

## UV에 대한 Glycolic Acid의 피부세포증식 기전연구 및 억제효과

이 화 정 · 이 충 우 · 안 광 수\* · 윤 여 표 · 표 형 배\*\* · 조 찬 휘\*\*\* · 홍 기 영\*\*\*\* · 홍 진 태†

충북대학교 약학대학, \*식품의약품안전청, \*\*한불화장품(주) 기술연구소, \*\*\*영동대학교 뷰티케어과, \*\*\*\*한남대학교 영문학과  
(2005년 6월 30일 접수, 2005년 8월 27일 채택)

### The Effects and Mechanisms of Glycolic Acid on the UV-induced Skin Cell Proliferation

Hwa Jeong Lee, Chung Woo Lee, Kwang Soo Ahn\*, Yeo Pyo Yun, Hyeong Bae Pyo\*\*, Chan Hwi Cho\*\*\*,  
Ki Young Hong\*\*\*\*, and Jin Tae Hong†

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Gaeshin-dong, Heungduk-gu, Cheongju 337-745 Korea

\*Korea Food and Drug Agency, \*\*R&D Center, Hanbul Cosmetics Co.

\*\*\*Department of Beauty Care, Youngdong University, \*\*\*\*School of English Language and Literature, Hannam University

(Received June 30, 2005; Accepted August 27, 2005)

**요약:** Glycolic acid는 과일과 우유 사탕수수에서 비롯되는 알파-hydroxy 산의 일종의 화장품 성분으로 UV-irradiate된 피부에서는 광보호와 항 염증효과 및 산화 방지 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나, UV자극에 의한 피부세포증식에 관하여 glycolic acid의 기능은 거의 알려지지 않았다. Glycolic acid는 UV에 의한 hairless mouse의 피부에서 종양 발진을 억제한다는 것을 본 연구자 등이 규명한바 있다. 따라서 이번 연구에서는 UV에 의한 피부의 종양발생억제 효과가 glycolic acid가 UV에 의한 피부의 세포성장을 억제하기 때문인지를 연구하였다. Glycolic acid를 처리한 피부에서 UV에 의하여 유도된 세포증식과 apoptotic cell death을 감소시켰다. *In vitro* 연구에서도 glycolic acid는 UVB에 의하여 유도된 피부 유래세포인 keratinocyte의 세포성장억제와 apoptotic cell death 및 caspase-3 활동을 억제하였다. 이 결과들은 glycolic acid가 UV에 의하여 유도된 피부종양발생 억제가 UV에 의한 피부세포성장과 apoptotic cell death를 억제하는 효과에 의한 것임을 시사한다.

**Abstract:** Glycolic acid, an alpha-hydroxy acid derived from fruit and milk sugars, has been commonly used as a cosmetic ingredient since it was known to have photo-protective, anti-inflammatory effects, and anti-oxidant effect in UV-irradiated skin. However, little has been known about the functional role of glycolic acid on UV-induced skin cell proliferation. It was previously found that glycolic acid inhibited UV-induced skin tumor development in hairless mouse. As a possible mechanism of glycolic acid on the UV-induced skin tumor development, the ability of glycolic acid to inhibit the UVB-induced cell growth and possible mechanisms were investigated. Glycolic acid treatment attenuated the UV-induced cell proliferation and apoptotic cell death in the skin. *In vitro* study, glycolic acid inhibited the UVB-induced cell growth and apoptotic death through inhibiting caspase-3 activity. These results suggest that glycolic acid may exert the inhibitory effect on the UVB-induced skin tumor development by regulating cell growth and apoptotic cell death.

**Keywords:** glycolic acid, UV, cell proliferation, apoptosis

## 1. 서 론

최근 생활환경의 개선과 의약품 개발에 의해 인간의 평균 수명이 연장됨에 따라 노화에 대한 관심이 높아지고 이와 함께 많은 노화관련 연구가 이루어지고 있다. 그러나 노화현상은 매우 복잡하여 단일 기전으로 설명하기

는 어렵다[1]. 그 중 피부노화에 크게 영향을 미치는 것 중 하나가 자외선(Ultraviolet, UV) 광량의 증가이다. 자외선은 파장에 따라서 자외선 A (UVA, 320 ~ 400 nm), 자외선 B (UVB, 290 ~ 320 nm), 자외선 C (UVC, 200 ~ 290 nm)로 분류되며 파장에 따라 피부의 침투정도가 달라지는데 그 중 자외선 B (UVB)를 피부에 조사하면 홍반 및 화상반응, 유전자변이, 국소 및 전신적 면역 억제 등 다양한 변화가 일어나며 색소침착, 일광화상, 피부암을 유발하

† 주 저자 (e-mail: jinthong@chungbuk.ac.kr)

는 주원인으로 알려져 있다[2].

자외선에 의한 일광화상과 같은 국소반응과 발열, 급성기 반응물질의 증가와 같은 전신반응의 발생기전에 각질형성세포에서 유래한 IL-1 $\alpha$ 가 관여한다는 것이 알려져 있으며 최근에 광면역학에서의 IL-1 역할에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 자외선 B 조사는 각질형성세포에서 interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등 다양한 사이토카인의 생산과 분비를 촉진시키며 이들 사이토카인은 자외선 조사에 의한 국소적 면역 및 염증반응에 중요한 역할을 한다[3].

