

유산균 유래 엑소솜 유사 나노베지클의 피부 장벽 개선 효과

왕혜수[†] · 이광수 · 강용원^{††}

(주)바이오솔루션

(2021년 4월 29일 접수, 2021년 6월 3일 수정, 2021년 6월 13일 채택)

Skin Barrier Improvement Effect of Exosomal Nanovesicles Derived from Lactic Acid Bacteria

Hyesoo Wang[†], Kwang-Soo Lee, and Yong-Won Kang^{††}

Biosolution Co., Ltd., 804, Seoul Technopark, 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

(Received April 29, 2021; Revised June 3, 2021; Accepted June 13, 2021)

요약: 본 연구에서는 프로바이오틱스 유래 엑소솜 유사 나노베지클을 분리하고, 피부에 대한 여러 가지 생리활성을 평가했다. 프로바이오틱스의 한 종인 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LL)를 배양하고 고압균질기와 한외여과를 통해 70 ~ 200 nm 크기를 갖는 LL 유래 엑소솜 유사 나노베지클(LVs)을 분리했다. 나노입자추적분석 결과 1.81×10^{11} particles/mL로 나타났다. LVs를 섬유아세포와 피부각질세포에 처리하여 피부 주름과 장벽 개선과 관련된 효능을 확인했다. 우선 섬유아세포에서 fibrillin (FBN1) 유전자 발현량이 23%, 피부각질세포에서 fibronectin (FN1)과 filaggrin (FGN) 유전자 발현량이 각각 65%, 400% 증가했다. 그리고 각질형성능은 대조군 대비 30% 증가함을 확인할 수 있었다. 또한, UV 조사한 피부각질세포에 LVs를 처리했을 때 collagen type I alpha 1 (COL1A1)이 대조군 대비 약 83% 증가하는 결과를 보여주었다. 이로써 프로바이오틱스 유래 엑소솜 유사 나노베지클은 장벽 개선과 관련하여 화장품 및 의약품 소재로 이용할 수 있음을 확인했다.

Abstract: In this study, exosomal-like nano-vesicles derived from probiotics were isolated and various physiological activities were evaluated on the skin. This study show that *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LL) are incubated, and then isolated LL derived exosomal nanovesicles (LVs) at the range of 70 ~ 200 nm by high-pressure homogenizer and ultrafiltration. The vesicle numbers were an average of 1.81×10^{11} particles/mL. This study finds out the bacterial nanovesicles' beneficial effect on the skin. Fibrillin (FBN1) gene expression increased by 23% in fibroblast cells. Fibronectin (FN1) and filaggrin (FLG) gene expression increased by 65% and 400% in keratinocytes. We could see that cornified envelope (CE) formation ability was increased by 30% compared to the control group. Furthermore, collagen type I alpha 1 (COL1A1) protein expression increased by 83% compared to the UV-irradiated control group. These results suggest that LVs could help skin barrier improvement and used as an ingredient for cosmetics or pharmaceuticals.

Keywords: probiotics, exosome, nanovesicles, extracellular vesicles, skin barrier

[†] 주 저자 (e-mail: envi2308@biosolutions.co.kr)
^{††} 교신저자 (e-mail: alpover@biosolutions.co.kr)
call: 02-3446-8884

1. 서 론

프로바이오틱스는 ‘생명을 위한’이라는 뜻의 라틴어로 1965년 Lilly와 Stillwell에 의해 처음 정의되었다[1]. 2002년 Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO)에서 ‘적절한 양을 취했을 때 숙주에게 이로운 효과를 주는 살아있는 미생물’로 정의했다. 프로바이오틱스의 종류로는 대부분 유산균이 차지하고 있으며, 가장 많은 부분을 차지하고 있는 락토바실러스 속(*Lactobacillus* spp.)과 더불어 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* spp.), 락토코쿠스 속(*Lactococcus* spp.) 등이 포함된다. 이러한 프로바이오틱스들은 면역력 조절 및 아토피, 관절염, 고혈압 개선 등 다양한 효능을 갖는 것으로 보고됐다[2-5]. 특히 *Lactococcus lactis*의 경우 식물 혹은 동물의 위장에 존재하며, 항균과 피부 개선 등의 효능이 보고된 바 있다[6-8].

