

Dermal equivalent를 이용한 AHA류 및 보습 성분의 wound healing 효과에 관한 연구 (Wound healing effect of AHAs and moisturizing compounds with dermal equivalent)

유 영 근, 정 민 석, 최 종 완 (한국화장품 기술 개발 연구소)

요 약

본 연구는 dermal equivalent를 이용하여 AHA류(lactic acid, glycolic acid, citric acid 및 malic acid) 및 보습 원료(sodium hyaluronate, glycerine, natural carbohydrate complex)에 대한 wound healing 효과 및 그 기작을 알아보기 위한 것이다. AHA류 및 보습 원료의 독성은 dermal equivalent를 이용하여 NR assay를 실시한 후 적정 농도를 petri dish위에 조성한 dermal equivalent에 처리하였다. 그리고 wound healing 효과를 알아보기 위하여 collagen 수축률을 측정하였다. 또한 collagen 합성을 촉진하는 것으로 잘 알려진 vitamin C도 함께 처리하였다. AHA류의 경우 평균 pH 2-3으로 매우 낮기 때문에 4N NaOH를 이용하여 pH를 6-7사이로 조절한 sample를 함께 실험하였다. 보습 원료의 경우 전반적으로 10% 이상의 높은 NR₅₀ 보여 주었다. 특히 sodium hyaluronate(1% stock solution)의 경우에는 16% NR₅₀를 보여 주었다. pH를 6-7로 조절한 AHA류의 경우에는 전반적으로 0.6% 내외의 NR₅₀를 보이는 가운데 lactic acid는 상대적으로 높은 2% NR₅₀를 보여 주었다.

Collagen 수축률 측정 실험 결과에서는 2% sodium hyaluronate(1% stock solution)가 대조군에 비하여 처리 후 2일째 25%내외의 향상된 수축률을 보여 주었다. pH를 6-7로 조절한 AHA류 중 0.1%의 malic acid의 경우에는 대조군에 비하여 처리 후 1일째 및 2일째 각각 28% 및 35%의 수축률을 보여 주었으며 pH를 6-7로 조절한 0.1% vitamin C에서도 유사한 결과를 보여 주었다. 반면에 pH를 6-7로 조절한 0.1% citric acid의 경우에는 10-20%의 낮은 수축률을 보여 주었다.

MTT assay를 이용한 UV 조사 후 pH를 6-7로 조절한 AHA류의 repairing UV

damage 효과에 대한 실험에서 0.1% 및 0.01%의 malic acid와 0.01% citric acid은 irradiation control에 비하여 약 10% 이상 세포수를 증가시켰다. 그러나 예외적으로 citric acid의 경우 0.1% 농도에서 오히려 20%내외로 세포수가 감소되는 경향을 보여주었다. 그리고 lactic acid 및 glycolic acid는 두드러지는 효과를 나타내지 않았다.

Collagen 합성을 측정 실험에서는 pH를 6-7로 조절한 AHA류에서는 대조군에 비하여 상대적으로 12-19% 더 합성을 촉진하였다. 반면에 pH가 2-3인 AHA류의 경우에는 대조군과 유사하거나 조금 낮은 합성율을 보여 주었다.

서론

기능성 화장품에 대한 관심이 고조되어 가면서 특별한 기능을 가진 성분들에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히 anti-aging과 밀접한 관계를 가지고 있는 성분들 예를 들면 vitamin C 및 AHA류들이 주목을 받고 있다(1,2). Vitamin C의 경우 skin fibroblast cell에서 noncollagen protein 합성에는 영향을 주지 않으면서 procollagen의 합성을 촉진하는 것은 주지된 사실이다. 이외에 미백 효과 및 UV-B에 의해 DNA가 파괴되는 것을 방지하는 효과도 보고된 바 있다(3,4,5). 특히 혈소판 내에 vitamin C가 결핍된 경우 wound healing 기능이 떨어지는 것으로 보고 되고 있다(3).

AHA류가 피부의 박피를 유도하여 새로운 세포의 생성을 증가시키는 기능은 오래 전부터 알려져 왔다(6). 또한 피부의 보습력을 향상시키며 점차적으로 자외선에 의한 손상을 회복시키고 미세 주름을 제거시켜 주는 효과도 보고된 바 있다. 이와 같은 이유로 retinoids보다 철저한 연구가 덜 이루어졌음에도 불구하고 광노화 치료제로 이용되고 있다. 임상 실험에서도 glycolic acid가 건조 및 광에 의해 손상 받은 피부를 개선시켜 주는 것으로 보고 되고 있다. 또한 기저 암세포나 광손상에 의해 형성된 비정상적인 기저 세포를 정상 세포로 회복시키는 효과도 보고 되고 있으며 collagen의 합성도 촉진하는 것으로 알려져 있다(7).

Hyaluronate은 진피내에서 지지 작용을 하는 glycosaminoglycan으로 천연 보습제로써 이용되고 있다. 이들 glycoprotein은 다양한 생물학적 기능들을 조절하는 기작에 관여하는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 세포의 plasma membrane permeability 및 면역 반응을 유도하는 세포 상호간의 신호 전달 과정에도 관여하며 wound healing을 유도하는 잠재력도 가지고 있는 것으로 알려져 있다(8).

Wound healing이 일어나는 동안에 fibroblasts의 다양한 행동들이 관찰된다. 예를 들어 상처 인접 부위로 이동하여 증식한 후 상처 부위에 다량의 collagen을 함유하고 있는 extracellular matrix를 합성한다. 또한 fibroblasts는 새로이 합성된 extracellular matrix를 적절한 형태로 만든 후 원위치로 되돌아 간다(9,10). 상처의 크기 및 위치에 따라 granulation tissue의 수축에 중요한 역할을 하는 myofibroblast가 이와 같은 wound healing에 관여하는 것으로 알려져 있다(11). Fibroblast의 wound healing 기능을 알아보기 위하여 *In vivo*의 wound contraction과 유사한 collagen gel의 reorganization 및 contraction이 일어나는 dermal equivalent culture가 이용되고 있다(12,13,14). 그래서 AHA류 및 vitamin C 그리고 hyaluronate에 대한 wound healing 효과를 알아보기 위하여 위 방법을 이용하였다.

Dermal equivalent은 동물 대체 실험법의 하나로 많은 연구가 진행되어져 왔으며 이를 이용한 독성, 미백 및 항산화 효과와 같은 많은 활성 성분들에 대한 피부의 생리적인 특성을 연구하는데 활용되고 있다(15,16,17).

실험 및 재료

Cell culture 및 처리 시료

Transformed mouse fibroblast L929를 37°C, 5% CO₂에서 5% bovine calf serum이 첨가된 DMEM 배지로 배양하였다. AHA류 중에서 lactic acid, glycolic acid, citric acid 및 malic acid를 사용하였으며 보습제로는 sodium hyaluronate (1% stock solution), glycerine 및 carbohydrate complex(50% stock solution, Pentapharm Ltd.)(18)를 이용하였다. 이외에 vitamin C를 사용하였다.

Collagen gels 조성

Collagen type I(Sigma)를 ethanol로 소독 후 건조 시킨다. 건조된 collagen을 0.05% acetic acid solution에 녹인 후 냉장 보관(4°C 이하)을 한다(19).