자외선은 세포내에서 여러 신호전달을 유도하여 repair, apoptosis 또는 세포분열에 관여하고 있다[3]. Apoptosis는 외부적 환경의 변화에 의해 급격히 일어나는 수동적 죽음인 괴사(necrosis)와는 달리, 세포 내부에 존재하는 죽음의 프로그램이 신호에 의해 개시된 세포에서 여러 유전자들이 발현됨으로써 일어나는 능동적인 죽음이다. Apoptosis에서 caspase family는 세포사멸의 중심적 역할을 하는데 initiator caspase인 caspase 8, 9, 10은 pro-apoptotic 신호인 bax, bik, bak 등과 긴밀히 연관하여 effector caspase인 caspase 3, 6, 7 등을 활성화시켜 세포 골격과 핵단백질에 손상을 주어 apoptosis를 유도한다.

결과적으로 자외선은 생리 화학적인 변화를 겪으면서 세포증식이나 돌연변이, 각질형성세포, Langerhans cells, 멜라닌세포, 비만세포, 혈관내피세포, 섬유아세포, 면역세포 등의 변화 및 파괴가 일어나며, 피부표면의 변화로는 sun burn, sun tan, 그리고 홍반(erythema) 등의 임상적인 광노화(photo-aging) 현상을 겪게 된다.

광노화(photo-aging) 현상은 치료와 예방이 중요하다. 치료와 예방방법으로는 자외선 차단제의 사용, tretinoin의 국소 도포, 그리고 외과적 처치로 기계적 박피, 다양한 화학물질을 이용한 화학 박피 등의 방법이 있다[4]. 1990년대 후반부터 광노화의 치료 방법의 하나로 관심이 집중되고 있는 것이 alpha-hydroxy acid (AHAs)의 사용이다.

AHAs는 자연 상태의 과일이나 우유 등에 존재하는 유기산으로서 glycolic acid, lactic acid, citric acid, malic acid 및 tartaric acid 등을 총칭하는 용어이다. 포도, 사과, 레몬, 오렌지 등 과즙과 식품 등에 많이 존재하여 일명 과일산(fruit acid)이라고 불려지고 있는 물질이다[5,6]. 이들 AHAs는 pH 조절제 및 피부박리작용과 피부보습작용 물질로서의 기능 때문에 화장품원료로 사용되고 있는데, 세포재생속도를 증가시켜 세포형성을 촉진하므로 피부노화를 막고 기미나 주근깨를 막아주는 기능이 있다고 알려져 있다[5-7].

AHAs는 고농도에서는 교소체(desmo-some) 손상으로 표피박리를 유발하여 표피 증식과 각질층의 정체를 보이

는 지루각화증, 광선각화증, 심상성 사마귀 등의 치료 등 화학적 박피술에 사용되고, 저농도에서는 하부 각질층에서 각질세포의 응집력(corneocyte cohesion)을 감소시켜 과각화된 각질층의 두께를 감소시켜 건조증, 어린선, 모낭성 과각화증 등 각질층의 정체로 인한 광노화의 여러 증상을 개선시키는 효과와 피부질환에 사용되는 것으로 연구되었다[8].

본 연구에서는 AHAs 함유 화장품 성분 중 그 함량이 제일 높고 가장 작은 크기로 피부 침투력이 높은 glycolic acid로 피부암 유발 작용이 알려진 UV에 의한 피부 자극에 의한 세포증식을 억제하고 과도한 세포사를 억제하는지를 UV를 처치한 마우스 피부에서 연구하였고, keratinocyte에 UV 단독치리와 UV와 glycolic acid를 병행 처리하여 세포성장, apoptosis, apoptosis 관련 유전자(caspase-3)를 비교 분석함으로써 UV에 의한 표피세포의 변화과정에서 glycolic acid가 어떤 방어역할을 하는지에 대하여 살펴보고 또한 그 작용 기작에 대하여 규명하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험동물 및 자외선 조사

실험동물은 국립독성연구원에서 생산한 6주령의 SPF (specific pathogen free) hairless mice (female)를 7일 이상의 기간동안 매일 관찰하여 건강한 동물만을 선발하여 실험에 사용하였다. 사육환경은 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 10\%$ , 12 h 조명(AM 07:00 ~ PM 07:00)하에 사육하였으며, 사료는 mouse용 고형사료를, 음용수는 상수를 제한 없이 섭취시켰다. 실험동물을 대조군(자외선 비조사군), 자외선 조사군 및 자외선조사 + glycolic acid 처리군의 실험군으로 각각 15마리씩 나누었다. UV조사는 최초 UVA를  $1.134 \text{ mJ/cm}^2$ 의 조사량으로 1회 조사하였으며, UVB 조사량  $0.035 \text{ mJ/cm}^2$ 으로 1주마다 10%씩 증가시켜 주 5회 노출시켰으며, glycolic acid 처리 군은 50% glycolic acid를 PEG (polyethylene glycol) base cream으로 만들어 pH 3.0으로 보정하여 일회처리 시 80 mg의 glycolic acid에 해당하는 양을 실험동물의  $1 \times 2 \text{ cm}^2$  면적의 등 중앙부위에 주 2회로 도포하였으며, UV조사에 의한 피부세포손상 및 glycolic acid의 세포손상억제효과를 23주간 매주 관찰하였다.