피부 개선 효능은 항노화 및 피부 장벽기능 개선을 통해 확인할 수 있다. 가장 바깥에 존재하는 표피의 각질층, 특히 최외각층인 피부 장벽은 보습을 유지하는 기능을 담당한다. 피부 장벽의 정상적인 각질 형성이 중요한데, 각질형성세포의 분열과 다양한 분화조절 인자에 영향을 받는다. 피부 장벽은 filaggrin, lorixin 등 여러 유전자와 단백질에 의해 유지되며, 이런 구조단백질의 결합으로 인해 단단한 구조인 각질세포막(comified cell envelop)이 형성된다[8,9]. 한편 진피가 갖고있는 콜라겐과 엘라스틴은 피부 구조 및 탄력을 유지하고, 피부를 보호하는 역할 또한 수행한다. 하지만 노화가 진행 되면 엘라스틴, 콜라겐 그리고 fibrillin의 합성량이 감소하게 되고 피부 구조가 약해진다. 결국 보호받지 못한 피부는 외부 자외선으로부터 활성산소가 유도되고 여러 신호 전달체계가 활성화 되어 수분손실과 탄력감소 등이 진행된다[10,11]. 이에 따라 피부 노화와 장벽 기능 개선을 위한 소재가 필요하다.

엑소솜 유사 나노베지클(nanovesicles)은 나노미터 크기의 소포체로, 인지질이중층 막으로 둘러싸여져 있으며 콜로이드 형태이다[12]. 미생물 특히 유산균 유래의 나노베지클은 유용 항균 물질 등을 포함하고 있어 다양한 형태로 연구되고 있으며[12,13], 세포 외 소포체(extracellular vesicles, EVs)를 포함하는 말로 세포 내부로부터 유래한다[14]. EVs는 50 ~ 200 nm 크기이며 DNA, RNA, 지질, 단백질 등 다양한 물질들을 포함하는 것으로 세포막에 의해 둘러 싸여 있다[15]. 이 세포 외 소포체는 다른 세포에 정보를 전달함으로써 영향을 주는 독특한 효능을 갖고 있으며, 질병 진단

및 치료제로써 큰 관심을 받고 있다[16,17]. 박테리아 유래 EVs는 1960년대 그람음성균인 *Escherichia coli* (*E. coli*)에서 처음 발견 되었다[18]. 그람양성균의 경우 비교적 최근에 발견 되었으며, 유산균 유래 EVs 또한 배양상등액으로부터 분리하여 그 특징과, 기능들이 밝혀지고 있다[19]. 그 예로는 *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*)의 EVs는 항우울 및 항아토피[20,21] 효능이, *Bifidobacterium longum* (*B. longum*)의 EVs는 음식물 알레르기 개선[22] 효능이, *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*)의 EVs는 간암세포 증식억제[23] 효능이 있는 것으로 밝혀져 있다. 하지만 유산균 유래 EVs와 관련 연구는 비교적 최근에 이루어지고 있으며, 시간 대비 분리 효율이 낮아 분리 방법에 관한 연구가 필요하다.

Lactococcus lactis subsp. *lactis* (LL)의 피부에 대한 연구는 밝혀져 있는 한편 LL 유래 엑소솜 모사 나노베지클과 관련된 연구는 미미한 실정이다. 이에 따라 본 연구에서는 생산 효율 및 효능의 증가를 위해 한외 여과방법을 이용하여 LL 유래 엑소솜 유사 나노베지클(LVs)을 고농도로 분리하고 그에 대한 특성을 분석하였다. 그리고 이로부터 형성된 LVs의 피부에 대한 항노화, 피부 장벽개선 효능을 확인하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 실험 재료 및 기기

고압균질기(high pressure homogenizer)는 MNP600P-300 (Micronox, Korea), 한외여과(ultrafiltration)는 Pellicon® 2 and 3 Mini Holder (Merck, Germany)를 사용하였다. 나노입자추적분석(nanoparticle tracking analysis, NTA)을 위한 기기로는 NanoSight NS-300 (Malvern NanoSight, Netherland), spectrophotometer는 Synergy HTX Multi Mode Reader (BioTek Instruments, Inc., USA)를 사용하였다.

