

피부 투과 펩티드가 함유된 리포솜을 이용한 주름 개선 펩티드 GHKs의 피부 흡수 증진

박수인* · 안규민 · 김민기 · 허수현 · 신문삼†

을지대학교 대학원 시니어헬스케어학과 화장품약리학 전공
(2019년 8월 16일 접수; 2019년 9월 26일 수정; 2019년 9월 26일 채택)

Enhancement of Skin Permeation of Wrinkle Improvement Peptides GHKs Using Liposomes Containing Skin Penetrating Peptides

Su In Park · Gyu Min An · Min Gi Kim · Soo Hyeon Heo · Moon Sam Shin†

*Department of Senior Healthcare, majored in Cosmetic Pharmacology, Eulji University,
Seongnam, Gyeonggi 13135, Korea
(Received August 16, 2019; Revised September 26, 2019; Accepted September 26, 2019)*

요 약 : 본 연구에서는 경피 흡수가 어려운 주름 개선 펩티드인 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK 리포솜 및 여기에 피부 투과 펩티드인 아르지닌 올리고머 R4(tetra-D-arginine), R6(hexa-D-arginine)를 첨가한 리포솜으로 경피 투과도를 측정하여 그 결과를 다음 6가지 구분으로 분석하였다. (1) 주름 개선 펩티드만 함유한 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK liposome의 경우; 24시간 최종 누적 경피 투과율은 6.05%, 7.4%, 8.83%를 보였다. (2) GHK에 약물 전달 펩티드 아르지닌 올리고머 R4, R6를 첨가한 리포솜의 경우; 24시간 최종 누적 경피 투과율은 13.63%, 7.68%를 나타냈다. (3) GHK-Cu에 R4, R6를 첨가한 리포솜의 경우; 24시간 최종 누적 경피 투과율은 15.46%, 8.64%로 나타났다. (4) Pal-GHK에 R4, R6를 첨가한 리포솜의 경우; 24시간 최종 누적 경피 투과율은 16.9%, 10.67%를 보였다. (5) GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 각각 R4를 첨가한 리포솜의 경우; 24시간 최종 누적 경피 투과율은 13.63%, 15.46%, 16.9%를 나타냈다. (6) GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 각각 R6를 첨가한 리포솜의 경우; 24시간 최종 누적 경피 투과율은 7.68%, 8.64%, 10.67%로 나타났다. 본 실험을 통해 구리이온(Cu²⁺)과 팔미트산에 의해 GHK의 피부 흡수가 증가하고, 피부 투과 펩티드에 의해 주름 개선 펩티드의 피부 흡수가 증진되며, GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에는 R4가 R6보다 높은 효과를 보이는 것을 알 수 있었다. 이를 통하여 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK의 피부 흡수를 증가를 위한 최적의 조건을 제시하여 그 효능을 극대화할 수 있는 방안을 제시함으로써 주름 개선 기능성 화장품에서의 폭넓은 활용과 응용을 제안한다.

주제어 : 주름 개선 펩티드, 피부 투과 펩티드, 리포솜, 피부 흡수 증진, GHKs

†Corresponding author
(E-mail: msshin@eulji.ac.kr)

Abstract : In this study, the skin permeability was measured by adding skin penetrating peptides, arginine oligomers R4(tetra-D-arginine), R6(hexa-D-arginine) to little skin-permeable wrinkle improvement peptides GHK, GHK-Cu, and Pal-GHK liposomes, and the results were analyzed by the following six cases. (1) In cases where only wrinkle improvement peptides GHK, GHK-Cu, and Pal-GHK were contained liposomes; the final cumulative permeations in 24 hours were 6.05%, 7.4%, and 8.83% respectively. (2) In cases where arginine oligomers R4, R6 were added to GHK liposomes; the final cumulative permeations in 24 hours were 13.63% and 7.68%. (3) In cases where R4, R6 were added to GHK-Cu liposomes; the final cumulative permeations in 24 hours were 15.46% and 8.64%. (4) In cases where R4, R6 were added to Pal-GHK liposomes; the final cumulative permeations in 24 hours were 16.9% and 10.67%. (5) In cases where R4 were added to GHK, GHK-Cu, and Pal-GHK liposomes; the final cumulative permeations in 24 hours were 13.63%, 15.46%, and 16.9% respectively. (6) In cases where R6 were added to GHK, GHK-Cu, and Pal-GHK liposomes; the final cumulative permeations in 24 hours were 7.68%, 8.64%, and 10.67% respectively. This experiment showed that skin absorption of GHK was increased by copper ion (Cu²⁺) and palmitic acid and skin absorption of wrinkle improvement peptides was enhanced by cell penetrating peptides, and R4 showed higher effect than R6 in GHK, GHK-Cu and Pal-GHK. Through this process, we propose broad use and application in wrinkle improvement functional cosmetics by presenting the optimal conditions for increasing skin absorption of GHK, GHK-Cu, thus maximizing its efficacy.

Keywords : *Wrinkle improvement peptide, Skin penetrating peptide, Liposome, Enhancement of skin absorption, GHKs*

1. 서론

우리나라는 빠른 속도로 고령화가 진행되어 2017년을 기준으로 65세 이상 인구 비율이 14% 이상인 고령화 사회에 들어섰다. 이러한 고령자의 증가로 인해 시니어 산업이 크게 성장하고 있으며[1], 화장품 시장에서도 시니어 세대 여성들이 중요한 소비자로 부상하고 있다[2]. 이에 따라 주름 개선 기능성 화장품에 대한 수요가 증가하고 있는 추세이며, 이러한 흐름에 맞춰 화장품산업에서는 주름 개선 기능성 소재에 대한 연구개발에 주력하고 있다[3].

아미노산 중합체인 펩티드는 우수한 생리 활성, 안전성, 안정성 등의 장점을 가지고 있고, 분자량이 비교적 작아 합성이 가능하므로 화장품의 기능성 소재로 활용 가능성이 높다. 따라서 펩티드는 주름 개선 기능성 화장품 소재로도 주목받고 있으며[4,5], 그 대표적인 예로 GHK(glycyl-histidyl-lysine)가 있다. 사람의 혈청에서 처음 분리된 GHK는 노화 과정에서 감소하여 사람의 혈액 속에서 20세에는 약 200 mg/mL 정도, 60세

에는 약 80 mg/mL 정도 존재하고, extracellular matrix인 collagen, elastin, glycosaminoglycan의 합성을 증가시켜 피부 재생 등의 작용을 한다고 알려져 있다. GHK는 구리이온에 높은 친화력을 가지므로 GHK-Cu 형태로 흔히 존재하며, GHK의 투과성과 안정성을 높이기 위해 지방산인 palmitate와 결합시킨 Pal-GHK 형태도 존재한다. 이러한 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK는 우수한 주름 개선 효능을 가진 소재이지만, 경피 투과가 어렵기 때문에 실제로 피부에서 효능을 나타내지 못한다는 문제가 있어 왔다[6-11].