### 2.2. 실험재료 및 기기

실험물질로는 glycolic acid와 UV를 사용하였으며, glycolic acid는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)에서 구입하였고, 등 부위에 도포하기 용이하도록 PEG cream을 만들어서 사용하였다. PEG cream은 PEG 8000 (Sig-

ma Co.)과 PEG 400 (USB CO.)을 1:2 (w/v)가 되도록 조제하였으며, PEG base cream은 D.W와 PEG cream의 비율을 2:1로 조제하였다. PEG base cream에 50% (w/v)이 되도록 glycolic acid를 넣어 용해시킨 후 pH 3.0이 되도록 조절하여 실험물질로 사용하였다.

UV irradiation을 위한 UV lighter는 F40T10 BLB 40 W UVA lamp와 F40 M UVB lamp가 부착된 RMX 3 W lighter (Dong Sung Lab. Tech., Seoul, Korea)를 사용하였다.

### 2.3. Immunohistochemistry

실험동물의 조직을 4% paraformaldehyde (PBS phosphate buffered saline, pH 7.4)로 24 h 동안 고정시킨 후, 20% sucrose 용액에 보관하였다. 조직을 10  $\mu$ m 두께로 cryostat section 하여 slide 상에서 4% paraformaldehyde로 고정시키고 PBS에 30 min 담가둔 다음 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가한 blocking serum solution (goat serum)으로 30 min간 반응시킨다. 또는 파라핀에 포맷된 슬라이드는 xylene 100%에 5 min씩 3회 세척한 후, 에탄올 100%, 95%, 80%에 5 min씩 담근 다음 증류수로 세척하여 파라핀 제거과정을 거친 후, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가한 blocking serum solution으로 30 min간 반응시켰다. 여기에 PBS로 적당히 희석된 1차 항체를 떨어뜨리고 파라핀으로 덮은 후 4°C에서 overnight 했다. 희석액으로 3회 정도 세척한 후, block serum solution으로 적당히 희석된 2차 항체를 떨어뜨리고 37°C moisture chamber에서 30 min간 반응시킨 다음 PBS로 3회 세척한다. ABC complex (VECTASTAIN ABC kit)를 사용 직전에 만들어 슬라이드 위에 충분히 떨어뜨리고 37°C incubator에서 30 min간 반응시켰다. 다음 PBS로 3회 세척한 후, 사용 직전에 만든 substrate solution (DAB; 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)을 가해 2 min간 실온에 반응시키고 즉시 증류수로 3회 세척하였다. Counter stain으로 Hematoxylin solution (Harry's solution)에 약 15 sec 정도 담가둔 후 증류수로 잘 세척하였다. 1% lithium carbonate solution에 약 15 sec 정도 담가둔 후 다시 증류수로 세척하였다. 에탄올 80%, 95%, 100%에 5 min씩 순서대로 담근 다음 xylene 100%에 5 min씩 3회 담근다. Mounting media (Fisher scientific)를 떨어뜨린 후 커버슬라이드로 덮고 현미경상에서 세포핵이 갈색으로 염색된 것을 확인하고 촬영하였다. caspase-3 reactive cell의 확인도 같은 방법으로 실시하였으며, active caspase-3 antibody (1:1000 희석) 사용하여 확인하였다.

### 2.4. 세포사(Apoptosis) 관찰

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-me-

diated dUTP nick-end labeling) assay는 apoptosis 초기 단계에 일어나는 DNA cleavage현상을 이용한 것으로 apoptosis에 의해 끊어진 3-OH 말단에 TdT를 이용하여 fluorescein-dUTP나 TMR-red-dUTP를 표지한다. TUNEL staining을 위한 슬라이드는 Poly-L-Lysine solution을 10배 희석하여 500  $\mu$ L씩 chamber slide에 넣고 2 h 뒤에 용액을 제거하고 멸균된 3차 증류수로 3회 세척한다.  $1 \times 10^5$  cell/mL로 파종하여 24 h 배양한 뒤 실험물질을 처리하고 24 h 배양한다. 배지 250  $\mu$ L를 빼내고 250  $\mu$ L의 paraformaldehyde를 넣어주고 4°C에서 2~3일간 고정한다. PBS로 세척 후 0.1% Triton X-100을 넣어준 뒤에 4°C 얼음에 2 min간 incubation시킨 후에 각각의 슬라이드에 TUNEL mixture 50  $\mu$ L를 넣어 37°C에서 2 h 정도 둔다. 2 h 후에 PBS로 세척을 하고 convert-POD를 50  $\mu$ L씩 넣고 37°C에서 1 h 정도 처리한 다음에 DAB solution으로 30 sec ~ 1 min간 발색시킨 뒤 cover glass를 덮고 광학현미경으로 관찰하였다.

