pISSN 1226-2587
J. Soc. Cosmet. Sci. Korea eISSN 2288-9507
Vol. 44, No. 1, March 2018, 81-87 http://dx.doi.org/10.15230/SCSK.2018.44.1.81

광산란 감소 물질에 의한 피부 각질층의 산란 감소 및 수화에 의한 각질세포의 물리적 특성에 대한 연구

전 승 현 · 염 준 석 · 안 병 준 · 박 선 규 · 이 천 구 · 이 설 훈* · 강 내 규†

(주)LG생활건강 기술연구원
*동덕여자대학교 응용화학과 화장품과학 전공
(2018년 3월 11일 접수, 2018년 3월 27일 수정, 2018년 3월 27일 채택)

Optical Clearing Agent Decreases Scattering of Stratum Corneum and Modulates Physical Properties of Corneocytes by Hydration

Seung-Hyun Jun, Jun-Seok Yeom, Byung Jun Ahn, Sun Gyoo Park, Cheon Koo Lee, Seol-Hoon Lee*, and Nae-Gyu Kang†

R&D Center, LG Household & Health Care Ltd., 175 Gajeong-ro, Youseong-gu, Daejeon 34114, Korea
*Department of Applied Chemistry (Cosmetic Science Major), Dongduk Women's University, Korea
(Received March 11, 2018; Revised March 27, 2018; Accepted March 27, 2018)

요 약: 본 연구에서는 각질층의 산란에 대한 새로운 분석 방법을 제공하고 광학에 사용되는 광산란 감소 물질들의 피부 각질층에서의 영향을 확인하였다. 각질층과 피부 구성 성분에 의해 산란되어지는 빛의 변화를 측정하기 위해 각질 테이프로 분리한 각질세포의 다크 필드 이미지 분석을 통해 다양한 광산란 감소 물질들의 각질층에서의 광산란 효과를 측정하고 분석하였다. 광산란 감소 물질의 처리 후 각질층의 물리적 특성(수분 함량, 케라틴 구조 및 두께) 변화는 FT-IR, 3D 레이저 현미경으로 관찰하였는데 화장품에서 보습제로 사용되는 단당류, 당알코올, 환원당, 히알루론산 등은 광산란을 감소시킬 수 있었다. 그러나 광학에서의 탈수 현상과 달리 낮은 농도 조건의 광산란 감소 물질은 각질층 케라틴 구조의 내부로 물의 침투를 향상시켜 각질층의 부피를 증가시키고 강성을 감소시키는 효과를 나타내었다. 이러한 광산란 감소 물질에 의한 각질층 각질세포의 수화 현상은 각질층의 광산란을 감소시켜 피부를 보다 투명하게 보이게 해 줄뿐만 아니라 지속적인 보습효과를 제공할 수 있는 각질층 타겟의 새로운 피부 개선 연구의 가능성을 확인할 수 있었다.

Abstract: The objective of this article is to provide analytical tools for the scattering of stratum corneum (SC) and to check whether the optical clearing agents (OCAs) could be applied in optics affecting the scattering reduction. Dark field images of tape striped corneocyte separates scattered light of the SC from others *in vitro*. Several optical clearing agents were tested to reduce the scattering. Physical properties of SC such as water contents, keratin configuration and volume after OCAs treatment were investigated by FT-IR and 3D laser microscope. Several reducing sugars, monomeric sugars, sugar alcohol, and hyaluronic acid, which were used as humectants in cosmetic field, also reduced scattering. However, unlike dehydration in optics, water penetrated into the keratin in SC and scattering was decreased at low concentration of OCAs. In that condition, the volume of corneocyte was increased and stiffness seemed to decrease. The analyzing of tape-stripped SC, showed the change of optical and physical properties of corneocyte by optical clearing agents. The hydration of SC layer by optical clearing agents decreased the scattering of corneocyte and thus improved the skin appearance and moisturizing effect, which are important benefits in the cosmetic field and could provide new possibility to develop skin care study targeting at SC.