피부는 표피, 진피, 피하조직의 세 층으로 이루어져 있으며, 외부의 물리 및 화학적 자극으로부터 생체를 보호하는 역할 한다. 피부의 최외곽층인 표피의 각질층은 케라틴 단백질과 각질세포간 지질로 구성되어 있어 외부 물질의 피부 투과를 방해하는 피부 장벽 역할을 한다. 따라서 기능성 화장품 소재의 경피 흡수 또한 어렵게 되므로 이러한 문제를 해결하기 위한 경피 약물 전달 시스템의 개발이 필요하다[12,13]. 이에 관한 연구의 일환으로 최근 리포솜이 많은 관심을 받고 있다.

리포솜은 생체막의 성분인 인지질을 주성분으로 하므로 생체 친화성이 높고, 다양한 물질을 포집할 수 있다는 장점을 가지고 있어 약물 전달체로서 널리 이용되고 있다[14,15].

한편 효율적인 세포 내 약물 전달을 위하여 세포 투과 펩티드(cell penetrating peptide)에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 세포 투과 펩티드는 일반적으로 10-30개의 짧은 아미노산 서열을 가지며, 대부분 염기성 아미노산인 lysine(K), arginine(R)을 많이 가지고 있다. 대표적인 세포 투과 펩티드로는 HIV-1에서 유래된 Tat 펩티드가 있다. Tat 펩티드는 86개의 아미노산 서열을 가지고, 그 중 RKKKRRQRRR 부분이 세포 투과 펩티드의 역할을 하는 최소 부위이며, lysine과 arginine이 세포 내 투과능의 핵심 역할을 한다고 알려져 있다[16-20]. 세포막과 피부 각질세포간지질은 모두 지질 이중층 구조로 구조적 유사성 가지므로 최근에 이를 응용하여 피부에 적용하여 기능성 화장품 소재의 피부 흡수 증진 효과를 가져올 수 있을 것으로 보고되고 있다 [21,22].

따라서 본 연구에서는 주름 개선 펩티드인 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK 함유 리포솜 제형과 여기에 피부 투과 펩티드인 아르지닌 올리고머 R4(tetra-D-arginine), R6(hexa-D-arginine)를 함유한 리포솜 제형으로 경피 투과도를 측정하여 이를 다음의 6가지 구분; (1) GHK, GHK-Cu, Pal-GHK만 함유한 리포솜, (2) GHK만 함유 및 여기에 R4, R6를 첨가한 리포솜, (3) GHK-Cu만 함유 및 여기에 R4, R6를 첨가한 리포솜, (4) Pal-GHK만 함유 및 여기에 R4, R6를 첨가한 리포솜, (5) GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 각각 R4를 첨가한 리포솜, (6) GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 각각 R6를 첨가한 리포솜으로 경피 투과도를 비교분석하고자 하였다. 이를 통하여 주름 개선 펩티드인 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK의 피부 흡수를 증진을 위한 최적 조건을 제시하여 주름 개선 기능성 화장품에서의 폭넓은 활용과 응용을 제안한다.

2. 실험

2.1. 시약

본 연구에 사용된 시약 및 그 구입처는 다음과 같다. GHK, GHK-Cu, Pal-GHK, R4, R6는

Dermafirm Co.(Korea)에서 구입하였고, lecithin은 Lipoid(Germany)의 Lipoid P 75-3 제품을 이용하였다. Tween 20, Tween 80, PBS, trifluoroacetic acid는 (SigmaAldrich, USA)에서, sodium lauryl sulfate, sodium oleate, glycerine, EDTA-2Na는 DaejungChemicals(Korea)에서, ethanol, acetonitrile은 SamchunChemicals(Korea)에서, caprylic/capric triglyceride(MCT)는 Cosnet(Korea)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 리포솜 제조 방법

본 연구에 사용된 리포솜 제조는 다음과 같은 순서로 진행하였다. 먼저 증류수에 lecithin (Lipoid P 75-3), sodium lauryl sulfate(26% solution), sodium oleate를 80 °C에서 교반하며 용해시킨 후 상온에서 glycerine, EDTA-2Na를 첨가하여 교반하였다. 다음으로 에탄올에 caprylic/capric triglyceride, GHK 또는 GHK-Cu 또는 Pal-GHK를 용해시킨 part 및 증류수에 Tween 20,80 [1:1] (20% solution), R4 또는 R6를 용해시킨 part를 첨가하여 상온에서 Homogenizer(CoreTech, Korea)로 유향시킨 후 High Pressure Homogenizer(Micronox, Korea)를 1500 bar로 3회 통과시켰다. 리포솜 제조 방법은 Table 1에 정리하였고, 상기 과정을 통하여 Table 2의 9가지 리포솜을 제조하여 본 연구의 시료로 사용하였다. 제조된 리포솜의 입도는 Dynamic Light Scattering System(Microtrac, USA)를 이용하여 측정하였다.

2.3. 경피 투과도 측정 방법

경피 투과도 측정은 Franz Diffusion Cells and Systems(PermeGear, USA)를 이용하여 진행하였다[23]. 피부는 Neoderm®-E(Tegoscience, Korea)를 사용하여 receptor chamber 위에 각질 층이 위로 가도록 올려놓고, donor chamber를 피부 위에 고정시킨 후 receptor chamber에 receptor medium인 PBS를 8.5 mL 채워주어 피부가 receptor medium과 접촉하도록 하였다. 온도는 항온수조(LabHouse, Korea)를 이용하여 37 °C를 유지하였고, 30분간 안정화 과정을 거친 후 Table 2의 9가지 시료 0.5 mL을 1.326665cm² 면적의 피부에 적하하였다. 투과된 시료가 receptor medium에 잘 혼합되도록 stirbar를 이용하여 500 rpm을 유지하면서 4, 8, 12, 16, 20, 24시간 후에 sampling port를 통해 receptor

Table 1. Formula of liposomes

(단위 : W/W%)