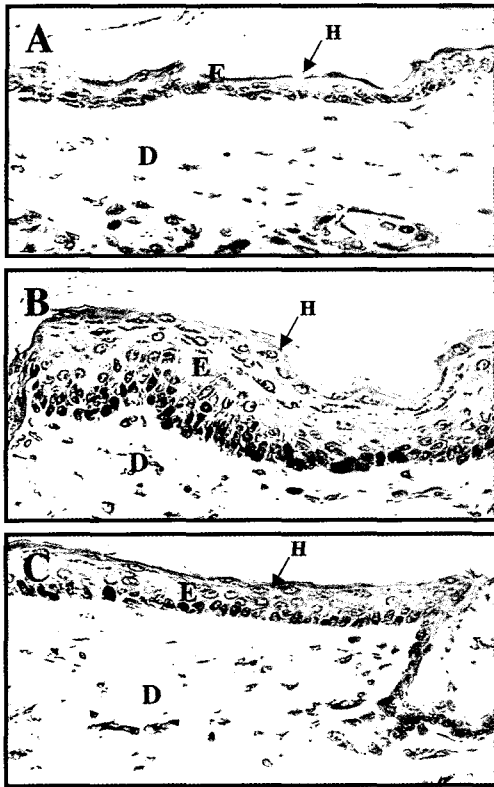
### 2.5. 세포배양

본 실험에 사용된 세포주는 독일의 krebsforschungszentrum 암연구소의 Norbert 박사로부터 분양 받은 사람피부세포주(HaCaT cell)를 사용하였다.

세포주의 특징은 immortalized human keratinocyte cell line이며, 160계대 이상 배양이 가능하며 mouse에 주입했을 경우 종양을 형성하지 않으므로 많은 실험에서 AP-1, reactive oxygen species, apoptosis, signaling 경로연구에 많이 이용된다. 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1%의 penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), F-12 Nutrient mixture, NaHCO<sub>3</sub>을 사용하였다. 약 85%의 습도 하에서 5% CO<sub>2</sub>를 공급하는 37°C incubator (Sanyo Co.)에서 배양하였다. 배양된 세포는 2~3일 마다 0.25% trypsin-EDTA 용액과 DMEM을 이용하여 세포를 계대 유지하였고 나머지는 LN<sub>2</sub> nitrogen tank에 보관하였다.

### 2.6. Methlthiazoltetrazilium (MTT) Assay

MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide]는 세포내로 흡수된 후, 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase에 의해 formazan을 형성하는데 이 물질이 세포내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하므로 세포의 생존율을 측정하는 방법으로 이용되고 있다. 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/mL의 세포를 100  $\mu$ L씩 파종하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 하루 정도 배양한 후 혈청이 없는 배지로 바꾸어 24 h 이상을 배양하였다. Serum starvation을 한 후, 실험물질이 함유된 혈청이 없는 배양액으로 교환하여 24 h 배



**Figure 1.** Effects of glycolic acid on the UV-induced expression of PCNA in mouse skin. Immunohistochemical staining of PCNA in SKH-1 hairless mouse skin section ( $\times 400$ ). A) Normal skin epithelium B) Skin epithelium treated with UV C) Skin epithelium treated with UV and glycolic acid. D: Dermis E: Epidermis H: Horny layer.

양 후 상층의 배지를 제거한 후 세척하였으며 배지를 제거하기 1 h 전에 UVB를 조사하였다.

세척된 각 well당 새로운 배지 200  $\mu\text{L}$ 씩 넣어주고 MTT (Sigma Co.)를 2 mg/mL의 농도로 준비하여 50  $\mu\text{L}$ 씩 첨가한 후 3 h에서 4 h 동안 반응을 시켰다. 각 well당 시험물질 220  $\mu\text{L}$ 를 제거하고 보라색물질 30  $\mu\text{L}$ 만 남긴 후 DMSO를 150  $\mu\text{L}$  첨가하여 microplate mixer상에서 10 min간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨 후, 96 well plate ELISA reader에서 540 nm 흡광도로 O.D. (optical density) 값을 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 대조 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정한 값을 산출하였다.

## 2.7. 통계 처리

Sigmastat 프로그램 (Version 2.03, J Scientific Co)을 이용하여 MTT assay, apoptosis 시험 결과치를 one-way ANOVA 검정을 실시한 후 multiple comparison

test (Dunnett's method)를 실시하여 p값이 0.05 이하인 것을 유의성 있는 것으로 "\*"로 표시하였다.