Stock collagen solution는 다음과 같은 성분들로 구성되어 있다. 즉 10×conc. DMEM 배지 0.3ml, 0.26M-NaHCO₃ buffer 0.3ml, FBS(fetal bovine serum) 0.3ml, 항생제가 들어 있는 10×conc. DMEM 배지 0.3ml를 잘 섞은 다음 cell suspension(1.0×10⁶cells/ml +

15% FBS) 0.48ml과 collagen를 섞어 준다. 이 때 최종 collagen의 농도는 1.2mg/ml이 되게 해 주고 cell의 농도는 1.66×10^5 cells/ml되게 해 준다. 이 stock collagen solution 3ml를 petri dish에 분주한 후 37°C, 5% CO₂에서 배양한다(20).

Contraction rate 측정 및 관찰

collagen gel의 지름을 Bell et al.의 방법에 따라 시료 처리 후 5일 동안 매일 측정하였다. collagen gel의 가장 긴축과 짧은 축을 측정한 후 그 평균을 구하였다. collagen gel내의 fibroblast에 대한 형태적인 변화를 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다(19,20).

Dermal equivalent toxicity

Trypsinization에 의해 회수한 transformed mouse fibroblast L929를 pre-stock collagen solution에 넣은 후 최종 collagen 농도는 2.5mg/ml이 되게 해 주고 cell 농도는 1×10^6 cells/ml이 되게 해 준다. 그리고 96 well tissue culture plate의 각각의 well에 stock collagen solution 50 μ l를 접종한 다음, 37°C에서 5% CO₂ 조건으로 2일간 배양하였다(15,21). 배양 후 medium 90 μ l를 분주 하고 여기에 시험물질 10 μ l를 처리한 후 2일간 배양하였다. 배양이 끝나면 각 well에 100 μ l의 neutral red solution(50 μ g/ml)을 첨가하여 3시간 동안 반응시켰다. neutral red가 완전히 plasma membrane을 통과하여 살아있는 세포 또는 손상받지 않은 세포의 lysosome에 농축된 후 1.0% formalin/1.0% CaCl₂ 100 μ l로 고정화한 다음 1.0% acetic acid/50% ethanol solution을 사용하여 세포내의 neutral red를 추출하였다(22). 추출된 neutral red를 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험 결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도로 보정하였다.

Repairing UV damage

Mitochondrial dehydrogenase activity의 index를 나타내는 MTT colorimetric reduction assay를 수행하여 자외선 조사 후 처리한 시험물질에 대한 세포의 생존률을 측정하였다. 먼저 trypsinization에 의해 회수한 transformed mouse fibroblast L929를 2% BCS가 함유된 DMEM으로 suspension시킨 후 96 well tissue culture plate의 각각의 well에 세포 현탁액(5000-10000 cells/well) 100 μ l를 접종한 다음, 37°C에서 5% CO₂ 조건으로 1일간 배양하였다. 배양후 serum free medium 90 μ l로 교체하였다. 그리고 각각의 well에 2.5 mJ/cm²의 UV를 조사한 후 시험물질 10 μ l를 처리하였다. 다시

24시간 배양한 후 각 well에 100 μ l의 MTT solution(0.1mg/ml)을 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. MTT가 세포의 환원력에 따라 mitochondrial dehydrogenase 의해 formazan으로 결정화 되고 이것을 isopropanol로 추출하였다. 추출된 formazan 결정체를 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험 결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도로 보정하였다(17,24,25).

Quantitation of collagen synthesis

Sirius Red를 이용하여 fibroblast에 의해 합성되는 collagen을 측정하였다. Transformed mouse fibroblast L929를 24 well plate에 4 \times 10⁴cells/well 되도록 분주하였다. 24hr이 지난 후 새로운 DMEM·F'10으로 교환한 후 시료를 처리한다. 48hr이 경과한 후 세포를 분쇄하고 배지를 건조시켰다. 각 well에 0.1% sirius red(Sigma) 1ml를 분주한 후 1hr 동안 상온에서 collagen을 염색하였다. 10mM HCl로 5회 정도 세척한 후 0.1M NaOH로 sirius red를 추출한 다음 이를 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험 결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도로 보정하였다(26).

결과 및 고찰

Dermal equivalent내의 fibroblast morphology

배양 후 24시간이 경과되면 monolayer culture의 fibroblast는 stellate 형태를 이룬다. 반면에 dermal equivalent에서는 bipolar 형태를 이루며 시간이 지남에 따라 dermal equivalent의 fibroblast는 처음 그대로의 형태를 유지하면서 세포의 양끝이 상호 연결되어 부분적으로 aggregation된 형태를 이룬다(Fig. 1). 반면에 monolayer culture에서는 시간이 지남에 따라 서로 서로 결합하여 전체적으로 매우 밀집된 형태를 이룬다. Dermal equivalent에서는 세포 및 extracellular matrix가 불균등하게 분포되어 있는 반면에 monolayer culture에서는 변화가 없었다. 또한 dermal equivalent에서는 collagen 섬유다발을 따라 세포가 elongation되고 migration이 활발하게 일어난다. 또한 굵은 섬유다발 주위에 수직하게 미세한 섬유 다발들이 관찰된다(Fig. 1-A)(19,25).

매우 근접된 2 cells은 collagen 섬유다발을 이용하여 서로 연결될 때 각각의 세포가 수

축 및 확장을 통하여 collagen 섬유다발을 밀어내는 작용을 하게 되는 것으로 알려져 있다. 그리고 이와같은 과정을 통하여 collagen 섬유다발이 장력을 받게 되는 것으로 추측되고 있다(19).

AHA류 및 보습제에 대한 dermal equivalent toxicity

pH가 2~3으로 낮은 AHA류(lactic acid, glycolic acid, citric acid, malic acid)에 대한 dermal equivalent toxicity 결과 전반적으로 유사한 NR₅₀을 보여주었(Fig. 4). 반면에 pH를 6~7사이로 중화시킨 AHA류의 경우에는 lactic acid가 2%이상의 상대적으로 높은 NR₅₀을 보여주었다. Glycolic acid, citric acid, malic acid는 유사한 범위의 NR₅₀을 보여주었다(Fig 3). 그리고 pH가 2-3인 AHA류 보다는 pH를 6-7로 조절한 AHA류의 NR₅₀이 상대적으로 높은 수치를 보여 주었다. 이것은 AHA류의 낮은 pH가 상대적으로 피부 자극을 유발시킬 수 있음을 보여 주고 있다(6). Vitamin C의 경우에도 AHA류와 유사하게 pH가 2-3인 경우에서 보다는 상대적으로 pH를 6-7로 조절한 vitamin C의 NR₅₀이 높았다.

보습제에 대한 dermal equivalent toxicity 결과에서 glycerine과 carbohydrate complex(50%)의 경우에는 6%이상의 매우 높은 NR₅₀을 보여 주었고 sodium hyaluronate(1%)의 경우 16% NR₅₀을 보여 주었다. 이것은 sodium hyaluronate가 수용액 상태상에서 pH가 낮아지기 때문인 것으로 보여진다(Fig. 2).