2.2. 사용 균주

사용된 유산균은 Korean culture center of microorganisms (KCCM, Korea)에서 분양 받은 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (KCCM 40104, LL)를 사용하였으며, 동결 건조된 균주를 MRS broth (Difco, USA)에 접종하여 37 °C에서 24 h 씩 배양 후 다시 계대배양하고 20 % glycerol 용액에 현탁하고 -80 °C에 보관하여 실험에 이용하였다.

2.3. 발효 배양

LL를 계대배양하고, 계대 배양된 유산균을 fermenter

(Fermentec, Korea)를 이용하여 발효 배양을 하였다. 구체적으로 1 L volume의 de Man, Rogosa and Sharpe (MRS; BD, USA) 배지에 1% (v/v)를 접종하고 30 °C에서 24 h 배양하였다. 배양 종료 후 배양액을 4,000 rpm, 4 °C 조건아래서 30 min 원심분리를 하여 균체를 수득하였다.

2.4. 유산균 유래 엑소좀 유사 나노베지클 분리 및 분석

수득한 균체를 500 mL의 3 차 증류수에 현탁하고 고압 균질기를 이용해 용해하였다. 용해물을 원심분리와 0.45 μm membrane filter를 통해 세포 잔여물을 제거했다. 여과한 용해물은 TFF system과 PES 재질의 막을 이용해 한외여과하고 농축하였다. 마지막으로 수득된 농축액을 0.2 μm membrane filter를 이용해 여과하여 LL 유래 엑소좀 유사 나노베지클 (LVs)을 얻었다. NTA를 통해 나노 입자를 분석한 후 나머지는 동결 건조했으며 이를 효능 평가에 이용하였다.

2.5. 세포배양

Human dermal fibroblast (HDF)와 HaCaT는 한림대학교 생명과학과 분자면역학연구소(Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 세포는 HDF, HaCaT 각각 medium 106 (Thermo Fisher Scientific, Ireland)과 DMEM (WELGENE, Korea)배지에서 37 °C, 5% CO₂조건하에 배양하고 2 ~ 3 회 계대배양 후 실험에 이용하였다.

2.6. 세포 성장 및 세포 독성 시험

배양된 HDF, HaCaT을 각각 1 × 10⁵, 5 × 10⁴ cell/mL의 농도로 96 well plate에 분주하고, 24 h 배양하였다. LVs를 0.001 ~ 0.02% (v/v)의 농도로 처리한 후 다시 48 h 배양했다. 세포 성장 및 세포 독성 확인 시험은 cell counting kit-8 (CCK-8, Dojindo, USA.)와 cytotoxicity LDH assay kit-WST (Dojindo, USA.)를 이용했으며 제조사의 방법에 따라 시험하였다. 구체적으로 세포 배양 후 상등액만을 이용하여 LDH solution과 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하고, plate에 남아있는 cell과 CCK-8를 반응시켜 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 아래 식에 따라서 세포 성장을 및 독성율을 계산하였으며, 대조군은 lysis buffer이다.

$$\text{세포 성장 (\%)} = \frac{OD(\text{시료 첨가군})}{OD(\text{시료 무첨가군})} \times 100$$

$$\text{세포 독성 (\%)} = \frac{OD(\text{시료 첨가군}) - OD(\text{시료 무첨가군})}{OD(\text{대조군}) - OD(\text{시료 무첨가군})} \times 100$$