† 주 저자 (e-mail: ngkang@lgcare.com)
call: 042)860-8890

Keywords: *skin scattering, optical clearing, skin hydration, keratin, stratum corneum*

1. 서 론

빛은 피부의 구성성분에 의해 다양한 방법으로 흡수, 산란, 반사되는데 이러한 빛과 피부의 상관관계가 사람의 눈에 피부가 어떻게 보이는지를 결정한다[1]. 피부의 최외각에 위치한 각질층은 실질적인 외부로부터의 방어막 및 내부로부터의 수분 방어막으로서의 기능을 제공하며, 표면적으로 판단할 수 있는 피부 상태에 대한 1차적인 외관을 제공한다[2-4]. 따라서 노화나 외부 환경으로 인한 각질층의 문제 개선은 화장품 분야의 주요 목적 중 하나이다.

인간의 피부는 본래 불투명한 미디어이나, 각질층은 일반적으로 투명하고 색이 없다[5]. 각질층의 표면 거칠기와 미세 구조는 빛의 산란을 일으키며, 피부 표면 아래에 존재하는 각 피부 구성 요소의 다른 반사 지수는 투과된 빛을 산란시킨다. 또한, 투과된 빛의 흡수는 기존의 미백제의 표적이었던 멜라닌과 헤모글로빈과 같은 발색단에 의해 발생된다[6]. 따라서 피부색 개선은 피부의 각 표적별로 효능 소재와 적절한 치료를 위해 단계별로 분리해야 하는데 이번 연구는 각질층, 특히 산란의 광학적 특성에 초점을 맞추었다.

각질층의 두께는 약 10-30 μm로 표피와 진피층에 비해 피부에서 가장 얇은 층이지만 일반적으로 피부 측정을 위해 사용되는 투명도 측정기(translucency meter)에서 발생되는 빛은 진피층까지 침투하기 때문에 각질층의 성질을 구분하기 어려운 측면이 있다[7]. 따라서 이번 연구는 각질층의 산란에 대한 분석 방법과 이의 조절 방법에 대한 연구를 수행하였다. 각질 테이프를 사용하여 피부로부터 각질층을 분리하고 분리된 각질세포의 산란광을 다크 필드 영상 분석 시스템에서 직접 투과 된 빛과 분리시켜 각질층의 산란광 강도를 측정하여 산란에 대한 다양한 물질의 효과를 비교할 수 있었다.

광학 분야에서의 사용되는 광산란 감소 물질들(optical clearing agents, OCAs)은 조직의 산란을 줄이고 조직을 더 투명하게 만들어주는 효과를 가진다[8]. 즉 광산란 감소 물질은 산란되는 물질과 주변 미디어의 굴절률을 일치시켜 광산란을 감소시켜 빛의 침투력을 향상시킨다[9]. 그러나 광학적으로 사용되는 광산란 감소 물질은 약 70-100%의 높은 농도로 사용되어 단백질 분해 및 탈수 현상을 일으키는 광학적 제거 메커니즘을 가지기 때문에 실제 화장품에서의 이들을 사용하기 위해서는 새로운 다른 접근방식이 필요하다[10].

본 연구에서는 다양한 광산란 감소 물질에 의한 각질층의 산란광 감소 효과를 확인하고, 수분 함량 및 케라틴 구조 변화 측면에서 메커니즘을 규명하는 연구를 수행하고자 하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

각질 테이프는 CuDerm Corporation, Dallas, TX, USA의 D-Squame sampling disk (지름 22 mm)를 사용하였다. 레시틴(lecithin), 염화 나트륨(sodium chloride), 우레아(urea), 글리세린(glycerin), 솔비톨(sorbitol), 트레할로스(trehalose), 에리스리톨(erythritol), 자일리톨(xylitol), 과당(fructose), 설탕(sucrose), 히알루론산(MW > 2000 kDa) 가수분해된 히알루론산(hydrolyzed hyaluronic acid, MW ~4,000 Da)은 Sigma (St Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다.

2.2. 각질세포의 산란 평가

건강한 사람의 팔에 테이프 스트리핑(D-Squame sampling disk, 지름 22 mm, CuDerm Corporation, Dallas, TX, USA)을 이용하여 각질층 각질세포의 샘플을 채취한 후 각질세포가 부착된 중앙 부위에 200 μL의 시료를 떨어뜨려 4 h 동안 보관하였다. 일정 시간 후 시료를 증류수로 씻고 건조한 후 32 ℃, 습도 50% 조건의 항온 항습기에서 1 h 더 보관하였다. 이후 샘플을 위상차 현미경(Leica DM 1000, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 이용하여 다크 필드 이미지 분석을 하였다. 백색으로 나타나는 각질층 각질세포의 산란광은 이미지 분석을 통해 정량화 하였다.