## 3. 실험결과

### 3.1. *In vivo* 동물실험에서의 Glycolic Acid의 UV에 의한 세포증식억제효과

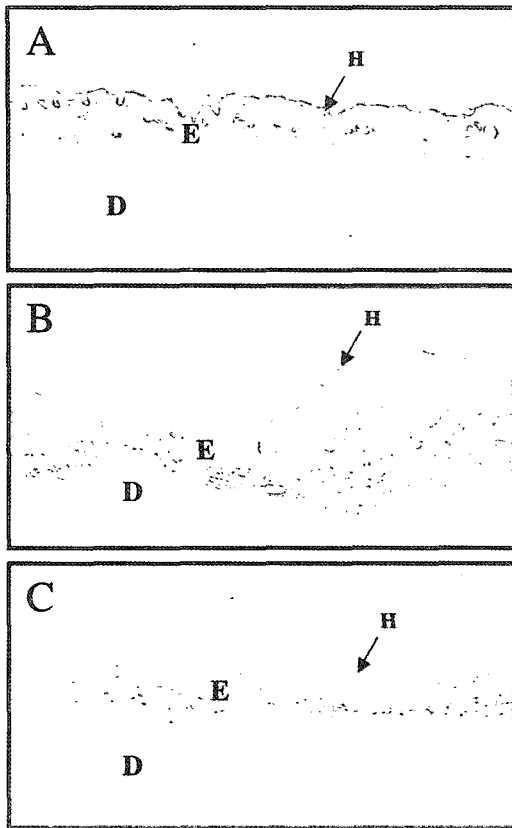
본 연구에서는 광노화 실험동물인 hairless mouse에 UV를 조사하여 일어나는 광손상을 살펴보고, 이러한 광손상 과정에서 자외선 조사 횟수의 차이가 어떠한 영향을 주는 지와 광손상이 일어난 hairless mouse의 피부에 glycolic acid가 미치는 영향에 대하여 알아보려고 하였다. UV 조사에 따른 hairless mouse에서 일어나는 지표들을 관찰하였는데, 대조군에 비하여 UV 단독처리 군에서는 표피 두께 및 진피층 두께가 현저한 증가를 보였다. 이와 같이 UV에 의해 유도된 변화는 다른 연구자들에서 보고된 관찰 조건과 유사하다. UV에 의한 피부세포손상은 표피와 진피층의 세포 증식의 과도한 증가가 원인이며 이를 glycolic acid가 억제하는지를 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 방법으로 확인하였다. 그 결과 UV에 의하여 과증식된 표피층이 glycolic acid 처리군에서는 현저히 감소함을 확인하였다.

#### 3.1.1. PCNA 항체를 이용한 세포증식 양상분석

실험동물의 피부조직을 잘라내어 슬라이드를 만든 후 PCNA 항체를 이용하여 효소반응을 시켰다. PCNA 항체를 이용한 세포증식의 양상은 immunohistochemical staining 방법으로 분한 결과 대조군에 비해 UV 단독 처리군에서 갈색으로 관찰되는 PCNA 항체가 결합된 세포수가 현저히 증가되었으며 UV와 glycolic acid를 병행처리한 군에서는 UV 단독처리 군보다 전체적으로 PCNA가 관찰되는 세포수가 감소되었다 (Figure 1).

#### 3.1.2. TUNEL Staining 방법에 의한 세포사멸 양상분석

PCNA 분석을 통하여 UV 단독처리 군에서 UV와 glycolic acid 병행처리군 보다 세포증식이 더 크게 일어난 상태로 유지되고 있음을 확인하여 glycolic acid가 세포증식을 억제함을 알 수 있었다. 따라서 다음 실험으로 TUNEL staining 방법으로 세포사멸에 대하여 분석하였다. 조직세포에 UV를 조사한 경우 세포증식과 더불어 세포사멸도 함께 증가하는 것을 확인하였고 UV에 glycolic acid를 병행처리 하면 TUNEL staining 방법에 의하여 염색되는 수 (세포사멸 수)가 급격히 줄어드는 것을 확인하였다. 이는 UV 단독 처리군에 의한 세포사멸을 glycolic acid 병행처리 시 억제한다는 것이 증명되었다 (Figure 2).



**Figure 2.** Effects of glycolic acid on the UV-induced expression of PCNA in mouse skin. Immunohistochemical staining of TUNEL in SKH-1 hairless mouse skin section ( $\times 400$ ). A) Normal skin epithelium B) Skin epithelium treated with UV C) Skin epithelium treated with UV and glycolic acid. D: Dermis E: Epidermis H: Horny layer.

3.2. *In vitro* Keratinocyte 배양세포에서의 UVB에 의한 세포증식과 세포사멸 억제 및 작용기전 연구

*In vitro* 배양시험은 immortalized human keratinocyte 인 HaCaT cell을 이용하여 세포증식에 glycolic acid가 어떠한 영향을 미치는 가를 세포수준에서 연구하였다.

3.2.1. Glycolic Acid의 세포증식억제 효과

*In vivo*에서 얻은 glycolic acid의 세포증식효과가 *in vitro* 결과에서도 일치하는 지와 더 구체적인 작용기전 연구를 위하여 인체 피부세포를 배양하였다. 피부세포가 UV에 의해 증식되는 것을 농도별 glycolic acid로 처리했을 때 따른 피부세포증식 억제 효과에 대한 실험을 하였다.

인체피부세포에서 배양된 glycolic acid를 0.1 ~ 100 mM로 처리하고 UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>)를 조사한 후 1 h, 4 h, 24 h까지 세포증식억제효과를 확인한 결과 용량 의존적으로 세포보호 효과가 나타났고 24 h대에는 고용량(10 ~ 100

**Table 1.** Dose Effects of Glycolic Acid on Cell Proliferation (% of control)

|     | 1 hr     | 4 hr     | 24 hr   |
|-----|----------|----------|---------|
| Con | 100 ± 14 |          |         |
| UV  | 74 ± 6   | 73 ± 12  | 61 ± 21 |
|     | 114 ± 15 | 94 ± 21  | 76 ± 13 |
|     | 121 ± 13 | 112 ± 13 | 81 ± 15 |
|     | 131 ± 9  | 114 ± 16 | 73 ± 7  |
|     | 127 ± 4  | 81 ± 14  | 53 ± 3  |

mM)에서 대조군과 같은 수준의 세포증식 양상을 나타내었다(Table 1).

