, The epidemiology of UV induced skin cancer, *J Photochem Photobiol B*, **63**(1-3), 8 (2001).
3. M. B. Hogan, K. Peele, and N. W. Wilson, Skin barrier function and its importance at the start of the atopic march, *J Allergy (Cairo)*, **2012**, 901940 (2012).
4. A. Barbulova, F. Apone, and G. Colucci, Plant cell cultures as source of cosmetic active ingredients, *Cosmetics*, **1**(2), 94 (2014).
5. B. György, T. G. Szabó, M. Pásztói, Z. Pál, P. Misják, B. Aradi, V. László, E. Pállinger, E. Pap, A. Kittel, G. Nagy, A. Falus, and E. I. Buzás, Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles, *Cell Mol Life Sci*, **68**(16), 2667 (2011).
6. M. Zhang, E. Viennois, C. Xu, and D. Merlin, Plant derived edible nanoparticles as a new therapeutic approach against diseases, *Tissue barriers*, **4**(2), e1134415 (2016).
7. S. Rome, Biological properties of plant-derived extracellular vesicles, *Food Funct.*, **10**(2), 529 (2019).
8. R. Lee, H. J. Ko, K. Kim, Y. Sohn, S. Y. Min, J. A. Kim, D. Na, and J. H. Yeon, Anti-melanogenic effects of extracellular vesicles derived from plant leaves and stems in mouse melanoma cells and human healthy skin, *J Extracell Vesicles*, **9**(1), 1703480 (2020).
9. J. Wu, H. Gao, L. Zhao, X. Liao, F. Chen, Z. Wang, and X. Hu, Chemical compositional characterization of some apple cultivars, *Food Chemistry*, **103**(1) 88 (2007).
10. M. Liaudanskas, P. Viškelis, D. Kviklys, R. Raudonis, and V. Janulis, A comparative study of phenolic content in apple fruits, *Int. J. Food Prop.*, **18**(5), 945 (2015).
11. L. Jong, Characterization of soy protein nanoparticles prepared by high shear microfluidization, *J. Dispers. Sci. Technol.*, **34**(4), 469 (2013).
12. P. Zhang, J. C. Yeo, and C. T. Lim, Advances in technologies for purification and enrichment of extracellular vesicles, *SLAS Technol.*, **24**(5), 477 (2019).
13. Y. Cui, J. Gao, Y. He, and L. Jiang, Plant extracellular vesicles, *Protoplasma*, **257**(1), 3 (2020).
14. A. E. Kalinin, A. V. Kajava, and P. M. Steinert, Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope, *Bioessays*, **24**(9), 789 (2002).
15. G. J. Fisher, S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, and J. J. Voorhees, Mechanisms of photoaging and chronological skin aging, *Arch Dermatol.*, **138**(11), 1462 (2002).
16. E. Woith, G. Guerriero, J. F. Hausman, J. Renaut, C. C. Leclercq, C. Weise, S. Legay, A. Weng, and M. F. Melzig, Plant extracellular vesicles and nanovesicles: focus on secondary metabolites, proteins and lipids with perspectives on their potential and sources, *Int. J. Mol. Sci*, **22**(7), 3719 (2021).