2.3. 각질세포의 수분 함량 분석

다양한 광산란 감소 물질들을 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군의 각질세포 테이프를 FT-IR (AVATAR 320, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham,

MA, USA)로 분석하였다. 상대 수분 함량은 3000-3650 cm^{-1} 범위의 수분 밴드(OH stretch)와 2995-2830 cm^{-1} 영역의 단백질 밴드(CH stretch)의 비율로 계산하였다.

2.4. 각질 구성 분석을 이용한 케라틴 물성 측정

FT-IR (AVATAR 320, THERMO)을 이용하여 각질 테이프의 적외선 아마이드(amide) I 밴드를 측정하여 대조군으로 사용하였고, 이와 비교하여 실험군인 각질층의 FT-IR 스펙트럼의 아마이드 I 밴드(1600-1720 cm^{-1})을 측정하였다. 이 범위의 스펙트럼에서 α-나선 구조의 폴리 펩타이드의 진동 스펙트럼인 1657 cm^{-1}과 β-시트 구조의 폴리 펩타이드 사슬의 진동 스펙트럼인 1631 cm^{-1}를 측정하면 α-나선 구조와 β-시트 구조의 비율을 산정할 수 있다[11]. β-시트 구조의 케라틴의 비율 증가를 통해 상대적으로 강성 즉 단단함이 감소됨을 예측할 수 있다.

2.5. 각질층의 두께 분석

3D 레이저 현미경(Keyence VK-X200, Keyence Corp., Osaka, Japan)을 이용하여 각질세포 테이프 표면의 상태와 두께를 나노미터 수준으로 관찰하였다. 10% 광산란 감소 물질의 다양한 조합 성분을 함유한 O/W 제형(Complex)을 제조하고 처리 전후의 각질층에서의 두께 변화를 측정하였다.

2.6. 통계 처리

모든 data는 3번 반복 실험을 수행하였으며, 결과는 평균 ± 표준오차(mean ± S.E.)로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 광산란 감소 물질에 의한 각질층 산란의 감소

각질층의 산란 특성을 분석하기 위해 인체 피부에서 각질 테이프를 이용해 채취하고 각질 테이프의 각질세포를 광학 현미경으로 시각화하였다. 명시야(bright field) 이미지는 특수한 광학유닛을 필요로 하지 않으면서 시료를 단순 확대하는 기본 관찰 방법으로 시료의 구조를 확인하는 데는 적합하나, 산란광을 확인하기에는 적합하지 않다. 다크 필드(dark field) 이미지는 시료에 닿는 직접 조명광은 밖으로 유도하고, 오로지 샘플에서 나오는 산란광만을 대물렌즈로 취하는 관찰

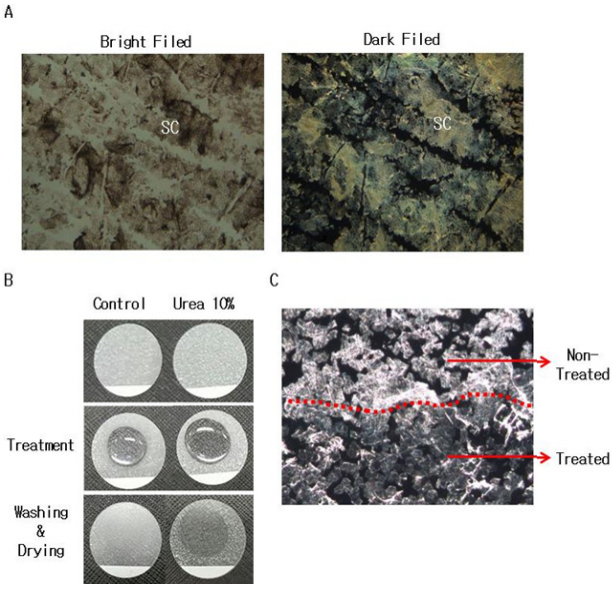


Figure 1. Evaluation of scattering by corneocytes attached to a tape. A) Optical microscope image of SC via bright field and dark field mode. B) Picture of SC on the SC tape treated with 10% urea. C) Reduction of light scattering in a region of stratum corneum treated with OCA.