No.	Component	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9
1	D.I. water	42.48	42.48	42.48	42.48	42.48	42.48	42.48	42.48	42.48
2	Lecithin (Lipoid P 75-3)	4	4	4	4	4	4	4	4	4
3	Sodium lauryl sulfate (26% solution)	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7
4	Sodium oleate	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
5	Glycerine	10	10	10	10	10	10	10	10	10
6	EDTA-2Na	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
7	Ethanol	10	10	10	10	10	10	10	10	10
8	Caprylic/capric triglyceride (MCT)	4	4	4	4	4	4	4	4	4
9	GHK	1	-	-	1	-	-	1	-	-
	GHK-Cu	-	1	-	-	1	-	-	1	-
	Pal-GHK	-	-	1	-	-	1	-	-	1
10	D.I. water	19.6	19.6	19.6	19.1	19.1	19.1	19.1	19.1	19.1
11	Tween 20,80 [1:1] (20% solution)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
12	R4	-	-	-	0.5	0.5	0.5	-	-	-
	R6	-	-	-	-	-	-	0.5	0.5	0.5

Table 2. Sample list used in this study

L1	GHK 10 mg/mL Liposome
L2	GHK-Cu 10 mg/mL Liposome
L3	Pal-GHK 10 mg/mL Liposome
L4	GHK 10 mg/mL + R4 5 mg/mL Liposome
L5	GHK-Cu 10 mg/mL + R4 5 mg/mL Liposome
L6	Pal-GHK 10 mg/mL + R4 5 mg/mL Liposome
L7	GHK 10 mg/mL + R6 5 mg/mL Liposome
L8	GHK-Cu 10 mg/mL + R6 5 mg/mL Liposome
L9	Pal-GHK 10 mg/mL + R6 5 mg/mL Liposome

medium을 0.5 mL씩 채취한 후 동량의 receptor medium을 보충해 주었다. 채취한 receptor medium은 HPLC(Agilent, USA)를 이용하여 정

량하였다. 경피 투과도 측정 방법은 Table 3에 정리하였다[24,25].

Table 3. Franz diffusion cells and systems operation conditions

Instrument	PermeGear V6A-02
Skin	Neoderm®-E
Area of skin	1.326665 cm ²
Volume of sample solution	0.5 mL
Weight of drug	5 mg
Receptor medium	PBS
Volume of receptor medium	8.5 mL
Temperature	37 ° C
Stirbar speed	500 rpm
Sampling aliquot	0.5 mL
Sampling time	4, 8, 12, 16, 20, 24 h

Table 4. HPLC operation conditions for determination of GHK, GHK-Cu, Pal-GHK

Instrument	Agilent 1100		
Column	Shiseido C18 (4.6*250 mm, 5 μm)		
Mobile phase	Time	0	50
	0.1% TFA in water	100	0
	0.1% TFA in acetonitrile	0	100
Detector wavelength	UV 220 nm		
Injection volume	20 μl		
Flow rate	1 mL/min		
Column temperature	25 °C		
Run time	50 min		

2.4. 경피 투과도 정량 방법

GHK, GHK-Cu, Pal-GHK의 경피 투과도의 정량은 HPLC를 이용하여 Shiseido C18 (4.6×250 mm, 5 μm) 칼럼으로 진행하였다. trifluoroacetic acid 0.1% 정제수와 trifluoroacetic acid 0.1% acetonitrile의 gradient를 이동상으로 하여 검출 파장 220 nm, 시료 투입량 20 μL, 유속 1 mL/min, 칼럼 온도 25 °C의 조건으로 각 시료 당 50분간 분석을 진행하였다. 경피 투과도 정량 방법은 Table 4에 정리하였다.

2.5. 통계 처리

모든 실험은 3회 반복 측정하여 평균과 표준편차를 산출하였고, SPSS 통계프로그램을 이용하여 일원배치분산분석 Duncan의 방법으로 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 리포솜 입도 측정 결과

본 실험에서 시료로 사용된 9가지 리포솜에 대한 입도를 측정하여 그 결과를 Table 5에 제시하

였다. 각각 리포솜의 입도는 GHK 10 mg/mL 리포솜은 154.03nm, GHK-Cu 10 mg/mL 리포솜은 132.3 nm, Pal-GHK 10 mg/mL 리포솜은 228.37 nm, GHK 10 mg/mL + R4 5 mg/mL 리포솜은 407.67 nm, GHK-Cu 10 mg/mL + R4 5 mg/mL 리포솜은 436 nm, Pal-GHK 10 mg/mL + R4 5 mg/mL 리포솜은 516.33 nm, GHK 10 mg/mL + R6 5 mg/mL 리포솜은 527 nm, GHK-Cu 10 mg/mL + R6 5 mg/mL 리포솜은 350 nm, Pal-GHK 10 mg/mL + R6 5 mg/mL 리포솜은 480.33 nm로 측정되었다. 따라서 모두 100-1000 nm 범위 내의 입도를 가지므로 이를 통하여 리포솜이 만들어진 것을 확인하였다. 또한 GHKs만 함유한 리포솜에 비해 R4, R6를 첨가하면 리포솜이 입도가 커지는 경향성을 알 수 있었다.

3.2. GHK (L1), GHK-Cu (L2), Pal-GHK (L3) 리포솜의 경피 투과도 비교

본 실험에서 경피 투과도는 GHKs의 초기 적하량 3.77 mg/cm² 대비 피부 투과량을 백분율로 나타내었다. GHK, GHK-Cu, Pal-GHK 리포솜의 경피 투과도를 측정된 결과 모두 투과도가 4시간까지 급격히 상승한 후 24시간까지 비교적 완만하게 상승하였다. 4시간까지의 누적 투과율을 비교하면, GHK는 2.52%, GHK-Cu는 3.24%, Pal-GHK는 4.59%의 투과율을 보여 GHK-Cu는 GHK에 비해 약 1.29배, Pal-GHK는 GHK에 비해 약 1.82배 많은 양이 투과되었다. 또한 24시간까지의 최종 누적 투과율을 비교하면, GHK는 6.05%, GHK-Cu는 7.4%, Pal-GHK는 8.83%의 투과율을 보여 GHK-Cu는 GHK에 비해 약 1.22배, Pal-GHK는 GHK에 비해 약 1.46배 많은 양이 투과되었다. 즉 Pal-GHK, GHK-Cu, GHK 리포솜 순으로 높은

Table 5. Particle size of liposomes (Unit : nm)

