

인공피부배양물(DA-3711)을 이용한 주름개선제 개발

김희정[†]·이미연·안병옥·이정환·김병문·이성희·권종원·김원배

동아제약(주) 연구소

Development of Anti-wrinkle Agent with Artificial Skin Culture Broth (DA-3711)

Hee Jung Kim[†], Mi Youn Lee, Byoung Ok Ahn, Jung Hwan Lee, Byung Moon Kim, Sung Hee Lee,
Jong Won Kwon, and Won Bae Kim

Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co. Ltd., 47-5, Sanggal, Kiheung-eup, Yongin-si, Kyunggi-do 449-905, Korea

요약 인공피부배양물(DA-3711)은 동아제약의 인공피부배양기술을 활용하여 개발되었으며, 노화된 피부상태를 개선시켜 줄 수 있는 천연의 세포외기질 단백질을 비롯하여 인체성장인자 등의 영양성분을 함유하고 있다. DA-3711의 항노화 효과는 *in vitro*와 *in vivo*에서 규명되었으며, 또한 인체 효능 연구 결과에서도 피부탄력을 개선시키고 주름을 감소시키는데 매우 효과적이었다. 즉, DA-3711을 이용한 새로운 주름개선제는 피부재생을 촉진시켜 항노화 및 주름개선 효능을 나타낸다.

Abstract: Artificial skin culture broth (DA-3711) was developed by using Dong-A pharmaceutical's artificial skin culture technique, and it contains plenty of nutrients, natural extracellular matrix proteins and human growth factors, which may improve aged skin conditions. The anti-aging effect of DA-3711 was investigated both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore the clinical studies showed that DA-3711 had been very effective in improving firmness and reducing wrinkles. The results suggest that the novel anti-wrinkle agent, DA-3711, may have anti-aging and anti-wrinkle effects by stimulating skin regeneration.

Keywords: artificial skin culture, natural extracellular matrix proteins, human growth factors, anti-aging, anti-wrinkle

1. 서 론

현재 널리 사용되어지는 피부노화를 억제하거나 치료하는 약물들을 대략 살펴보면, 자외선차단제, 트레티노인(tretinoin)을 비롯한 비타민 A 및 유도체, 천연유기산인 AHA (alpha hydroxy acid), 항산화제(anti-oxidant) 등이 있다. 이러한 약물들은 다양한 기전으로 피부노화의 원인을 차단하거나 노화증상을 개선시켜주는 역할들을 하고 있다. 피부노화는 다양한 원인에 의해 피부 조직이 점차 손상되는 현상이다[1]. 피부에 노화를 일으키는 원인은 크게 연령의 증가에 따른 자연노화와 외부환경 영향으로 인한 외인성노화로 알려져 있다. 특히 외인성 노화로는 자외선의 의한 광노화가 가장 대표적인 현상이며, 노화된 피부의 대표적인 증상은 잔주름 및 주름의 발생이다. 이는 노화로 조직이 손실됨에 따라 피부가 위축되고 탄력이 감소되며 건조해지는 현상에서 비롯된 결과이며, 특히

광노화 피부에서는 자외선에 의해 피부 기질을 형성하는 콜라겐과 탄력섬유인 엘라스틴 등이 파괴되어, 자외선에 노출되지 않은 부위에 비해 굵은 주름이 두드러지게 형성된다[2,3]. 이런 현상을 고려하면, 피부노화의 대표적인 정후인 주름을 예방하거나 개선하기 위해서는, 피부노화를 촉발하는 요인을 제거해 주거나 노화에 의해 손실되는 성분을 보충할 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 노화에 의해 손실되는 성분으로 피부 조직의 지지체 역할을 하는 기질 단백질을 구성하는 콜라겐의 생성을 촉진하는 효능을 중심으로 연구를 수행하였다. 연구에 사용된 인공피부배양물(DA-3711)은 섬유아세포를 3차원 배양하여 제조한 인공피부의 배양액으로 섬유아세포가 정상 피부조직에서와 같은 형태로 3차원적 배양되었을 때 섬유아세포에서 생성되는 다양한 성장인자, 세포외기질 단백질, 아미노산, 당 및 비타민 등의 성분을 함유하고 있다. 이와 같은 성장인자 및 영양물질들은 각기 피부 세포의 성장을 촉진하는 효과가 있는 것으로 보고되어 있으므로[4,5], DA-3711에도 피부의 재

[†] 주 저자 (e-mail: heejung@dreamwiz.com)

생을 돕는 효과가 존재하며, 주름 발생을 억제하거나 개선하는 효과가 있을 것으로 기대되어 이를 규명하기 위하여 *in vitro*와 *in vivo* 조건에서 시험을 실시하였다. 특히 콜라겐으로 대표되는 세포외기질의 생합성을 촉진하는 효과가 주름 개선에 중요한 기전이므로, 섬유아세포배양액의 주름 억제 및 개선 효능 보유 여부를 콜라겐 생합성 촉진 효과로서 평가하는 것이 타당하다고 판단되며, 부수적으로 콜라겐을 합성하는 섬유아세포의 증식 효과와 항산화 효과도 평가하였다. 그리고 이상의 결과를 바탕으로 DA-3711을 함유하고 인체피부에 대한 안전성과 상품성을 가진 화장품 제형의 주름개선제를 이용하여 최종적으로 인체피부에서의 탄력개선 및 주름개선 효능을 확인하였다.