법으로 현미경의 상부 광원으로부터의 빛은 각질세포에서 산란되어 흰색으로 보임을 확인하였다(Figure 1A).

각질층의 산란 감소 실험을 위해 광학분야에서 일반적으로 사용되는 10% 우레아를 각질세포 테이프의 표면에 떨어뜨려 4 h 동안 방치한 후 각질 세포 테이프를 씻어서 건조시켰다. 그 결과, 물을 처리했을 경우 세척 및 건조 후에는 다시 각질부위가 불투명한 상태로 복원되나, 광산란 감소 물질인 우레아의 처리 부위에는 세척 및 건조 후에도 투명한 상태로 유지되는 것을 확인하였다(Figure 1B). 다크 필드 이미지 분석 결과에서도, 경계면을 기준으로 우레아 처리 부위와 무처리 부위의 산란 정도에서 차이가 명확히 드러남을 확인하였다. (Figure 1C).

우레아 외에도 다양한 물질들이 광산란 감소 물질로 사용되는데 본 연구에서는 화장품 분야에서 널리 사용되는 다양한 후보 성분을 대상으로 평가하였다. 생체 보습인자들(natural moisturizing factors, NMFs)은 적절한 피부 보습을 유지하는 효과를 가지는데 대표적으로 우레아, 무기 염, 당 및 아미노산으로 구성되어 있다[12]. 이러한 성분들의 효과를 확인하기 위해, 10% 우레아 용액의 산란 감소 효율을 100%로 놓고 동일 농도

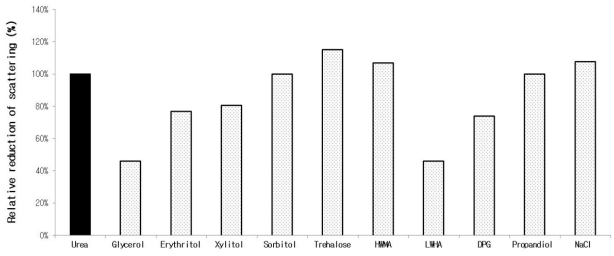


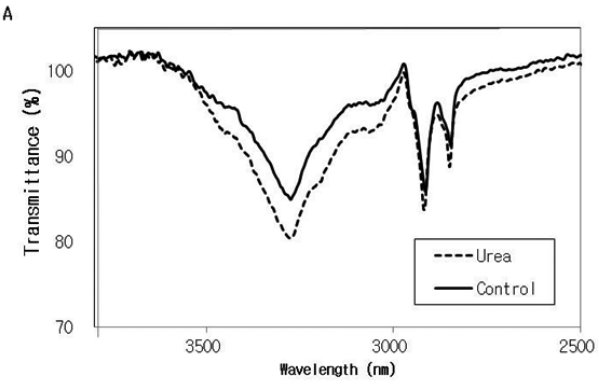
Figure 2. Relative reduction of scattering of OCAs on SC attached to a tape (n = 6). The relative reduction of scattering, which is defined as the ratio of reduction of scattering of SC treated with 10% urea to that of SC treated with same concentration of various OCAs.

의 각 물질의 산란 감소 효율을 상대값으로 비교하여 상대 산란 감소 효율로 비교하였다(Figure 2). 높은 수분 보유 능력을 가지고 있어 화장품에서 보습제로 사용하고 있는 단당류, 당알코올, 환원당, 히알루론산 등을 평가한 결과, 당알코올의 경우, 글리세린(C3), 에리스리톨(C4), 자일리톨(C5), 소르비톨(C6) 순으로 즉 탄소수가 증가할수록 더 효과적으로 광산란을 감소시켰다. 환원당의 경우, 프럭토스보다 높은 분자량을 갖는 트레할로오스에 의해 산란감소 효율이 증가하였다. 반면, 히알루론산의 경우, 분자량이 높은 폴리머 형태의 히알루론산(> 300 kDa)은 산란 감소 효율이 거의 나타나지 않았으나, 올리고머 형태의 히알루론산(~10 kDa)은 산란 감소 효과가 나타났다. 또한, 프로판디올, 디프로필렌글라이콜, 염(NaCl) 등도 본 실험에서 광산란 감소에 효과적임을 확인하였다.