AHA류 및 보습제의 wound healing effect

AHA류 및 보습제와 vitamin C에 대한 Dermal equivalent toxicity의 결과를 토대로 dermal equivalent에 영향을 주지 않는 적정 농도를 처리하였다. pH를 6-7로 조절한 AHA류 및 vitamin C의 경우에는 0.1%, 0.05% 및 0.01%를 처리 하였다. 그러나 예외적으로 상대적으로 독성이 낮았던 lactic acid의 경우에는 1%, 0.1%를 처리 하였다(Fig. 2 및 Fig. 3).

Vitamin C는 pH를 6-7로 조절한 시료와 원액 시료 모두에서 가시적인 wound healing 효과를 보여주었다. pH를 6-7로 조절한 vitamin C의 경우에는 0.1%를 처리하였을 때 1일째 및 2일째 대조군에 비하여 각각 33% 및 35% 수축률을 보여 주었다. 원액의 경우에는 0.1% vitamin C를 처리하였을 때 collagen 자체가 용해되었으며 0.05%를 처리하였을 때에는 pH를 6-7로 조절한 vitamin C 0.1%를 처리하였을 때와 유사하게 1일째 및 2일째 각각 30% 및 35%의 수축률을 보여 주었다(Fig. 6).

AHA류의 경우 pH를 6-7로 조절한 시료인 malic acid의 경우 동일 농도의 vitamin C(pH 6, 0.1%)와 유사하게 1일째 및 2일째 각각 28% 및 35%의 수축률 보여 주었다. 반면에 같은 농도의 pH가 2-3인 시료의 경우에는 가시적인 wound healing 효과를 보여 주지는 않았다. 0.1% glycolic acid은 시료 처리 후 2일째 약 20%의 수축률을 보여주었고 0.1% citric acid의 경우에는 시료 처리 후 1일째 약 23%의 수축률을 보여 주었으며 2일째에도 20%의 수축률을 유지하였다. 그러나 0.1% lactic acid의 경우에는 시료처리 후 1일째 및 2일째 모두 약 10%내외로 다른 AHA류에 비하여 상대적으로 낮은 수축률을 보여 주었다(Fig. 6). 이것은 상대적으로 다른 AHA류들이 해당과정 및 citric acid cycle에서 energy 생성과정을 촉진시키고 이것이 세포의 이동과 생리적인 활성 그리고 collagen 및 glycosaminoglycans 합성과 같은 물질 대사를 촉진하기 때문인 것으로 여겨진다(2). 예를들어 glycolic acid의 경우 glycerate kinase에 의하여 phosphorylation되어 2-phosphoglyceric acid로 전환된다(26). 또한 malic acid 및 citric acid은 citric acid cycle의 substrate로 이용되는 물질이다(2,26). 그리고 0.05% 및 0.01%를 처리한 pH를 6-7로 조절한 AHA류에서는 가시적인 collagen 수축률이 관찰되지 않았다. pH가 2-3인 AHA류의 경우에는 동일한 0.1% 농도에서도 가시적인 collagen 수축률이 관찰되지 않았으며 이것은 낮은 pH가 collagen 수축에 영향을 주는 요소인 세포의 성장 및 활동이 영향을 주기 때문인 것으로 여겨진다(6,20). 반면에 임상적인 결과는 상당한 collagen의 합성이 보고되고 있다. 예를들어 2-4%에서 피부를 부드럽게 해 주며 collagen의 전구체인 glycosaminoglycans를 증가시키고 8-12%에서 피부내에 collagen이 축적이 증가시키며 12-15%에서 상당한 collagen 축적이 이루어지는 것으로 보고 되고 있다(7). 이것은 AHA류가 피부를 통과 하면서 이온화 과정을 거친 후 pH를 6-7로 조절한 상태에서 심층에 존재하는 fibroblast에 영향을 주기 때문인 것으로 추측된다. 그 이유는 pH가 2-3인 AHA류를 처리한 후 피부의 깊이에 따른 pH의 변화를 살펴본 실험에서 깊이가 증가할수록 pH가 증가되는 경향을 보여주고 있기 때문이다(2,6,28). 또한 각질층이 깊이에 따라 pH gradient를 이루고 있는 것으로 알려져 있으며 진피층 근처에서 거의 pH 7에 가까운 것으로 알려져 있다. 일부 *In vivo* 실험에서 glycine, arginine 그리고 lysine이 AHA류의 buffer 역할을 하는 것으로 알려져 있다(29). 보습제에서도 dermal equivalent toxicity의 결과를 토대로 dermal equivalent에 영향을 주지 않는 적정 농도를 처리하였다. glycerine은 2%, carbohydrate complex(50%)은 2% 그리고 sodium hyaluronate(1%)은 2%를 처리하였다. 그 결과 sodium hyaluronate의 경우에서만 가시적인 효과를 관찰할 수 있었다. 시료 처리 후 1일째, 2일째 및 3일째 각각 20%, 27% 및 22%의 수축률을 보여 주었고

glycerine의 경우에는 시료처리 후 1일째 및 2일째 약 5-7%의 수축률을 보여 주었다. 또한 carbohydrate complex(50%)는 1일째, 2일째 및 3일째 9%, 15% 및 7%의 수축률을 보여 주었다(Fig. 5). 이와같이 sodium hyaluronate(1%)가 상대적으로 높은 수축률을 보여주는 이유는 cell migration를 촉진하기 때문으로 여겨진다. 예를들어 wound healing 및 development가 일어나는 동안에 hyaluronate가 과량으로 합성되며 이렇게 합성된 hyaluronate가 수분을 흡수하여 matrix를 부풀게 하여 cell migration를 촉진시키는 것으로 알려져 있다(30). 그러나 많은 농도를 처리한 다른 보습제에 비하여 높은 수축률을 보여 주고 있는 sodium hyaluronate은 보습 효과에 의한 기작 이외에 진피를 구성하는 성분으로서의 또다른 특성이 수축률에 영향을 주는 것으로 보여진다(31).

AHA류의 repairing UV damage

일정량의 UV(2.5 mJ/cm²)를 조사하여 세포에 손상을 입힌 후 pH를 6-7로 조절한 AHA류(lactic acid, glycolic acid, citric acid, malic acid)와 pH가 2-3인 AHA류를 처리한 다음 MTT assay를 이용해 세포의 생존률을 측정하였다. pH가 2-3인 AHA류를 0.1% 농도로 처리하였을 때 irradiation control에 비하여 약 10-13% 낮은 세포 생존률을 보인 반면에 pH를 6-7로 조절한 AHA류를 동일한 농도로 처리하였을 때 irradiation control에 비하여 약 10-13% 높은 세포의 생존률을 보여 주었다(Fig. 7 및 Fig. 8). 이와같은 결과는 AHA류의 독성 실험에서 보여준 결과와 유사하게 낮은 pH가 세포에 자극으로 작용할 수 있음을 보여주고 있다. 반면에 pH를 6-7로 조절한 AHA류의 경우 즉 심층에 도달한 이온화된 AHA는 광에 의한 손상된 세포를 회복시킬 수 있음을 보여 주고 있다. 예외적으로 citric acid의 경우에는 pH와 관계없이 2종류 모두에서 약 20% 내외로 세포의 생존율이 감소하였다. 그러나 0.01%의 중화시킨 citric acid에서는 약 10% 높은 세포의 생존률을 보여 주었다(Fig. 7-B). citric acid의 이와같은 특징은 citric acid 자체가 해당과정에서 inhibitor로 작용하기 때문인 것으로 여겨진다. 예를들어 citric acid은 glucose-6-phosphotransferase와 phosphofructokinase의 활성을 상당히 억제하는 것으로 알려져 있다(27). Lactic acid의 경우에는 동일한 0.1% 및 1% 농도에서 pH를 6-7로 조절한 시료의 경우 control과 비교하여 두드러진 세포 생존률의 증가는 관찰되지 않았으며 pH가 2-3인 경우에는 irradiation control에 비하여 10% 낮은 세포의 생존률을 보여 주고 있다. 위 결과는 wound healing effect에서와 동일한 경향성을 보여 주고 있으며 이와같은 결과도 AHA류들의 물질 대사와 관련된 생화학적인 특징에 기인된 것으로 보여진다(2,6,26).