2. 실험 방법

2.1. 재료

시험에 사용된 DA-3711은 콜라겐/키토산/글리코사미노글리칸(GAG)으로 만들어진 생체적합성 지지체(scaffold)에 정상 사람 섬유아세포를 접종하여 제작한 인공피부에 fetal bovine serum (FBS) 10%를 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 첨가하고 배양하여 얻은 배양액을 0.22 μm filter로 여과하여 준비하였다. 대조물질로서는 DMEM을 사용하였다.

2.2. 세포배양

DA-3711의 *in vitro* 항노화 효능 평가를 위하여 신생아에서 분리한 정상 사람 섬유아세포(normal human dermal fibroblast)를 사용하였다. 세포는 Cambrex (USA)에서 구입하였고 2~8세대까지 사용하였다. 세포 준비를 위한 배양은 FBS 10%를 함유하는 DMEM을 첨가하여 37°C, CO₂ 5% 조건으로 배양하였다.

2.3. 시험법

2.3.1. 콜라겐 생합성 촉진 효과 시험

DA-3711의 콜라겐 생합성 촉진 효과를 정상 사람 섬유아세포를 사용하여 시험하였다. 섬유아세포에서 실제적으로 콜라겐의 합성이 증가되었음을 확인하기 위하여, 배양한 세포를 회수하여 세포 내에 합성된 콜라겐의 양을 평가하였고, 섬유아세포가 생성하는 전체 콜라겐의 양을 확인하기 위해 배양상등액을 채취하여 콜라겐의 양을 정량하였다.

시험에서는 섬유아세포를 6웰 플레이트에 1×10^5 cells/well로 접종하여, FBS 1%를 함유하는 DMEM을 첨가하여 배양하였다. 48 h 배양한 후, 플레이트를 세척하고

DA-3711 및 대조군을 첨가한 DMEM을 첨가하여 72 h 추가 배양하였다. 세포를 회수하여 효소 처리하여 콜라겐을 추출하고 human type I collagen detection kit (Chondrex, USA)로 세포 내 콜라겐 양을 정량하였다. 배양상등액에 대해서는 Junqueira 등[6]의 spectrophotometric dye-binding technique를 변형하여 콜라겐의 양을 정량하였다. 배양상등액 100 μL 에 0.5 M acetic acid에 녹인 50 μM Sirius red 용액(Biocolour, UK) 1 mL을 첨가하여 30 min간 실온에서 천천히 교반하며 반응시켰다. Sirius red는 음이온계 색소로서 콜라겐의 [Gly-X-Y]_n helix 구조에 특이적으로 결합한다. 30 min간 반응시킨 후 반응액을 5000 xg 이상에서 20 min간 원심분리하여 콜라겐-색소 결합체를 침전시켰다. 침전물에 0.5 M NaOH를 가해 실온에서 5 min 동안 용해시켰다. 이 액을 마이크로 웰 플레이트 리더(micro well plate reader)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군의 결과에 DA-3711 시험군을 비교하여 콜라겐 생합성 촉진 효과를 평가하였다. 시험군으로서 각기 DA-3711 1%, 3%, 5%를 대조군으로 DA-3711을 포함하지 않는 DMEM (0% 대조군)을 사용하였다.

2.3.2. 세포증식 촉진 효과 시험

DA-3711의 세포증식 촉진 효과를 정상 사람 섬유아세포를 사용하여 확인하였다. 섬유아세포를 6웰 플레이트에 2×10^4 cells/well로 접종하였다. 섬유아세포를 24 h 배양하여 배양접시에 생착시킨 후, 플레이트를 세척하고 DA-3711 또는 대조군을 첨가한 DMEM을 첨가하여 48 h 추가 배양하였다. 배양 후 섬유아세포를 0.05% 트립신(Gibco, USA) 처리하여 회수하고, 세포현탁액에 0.4% Trypan blue 용액(Sigma, USA)을 첨가하여 생존 세포수를 측정하였다. 대조군의 결과에 DA-3711 시험군을 비교하여 세포 증식 효과를 측정하였다. 시험군으로서 각기 DA-3711 1%, 3%, 5%를 대조군으로서 DA-3711을 포함하지 않는 DMEM (0% 대조군)을 사용하였다.