일반적으로 OCAs와 NMFs는 흡습성 수용성 물질로서 OCAs와 단백질 사이의 수소 결합에 의한 상호 작용은 광산란 감소를 위한 핵심 요소이다[9,13]. 따라서 NMF 성분 중 탄소가 증가로 인해 많은 하드록시기를 갖는 분자는 각질 내 침투하여 단백질과 수소결합을 함으로써 산란을 효율적으로 제거하는 것으로 보인다.

3.2. 광산란 감소 물질에 의한 각질층 내로의 수분 침투

바이오 의학 분야에서 사용되는 OCAs는 70-100%의 고농도로 사용하기 때문에 단백질 변성과 탈수 현상이 발생한다[10,14]. 이와 달리 화장품 영역에서는 피부의 수분 공급이 건강한 피부를 만드는 가장 핵심적인 요소이다. 따라서 OCAs를 저농도(약 10% 내외)로 사용했을 때, OCAs가 각질의 수분 함량에 미치는 영향을



B

	⊿ Water/protein ratio
Glycerine	0 ± 3
Sorbitol	23 ± 9
Trehalose	36 ± 7
Hydrolyzed HA	25 ± 5

Figure 3. (A) FT-IR peak of control and urea treated SC. (B) Water/protein ratio of SC treated with various OCAs.

확인하였다. 피부 각질층 각질세포를 채취한 각질 테이프의 가운데 영역을 각 물질로 도포 후 세척과 건조를 시킨 후 FT-IR을 이용해 물과 단백질 피크의 비율을 무처리 대조군 영역에서의 비율과 비교하였다(Figure 3). 그 결과, 화장품에서 가장 대표적인 보습제인 글리세린은 실제 각질 내의 수분 함유 증가에 큰 영향을 끼치지 않았다. 반면, 소르비톨, 트레할로스 및 저분자 히알루론산의 경우, 각질 내의 수분 함량비를 증가시킴을 확인할 수 있었다. 이는 광산란 감소 물질 분자가 각질 세포로 침투하여 각질 내 케라틴 섬유 사이에서 물을 잡고(water holding) 있으며, 이렇게 투과된 물이 굴절률의 불균일성을 제거하는 역할을 하는 것으로 예측된다[9].

3.3. 광산란 감소 물질 처리에 의한 각질층의 물성 변화

각질세포의 수분 흡수 효과를 확인하기 위해 각질 테이프 위의 각질세포의 두께 변화를 측정하였다. 이를 위해 10% 우레아가 처리된 영역과 처리되지 않은 영역 사이의 경계 라인을 포함하는 영역을 3D 레이저 현미경으로 시각화하였다(Figure 4). 그 결과, 우레아가 미처리된 대조군 각질층의 두께는 13.7 μm, 우레아가 처리 된 실험군의 두께는 17.7 μm로 약 29% 증가하는