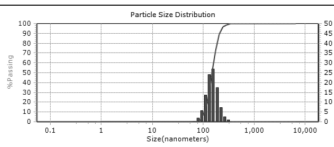
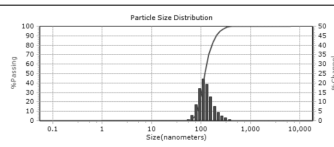
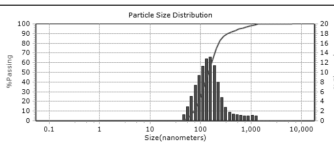
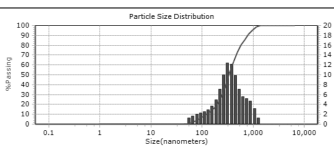
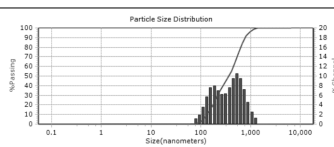
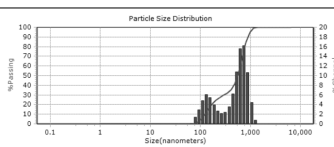
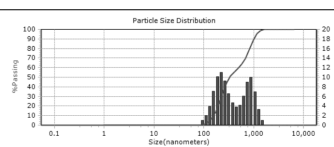
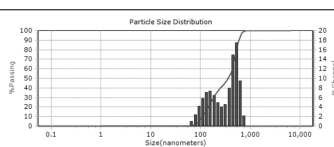
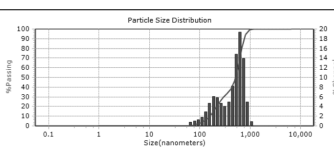
GHK 10 mg/mL Liposome (L1)	GHK-Cu 10 mg/mL Liposome (L2)	Pal-GHK 10 mg/mL Liposome (L3)
154.03 ± 1.65	132.3 ± 1.92	228.37 ± 25.12
		
GHK 10 mg/mL + R4 5 mg/mL Liposome (L4)	GHK-Cu 10 mg/mL + R4 5 mg/mL Liposome (L5)	Pal-GHK 10 mg/mL + R4 5 mg/mL Liposome (L6)
407.67 ± 7.64	436 ± 20.52	516.33 ± 12.9
		
GHK 10 mg/mL + R6 5 mg/mL Liposome (L7)	GHK-Cu 10 mg/mL + R6 5 mg/mL Liposome (L8)	Pal-GHK 10 mg/mL + R6 5 mg/mL Liposome (L9)
527 ± 32.14	350 ± 24.64	480.33 ± 8.5
		

Table 6. Cumulative release of GHK, GHK-Cu, Pal-GHK liposomes (%)

Time		0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h	
Sample	GHK	mean	0	2.52	3.63	4.16	5.06	5.61	6.05
		SD	0	0.15	0.26	0.16	0.21	0.26	0.29
GHK-Cu	mean	0	3.24	4.31	5.27	5.95	6.87	7.4	
	SD	0	0.16	0.18	0.17	0.18	0.19	0.18	
Pal-GHK	mean	0	4.59	5.56	6.45	7.49	8.22	8.83	
	SD	0	0.25	0.29	0.38	0.23	0.2	0.25	
onw-way ANOVA		-	.000	.000	.000	.000	.000	.000	

경피 투과도를 보였다. 이는 구리아온과 팔미트산이 GHK의 경피 투과도를 증진시킨 결과로 생각된다. 본 결과는 Table 6 및 Figure 1에 나타내었다.

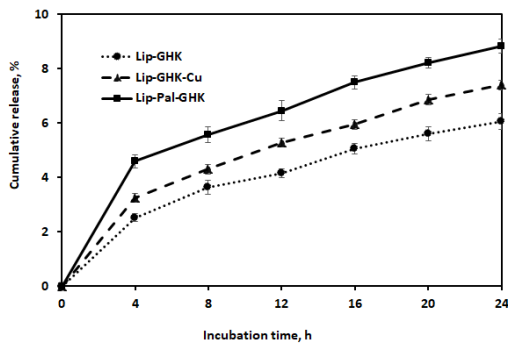


Fig. 1. Cumulative release of GHK, GHK-Cu, Pal-GHK liposomes (%)

3.3. GHK (L1), GHK에 R4 첨가 (L4), GHK에 R6 첨가 (L7) liposome의 경피 투과도 비교

GHK, GHK에 R4첨가, GHK에 R6첨가 리포솜의 GHK 경피 투과도 역시 4시간까지는 빠르게 상승하다가 24시간까지는 서서히 상승하였다. 4시간까지의 GHK 누적 투과율을 비교하면, GHK는 2.52%, GHK+R4는 6.07%, GHK+R6는 3.2%의 투과율을 보여 GHK+R4는 GHK에 비해 약 2.41배, GHK+R6는 GHK에 비해 약 1.27배 많은 양이 투과되었다. 또한 24시간까지의 GHK 최종 누적 투과율을 비교하면, GHK는 6.05%, GHK+R4는 13.63%, GHK+R6는

7.68%의 투과율을 보여 GHK+R4는 GHK에 비해 약 2.25배, GHK+R6는 GHK에 비해 약 1.27배 많은 양이 투과되었다. 즉 GHK에 R4첨가, GHK에 R6첨가, GHK 리포솜 순으로 높은 GHK 경피 투과도를 보였다. 이를 통해 약물 전달 펩티드인 arginine oligomer에 의해 GHK의 경피 투과도가 증가하고, GHK의 약물 전달에는 R6보다 arginine의 수가 비교적 적은 R4가 더 적합함을 알 수 있었다. 본 결과를 Table 7 및 Figure 2에 제시하였다.