2.3.3. 항산화 효과 시험

DA-3711의 항산화 효과를 정상 사람 섬유아세포를 사용하여 확인하였다. 섬유아세포를 96웰 플레이트에 1×10^4 cells/well로 접종하여, 1% FBS를 함유하는 DMEM을 첨가하고 37°C, CO₂ 5% 조건 하에서 배양시켰다. 세포를 24 h 배양하여 생착시킨 후 플레이트를 세척하고, 산화적 스트레스를 가하기 위해 각 웰당 50 μL 의 20 mM hydrogen peroxide (Fluka, USA; H₂O₂, 최종 농도로서 10 mM)을 첨가하고, DMEM에 희석한 DA-3711 또는 대조군 50 μL 를 첨가하여 48 h 동안 추가 배양하였다. MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)와 PMS (ph-

enazine methosulfate)를 20:1로 혼합한 MTS반응액(Pro-mega, USA)을 용시 조제하여, 각 웰에 10 μ L씩 처리하고 37°C, CO₂ 5% 조건으로 반응시켰다[7]. MTS는 살아 있는 세포내에 선택적으로 흡수되어 청남색 수용성 formazan으로 대사되므로, 배지 내로 유리된 formazan의 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 평가할 수 있다. MTS 반응액에 1 h 동안 반응시킨 후, 플레이트를 마이크로 웰 플레이트 리더로 490 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때 대조군의 세포생존율을 100%로 하여, 이에 비교한 시험군의 세포생존율 증감도(%)를 산화적 세포 독성 억제 효과로 계산하였다. 시험군으로서 각기 DA-3711 1%, 3%, 5%를 대조군으로서 DA-3711을 포함하지 않는 DMEM (0% 대조군)을 사용하였다.

2.3.4. *In vivo* 피부 광노화 개선 효과 시험

DA-3711의 *in vivo* 피부 광노화 개선 효과를 확인하기 위하여 무모쥐주름모델(UV induced hairless mouse wrinkle model)을 선정하여 시험을 수행하였다. 건강한 4~5 주령 자성 무모쥐(hairless mouse)의 등 피부에 8주간 주 5회씩 UVB를 조사하여 인공적인 주름을 유발시켰다. UVB 조사량은 15 mJ/cm² (suberythral dose)로 시작하여 4주차까지 10 mJ/cm² 씩 늘려 조사하였고, 4주차로부터는 매회 45 mJ/cm² 씩 조사하였다. 주름 유발 이후 연속된 8주간은 동일하게 주 5회씩, 매회 45 mJ/cm²의 UVB를 조사하고(16주간 총 누적조사량 3.3 J/cm²), 이에 병행하여 hairless mouse의 등 피부에 시험물질 및 대조물질을 매회 0.1 mg씩 도포하였다. 시험군은 DA-3711 15%, DA-3711 30%, 레티놀(Cylasphere retinol; 2500 IU)을 각 농도의 로션 제형으로 적용하였으며, 대조군으로서 로션베이스 처방 및 자외선을 조사하지 않은 비조사 대조군을 설정하였다. 16 주간의 처치 후 주름 완화정도를 육안 평가하였고(0~3 등급), 레플리카(replica)를 채취하여 광노화에 의해 유발되는 주름에 대한 개선 효과를 평가하였다.

2.3.5. 인체피부 탄력 개선 효과 시험

DA-3711의 인체피부 탄력 개선 효과를 확인하기 위하여 시험물질 및 대조물질을 이중맹검법으로 적용하고 비침습적 장비를 이용한 기기평가를 수행하였다. 30~48세의 건강한 여성 29명에게 4주간 매일 아침, 저녁으로 2회씩 안면 좌우에 각각 시험물질 및 대조물질을 일정한 부위에 동일하게 도포하도록 하였다. 시험군은 *in vitro* 시험 결과를 근거로 인체피부에 대한 안전성과 화장품으로서의 상품성을 고려하여 DA-3711 3% 농도의 로션 제형으로 적용하였으며, 대조군으로서 DA-3711을 함유하지 않는 로션베이스 처방을 적용하도록 설정하였다. 이마, 눈꼬리, 볼 부위에서의 피부 탄력도를 기기(cutometer MPA

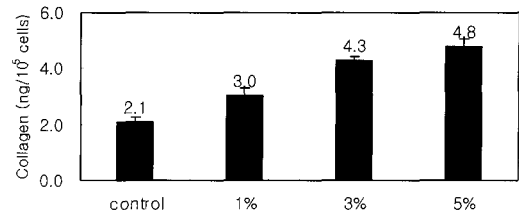


Figure 1. Collagen amounts accumulated in DA-3711 treated fibroblasts (in-cell collagen amounts).

580, Courage and Khazaka, Germany)를 이용하여 측정하고 4주 적용 전후의 차이를 비교하여 탄력 개선 효과를 평가하였다.