2.7. 피부 탄력 및 장벽 관련 유전자 발현 측정

LVs가 피부 탄력 및 장벽과 관련된 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 섬유아세포에서 fibrillin (FBN1)과 피부각질세포에서 fibronectin (FN1), filaggrin (FLG)의 유전자 발현량을 확인하였다. 세포를 24 well plate에 분주하고 24 h 배양한 후 시료를 처리하고 48 h 추가 배양하였다. 시료의 농도는 0.001% (v/v)가 되게 하였다. 상등액을 제거하고 TaKaRa MiniBEST Universal RNA extraction kit (TaKaRa, Japan)를 이용해 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA의 순도를 위해 A₂₆₀/A₂₈₀ ratio를 측정하였으며, 260 nm 측정값을 이용해 RNA를 정량 하였다. cDNA 합성을 위해 정량한 RNA와 amfiRivert cDNA synthesis platinum master mix (GenDEPOT, USA)를 섞어 사용한다. 60 °C에서 1 min 간 RNA denaturation, 25 °C에서 5 min 간 annealing, 42 °C에서 60 min 간 extend, 85 °C에서 1 min 간 reverse transcriptase inactivation시켰다. 그리고 합성된 cDNA를 증폭하기 위해 cDNA, primer 그리고 LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master Mix (Roche, Swiss)를 섞었고, LightCycler[®] 480 System을 이용해 qRT-PCR을 진행하였다. 각 primer 서열은 Table 1과 같다.

2.8. Enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA)를 이용한 콜라겐 단백질 생성 측정

LVs의 콜라겐 단백질 생성 측정을 위해, 광노화된 피부 각질세포에 LVs를 처리하고 콜라겐(collagen type I alpha 1, COL1A1) 생성 변화를 확인하였다. 세포를 24 well plate에 분주하고 24 h 배양한 후 시료를 처리한 후 48 h 배양한다. 시료의 농도는 제일 낮은 농도인 0.001% (v/v)로 했다. 그 후 배양배지를 DPBS (Capricorn, Germany)로 교체하고 UVB 5 mJ/cm²을 조사한 후 배양 배지에서 24 h 추가 배양했다. 비교를 위해 UV 조사 군과 비조사군으로 나누어 실험을 진

Table 1. Forward and Reverse Primer PCR Sequence for qRT-PCR

| Gene | | Primer sequence |
|-------|---------|-------------------------------|
| FLG | Forward | 5'-CGGGTTTAGACTCTCAGCA-3' |
| | Reverse | 5'-GCCACATAAACCTGGGTCCTT-3' |
| FN1 | Forward | 5'-GCCAGTCCTACAACCAGTATTC-3' |
| | Reverse | 5'-CTCGGGAATCTTCTCTGTCAG-3' |
| FBN1 | Forward | 5'-TATCACCCAGTTCACCACTGAG-3' |
| | Reverse | 5'-AAAGAAGAAGCCAGTGGCTGGA-3' |
| GAPDH | Forward | 5'-CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3' |
| | Reverse | 5'-AGTGGTCGTTGAGGGCAATGC-3' |

행했으며, 시료 처리 후 72 h 배양했다. 그리고 상등액만을 취하고 효소면역측정법(ELISA)를 이용해 발현량을 측정하였다. ELISA는 human pro-collagen I alpha 1 DuoSet ELISA (R&D Systems, USA)를 이용하였으며, 실험방법은 제조사의 방법에 따랐다. 대조군은 시료를 처리하지 않은 군이다.

2.9. Cornified Envelop (CE) 단백질 형성 확인

LVs의 각질형성능을 측정하기 위하여 cornified envelope assay를 수행하였다. HaCaT 세포를 6 well plate에 분주하고 24 h 동안 배양해 세포가 100% 밀집 상태가 되게 하였다. 0.001% (v/v)의 시료를 처리한 후 6 일 간 배양하였고, 시료는 3 일 마다 재처리 하였다. 6 일 후 DPBS를 이용해 세포를 세척하고, 2% SDS solution을 150 μ L씩 처리하였다. 5 min 간 ice에서 반응시킨 후, 세포들을 1.5 mL tube에 scraper로 수득하고 5 s 간 초음파 파쇄 하였다. 그리고 BCA protein assay kit (iNtRON biotechnology, Korea)를 이용해 단백질을 정량 했다. 나머지는 13,000 rpm, 20 min 조건 아래 원심분리 하고 상등액을 제거했다. Pellet에 20 mM DTT in 2% SDS solution을 100 μ L씩 각각 첨가하고, 90 °C에서 20 min 동안 끓여 주었다. 그리고 이를 96 well plate에 옮긴 후, spectrophotometer를 이용하여 310 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 Ca^{2+} 을 처리한 것으로 했다.