3.2.2. TUNEL 방법에 의한 Apoptotic Cell 분석

자외선에 의한 피부세포의 독성유발기전은 apoptosis로 보고되어지고 있는데, 이는 DNA에 직접적인 손상을 주어 apoptosis에 관련된 유전자들을 발현시킴으로써 유발된다.

HaCaT cells에서 정상세포와 UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>)만 단독으로 처리한 세포, 그리고 glycolic acid를 농도별로 UVB와 병행처리 하여 apoptosis가 어떻게 변화하는지를 TUNEL 염색약으로 세포내 직접 염색하여 관찰하였다. 정상세포에 glycolic acid 농도를 0.1~1 mM로 처리한 후 24 h 동안 배양하여 세포를 회수하였으며 회수하기 1 h 전에 UVB (60 mJ/cm<sup>2</sup>)를 조사하였다. 현미경상에서 염색질(chromatin)의 응축을 관찰하여 apoptosis의 경향을 보았으며, apoptotic body의 결정은 TUNEL 방법에 의하여 염색질이 응축되어 진하게 염색된 곳(chromatin condensation)이 3~4개 발견되는 시점으로 결정하였다.

현미경상에서 각 실험 군마다 세포를 1,000개씩 세어 apoptosis 비율을 구한 결과, 대조군은 약 1.5%, UVB 단독으로 처리한 군에서는 약 5.5%, UVB와 glycolic acid 0.1 mM 병행 처리한 군에서는 약 4.5%, UVB와 glycolic acid 1 mM 병행 처리한 군에서는 약 2.8%, UVB와 glycolic acid 10 mM 병행 처리한 군에서는 2.4%의 apoptotic cell을 관찰할 수 있었다. 그 결과 정상세포에 비해 UVB 단독으로 처리한 군에서는 TUNEL 염색되는 세포사멸 수가 현저하게 증가하여 apoptosis가 유발됨을 확인하였고 이를 glycolic acid가 apoptosis를 억제시킴을 확인할 수 있었다(Table 2).

3.2.3. Caspase-3 반응세포의 변화

자외선에 의한 DNA손상으로 유발되는 apoptosis가 일어나는 과정 중에 caspase family들이 중요한 역할을 하는데, 이 중에서 initiator caspase중 하나인 caspase 9의 역할이 매우 중요하게 작용을 하는 것으로 알려져 있다

**Table 2.** Induction of Apoptosis and Effect of Glycolic Acid on Caspase-3 Reactive Cells

|             | Apoptotic cell (%) | Caspase-3 reactive cell (%) |
|-------------|--------------------|-----------------------------|
| Control     | 1.5 ± 0.2          | 2.8 ± 0.8                   |
| UV          | 5.5 ± 1.3          | 7.7 ± 1.2                   |
| UV + 0.1 mM | 4.5 ± 0.8          | 4.5 ± 2.3                   |
| UV + 1 mM   | 2.8 ± 3*           | 4.1 ± 1.7*                  |
| UV + 10 mM  | 2.4 ± 2*           | 2.9 ± 0.4*                  |

\* Significant difference from UV treated growth.

[9]. Apoptosis의 여러 단계 중 하나인 Bax의 발현과 caspase 9 그리고 apoptosis과정의 마지막 인자인 caspase 3의 활성화로 이어진다.

Caspase-3는 apoptosis의 말기 단계에 나타나는 factor로서 cleavel caspase-9에 의해서 active한 상태로 잘려진다. Apoptosis의 마지막 factor인 caspase-3의 발현에 의해 apoptosis의 과정을 겪게 된다. Caspase-3는 UVB에 의하여 DNA에 손상을 받은 세포에서 활성화되어 apoptosis를 유도하는 대표적인 단백질이기도 하다.

Caspase-3 면역염색 세포 수를 확인한 결과 UVB만 단독으로 조사한 경우에는 caspase-3의 발현이 현저히 (2~3배) 증가함을 확인하였고 UVB와 glycolic acid를 병행처리 한 경우에 caspase-3의 발현이 감소함을 확인할 수 있었다. 이는 glycolic acid가 농도 의존적으로 caspase-3를 감소시킴을 확인할 수 있었다(Table 2).

#### 4. 고 찰

Glycolic acid를 비롯한 AHAs 제제는 화장품이나 의약품에 포함되어 오랫동안 각질제거, 보습, 연화 등의 목적으로 사용되어 왔으며 거칠어진 피부, 여드름, 건조증, 버짐 등을 개선시키고 광노화 피부, 미세주름, 과색소침착에 매우 효과가 있는 것으로 알려졌다[11-13]. AHAs가 피부에 미치는 영향의 정확한 작용기전은 아직 알려져 있지 않으나, 표피와 진피에 각각 서로 다른 영향을 미치는 것으로서 표피의 경우, AHAs는 과립층에서 각질형성세포들간의 연결을 약화시키고 새로운 표피의 재생을 촉진시키는 각질용해작용이 있으며, 이러한 과정을 통하여 비정상적으로 두꺼워진 각질층을 정상화하는 것으로 알려져 있다[13,14]. 또한 진피에 대한 효과로는 교원질의 증가와 점다당질(glycosaminoglycan)의 증가 등이 보고된바 있다[15,16].