2.3.6. 인체피부 주름 개선 효과 시험

DA-3711의 인체피부 주름 개선 효과를 확인하기 위하여 시험물질 및 대조물질을 이중맹검법으로 적용하고 레플리카를 채취하여 기기 분석으로 평가를 수행하였다. 33~52세의 건강한 여성 20명에게 12주간 매일 아침, 저녁으로 2회씩 안면 좌우 눈꼬리 부분을 중심으로 각각 시험물질 및 대조물질을 일정한 부위에 동일하게 도포하도록 하였다. 인체피부 탄력 개선 효과 시험과 동일하게 시험군은 *in vitro* 시험 결과를 근거로 인체피부에 대한 안전성과 화장품으로서의 상품성을 고려하여 DA-3711 3% 농도의 로션 제형으로 적용하였으며, 대조군으로서는 DA-3711을 함유하지 않는 로션베이스 처방을 적용하도록 설정하였다. 12주 경과 후 적용 전후에 채취한 레플리카를 기기(skin-visiometer SV 600, Courage and Khazaka, Germany)로 비교분석하여 인체피부에 대한 주름 개선 효과를 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 시험 결과

3.1.1. 콜라겐 생합성 촉진 효과 시험

DA-3711에 의해 세포 내에서 콜라겐 생합성이 촉진됨을 확인하기 위하여 human type I collagen specific antibody를 이용한 효소면역측정법(ELISA)로서 섬유아세포 내의 콜라겐 축적 생합성량을 평가하였다. 섬유아세포에 DA-3711 및 대조군을 48 h 처치한 결과, DA-3711의 시험군은 대조군에 비하여 세포 내에 축적된 콜라겐 양이 증가된 것으로 나타났다(Figure 1). DA-3711 처치 후 세포 내의 콜라겐 축적량이 증가된 것은 섬유아세포의 콜라겐 생합성이 촉진되었기 때문으로 생각된다. 따라서 시

Table 1. Effect of DA-3711 on Collagen Accumulation in Cultured Fibroblasts Cells (In-cell collagen amounts)

Groups	Additions	Treatment conc. (%)	Collagens in cells (ng/10 ⁵ cells)	Stimulating effect (%)	References
Control	DMEM	As is	2.1	100.0	Negative control
	DA-3711	1 %	3.0	145.5	-
DA-3711	DA-3711	3 %	4.3	206.1	-
	DA-3711	5 %	4.8	229.6	-

Table 2. Collagen Synthesis Stimulating Effects of DA-3711 in Fibroblast Culture (Total collagen concentrations of culture supernatant)

Groups	Treatment conc. (%)	Collagens in media (μg/mL)			Mean	S.D	Stimulating effect (%)
		# 1	# 2	# 3			
Control (DMEM)	As is	6.89	8.36	10.33	8.53	1.73	100.0
	1%	10.22	12.00	16.44	12.89	3.20	151.1
DA-3711	3%	18.56	23.82	27.00	23.12	4.26	271.1
	5%	19.67	25.64	29.22	24.84	4.83	291.3

험군의 콜라겐 축적량을 대조군과 비교하여 시험군에서의 콜라겐 생합성 촉진율(%)을 산출할 수 있다. 시험군의 세포 내 누적 콜라겐량은 처치 농도에 따라 증가되는 양상을 보였으며, Table 1에서와 같이 DA-3711 1%를 처치한 시험군에서 46%, 3%를 처치한 시험군에서 106%, 5%를 처치한 시험군에서 130%로 콜라겐의 생합성이 촉진됨을 확인할 수 있었다.

섬유아세포가 생합성한 콜라겐의 상당수는 세포 외로 분비되므로, DA-3711을 처치한 섬유아세포에서의 전체 콜라겐의 생산량이 증가됨을 증명하고자 세포 외로 분비된 콜라겐의 양도 함께 정량하였다. DA-3711 및 대조군을 48 h 처치한 섬유아세포의 배양상등액을 취하여 Sirius red 염색정량법을 수행한 결과, DA-3711을 처치한 시험군의 배양상등액에 함유된 콜라겐(세포 외 콜라겐 양)의 양이 대조군에 비하여 증가되었고, 처치 농도에 따라 증가율이 커지는 양상을 보였다. 시험군의 세포 외 콜라겐의 양을 대조군에 비교하여 콜라겐 생합성 촉진율(%)을 산출한 결과, Table 2에서와 같이 DA-3711 1%를 처치한 시험군에서 51%, 3%를 처치한 시험군에서 171%, 5%를 처치한 시험군에서 191%씩 콜라겐의 생합성이 촉진됨을 확인할 수 있었다.

그러므로 DA-3711은 섬유아세포에서 콜라겐의 생합성을 촉진하는 효과가 있는 것으로 평가되었다.

3.1.2. 세포증식 촉진 효과 시험

DA-3711 및 대조군을 처치하여 세포 증식 효과를 비교한 결과, 시험군에서 대조군에 비하여 섬유아세포의 증식이 신장됨을 확인하였다. DA-3711을 처치한 시험군에

서는 Figure 2에서와 같이 배양 플레이트에서 세포가 많이 증식되는 것이 관찰되었으며, 시험물질 처치 48 h 후에 세포를 회수하여 생존세포의 수량을 측정된 결과 대조군에 비해 DA-3711 1%를 처치한 시험군은 25%, 3%를 처치한 시험군은 41%, 5%를 처치한 시험군은 46%씩 각기 세포수가 증가되는 것으로 측정되었다.

따라서, DA-3711은 섬유아세포의 증식을 촉진하는 효과가 있다고 할 수 있다.