2.10. 통계 분석

본 실험에서는 3 회 반복 실험을 진행하여 결과를 평균값으로 나타냈다. 통계적 유의성은 student's *t*-test를 사용하여 $p < 0.05$ 의 신뢰수준에서 검증하였다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3. 결과 및 고찰

3.1. 유산균 유래 나노베지클 특성 분석

NTA 방식으로 나노 입자를 측정하였고, 분석은 NS300 소프트웨어를 통해 자동 분석했다. 분석한 결과 70 ~ 200 nm 크기로, 최빈값은 115 nm 인 것으로 나타났다. 입자 수는 1.81×10^{11} particles/mL로 나타났다(Figure 1, Table 2).

3.2. 세포 성장 및 독성 측정

LVs의 안전성을 확인하기 위해 세포 성장 및 세포 독성 시험을 진행하였다. 먼저 CCK-8을 이용한 세포 성장 측정을 진행했을 때 LVs 실험 농도 모두 세포 증식을 확인했다. HaCaT과 HDF 세포에서 세 농도 모두 심각한 세포 성장 억제능을 보이지 않았으며, 특히 HaCaT 세포에 고농도를 처리했을 때는 20% 이상의 증식률을 보여주었다. 세포 독성 시험(LDH assay) 결과 실험 농도 모두 세포 독성이 없음을 확인하였다. 이로 LVs를 이용한 실험에서 세포 성장 억제 및 독성에 의한 영향은 없으며, 화장품 등에 이용할 수 있는 안전한 원료임을 확인했다(Figure 2, 3).

Table 2. Results of Nanoparticle Tracking Analysis

| | |
|--------------------|------------------------------------|
| Mean peak diameter | 129.8 nm |
| Mode peak diameter | 114.1 nm |
| D10 | 100.9 nm |
| D50 | 121.1 nm |
| D90 | 171.8 nm |
| Concentration | 1.81×10^{11} particles/mL |

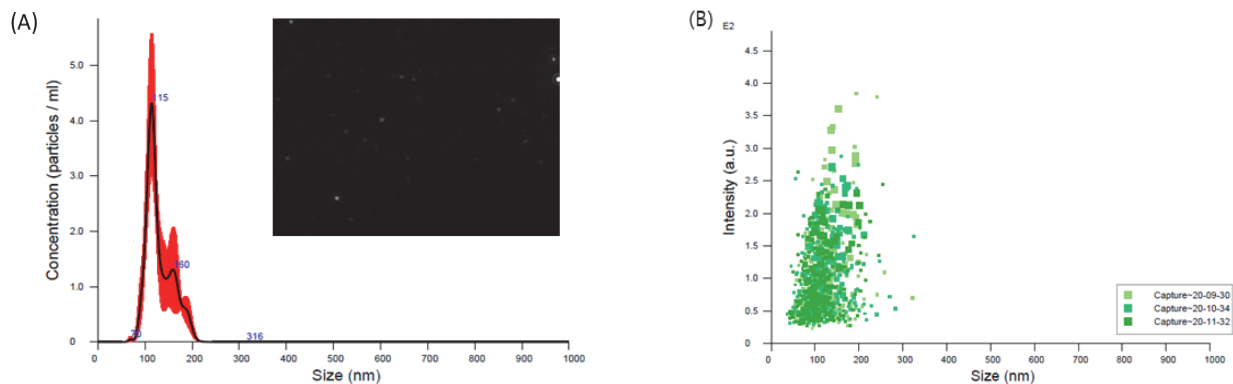


Figure 1. Characterization of exosomal nanovesicles isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LL) (A) Representative graph shows particle concentration and their size measurements. (B) The scattering distributions are presented from three consecutive 30 s runs for nanoparticles.