AHA류의 collagen synthesis

Sirius red를 이용하여 AHA류(lactic acid, glycolic acid, citric acid, malic acid)를 처리한 후 fibroblast cell에서 collagen의 합성량을 측정하였다. pH를 6-7로 조절한 AHA류의 경우 0.1%를 처리한 결과 12-19% 정도 대조군에 비하여 collagen 합성율이 증가하였다. 반면에 pH가 2-3인 AHA류의 경우에는 대조군과 유사하거나 조금 낮은 collagen 합성율을 보여 주었다. 이와같은 결과는 collagen 합성시 pH가 영향을 줄 수 있음을 보여 주는 것이다. 그리고 pH를 6-7로 조절한 AHA류 중 citric acid를 제외하고 유사한 collagen 합성율을 보여 주었다. 즉 lactic acid, glycolic acid, 그리고 malic acid은 각각 대조군에 비하여 17%, 19% 그리고 16% 합성율이 증가되었으며 citric acid의 경우에는 12% 증가하였다. 이와같은 결과는 pH를 6-7로 조절한 AHA류가 collagen 합성 유도 효과가 유사함을 보여 주는 것이다(Fig 9).

결론

Vitamin C 및 AHA류(lactic acid, glycolic acid, citric acid, malic acid) 그리고 sodium hyaluronate가 wound healing 효과를 가지고 있음을 dermal equivalent을 이용한 collagen 수축률 실험을 통하여 확인해 볼 수 있었다. Sodium hyaluronate의 경우 glycerine 및 carbohydrate complex에 비하여 상대적으로 두드러진 27%의 collagen 수축률을 보여주었다. 이것은 위 시료들의 처리 농도에서의 세포 생존율 및 sodium hyaluronate의 상대적으로 낮은 처리 농도를 고려해 볼 때 sodium hyaluronate의 보습 기능에 의한 세포의 migration 촉진 이외에 피부 조직 성분으로서의 생리적인 기능이 wound healing 효과의 차이를 가져온 것으로 보여진다.

AHA류 중에서는 malic acid가 0.1% 농도에서 가장 두드러진 35%의 collagen 수축률을 보여주었으며 glycolic acid와 citric acid은 다소 낮은 20%의 collagen 수축률을 보여 주었다. 반면에 collagen 합성을 실험에서는 lactic acid, glycolic acid, malic acid은 유사한 collagen 합성율인 17%, 19% 그리고 16%을 보여 주었으며 citric acid은 약간 낮은 12%의 collagen 합성율을 보여 주었다. 또한 0.1%에서의 AHA류에 대한 세포의 생존율이 유사하다는 점을 고려해 볼 때 AHA류 사이에서의 wound healing 효과 차이는 collagen

합성을 및 세포의 생존율보다는 AHA류의 energy 대사와 관련된 생화학적인 특징에 기인한 것으로 추측된다. Repairing UV damage 실험에서도 wound healing 실험 결과와 유사하게 0.1% malic acid에서 가장 두드러진 효과를 보여 주었다.

References

1. R. Hermitte, Aging skin, retinoids and alpha hydroxy acids, *Cosmet. & Toiletr.*, 107, 63-67(1992).
2. P.M.B.G.M. Campos, G. Ricci, M. Semprini, R.A. Lopes, Histopathological, morphometric, and sterologic studies of dermocosmetic skin formulations containing vitamin A and/or glycolic acid, *J. Cosmet. Sci.*, 50, 159-170(1999).
3. R.S. Pinnell, S. Murad, D. Darr, Induction of collagen synthesis by ascorbic acid, *Arch. Dermatol.*, 123, 1684-1686(1987).
4. M. Sugimoto, N. Nagao, N. Miwa, Antioxidant functions of vitamin C : Preventive effects on UV and peroxy lipid-induced injuries and aging in the cell, *Fragrance journal*, 195, 41-54(1997).
5. J. Akiyama, M. Yanagide, E. Miyai, Inhibitory effect of vitamin C on skin pigmentation, *Fragrance journal*, 195, 55-61(1997).
6. W.P. Smith, Hydroxy acids and skin aging, *Cosmet. & Toiletr.*, 109, 41-48 (1994).
7. C.E.R.I.E.S. International Skin News, issue 1 : skin aging, 5-6(1998).
8. W. Pauly, O. Frieis, G. Pauly, Galactomannan and xyloglucan: Bio-active polysaccharides, *Cosmet. & Toiletr.*, 114, 65-48(1994).
9. E.E. Peacock, Wound repair, 3rd Ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1984
10. R.A.F. Clark, Cutaneous tissue repair: Basic biological considerations, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 13, 701-725(1985).
11. G. Gabbiani, B.J. Hirschel, G.B. Ryan, P.R. Statkov, G. Majno, Granulation tissue as a contractile organ. a study of structure and function, *J. Exp. Med.*, 135:719-733(1972).
12. C.G. Bellows, A.H. Melcher, J.E. Aubin: Contraction and organization of

- collagen gels by cell cultured from periodontal ligament, gingiva, and bone suggest functional differences between cell types, *J.Cell.Sci.*,50,299-314 (1981).
13. F. Grinnell, F.R. Lamke, Reorganization of hydrated collagen lattices by human skin fibroblast, *J. Cell. Sci.*,66,51-63(1984).
 14. A.K. Harris, D. Stopak, P. Wild, Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis, *Nature*,290,249-251(1981).
 15. C. Augustin, O. Damour, Development of kit for predicting cutaneous toxicity *in vitro* using three-dimensional dermal equivalent: phase 1 reproducibility of dermal equivalent, *Cell. Eng. Inc. Molecular Eng.*,1,58-62 (1995).
 16. G. Majmudar, G. Jacob, Y. Laboy, L. Fisher, An *in vitro* method for screening skin-whitening products, *J. Cosmet. Sci.*,49,361-367(1998).
 17. T. Forster, J. Meister, H. Moller, S. Ortanderl, K. Schlotmann, Protecting the Skin Against Exogenous Noxes, *Cosmet.&Toiletr.*,114,71-80(1999).
 18. G. Padberg, *Arch. klin. exp. Dermatol.*,229,
 19. E. Bell, B. Ivarsson, C. Merrill, Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*,76,1274-1278(1979).
 20. C.G. Bellows, A.H. Melcher, J.E. Aubin, Contraction and organization of collagen gels by cells cultured from periodontal ligament, gingiva and bone suggest functional differences between cell types, *J.Cell.Sci.*,50,299-314 (1981).
 21. S.L. Schor, Cell proliferation and migration on collagen substrate *in vitro*, *J. Cell. Sci.*,41,159-175(1998).
 22. D. Triglia, S.S. Braa, C. Yonan, G.K. Naughton, Cytotoxicity testing using neutral red and MTT assays on a three-dimensional human skin substrate, *Toxic.in Vitro*,5,573-578(1991).
 23. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Meth.*,65,55-62 (1983).
 24. L.M. Green, J.L. Reade, C.F. Ware, Rapid colorimetric assay for cell

viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines, *J. Immunol. Meth.*, 70, 257-268 (1984).