3.1.3. 항산화 효과 시험

10 mM hydrogen peroxide와 시험물질을 48 h 처치한 후, MTS assay로 세포의 생존율을 측정된 결과, 시험군의 세포 생존율이 대조군에 비해 상대적으로 높았다. 처치한 DA-3711의 농도별로 비교하면, Table 3에서와 같이 대조군에 비해 DA-3711 1%를 처치한 시험군은 13%, 3%를 처치한 시험군은 20%, 5%를 처치한 시험군은 25%씩 세포의 생존율이 높아지는 결과를 나타냈다. 이것은 곧 세포의 생존율이 증가한 만큼 섬유아세포에 가해진 산화적 스트레스가 경감된 것으로 판단할 수 있다.

즉, DA-3711이 과산화수소가 세포에 미치는 산화적 스트레스를 감소시키는 결과를 나타내었으므로 DA-3711은 항산화 효과를 가지는 것으로 확인되었다.

3.1.4. In vivo 피부 광노화 개선 효과 시험

육안 평가 결과, DA-3711을 함유한 시험군이 레티놀 시험군과 로션베이스 대조군에 비교하여 주름 score가 낮아, 피부 주름이 감소함이 관찰되었다. 특히 로션베이스 대조군에 비해 유의하게 주름 score가 낮아져(p < 0.05)

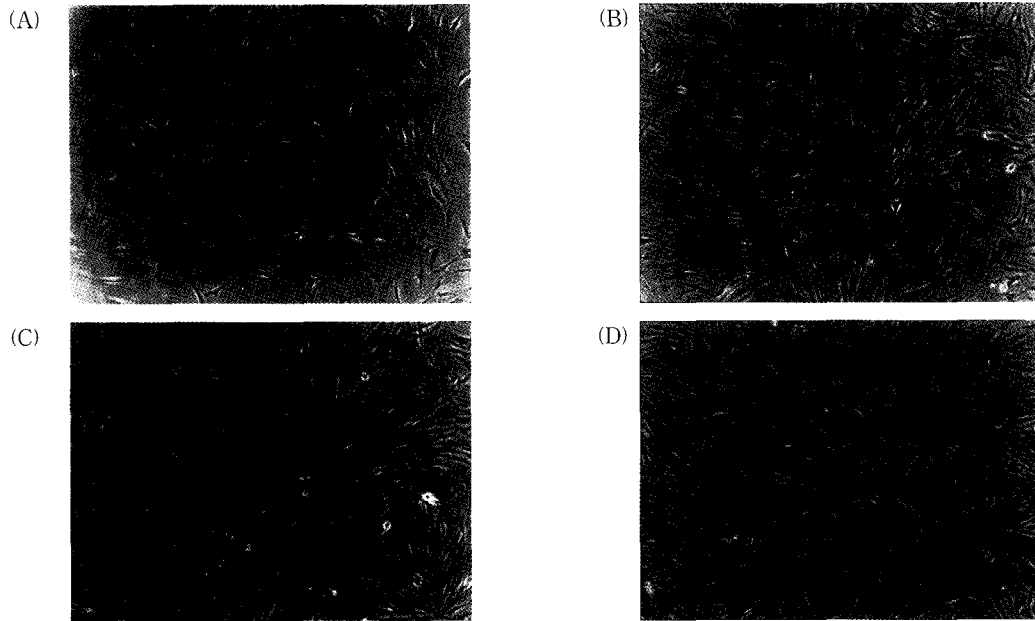


Figure 2. Microscopic observations on fibroblasts treated with DA-3711 (Olympus IX70, ×40).

(A) Control (after 48 h) (B) DA-3711 1% (after 48 h) (C) DA-3711 3% (after 48 h) (D) DA-3711 5% (after 48 h)

Table 3. Cell Proliferation Activity of DA-3711 in Fibroblast

Groups	Treatment conc. (%)	Viable cells (cells/well)			Mean	S.D	Stimulating effect (%)
		# 1	# 2	# 3			
Control (DMEM)	As is	134,375	120,313	137,847	130,845	9285	100.0
	1%	171,354	151,389	169,097	163,947	10934	125.3
DA-3711	3%	189,410	170,833	193,229	184,491	11981	141.0
	5%	197,743	175,694	197,743	190,394	12730	145.5

DA-3711 처치에 의해 *in vivo*에서 주름이 완화되는 효과가 확인되었다. Figure 4의 레플리카 표면을 비교하면 DA-3711 30% 시험군이 로션베이스 대조군에 비해 표면의 주름이 현저히 낮게 발생하는 것을 확인할 수 있다.

따라서, DA-3711은 노화의 주된 원인 중 하나인 광노화로 인한 주름의 발생을 감소시켜주는 효과가 있다고 할 수 있다.

3.1.5. 인체피부 탄력 개선 효과 시험

DA-3711의 인체피부에 대한 탄력 개선 효과를 평가한 결과, 4주 후 대조제품에 비해 이마, 눈꼬리, 볼 부위에서 cutometer를 이용한 기계적 분석에 의해 우수한 탄력개선 효과를 확인하였다. 특히 Figure 5에서 나타낸 바와 같이 볼 부위에서는 개선도가 뚜렷하여, 통계적으로 유의한 수준($p < 0.05$)으로 개선효과가 나타남을 관찰할 수 있었다.