3.4. GHK-Cu (L2), GHK-Cu에 R4 첨가 (L5), GHK-Cu에 R6 첨가 (L8) 리포솜의 경피 투과도 비교

Table 8 및 Figure 3은 GHK-Cu에 R4 또는 R6 첨가에 따른 경피 투과도를 나타낸 결과이다. GHK-Cu, GHK-Cu에 R4첨가, GHK-Cu에 R6첨가 리포솜의 GHK-Cu 경피 투과도 또한 4시간까지 급격히 상승하다가 24시간까지는 완만한 상승세를 보였다. 4시간까지의 누적 투과율을 비교하면, GHK-Cu는 3.24%, GHK-Cu+R4는 7.87%, GHK-Cu+R6는 4.22%의 투과율을 보여 GHK-Cu+R4는 GHK-Cu에 비해 약 2.43배, GHK-Cu+R6는 GHK-Cu에 비해 약 1.3배 많은 양이 투과되었다. 또한 24시간까지의 최종 누적 투과율을 비교하면, GHK-Cu는 7.4%, GHK-Cu+R4는 15.46%, GHK-Cu+R6는 8.64%의 투과율을 보여 GHK-Cu+R4는 GHK-Cu에 비해 약 2.09배, GHK-Cu+R6는 GHK-Cu에 비해 약 1.17배 많은 양이 투과되었다. 즉 GHK-Cu에 R4첨가, GHK-Cu에 R6첨가, GHK-Cu 리포솜 순으로 높은 GHK-Cu 경

Table 7. Cumulative release of GHK, GHK+R4, GHK+R6 liposomes (%)

Time		0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h	
Sample	GHK	mean	0	2.52	3.63	4.16	5.06	5.61	6.05
		SD	0	0.15	0.26	0.16	0.21	0.26	0.29
	GHK+R4	mean	0	6.07	8.19	9.56	10.84	12.52	13.63
		SD	0	0.46	0.47	0.45	0.45	0.43	0.79
	GHK+R6	mean	0	3.2	4.43	5.42	6.08	6.79	7.68
		SD	0	0.46	0.48	0.47	0.49	0.49	0.41
onw-way ANOVA		-	.000	.000	.000	.000	.000	.000	

피 투과도를 보였다. 이를 통해 arginine oligomer에 의한 GHK-Cu 경피 투과도 증진을 확인하였고, GHK와 마찬가지로 GHK-Cu의 약물 전달에는 R6보다 R4가 더 효율적임을 알 수 있었다.

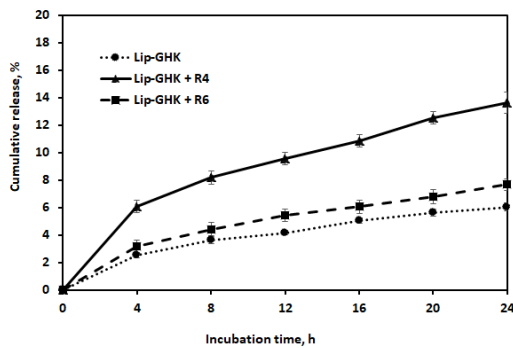


Fig. 2. Cumulative release of GHK, GHK+R4, GHK+R6 liposomes (%)

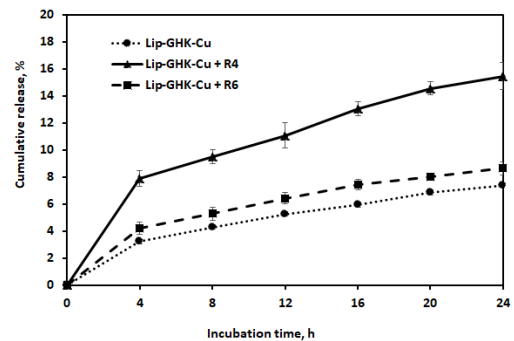


Fig. 3. Cumulative release of GHK-Cu, GHK-Cu+R4, GHK-Cu+R6 liposomes (%)

3.5. Pal-GHK (L3), Pal-GHK에 R4 첨가 (L6), Pal-GHK에 R6 첨가 (L9) 리포솜의 경피 투과도 비교

Table 8 및 Figure 4는 Pal-GHK에 R4 또는 R6 첨가에 따른 경피 투과도를 나타낸 결과이다. Pal-GHK, Pal-GHK에 R4첨가, Pal-GHK에 R6첨가 리포솜의 Pal-GHK 경피 투과도에서도

Table 8. Cumulative release of GHK-Cu, GHK-Cu+R4, GHK-Cu+R6 liposomes (%)

Time		0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h	
Sample	GHK-Cu	mean	0	3.24	4.31	5.27	5.95	6.87	7.4
		SD	0	0.16	0.18	0.17	0.18	0.19	0.18
	GHK-Cu +R4	mean	0	7.87	9.48	11.08	13.05	14.54	15.46
		SD	0	0.57	0.52	0.96	0.51	0.49	0.99
	GHK-Cu +R6	mean	0	4.22	5.3	6.43	7.43	8.01	8.64
		SD	0	0.43	0.49	0.44	0.39	0.13	0.5
onw-way ANOVA		-	.000	.000	.000	.000	.000	.000	

4시간까지는 급격한 상승세를, 24시간까지는 완만한 상승세를 나타냈다. 4시간까지의 누적 투과율을 비교하면, Pal-GHK는 4.59%, Pal-GHK+R4는 8.6%, Pal-GHK+R6는 5.62%의 투과율을 보여 Pal-GHK+R4는 Pal-GHK에 비해 약 1.87배, Pal-GHK+R6는 Pal-GHK에 비해 약 1.22배 많은 양이 투과되었다. 또한 24시간까지의 최종 누적 투과율을 비교하면, Pal-GHK는 8.83%, Pal-GHK+R4는 16.9%, Pal-GHK+R6는 10.67%의 투과율을 보여 Pal-GHK+R4는 Pal-GHK에 비해 약 1.91배, Pal-GHK+R6는 Pal-GHK에 비해 약 1.21배 많은 양이 투과되었다. 즉 Pal-GHK에 R4첨가, Pal-GHK에 R6첨가, Pal-GHK 리포솜 순으로 높은 Pal-GHK 경피 투과도를 보였다. 본 결과에서도 arginine oligomer에 의한 Pal-GHK의 경피 투과도 증가 효과를 확인하였고, GHK 및 GHK-Cu와 마찬가지로 R6보다 R4가 Pal-GHK의 약물 전달 효율을 현저하게 상승시켰다.