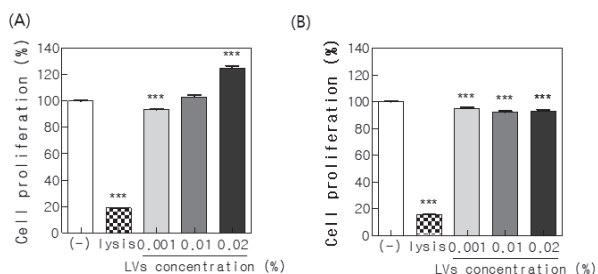


Figure 2. Effect of LVs on the cell viability. (A) HaCaT, (B) HDF. (-); non-treated, lysis; lysis buffer treated, LVs; LVs treated. The results are expressed as the mean \pm SD (N = 3). *** $p < 0.001$ compared with non-treated.

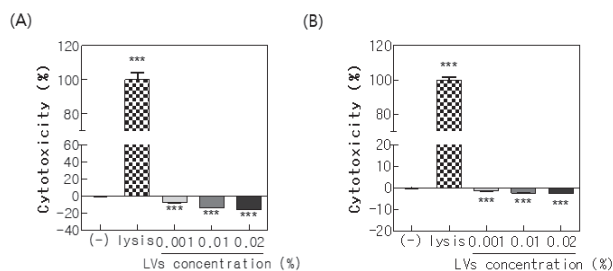


Figure 3. Effect of LVs on the cell cytotoxicity. (A) HaCaT, (B) HDF. (-); non-treated, lysis; lysis buffer treated. LVs; LVs treated. The results are expressed as the mean \pm SD (N = 3). *** $p < 0.001$ compared with non-treated.

3.3. 유전자 발현량 확인

3.3.1. FBN1 유전자 발현 증가 효능

Fibrillin (FBN1)은 collagen type I alpha 1 (COL1A1), fibronectin (FNI)과 함께 세포 외 기질의 중요한 구성 요소이며, 탄력섬유로써 피부 탄력과 보습 인자로 많이 알려져 있다[24,25]. 따라서 FBN1 유전자 발현 확인을 통해 LVs의 피부 탄력에 관한 효능을 평가했다. 섬유아세포에 LVs를 처리했을 때 FBN1 유전자 발현은 Figure 4와 같다. 유전자 발현이 대조군 대비 약 23% 증가함을 확인하였다. 이에 따라 LVs는 피부 자극 없이 탄력 회복하는 것에 도움이 될 것으로 생각된다.

3.3.2. FNI, FLG 유전자 발현 증가 효능

FNI은 세포외 기질의 당단백질로 피부 구조 유지에 중요하여 상처치유 및 장벽 개선, 주름 예방에 매우 중요한 역할을 하고 있다[26-28]. Filaggrin (FLG)은 FNI과 마찬가지로 장벽에 중요한 역할을 하며, FLG 결핍은 천연보습인자(natural moisturizing factors, NMF)가 감소되고 아토피 피

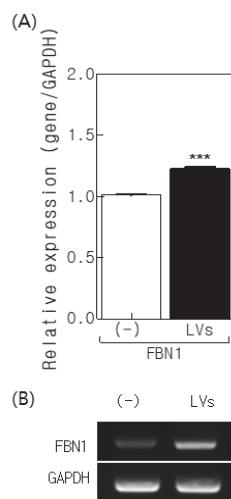


Figure 4. Effect of LVs on fibrillin (FBN1) gene expression. (A) mRNA expressions of FBN1 were measured by qRT-PCR, (B) RT-PCR for FBN1 mRNA. (-); non-treated, LVs; LVs treated (0.001%). The results are expressed as the mean \pm SD (N = 3). *** $p < 0.001$ compared with non-treated.

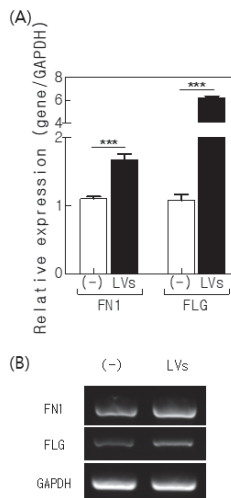


Figure 5. Effect of LVs on fibronectin (FNI) and filaggrin (FLG) gene expression. (A) mRNA expressions of FNI and FLG were measured by qRT-PCR, (B) RT-PCR for FNI and FLG mRNA. (-); non-treated, LVs; LVs treated (0.001%). The results are expressed as the mean \pm SD (N = 3). *** $p < 0.001$ compared with non-treated.