이 결과는 DA-3711 및 DA-3711 3%를 함유하는 화장

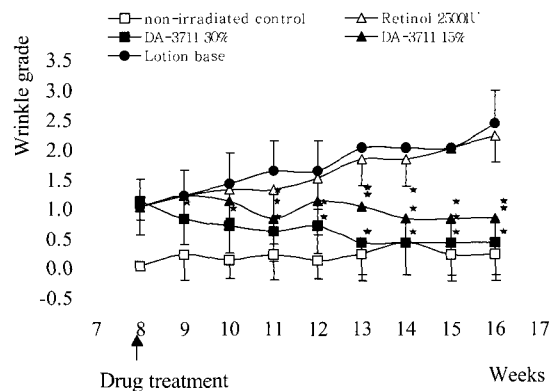


Figure 3. Visual assessment of wrinkle grade in UVB-irradiated mice after DA-3711 treatment.

* Significantly different to "lotion base" group ($p < 0.05$)

※ Wrinkle grade criteria

- 0: no coarse wrinkles
- 1: a few shallow coarse wrinkles
- 2: some coarse wrinkles
- 3: several deep coarse wrinkles

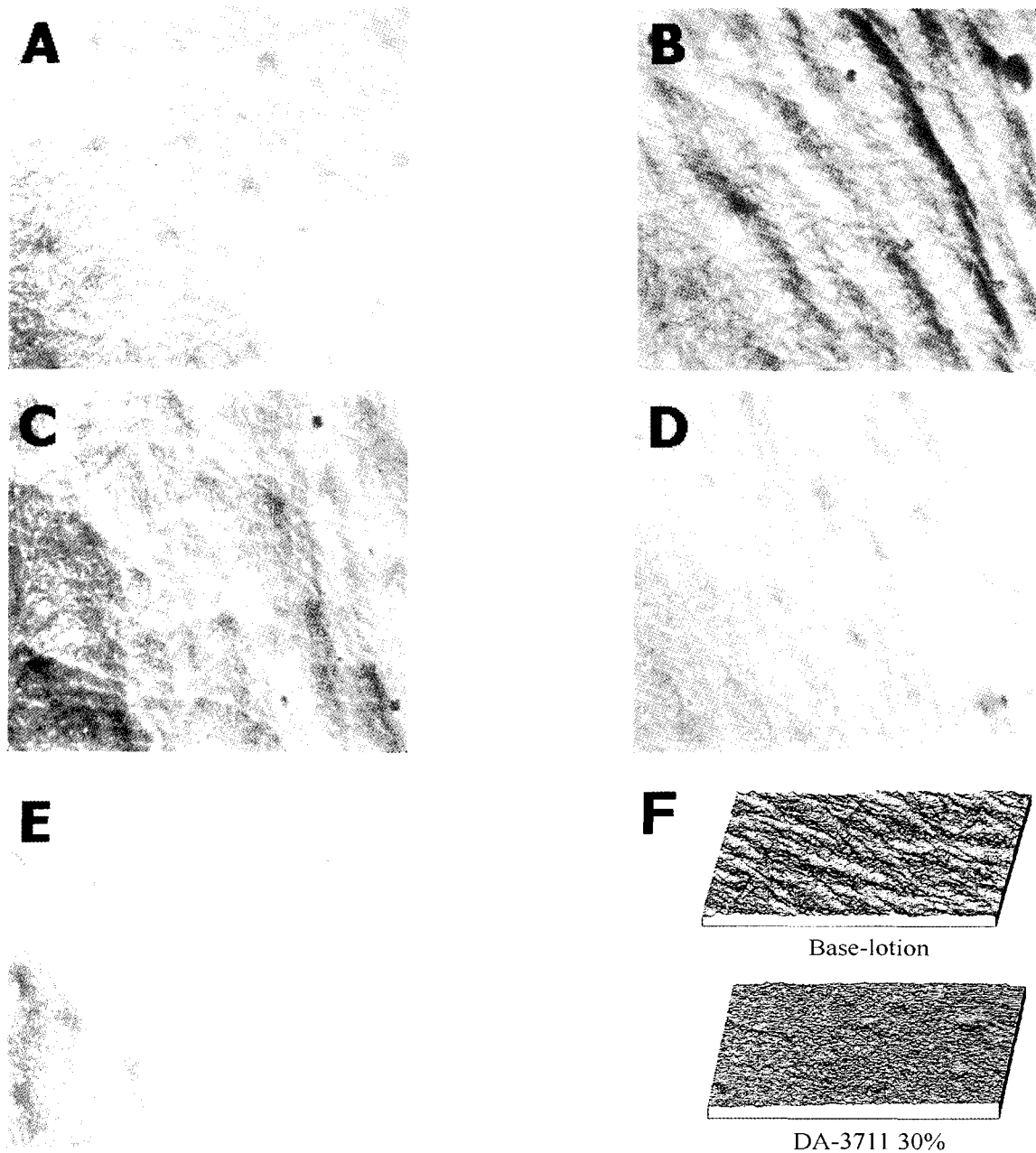


Figure 4. Skin surface replicas taken from UVB-irradiated hairless mouse after topical application (8 weeks). (A) Non-irradiated control (B) Lotion base (C) Retinol 2500 IU (D) DA-3711 15% (E) DA-3711 30% (F) Comparisons of replica surfaces.