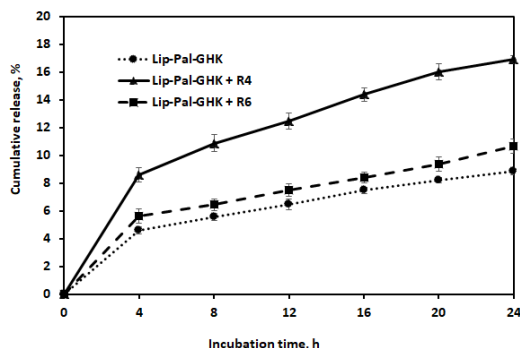


Fig. 4. Cumulative release of Pal-GHK, Pal-GHK+R4, Pal-GHK+R6 liposomes (%)

3.6. GHK에 R4첨가 (L4), GHK-Cu에 R4첨가 (L5), Pal-GHK에 R4첨가 (L6) 리포솜의 경피 투과도 비교

GHK에 R4첨가, GHK-Cu에 R4첨가, Pal-GHK에 R4첨가 리포솜의 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK 경피 투과도를 비교분석하였고, 이를 Table 10 및 Figure 5에 제시하였다. 4시간까지의 누적 투과율을 비교하면, GHK+R4는 6.07%, GHK-Cu+R4는 7.87%, Pal-GHK+R4는 8.6%의 투과율을 보여 GHK-Cu+R4는 GHK+R4에 비해 약 1.3배, Pal-GHK+R4는 GHK+R4에 비해 약 1.42배 많은 양이 투과되었다. 또한 24시간까지의 최종 누적 투과율을 비교하면, GHK+R4는 13.63%, GHK-Cu+R4는 15.46%, Pal-GHK+R4는 16.9%의 투과율을 보여 GHK-Cu+R4는 GHK+R4에 비해 약 1.13배, Pal-GHK+R4는 GHK+R4에 비해 약 1.24배 많은 양이 투과되었다. 즉 Pal-GHK에 R4첨가, GHK-Cu에 R4첨가, GHK에 R4첨가 리포솜 순으로 높은 Pal-GHK, GHK-Cu, GHK 경피 투과도를 보였다. 이는 구리이온과 팔미트산이 GHK의 경피 투과도를 상승시킨 결과로, 구리이온보다 팔미트산에 의한 약물 전달 증진 효과가 더 큰 것을 알 수 있었다.

3.7. GHK에 R6첨가 (L7), GHK-Cu에 R6첨가 (L8), Pal-GHK에 R6첨가 (L9) 리포솜의 경피 투과도 비교

GHK에 R6첨가, GHK-Cu에 R6첨가, Pal-GHK에 R6첨가 리포솜의 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK 경피 투과도를 비교분석하여 그 결과를 Table 11 및 Figure 6에 제시하였다. 4시간까지의 누적 투과율을 비교하면, GHK+R6는 3.2%, GHK-Cu+R6는 4.22%, Pal-GHK+R6

Table 9. Cumulative release of Pal-GHK, Pal-GHK+R4, Pal-GHK+R6 liposomes (%)

Time		0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h	
Sample	Pal-GHK	mean	0	4.59	5.56	6.45	7.49	8.22	8.83
		SD	0	0.25	0.29	0.38	0.23	0.2	0.25
	Pal-GHK+R4	mean	0	8.6	10.88	12.46	14.38	16.01	16.9
		SD	0	0.54	0.61	0.6	0.49	0.59	0.28
	Pal-GHK+R6	mean	0	5.62	6.44	7.51	8.41	9.36	10.67
		SD	0	0.51	0.4	0.44	0.41	0.52	0.54
onw-way ANOVA		-	.000	.000	.000	.000	.000	.000	

Table 10. Cumulative release of GHK+R4, GHK-Cu+R4, Pal-GHK+R4 liposomes (%)

Time		0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h	
Sample	GHK+R4	mean	0	6.07	8.19	9.56	10.84	12.52	13.63
		SD	0	0.46	0.47	0.45	0.45	0.43	0.79
	GHK-Cu+R4	mean	0	7.87	9.48	11.08	13.05	14.54	15.46
		SD	0	0.57	0.52	0.96	0.51	0.49	0.99
	Pal-GHK+R4	mean	0	8.6	10.88	12.46	14.38	16.01	16.9
		SD	0	0.54	0.61	0.6	0.49	0.59	0.28
onw-way ANOVA		-	.003	.003	.006	.000	.000	.005	

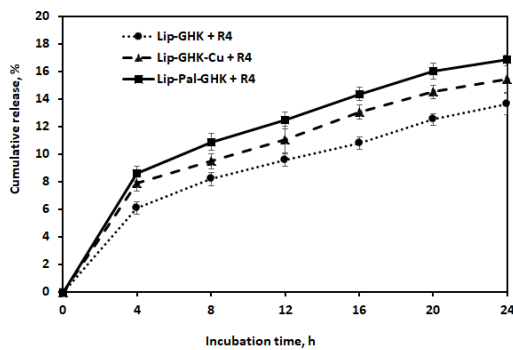


Fig. 5. Cumulative release of GHK+R4, GHK-Cu+R4, Pal-GHK+R4 liposomes (%)

다. 또한 24시간까지의 최종 누적 투과율을 비교하면, GHK+R6는 7.68%, GHK-Cu+R6는 8.64%, Pal-GHK+R6는 10.67%의 투과율을 보여 GHK-Cu+R6는 GHK+R6에 비해 약 1.13배, Pal-GHK+R6는 GHK+R6에 비해 약 1.39배 많은 양이 투과되었다. 즉 Pal-GHK에 R6첨가, GHK-Cu에 R6첨가, GHK에 R6첨가 리포솜 순으로 높은 Pal-GHK, GHK-Cu, GHK 경피 투과도를 보였다. 본 결과에서도 구리이온과 팔미트산이 GHK의 경피 투과도를 상승시키고, 구리이온보다 팔미트산에 의한 약물 전달 증진 효과가 더 큰 것을 확인하였다. 이는 각질세포간지질을 투과하는 데에는 비극성인 팔미트산이 더 효과적이기 때문으로 생각된다.

는 5.62%의 투과율을 보여 GHK-Cu+R6는 GHK+R6에 비해 약 1.32배, Pal-GHK+R6는 GHK+R6에 비해 약 1.76배 많은 양이 투과되었

Table 11. Cumulative release of GHK+R6, GHK-Cu+R6, Pal-GHK+R6 liposomes (%)

Time		0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h	
Sample	GHK+R6	mean	0	3.2	4.43	5.42	6.08	6.79	7.68
		SD	0	0.46	0.48	0.47	0.49	0.49	0.41
	GHK-Cu+R6	mean	0	4.22	5.3	6.43	7.43	8.01	8.64
		SD	0	0.43	0.49	0.44	0.39	0.13	0.5
	Pal-GHK+R6	mean	0	5.62	6.44	7.51	8.41	9.36	10.67
		SD	0	0.51	0.4	0.44	0.41	0.52	0.54
onw-way ANOVA		-	.002	.005	.004	.002	.001	.001	