최근 UV에 의한 광노화(photo-aging)를 개선시키는 물질로 glycolic acid에 관한 보고에 의하면 glycolic acid의 국소 도포시 각질층의 용해작용은 있으나 피부장벽 기능

을 나타내는 경피수분손실(TEWL)은 증가시키지 않으며, 미세구조상의 조직의 피사나 변성은 초래하지 않으면서 피부장벽 회복의 징후인 표피내 층판소체의 분비는 증가시킨다고 발표하였다[17,18]. 이는 glycolic acid가 피부에 미치는 영향이 단순한부식성 물질로서의 각질층의 제거가 아닌 다른 기전을 통해 이루어질 수도 있을 것이라는 의구심을 가지게 한다. 본 연구결과는 자외선에 의한 과도한 피부세포증식과 세포사멸에 glycolic acid가 적절하게 방어 역할을 하는 것으로 판단된다. 아직 세포증식 및 세포사에 미치는 정확한 기전은 밝혀지지 않았으나 최소한 UV의 흡수저해에 의한 것은 아닌 것 같으며 UV에 의한 tpvhwdttr (세포사) 조절 신호들에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 최근 연구에 의하면 glycolic acid가 각질층의 Cathepsin D-like proteinase의 작용을 활성화시켜서 각질박리에 효과가 있다고 보고되고 있다[19]. 한편 IL-1 $\alpha$ 나 TNF- $\alpha$ 와 같은 사이토카인의 증가가 표피증식을 유발하는 직접적인 신호로 작용한다고 보고되고 있다[20].

본 실험에서 UV 누적광량에 의해 표피는 과증식되었고 각질형성세포(keratinocyt)의 크기와 배열이 불규칙해지며 멜라닌 색소가 표피 상층부로 확산되고 광선각화증 현상을 보였다. 진피에서는 콜라겐 섬유가 가늘어지고 불규칙해지며 점차 소실되고 탄력섬유는 증식하고 두꺼워지고 서로 뭉쳐진 덩어리로 관찰되었다. 이와같은 현상은 진피의 기질인 hyaluronic acid와 sulfated glycosaminoglycan도 증가하는 경향을 보인 결과와 일치된 현상이다. 그 결과 UV조사는 표피의 두께를 증가시키는데 인체에서 UVB 조사 후 1주~3주 내에 유극층은 2배, 각질층은 1.5 ~ 3배 정도 증가하였다.

표피층의 과증식을 유도하는 각질형성세포(keratinocyte)를 glycolic acid가 영향을 주는지를 *in vitro*에서 실험하였다. Immortalized keratinocyte 배양세포에 UVB를 조사하여 UV에 대한 세포증식에 glycolic acid가 어떠한 영향을 미치는 가를 세포수준에서 연구하였다. 세포증식은 UV에 의하여 억제되었으며 glycolic acid가 UVB의 세포증식 억제를 방어함을 확인하였다. 또한 apoptosis의 양을 측정할 결과 UVB 단독처리한 세포에서는 정상세포에 비하여 염색성이 현저하게 증가하여 apoptosis가 유발됨을 확인하였고, glycolic acid를 농도별로 UVB와 병행처리했을 때 glycolic acid의 농도에 따라 염색성이 감소하여 apoptosis를 억제함을 확인할 수 있었다. 이 결과는 *in vivo*에서 나타난 현상과 유사한 것으로써 결국 과도한 세포사 및 증식을 glycolic acid가 억제함으로써 정상적인 세포의 균형을 유지할수 있는 glycolic acid의 효과가 피부각질층의 변화를 막아주는 것으로 판단된다. Apoptosis를 정량적으로 확인하기 위하여 자외선에 의한 DNA 손

상에 따라 발현되는 caspase-3의 반응성 세포수를 측정 한 결과, glycolic acid와 병행처리 했을 때에 caspase-3의 반응성 세포수가 유의적으로 감소하여 glycolic acid가 apoptosis과정의 마지막 인자인 caspase-3의 활성화로 이어지는 경로를 차단함으로써 apoptosis 억제효과를 확인할 수 있었다. Caspase-3가 UVB 단독으로 처리한 군에서는 증가되었다가 병행처리 시 약하게 증가된 결과는 단백질 수준에서의 발현 차이에서 기인된다고 해석된다. 이와같은 현상은 glycolic acid는 표층박피제로 활발히 이용되면서 표피에서는 각질세포(keratinocyte)의 응집력을 감소시켜 각질탈락을 유도하여 정상적인 각질층의 두께를 유지할 수 있도록 새로운 각질층의 형성과 각질층의 턴오버(turn-over)를 촉진시키는 자기상승(long-term)활성으로 외견상 젊어 보이는 효과와 광노화(photo-aging) 치료 및 방지에 도움이 된다는 기존의 인식을 뒷받침할 수 있을 것이다. 이를 근거로 향후 UV에 의한 피부손상으로부터 피부를 정상화시킬 수 있는 제제로서의 glycolic acid의 사용 가능성을 확인할 수 있었다. 다만 그 실제 사용 양에 있어서는 개인적 편차가 있고 광에 대한 피부손상을 더 증가시킨다는 보고 등이 있는바 적절한 양의 선택이 중요하다고 판단된다.