25. S. Nakagawa, P. Pawelek, F. Grinnell, Long-term culture of fibroblasts in contracted collagen gels: effects on cell growth and biosynthetic activity, *J.*

Invent. Dermatol., 93, 792-798 (1989).

26. B.J. Walsh, S.C. Thornton, R. Penny, and S.N. Breit, Microplate Reader-Based Quantitation of collagens, *Anal. Biochem.*, 203, 187-190 (1992).

27. E.J. Van scott, R.J. Yu, Hyperkeratinization, corneocyte cohesion, and alpha hydroxy acids, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 11, 867-879 (1984).

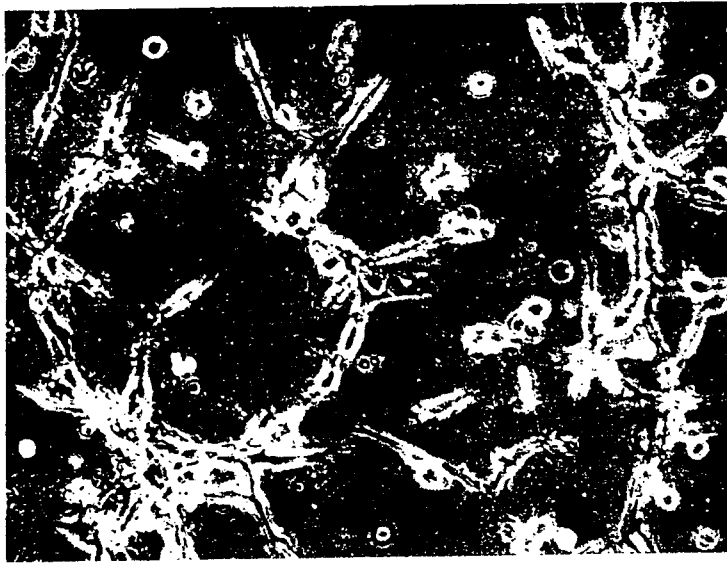
28. M. E. K. Kraeling, R. L. Bronaugh, In Vitro percutaneous absorption of alpha hydroxy acids in human skin, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 48, 187-197 (1997).

29. P. Morganti, S.D. Randazzo, G. Fabrizi and C. Bruno, Decreasing the stinging capacity and improving the antiaging activity of AHAs, *J Appl Cosmetol*, 14, 79-91, (1996).

30. T.C. Laurent, J.R.E. Fraser, The properties and turnover of hyaluronan. In functions of proteoglycan, ciba foundation symposium, *Wiley*, 124, 9-29 (1986).

31. C.J. Doillon, A.J. Wasserman, et al., Behaviour of fibroblasts and epidermal cells cultivated on analogues of extracellular matrix, *Biomaterials*, 9, 91-99, (1988).

A.



B.