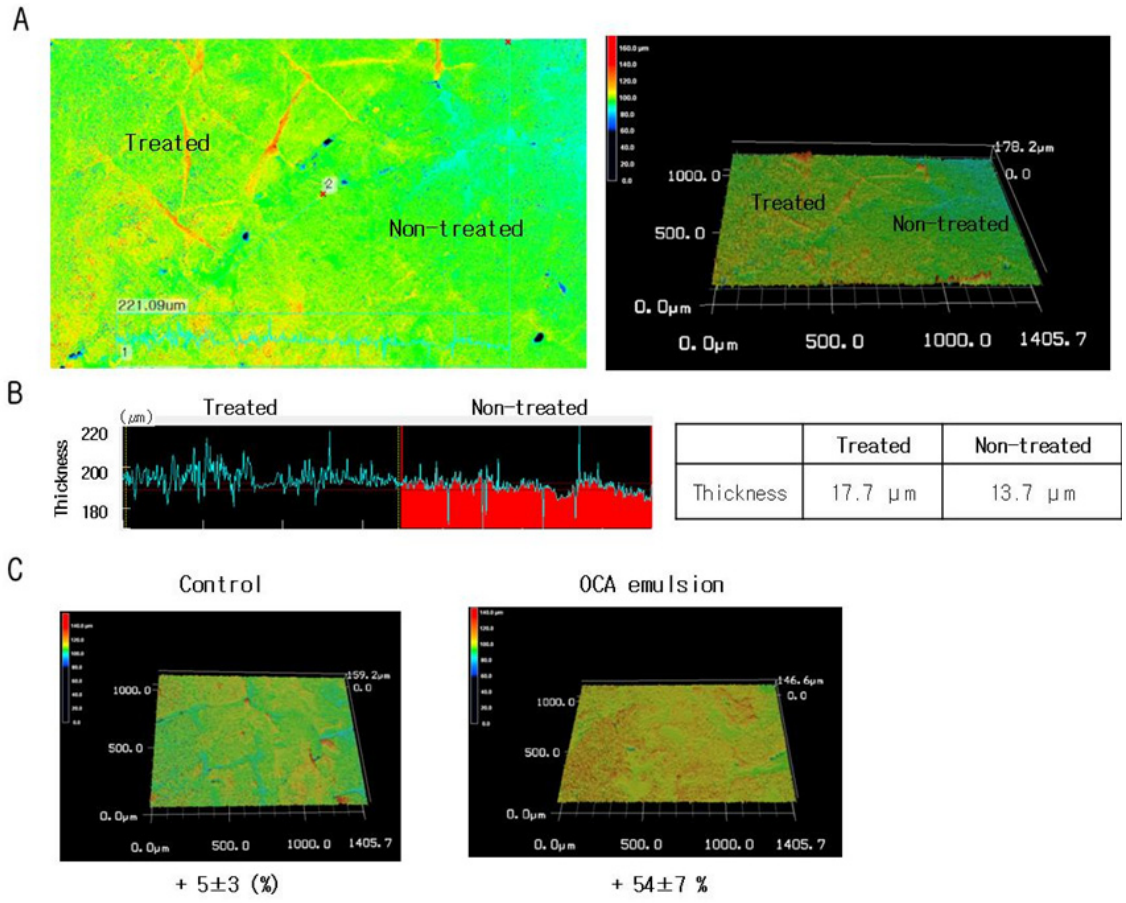


Figure 4. Analysis of SC thickness using 3D laser microscopy showing a region treated with 10% urea compared with a control region (A, B). (C) The thickness of the SC attached to a tape increased following OCA treatment (n=3).

것을 확인하였다. 다음으로 본 연구에서 사용된 10% 광산란 감소 물질이 함유된 O/W 제형을 이용해 같은 방법으로 각질 두께를 측정하였을 때, 각질층 두께는 O/W 제형이 처리된 실험군에서 약 54% 증가하였으나 물 처리한 각질에서는 두께의 큰 변화가 나타나지 않았다.

각질세포의 강성 즉 단단함(stiffness)은 케라틴이 각질층의 최대 부피 분율을 구성하기 때문에 케라틴 필라멘트 사이의 수분 함량에 좌우되며 α-나선 구조 대비 β-시트 구조가 증가하면 단단함이 감소한다[11,15]. 또한, 각질세포 내의 케라틴 구조는 수분 함량 유무에 따라서 그 구조가 바뀔 수 있다는 연구들이 보고되었다[16]. 본 연구에서는 광산란 감소 물질인 OCA에 의해 케라틴의 구조 변화를 확인하기 위해 각질세포가 고정된 각질 테이프 위에 각 OCA 시료를 4 h 동안 도포하고, 세척 및 건조시킨 후, FT-IR의 아마이드 밴드 분석을 통해 α-나선 및 β-시트를 분석하였다(Figure 5). β-시트의 피크는 광산란 감소 물질함유 제형에서 36%로 증가된 반면, 정제수와 대조군이 처리된 각질세포에서는 β-시트 피크의 변화가 일어나지 않았다. 이를 통해 각질층의 케라틴 내로 광산란 감소 물질들이 침투하여 물 분자를 잡고 있게 되면 케라틴의 결합력 변화에 의해 구조에 영향을 준다고 볼 수 있다. 또한, 증가된 물 부분은 단백질의 2차 구조와 관련된 아마이드 I 밴드 사이의 수소 결합을 약화시킨다. 따라서 광산란 감소 물질에 의한 각질세포의 수화는 각질층의 부피를 증가시키고 강성을 감소시키는 것으로 생각된다. 또한 이러한 광산란 감소 물질들은 각질세포를 투명하게 만들기 위해 굴절률을 조절하는데 도움이 될 수 있다. 향후에는 본 연구에서 측정한 FT-IR 결과가