### 참 고 문 헌

- H. I. Mahler, J. A. Kulik, J. Harrell, A. Correa, F. X. Gibbons, and M. Gerrard, Effects of UV photographs, photoaging information, and use of sunless tanning lotion on sun protection behaviors, *Arch Dermatol.*, **141**(3), 373 (2005).
- I. Kimber, M. Cumberbatch, R. J. Dearman, M. Bhushan, and C. E. Griffiths, Cytokines and chemokines in the initiation and regulation of epidermal langerhans cell mobilization, *Br. J. Dermatol.*, **142**, 401 (2000).
- 지두현, 임연순, 장경애, 성환태, 여운철, 성경제, 최지호, 자외선 B 조사에 의한 사람 각질형성세포주 HaCaT 세포의 Interleukin-1 $\alpha$  생산에 미치는 1,25-Dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>의 영향, *대한피부과학회지* **39**(2), 127 (2001).
- L. Zhuang, Molecular mechanism of ultraviolet-induced keratinocyte apoptosis, *J. Interferon. Cytokine*, **20**(5), 445 (2000).
- B. A. Gilchrest, A review of skin aging and its medical therapy, *Br. J. Dermatol.*, **135**, 867 (1996).
- V. N. Sehgal, A. Luthra, and A. K. Aggarwal, Evaluation of graded strength glycolic acid (GA) facial peel: an Indian experience, *J. Dermatol.*, **30** (10), 758 (2003).
- W. P. Coleman and H. J. Brody, Efficacy of low-strength glycolic acid application in the treatment of melasma, *Arch Dermatol.*, **139**(6), 811 (2003).
- R. Sarkar, C. Kaur, M. Bhalla, and A. J. Kanwar, The combination of glycolic acid peels with a topical reginen in the treatment of melasma in dark-skinned patients: comparative study, *Dermatol. Surg.*, **28**(9), 828 (2002).
- M. Kharfi, N. Tekaya, F. Zeglaoui, N. Ezzine, I. Mokhtar, F. Kamoun, and M. R. Kamoun, Comparative study of the efficacy and tolerance of 12% glycolic acid cream and 0.05% retinoic acid cream for polymorphic acne, *Tunis Med.*, **79**(6), 347 (2001).
- A. Leonid, Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes, *J. Biol. Chem.*, **277**, 19346 (2002).
- T. Horikoshi, M. Matsumoto, A. Usuki, S. Igarashi, R. Hikima, H. Uchiwa, S. Hayashi, M. M. Brysk, M. Ichihashi, and Y. Funasaka, Effects of glycolic acid on desquamation-regulating proteinases in human in human stratum corneum, *Exp. Dermatol.*, **14**, 34 (2005).
- Y. Funasaka, H. Sato, and A. Usuki, The efficacy of glycolic acid for treating wrinkles: analysis using newly developed facial imaging systems equipped with fluorescent illumination, *J. Dermatol. Sci.*, (Suppl. 1), S53 (2001).
- S. K. Jeong, J. Y. Ko, T. J. Seo, K. S. Ahn, C. W. Lee, and S. H. Lee, Stimulation of epidermal calcium gradient loss and increase in TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  expressions by glycolic acid in murine epidermis, *Exp. Dermatol.*, **14**, 571 (2005).
- 고주연, 정세규, 이승헌, 이창우, Glycolic acid 국소도포가 무모생쥐의 표피내 사이토 카인 및 칼슘이온 기울기에 미치는 영향에 관한 연구, *대한피부과학회지*, **42**(3), 290 (2004).
- S. E. Moon, J. A. Kim, and J. K. Lee, Effect of glycolic acid on collagen gene expression in cultured human skin fibroblasts, *Ann. Dermatol.*, **13**, 92 (2001).
- E. F. Bernstein, J. Lee, D. B. Brown, R. Yu, and E. Scott, Glycolic acid treatment increases type I collagen mRNA and hyaiuronic acid content of human skin, *Dermatol. Surg.*, **27**, 429 (2001).
- 정세규, 김산, 이은희, 최용호, 안성구, 이승헌, 화학적

- 박피가 피부장벽에 미치는 영향에 대한 비교연구, *대한피부과학회지*, **40**, 1181 (2002).
18. T. H. Kim, E. H. Choi, Y. C. Kang, S. H. Lee, and S. K. Ahn, The effects of topical  $\alpha$ -hydroxyacids on the normal skin barrier of hairless mice, *Br J. Dermatol.*, **144**, 267 (2001).
19. T. Horikoshi, M. Matsumoto, A. Usuki, S. Igarashi, R. Hikima, H. Uchiwa, S. Hayashi, M. M. Brysk, M. Ichihashi, and Y. Funasaka, Effects of glycolic acid on desquamation-regulating proteinases in human in human stratum corneum, *Exp. Dermatol.*, **14**, 34 (2005).
20. 최응호, 김민정, 이세원, 박원석, 피부장벽에 사이토카인이 미치는 영향, *한국피부장벽학회*, **4**, 95 (2002).