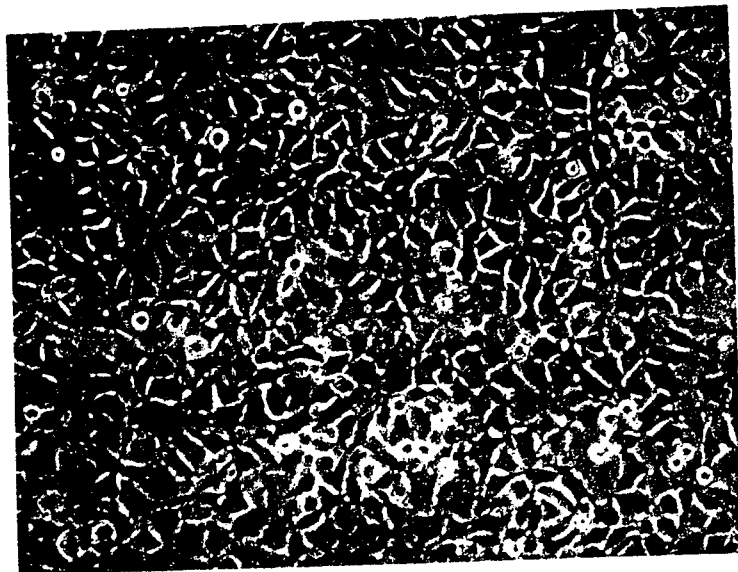


Figure 1. Fibroblast in dermal equivalent and monolayer culture

A. Dermal equivalent

B. Monolayer culture

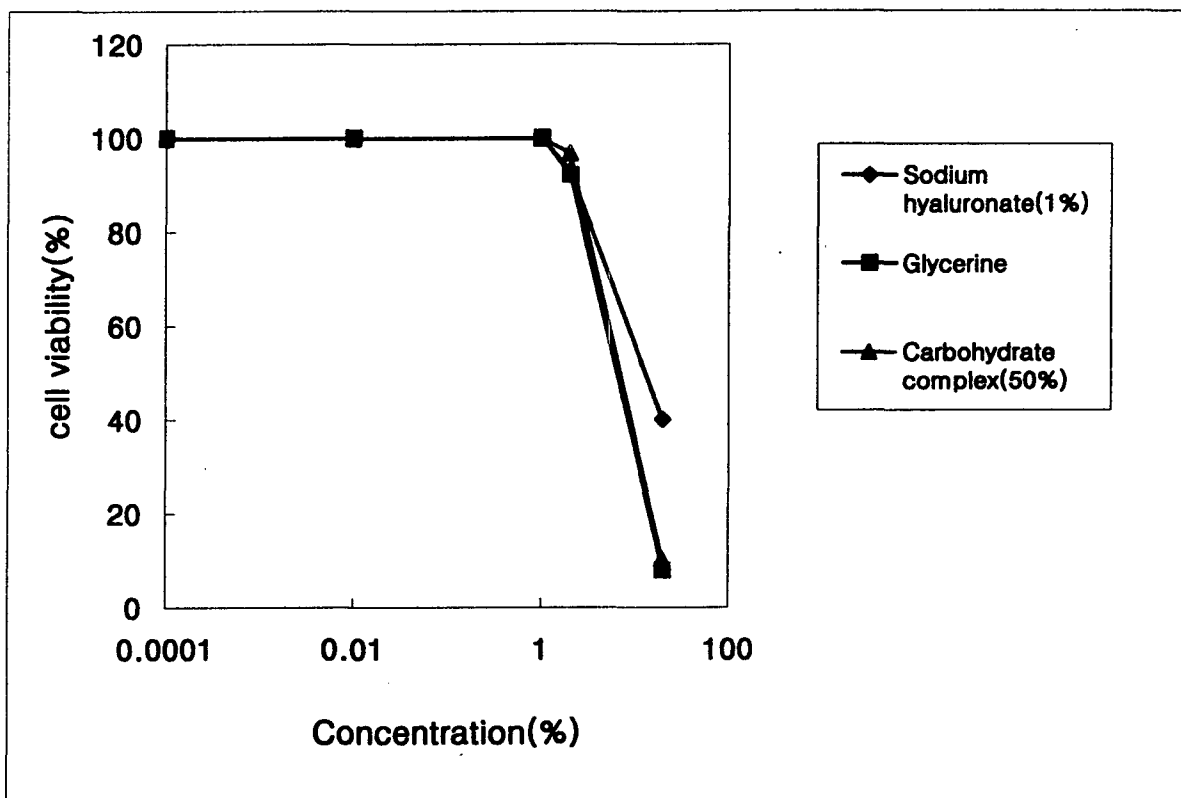


Figure 2. NR assay of dermal equivalent for moisturizing compounds

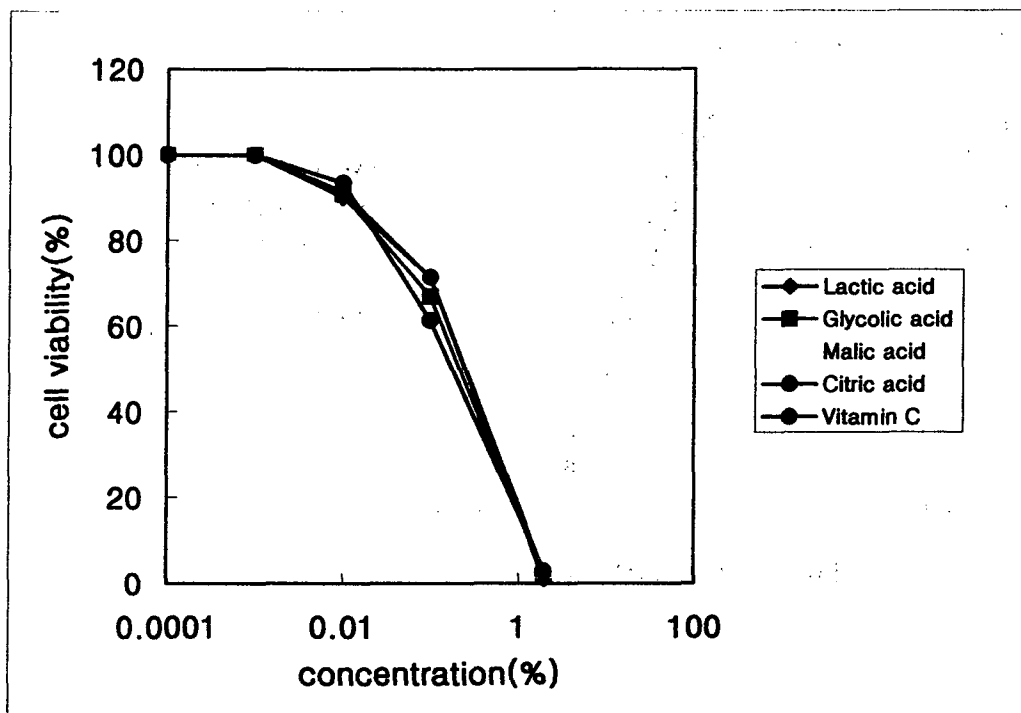


Figure 3. NR assay of dermal equivalent for AHAs and vitamin C
 AHAs and vitamin C at pH 2-3