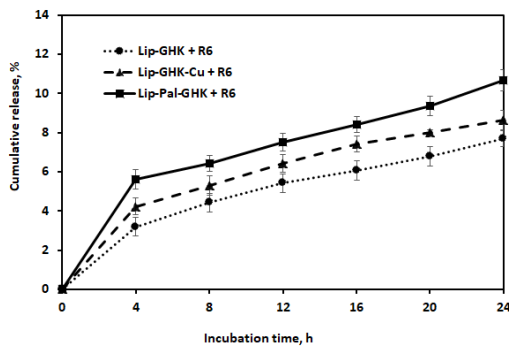


Fig 6. Cumulative release of GHK+R6, GHK-Cu+R6, Pal-GHK+R6 liposomes (%)

4. 결론

본 연구에서는 주름 개선 펩티드인 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK 함유 리포솜 제형과 여기에 피부 투과 펩티드인 아르지닌 올리고머 R4, R6를 첨가한 리포솜 제형으로 경피 투과도를 측정하여 주름 개선 펩티드의 피부 흡수 증진을 위한 최적 조건을 제시하였다.

(1) 주름 개선 펩티드만 함유한 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK liposome의 24시간까지의 최종 누적 투과율을 비교하면, GHK는 6.05%, GHK-Cu는 7.4%, Pal-GHK는 8.83%의 투과율을 보여 GHK-Cu는 GHK에 비해 약 1.22배, Pal-GHK는 GHK에 비해 약 1.46배 많은 양이 투과되었다. 즉 Pal-GHK, GHK-Cu, GHK 리포솜 순으로 높은 경피 투과도를 보였다.

(2) GHK에 약물 전달 펩티드 R4, R6를 적용한 GHK, GHK에 R4첨가, GHK에 R6첨가 리포솜의 24시간까지의 GHK 최종 누적 투과율을 비교하면, GHK는 6.05%, GHK+R4는 13.63%, GHK+R6는 7.68%의 투과율을 보여 GHK+R4는 GHK에 비해 약 2.25배, GHK+R6는 GHK에 비해 약 1.27배 많은 양이 투과되었다. 즉 GHK에 R4첨가, GHK에 R6첨가, GHK 리포솜 순으로 높은 GHK 경피 투과도를 보였다.

(3) GHK-Cu에 R4, R6를 적용한 GHK-Cu, GHK-Cu에 R4첨가, GHK-Cu에 R6첨가 리포솜의 24시간까지의 최종 누적 투과율을 비교하면, GHK-Cu는 7.4%, GHK-Cu+R4는 15.46%, GHK-Cu+R6는 8.64%의 투과율을 보여

GHK-Cu+R4는 GHK-Cu에 비해 약 2.09배, GHK-Cu+R6는 GHK-Cu에 비해 약 1.17배 많은 양이 투과되었다. 즉 GHK-Cu에 R4첨가, GHK-Cu에 R6첨가, GHK-Cu 리포솜 순으로 높은 GHK-Cu 경피 투과도를 보였다.

(4) Pal-GHK에 R4, R6를 적용한 Pal-GHK, Pal-GHK에 R4첨가, Pal-GHK에 R6첨가 리포솜의 24시간까지의 최종 누적 투과율을 비교하면, Pal-GHK는 8.83%, Pal-GHK+R4는 16.9%, Pal-GHK+R6는 10.67%의 투과율을 보여 Pal-GHK+R4는 Pal-GHK에 비해 약 1.91배, Pal-GHK+R6는 Pal-GHK에 비해 약 1.21배 많은 양이 투과되었다. 즉 Pal-GHK에 R4첨가, Pal-GHK에 R6첨가, Pal-GHK 리포솜 순으로 높은 Pal-GHK 경피 투과도를 보였다.

(5) GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 각각 R4를 첨가한 GHK에 R4첨가, GHK-Cu에 R4첨가, Pal-GHK에 R4첨가 리포솜의 24시간까지의 최종 누적 투과율을 비교하면, GHK+R4는 13.63%, GHK-Cu+R4는 15.46%, Pal-GHK+R4는 16.9%의 투과율을 보여 GHK-Cu+R4는 GHK+R4에 비해 약 1.13배, Pal-GHK+R4는 GHK+R4에 비해 약 1.24배 많은 양이 투과되었다. 즉 Pal-GHK에 R4첨가, GHK-Cu에 R4첨가, GHK에 R4첨가 리포솜 순으로 높은 Pal-GHK, GHK-Cu, GHK 경피 투과도를 보였다.

(6) GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 각각 R6를 첨가한 GHK에 R6첨가, GHK-Cu에 R6첨가, Pal-GHK에 R6첨가 리포솜의 24시간까지의 최종 누적 투과율을 비교하면, GHK+R6는 7.68%, GHK-Cu+R6는 8.64%, Pal-GHK+R6는 10.67%의 투과율을 보여 GHK-Cu+R6는 GHK+R6에 비해 약 1.13배, Pal-GHK+R6는 GHK+R6에 비해 약 1.39배 많은 양이 투과되었다. 즉 Pal-GHK에 R6첨가, GHK-Cu에 R6첨가, GHK에 R6첨가 리포솜 순으로 높은 Pal-GHK, GHK-Cu, GHK 경피 투과도를 보였다.

본 연구에서는 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK 함유 리포솜 제형과 여기에 R4, R6를 첨가한 리포솜 제형으로 경피 투과도를 측정하였다. 이를 통하여 구리이온과 팔미트산에 의해 GHK의 피부 흡수가 증가하며, Pal-GHK가 GHK-Cu보다 높은 경피 투과도를 보이는 것을 확인하였다. 또한 피부 투과 펩티드에 의해 주름 개선 펩티드의 피

부 흡수가 증진되며, 분자량이 크지 않은 주름 개선 펩티드인 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에는 아르지닌 수가 비교적 적은 R4가 R6보다 높은 약물 전달 효과를 보였다.

후속 연구에서는 주름 개선 펩티드에 아르지닌 올리고머를 접합한 복합단백질의 경피 투과도를 측정할 예정이며, 이를 통하여 피부 흡수 증진을 위한 최적의 주름 개선 펩티드를 개발하여 그 효능을 극대화함으로써 주름 개선 기능성 화장품에서의 폭넓은 활용과 응용을 제안하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 2017년도 과기정통부의 재원으로 한국연구재단 바이오·의료기기개발사업의 지원을 받아 수행되었음(No. 2017M3A9D8048416).