품이 노화의 한 현상으로 나타나는 피부 탄력 저하를 개선시켜 주는 효과를 가지는 것을 의미한다.

3.1.6. 인체피부 주름 개선 효과 시험

DA-3711의 인체피부에 대한 주름 개선 효과를 눈꼬리 부분에서 레플리카를 채취하여 visiometer로 분석하는 방

법으로 평가한 결과, Figure 6에서와 같이 12주 후 시험 물질에서의 개선도가 크고 대조제품에 비해 통계적으로 유의한 수준($p < 0.05$)으로 개선효과가 나타남을 관찰할 수 있었다.

결론적으로 DA-3711 및 DA-3711 3%를 함유하는 화장품이 인체피부가 노화되어 발생하는 주름을 개선시켜

Table 4. Anti-oxidative Effect of DA-3711 in Fibroblast under 10 mM H₂O₂

Groups	Treatment conc. (%)	Cell viability (%)				Relative anti-oxidative effect (%)
		# 1	# 2	# 3	Mean	
Control (DMEM)	As is	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0
	1%	114.2	111.1	113.8	113.0	13.0
	3%	121.0	119.5	120.4	120.3	20.3
	5%	125.9	123.8	125.1	124.9	24.9

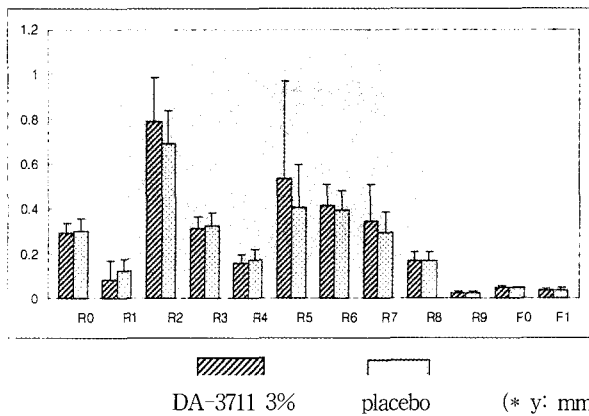


Figure 5. Skin firmness of cheek after topical application (4 weeks).

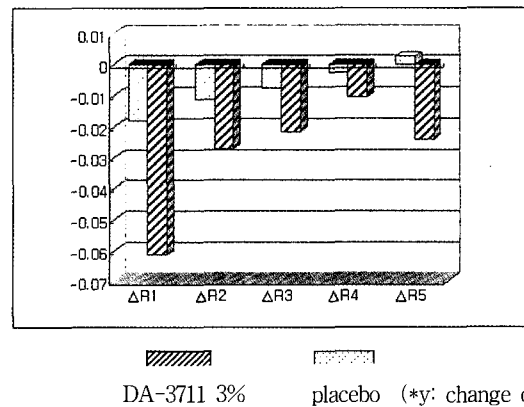


Figure 6. Skin replica analysis after topical application (12 weeks).

주는 효과를 가진다고 할 수 있다.

3.2. 고찰

피부의 노화 현상인 주름은 조직 내에서 피부세포 및 기질 단백질의 감소로 조직이 느슨해짐에 따라 발생하며, 특히 자외선에 의한 콜라겐 파괴 및 분해촉진 효과로 외부에 노출된 피부에서 더욱 심각하게 발생한다. 그러므로 노화에서 오는 콜라겐의 파괴를 방지하거나 피부 내 콜라겐의 합성을 촉진시킨다면 주름의 형성을 완화할 수 있을 것으로 생각된다.

섬유아세포는 피부의 진피에 존재하는 세포로서, 특히 콜라겐을 다량 생합성한다[8]. 따라서 본 연구에서는 섬유아세포에 DA-3711을 처리하여, 콜라겐이 증가됨을 정량적으로 평가하여 콜라겐 생합성 촉진 효과를 평가하였다. 그런데 DA-3711은 섬유아세포에서 생산되어 콜라겐이 함유되어 있는 물질이므로 일반적인 평가방법에 이용되는 세포 외 배양상등액에는 이미 섬유아세포배양액에 함유된 상당량의 콜라겐이 존재한다. 그러므로 처리물질의 효과를 분명히 확인하기 위해서는 먼저 세포 내에서 실제 콜라겐의 합성이 증가되는지 확인하고자 하였다. 그 결과, DA-3711을 처리한 섬유아세포에서는 대조군보다 세포 내의 콜라겐 양이 증가하는 것으로 나타났으며, 이