부염을 유발한다고 밝혀져 있다[29,30]. 이에 따라 피부세포에 LVs를 처리해 FNI과 FLG 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하여 피부 장벽에 관한 효능을 평가했다. Figure 5와 같이 LVs을 처리함에 따라 대조군 대비 FNI 유전자는

약 65%, FLG은 400% 이상 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 LVs는 FNI 발현을 증가시켜 장벽 및 주름 개선에 도움을 줄 것으로 생각한다.

3.4. 피부 세포에서 콜라겐 단백질 생성량 증가 확인

Type I collagen은 type III와 함께 피부 표피 구조를 지지해주는 주요한 콜라겐이며, 피부 항노화와 탄력 인자로 널리 알려져 있다[31]. 특히 자연 노화 혹은 자외선에 의한 광노화 때문에 피부의 콜라겐이 분해되어 주름이 생성된다. 이에 따라 광노화 된 피부각질세포와 일반 피부각질세포에서 콜라겐 생성에 미치는 영향을 확인할 수 있다[32,33]. LVs가 콜라겐 생성에 미치는 영향은 Figure 6에서 확인할 수 있다. UV 비 조사 군에서는 45%, UV 조사 군에서는 83%로 현저하게 증가함을 보여주었다. 따라서 LVs는 피부 탄력 및 항노화에 도움을 줄 것으로 생각되며, 특히 자외선에 의한 광노화를 개선시킬 것으로 판단된다.

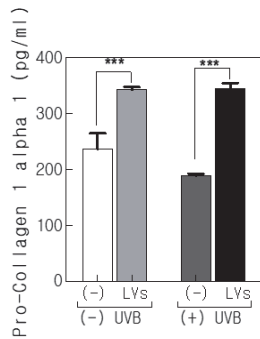


Figure 6. Effect of LVs on collagen type 1 (COL1A1) expression. (-); non-treated, LVs; LVs treated (0.001%). The results are expressed as the mean \pm SD (N = 3). *** $p < 0.001$ compared with non-treated.

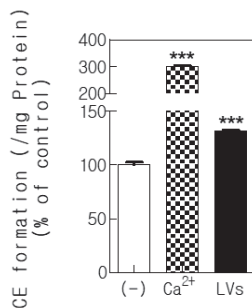


Figure 7. Effect of LVs on cornified envelop (CE) formation. (-); non-treated, Ca²⁺; Ca²⁺ treated, LVs; LVs treated (0.001%). The results are expressed as the mean \pm SD (N = 3). *** $p < 0.001$ compared with non-treated.

3.5. Cornified Envelop 형성능 확인

피부각질세포는 피부장벽기능에 중요한 역할을 하며 피부 기저층에서부터 각질층까지 분화가 이루어지게 되어 있다[34]. 분화 마지막 과정에서 Ca²⁺ 농도가 높아지면 lorixin, filaggrin (FLG)과 같은 인지질의 분화가 유도된다. 여기서 FLG은 피부의 탄탄한 장벽인 cornified envelop (CE) 형성에 중요한 역할을 한다[30]. 피부각질세포의 분화능을 확인하기 위해 CE 형성능 확인 시험을 진행하였다. LVs의 처리함 따라 약 30% 증가되는 것을 확인했으며, CE 형성능을 확인할 수 있었다(Figure 7). 따라서 LVs가 피부 장벽 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

4. 결 론

유산균은 장 건강을 포함해 면역력을 개선하고 다양한 질병 예방의 효능이 알려지면서 큰 관심을 받고 있다. 또한 피부상태 개선에 대한 효능이 알려지면서 화장품 소재로 널리 쓰이고 있다[35,36]. 이에 반해, 사균, 여과물 및 용해물을 끝으로 종류에 한계에 부딪혀 있는 것이 현실이다. 엑소좀 또한 유산균과 더불어 여러 효능이 밝혀지면서 최근 큰 주목을 받고 있다. 본 연구에서도 유산균 유래 엑소좀 유사 나노베지클을 이용해 피부에 대한 효능을 확인하였지만, 아직 많은 연구가 이루어지지 않아 밝혀야 할 부분들이 더 많다. 따라서 지속적인 연구를 통해서 엑소좀 유사 나노베지클의 특성 및 분석과 관련된 연구가 요구된다.