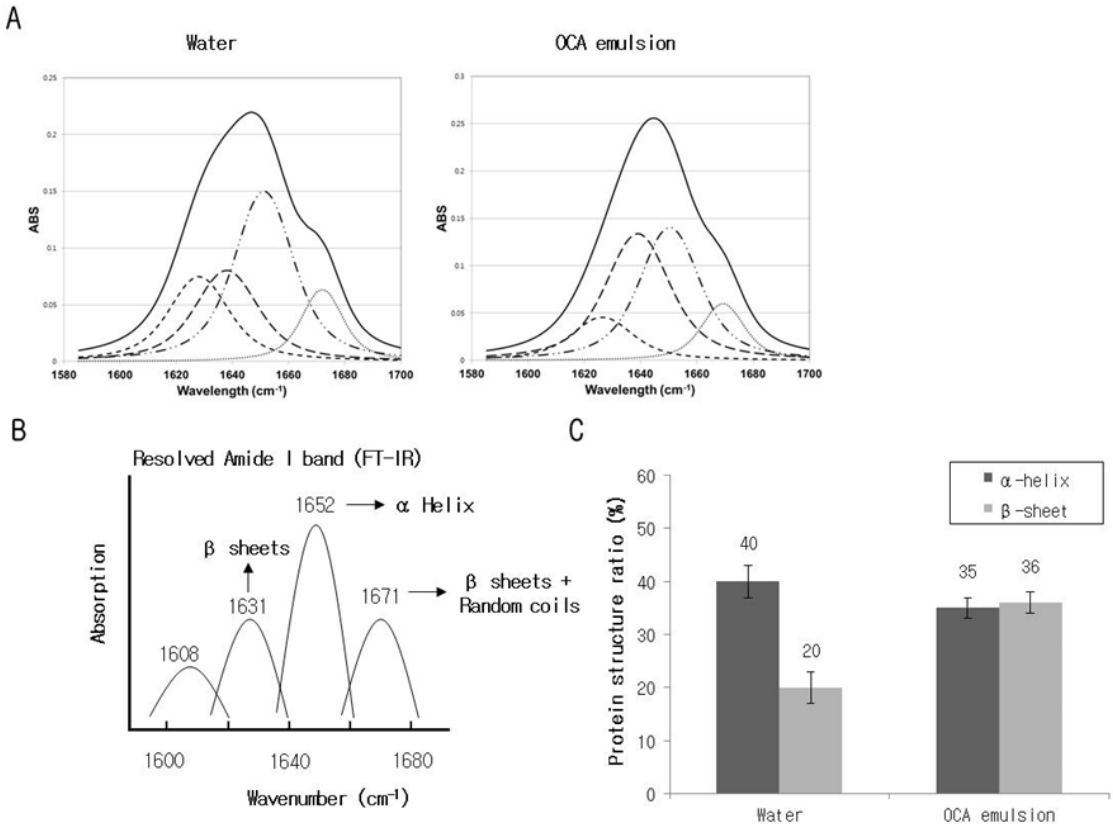


Figure 5. Analysis of stiffness, as determined by the resolution of Amide I in FT-IR. (A, B). (C) The proportion of β-sheets in the SC attached to tape was increased after OCA treatment (n=3).

측정조건에 따른 수분함량이나 도포된 광산란 물질 자체에 의한 영향인지를 확인하기 위해 wide-angle x-ray diffraction (WAXD) 분석 등을 진행할 예정이다.

4. 결 론

본 연구에서는 각질층 각질세포 테이프의 *in vitro*이미지 분석을 통해 각질층의 광산란 정도를 수치적으로 측정하였고 이를 통해 이미 광학 분야에서의 광산란 감소 물질(OCA)로 이용되거나 화장품의 보습제로 사용되는 물질들이 각질층의 광산란을 효과적으로 감소시키는 것을 확인하였다. 그러나 광학 분야와는 반대로 화장품 분야에서는 각질층에서 OCA에 의한 물의 침투와 유지 역할이 매우 중요하다고 판단된다. 각질층의 두께와 강성(단단함)과 같은 몇 가지 물성 또한 광학 투명화 과정에서 변화하였음을 확인하였다. 이 결과로 광산란 감소 물질에 의한 각질층의 수분 공급이 화장 영역에서 가장 중요한 이점인 투명한 피부톤과 지속적인 보습효과 제공에 도움이 된다는 것을 입증하였다.