는 섬유아세포가 실제 콜라겐을 더 많이 생합성하기 때문으로 생각되었다. 한편, 생성된 콜라겐의 약 85%는 세포 외로 분비되므로[9], 전체 콜라겐 양의 변동을 확인하기 위해서는 세포 외 콜라겐 양도 평가할 필요가 있다. 따라서 시험한 섬유아세포의 배양상등액을 채취하여 분석하였다. 그 결과 DA-3711을 처리한 시험군의 배양상등액에 함유된 콜라겐은 대조군에 비해 크게 증가하였고, 처리 농도에 따라 증가폭이 상승되어, 5% 시험군에서는 대조군의 약 2배에 가까운 농도임을 확인할 수 있었다. 그러므로 DA-3711은 섬유아세포에서 콜라겐의 생합성을 촉진하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

또한 노화된 피부에서는 조직 내의 세포수가 감소하는 것으로 알려져 있고, 세포와 기질단백질을 손상시키는 산화물질의 영향이 큰 것으로 알려져 있으므로, 본 연구에서는 부가적으로 DA-3711의 세포 증식 효과와 항산화 효과도 함께 확인하였다. 그 결과 DA-3711을 처리한 시험군에서는 세포의 수가 증가되는 것을 현미경 조건하에서 관찰하였고, DA-3711 처리 48 h 후에 세포를 회수하여 생존세포의 수량을 측정한 결과 대조군에 비해 DA-3711 5% 처리군에서 46%까지 세포수가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 Pinney 등의 보고[5]와 유사한 결과를 나타내고 있다. 그리고 hydrogen peroxide가

유발한 산화 환경에서 DA-3711을 처치한 섬유아세포의 생존율은 25%까지(DA-3711 5% 처치군) 증가되는 결과를 보였다. 즉, DA-3711의 처치에 의해 산화적 스트레스가 경감되었다고 볼 수 있으므로 항산화 효과를 가지는 것으로 판단되었다.

In vitro 시험 결과에서 DA-3711이 피부 노화를 완화하는 효능이 있는 것으로 판단되었으므로, 실제 피부에서의 효능을 확인하기 위하여 1차적으로 주름을 유발시킨 hairless mouse를 이용하여 *in vivo* 시험을 수행하였다. 육안 평가 및 레플리카 평가에서 DA-3711의 처치에 의해 자외선을 조사하여 유발시킨 hairless mouse의 광노화에 의한 주름 생성이 감소하는 양상을 나타냄을 확인하여, DA-3711의 *in vivo* 항노화 기능을 확인할 수 있었다.

이상의 시험 결과를 근거로 하여, *in vitro* 시험 결과 상승효과가 탁월한 유효농도인 DA-3711 3%를 인체피부에 대한 안전성과 화장품으로서의 상품성을 확보한 로션 제형을 이용하여 적용한 결과, 기기적 평가에 의해 통계적으로 유의하게 탄력과 주름 개선 효능을 나타내었다.

따라서, 인공피부배양물(DA-3711)은 콜라겐 합성과 섬유아세포 증식을 촉진하는 기전으로 피부 재생을 촉진시켜 피부의 노화현상을 개선할 수 있는 새로운 물질인 것으로 평가되었으며, 아울러 이를 함유한 화장품 제형은 주름개선제로서의 효능을 가지는 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업(고유번호 02-PJ1-PG4-PT05-0008)에 의하여 이루어진 것입니다.

참고 문헌

1. M. C. Branchet, S. Boisnic, C. Frances, and A. M. Robert, Skin thickness changes in normal aging skin, *Gerontology*, **36**, 28 (1990).
2. L. J. Green, A. McCormic, and G. D. Weinstein, Photoaging and the skin: the effects of tretinoin, *Dermatol. Clin.*, **11**, 97 (1993).
3. M. Yaar and B. A. Gilchrest, Aging versus photoaging: postulated mechanisms and effectors, *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, **3**, 47 (1998).
4. J. N. Mansbridge, K. Liu, R. E. Pinney, R. Patch, A. Ratcliffe, and G. K. Nau-ghton, Growth factors secreted by fibroblasts: role in healing diabetic foot ulcers, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **1**, 265 (1999).
5. E. Pinney, K. Liu, B. Sheeman, and J. Mansbridge, Human three-dimensional fibroblast cultures express angiogenic activity, *J. Cell Physiol.*, **183**, 74 (2000).
6. L. C. U. Junqueira, G. Bignolas, and R. R. Brentani, A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen, *Anal. Biochem.*, **94**, 96 (1979).
7. K. Vorauer, F. Steindl, A. Jungbauer, R. Hahn, and H. Katinger, Cytokine activity assay by means of proliferation measured in plane convex microtiter wells, *J. Biochem. Biophys. Method*, **32**, 85 (1996).
8. R. E. Burgeson and M. E. Nimni, Collagen types: molecular structure and tissue distribution, *Clin. Orthop.*, **282**, 250 (1992).
9. S. A. Jimenez, W. McArthur, and J. Rosenbloom, Inhibition of collagen synthesis by mononuclear cell supernates, *J. Exp. Med.*, **150**, 1421 (1979).