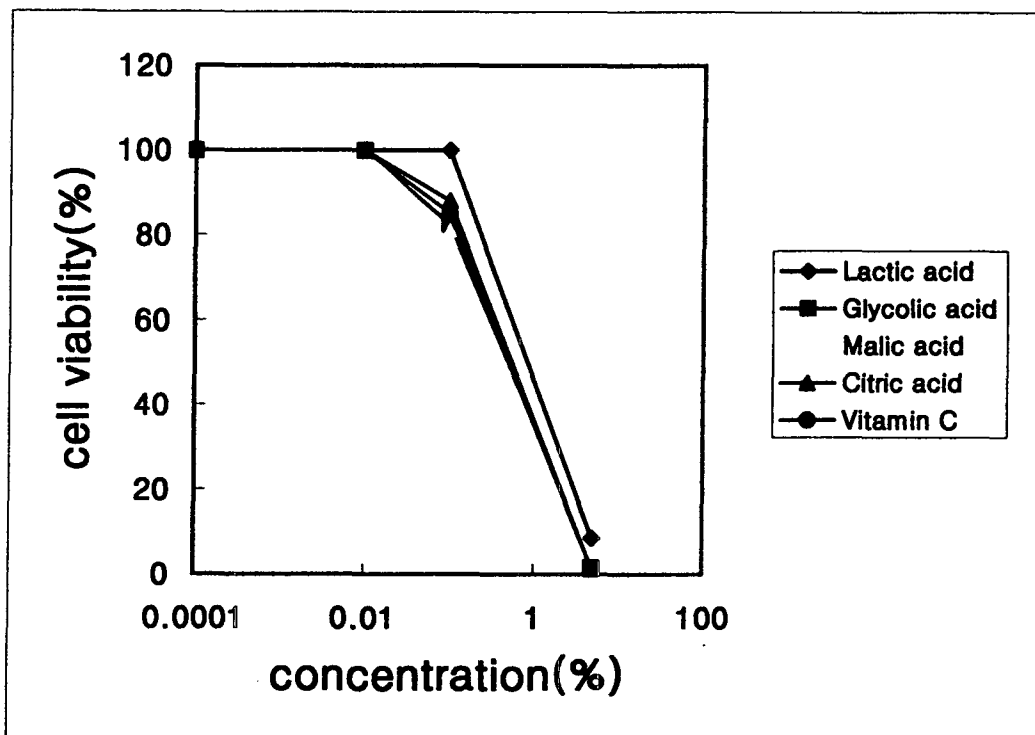


Figure 4. NR assay of dermal equivalent for AHAs and vitamin C at pH 6-7

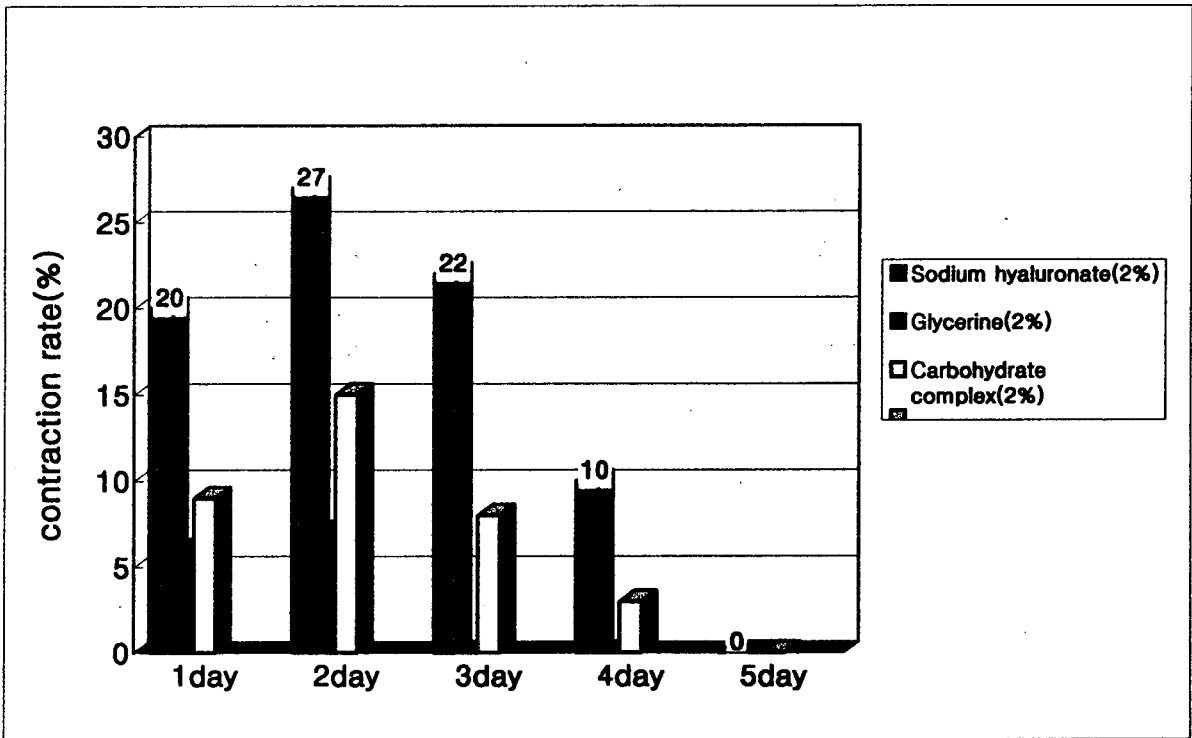


Figure 5. Wound healing effect of dermal equivalent for moisturizing compounds

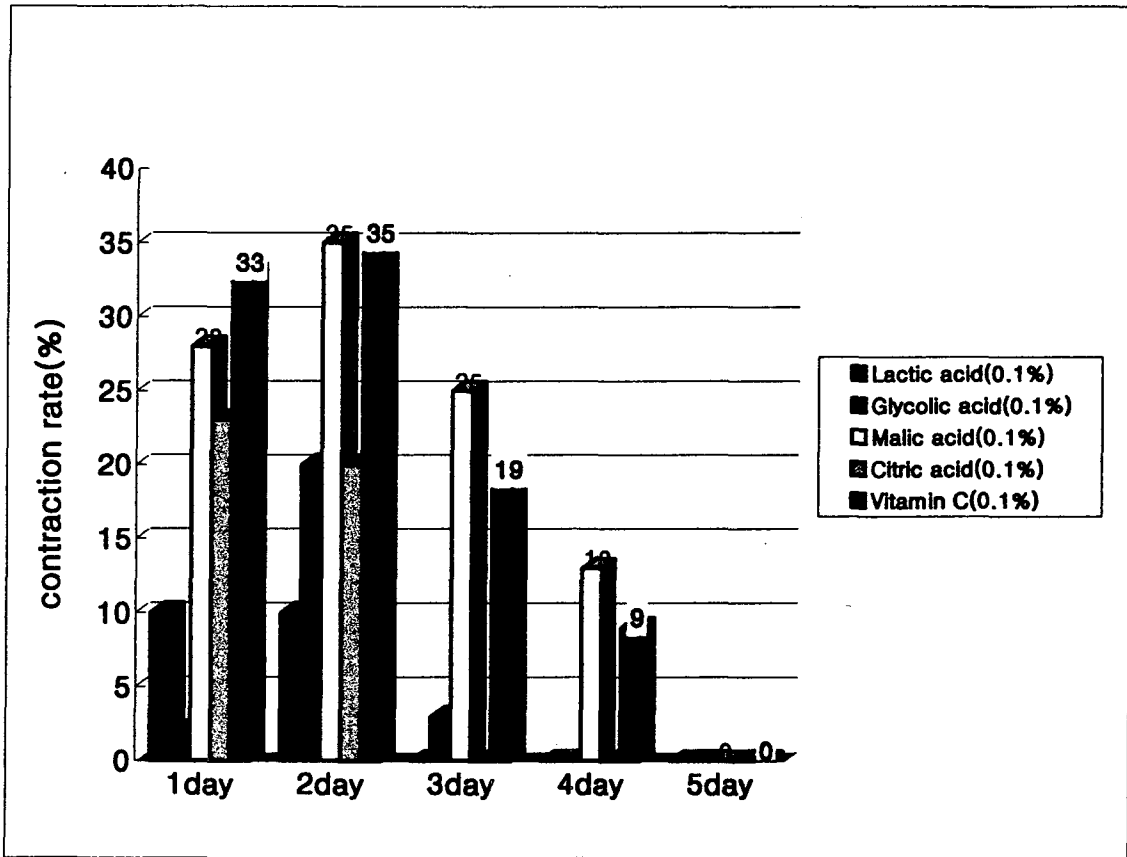
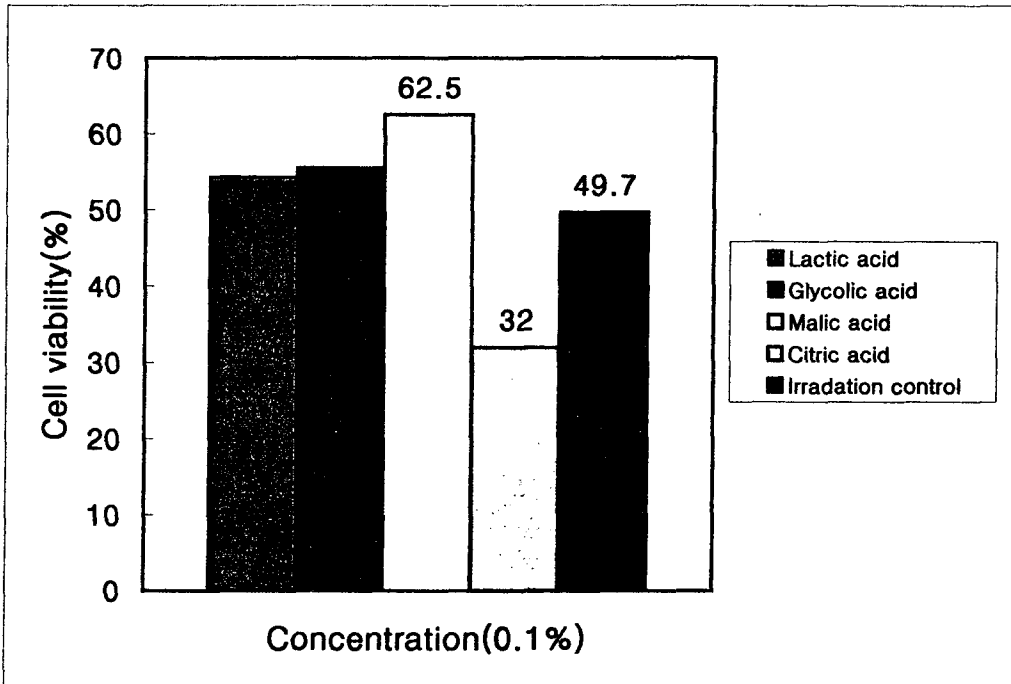


Figure 6. Wound healing effect of dermal equivalent for AHAs and vitamin C at pH 6-7

A.



B.