또한, 기존의 피부 보습 연구는 주로 지질 장벽의 기능 개선에 중점을 두었으나 본 연구에서는 피부 표면의 대부분을 차지하는 각질세포 측면에서 물의 침투로 인한 각질세포의 물리적 (수분 함량) 특성의 변화로 확인하였다. 앞으로 각질 팽창이 미세 주름의 감소에 미치는 영향과 각질층의 단단함 감소가 실제로 피부에 주는 물리적 영향(피부 당김)과 그 정도를 확인하는 추가적인 연구를 진행할 예정이다.

Reference

1. T. Lister, P. A. Wright, and P. H. Chappell, Optical

properties of human skin, *J. Biomed. Opt*., **17**, 90901 (2012).
2. G. K. Menon, New insights into skin structure: scratching the surface, *Adv. Drug Deliv. Rev*., **54**, S3 (2002).
3. S.-H. Lee, N. G. Kang, and S. Lee, Selection of skin-penetrating peptide using phage display, *Yakhak Hoeiji*, **57**, 125 (2013).
4. A. Baroni, E. Buommino, V. De Gregorio, E. Ruocco, V. Ruocco, and R. Wolf, Structure and function of the epidermis related to barrier properties, *Clin. Dermatol*., **30**, 257 (2012).
5. Z.-X. Jiang and J. DeLaCruz, Appearance benefits of skin moisturization. *Ski. Res. Technol*., **17**, 51 (2011).
6. N. Kollias, G. Zonios, and G. N. Stamatas, Fluorescence spectroscopy of skin. *Vib. Spectrosc*., **28**, 17 (2002).
7. Z. Jiang and P. D. Kaplan, Point-spread imaging for measurement of skin translucency and scattering, *Ski. Res. Technol*., **14**, 293 (2008).
8. S. G. Proskurin and I. V. Meglinski, Optical coherence tomography imaging depth enhancement by superficial skin optical clearing, *Laser Phys. Lett*., **4**, 824 (2007).
9. W. Feng, R. Shi , N. Ma , D. K. Tuchina, V. V. Tuchin, and D. Zhu, Skin optical clearing potential of disaccharides. *J. Biomed. Opt*., **21**, 81207 (2016).
10. C. G. Rylander, O. F. Stumpp, T. E. Milner, N. J. Kemp, J. M. Mendenhall, K. R. Diller, and A. J. Welch, Dehydration mechanism of optical clearing in tissue. *J. Biomed. Opt*., **11**, 411 (2006).
11. L. Kreplak, J. Doucet, P. Dumas, and F. Briki, New aspects of the alpha-helix to beta-sheet transition in stretched hard alpha-keratin fibers, *Biophys. J*., **87**, 640 (2004).
12. Harding, Watkinson, Rawlings, and Scott. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis, *Int. J. Cosmet. Sci*., **22**, 21 (2000).
13. Y. Jokura, S. Ishikawa, H. Tokuda, H, and G. okawa, Molecular analysis of elastic properties of the stratum corneum by solid-state 13C-nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Invest. Dermatol*., **104**, 806 (1995).
14. B. J. Bennion and V. Daggett, The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea, *Proc. Natl. Acad. Sci*., **100**, 5142 (2003).
15. R. Vyumvuhore, A. Tfayli, H. Duplan, A. Delalleau, M. Manfait, and A. Baillet-Guffroy, Effects of atmospheric relative humidity on stratum corneum structure at the molecular level: ex vivo raman spectroscopy analysis, *Analyst*, **138**, 4103 (2013).
16. S. Yadav, R. R. Wickett, N. G. Pinto, G. B. Kasting, and S. W. Thiel, Comparative thermodynamic and spectroscopic properties of water interaction with human stratum corneum, *Skin Res. Tech*. **15**, 172 (2009).