References

1. D. Y. Jung, "Golyeongchinhwasaneob Sijanghyeonhwang mich Jeonmang", The Magazine of the IEEE, Vol.44, No.12 pp. 16-24 (2017).
2. J. S. Oh, "A Study on the Usage and Purchase Intention of Basic Cosmetics for Silver Generation Women", The Journal of Cultural Exchange, Vol.6, No.3 pp. 77-97 (2017).
3. K. S. Kang, I. D. Kim, R. H. Kwon, Y. Y. Heo, S. H. Oh, M. A. Kim, H. J. Jung, H. Y. Kang, B. J. Ha, "The Evaluation of Anti-wrinkle Effects in Oriental Herb Extract", Journal of Life Science, Vol.17, No.8 pp. 1147-1151 (2007).
4. S. H. Moh, D. H. Jung, H. S. Kim, M. J. Cho, H. H. Seo, S. J. Kim, "Characteristics and Applications of Bioactive Peptides in Skin Care", The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Vol.26, No.6 pp. 483-490 (2011).
5. B. J. Yoo, J. J. Yeon, "Hwajangpum Wonlyoyong Peptaideu-ui Hyomo Balhyo Saengsan Gisul", BT News, Vol.24, No.2 pp. 52-56 (2017).
6. H. Li, Y. S. J. Low, H. P. Chong, M. T. Zin, C. Y. Lee, B. Li, M. Leolukman, L. Kang, "Microneedle-Mediated Delivery of Copper Peptide Through Skin", Pharmaceutical Research, Vol.32, No.8 pp. 2678-2689 (2015).
7. F. X. Maquart, L. Pickart, M. Laurent, P. Gillery, J. C. Monboisse, J. P. Borel, "Stimulation of Collagen Synthesis in Fibroblast Cultures by the Tripeptide-copper Complex Glycyl-L-Histidyl-L-Lysine-Cu²⁺", FEBS Letters, Vol.238, No.2 pp. 343-346 (1988).
8. L. Pickart, "The Human Tri-peptide GHK and Tissue Remodeling", Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, Vol.19, No.8 pp. 969-988 (2008).
9. F. X. Maquart, G. Bellon, B. Chaqour, J. Wegrowski, L. M. Patt, R. E. Trachy, J. C. Monboisse, F. Chastang, P. Birembaut, P. Gillery, "In Vivo Stimulation of Connective Tissue Accumulation by the Tripeptide-copper Complex Glycyl-L-Histidyl-L-Lysine-Cu²⁺ in Rat Experimental Wounds", Journal of Clinical Investigation, Vol.92, No.5 pp. 2368-2376 (1993).
10. D. Godet, P. J. Marie, "Effects of the Tripeptide Glycyl-L-Histidyl-L-Lysine Copper Complex on Osteoblastic Cell Spreading, Attachment and Phenotype.", Cellular and Molecular Biology, Vol.41, No.8 pp. 1081-1091 (1995).
11. L. Pickart, J. H. Freedman, W. J. Loker, "Growth-modulating Plasma Tripeptide may Function by Facilitating Copper Uptake into Cells", Nature, Vol.288, No.5792 pp. 715-717 (1980).
12. J. J. Thiele, C. Schroeter, S. N. Hsieh, M. Podda, L. Packer, "The Antioxidant Network of the Stratum corneum", Current Problems in Dermatology, Vol.29, No.1 pp.26-42 (2001).
13. G. N. Lim, S. Y. Kim, M. J. Kim, S. N.

- Park, "Physical Characteristic and In vitro Transdermal Delivery of PCL-b-PEG Micelles Containing Quercetin and Rutin", *Polymer*, Vol.36, No.4 pp.420-426 (2012).
14. M. Alavi, N. Karimi, M. Safaei, "Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems", *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, Vol.7, No.1 pp.3-9 (2017).
 15. M. M. A. Elsayed, O. Y. Abdallah, V. F. Naggari, N. M. Khalafallah, "Lipid Vesicles for Skin Delivery of Drugs: Reviewing Three Decades of Research", *International Journal of Pharmaceutics*, Vol.332, No.1-2 pp.1-16 (2007).
 16. H. J. Lee, Y. W. Huang, S. H. Chiou, R. S. Aronstam, "Polyhistidine Facilitates Direct Membrane Translocation of Cell-penetrating Peptides into Cells", *Scientific Reports*, Vol.9, No.1 pp.93-98 (2019).
 17. E. Vive, P. Brodin, B. Lebleu, "A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus", *Journal of Biological Chemistry*, Vol.272, No.25 pp.16010-16017 (1997).
 18. K. Wang, X. Zhao, F. Yang, P. Liu, J. Xing, "Percutaneous Delivery Application of Acylated Steric Acid-9-P(arginine) Cell Penetrating Peptides Used as Transdermal Penetration Enhancer", *Journal of Biomedical Nanotechnology*, Vol.15, No.3 pp. 417-430, (2019).
 19. D. Yi, L. Guoming, L. Gao, L. Wei, "Interaction of Arginine Oligomer with Model Membrane", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.359, No.4 pp.1024-1029 (2007).
 20. W. Liang, D. Davalian, V. P. Torchilin, "Interaction of a Novel Peptoid Enhancer-Arginine Oligomer with Bovine Submaxillary Mucin", *Yao Xue Xue Bao*, Vol.39, No.12 pp.1011-1017 (2004).
 21. L. Mazurowska L, M. Mojski, "TBiological Activities of Selected Peptides: Skin Penetration Ability of Copper Complexes with Peptides", *International Journal of Cosmetic Science*, Vol.59, No.1 pp.59-69 (2008).
 22. M. H. Kim, "Skin Barrier and Protein", *The Journal of Skin Barrier Research*, Vol.11, No.1 pp. 28-34 (2009).
 23. T. J. Franz, "Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data", *Journal of Investigative Dermatology*, Vol.64, No.3 pp. 190-195 (1975).
 24. E. N. Kim, K. H. Park, B. H. Kim, G. S. Jeong, "Permeation Characteristics of Transdermal Preparations Containing Artemisiae Capillaris Herba in Franz Diffusion Cell", *Korean Journal of Pharmacognosy*, Vol.49, No.2 pp. 165-171 (2018).
 25. J. H. Kim, H. J. Yang, B. R. Won, Y. J. Ahn, M. K. Kang, S. N. Park, "Preparation of Vitamin E Acetate Nano-emulsion and In Vitro Research Regarding Vitamin E Acetate Transdermal Delivery System which Use Franz Diffusion Cell", *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, Vol.35, No.2 pp. 91-101 (2009).