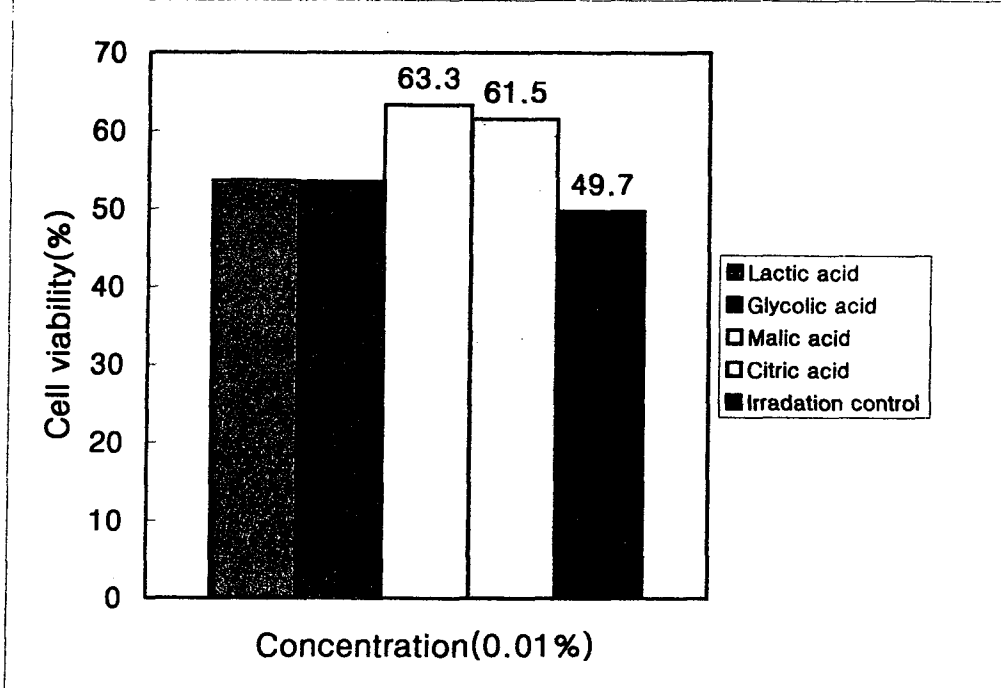


Figure 7. Repairing UV damage of AHAs at pH 6-7 on UV-induced cell damage

A. Cell viability after treatment of 0.1% AHAs at pH 6-7

B. Cell viability after treatment of 0.01% AHAs at pH 6-7

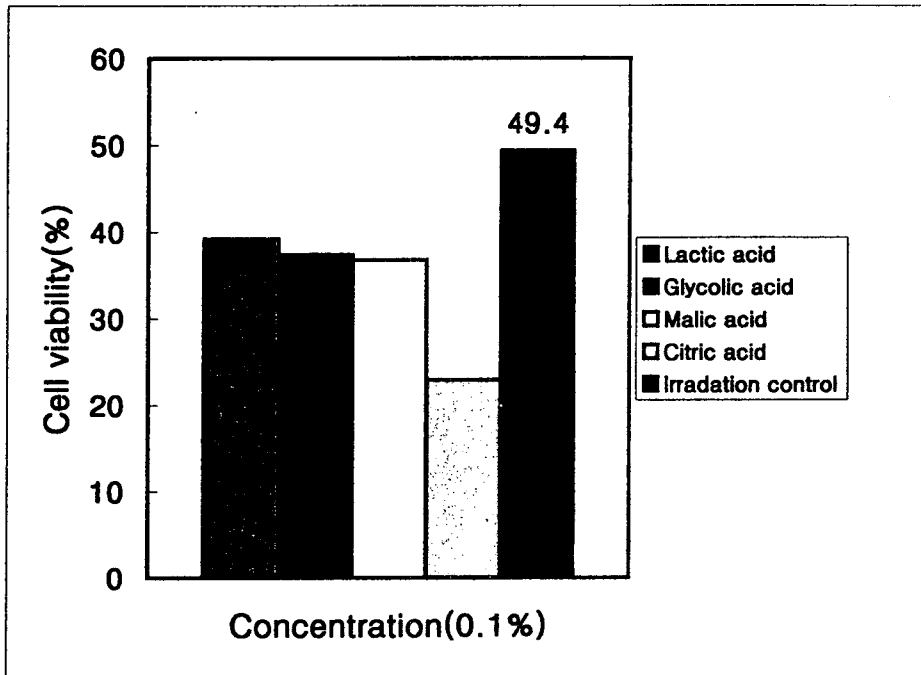


Figure 8. Repairing UV damage of AHAs at pH 2-3 on UV-induced cell damage

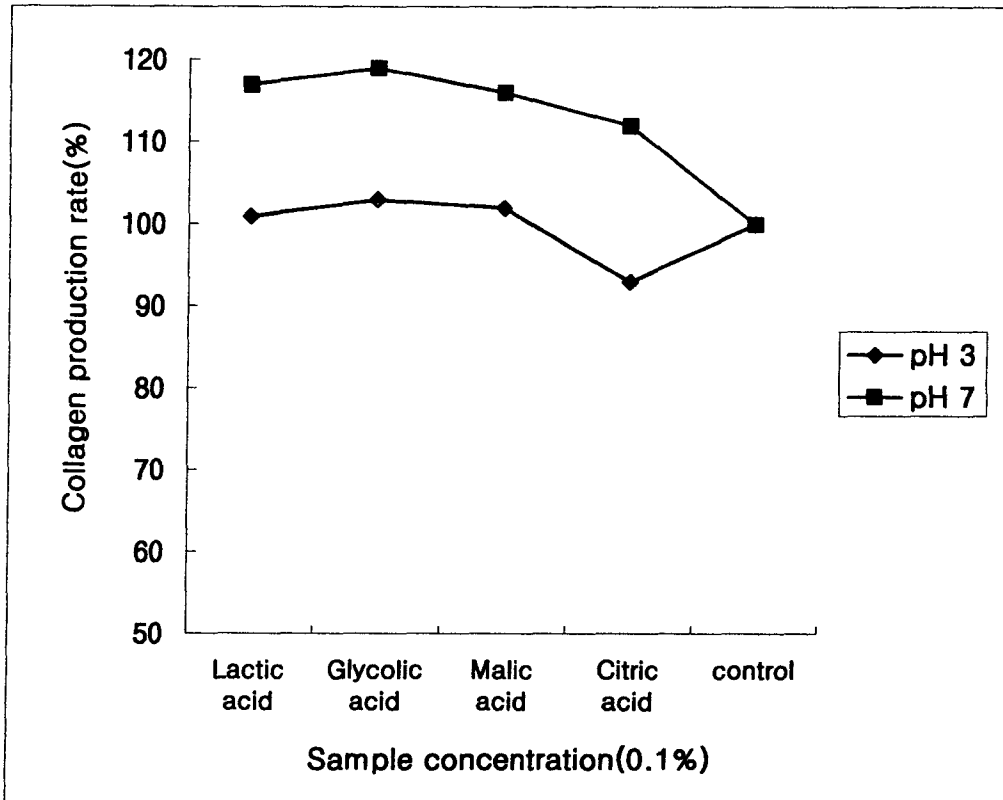


Figure 9. Relative quantitation of collagen synthesis for AHAs at pH 3 and pH 7 in fibroblast culture