본 연구에서는 유산균 중 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 유래 엑소좀 유사 나노베지클을 대상으로 하여 연구를 진행했다. 먼저 엑소좀 유사 나노베지클을 분리하고, NTA를 통해 그 특성을 확인하였다. 피부 장벽과 관련된 FNI, FLG 유전자 발현량을 확인했을 때 LVs가 발현량을 현저하게 증가시켰고, 피부각질세포의 분화를 촉진해 피부 각질형성능이 증가하였다. 이는 피부 장벽을 이루고 있는 단백질 및 그에 대한 유전자 발현을 증가시켜 손상된 피부의 기능 회복에 도움을 줄 것으로 판단된다. 그리고 노화와 관련된 FBN1 유전자 발현 및 콜라겐 생성량이 LVs 처리에 의해 현저하게 증가한 것을 알 수 있었다. 이로 인해 노화로 감소한 탄력과 주름의 개선 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

결론적으로 유산균 유래 엑소좀 유사 나노베지클은 피부 상태 개선을 위한 신규 원료로서 화장품 혹은 코스메슈티컬 분야에 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

References

1. D. M. Lilly and R. H. Stillwell, Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms, *Science*, **147**(3659), 747 (1965).
2. M. G. Gareau, P. M. Sherman, and W. A. Walker, Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **7**(9), 503 (2010).
3. G. Q. Zhang, H. J. Hu, C. Y. Liu, Q. Zhang, S. Shaky, and Z. Y. Li, Probiotics for prevention of atopy and food hypersensitivity in early childhood: a PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Medicine (Baltimore)*, **95**(8), e2562 (2016).
4. A. M. Watts, N. P. West, P. K. Smith, A. W. Cripps, and A. J. Cox, Probiotics and allergic rhinitis: a Simon two-stage design to determine effectiveness, *J Altern Complement Med*, **22**(12), 1007 (2016).
5. M. He and B. Shi, Gut microbiota as a potential target of metabolic syndrome: the role of probiotics and prebiotics, *Cell Biosci.*, **7**, 54 (2017).
6. A. Bolotin, P. Wincker, S. Mäuger, O. Jaillon, K. Malarme, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, and A. Sorokin, The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403, *Genome Res.*, **11**(5), 731 (2001).
7. H. Kimoto-Nira, R. Aoki, K. Sasaki, C. Suzuki, and K. Mizumachi, Oral intake of heat-killed cells of *Lactococcus lactis* strain H61 promotes skin health in women, *J. Nutr. Sci.*, **1**, e18 (2012).
8. A. A. Kadhim, J. A. S. Salman, and A. Haider, Antibacterial and anti virulence factors activity of ZnO nanoparticles biosynthesized by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Indian J. Public Health Res. Dev.*, **9**(12), 1228 (2018).
9. J. Nam and C. S. Park, Effect of *Chrysanthemum zawadskii* and *Mentha arvensis* on skin barrier function via keratinocytes differentiation, *2021 KSBB Spring Meeting & International Symposium*, Changwon, 254 (2012).
10. G. Bertuccelli, N. Zerbinati, M. Marcellino, N. S. Nanda Kumar, F. He, V. Tsepakolenko, J. Cervi, A. Lorenzetti, and F. Marotta, Effect of a quality-controlled fermented nutraceutical on skin aging markers: an antioxidant-control, double-blind study, *Exp. Ther. Med.*, **11**(3), 909 (2016).
11. S. H. So, S. K. Lee, E. I. Hwang, B. S. Koo, G. H. Han, and N. M. Kim, Effects of Korean red ginseng and herb extracts mixture (KING0345) on procollagen biosynthesis and matrix metalloproteinase-1 activity in human dermal fibroblast, *J Ginseng Res.*, **31**(4), 196 (2007).
12. P. S. Malheiros, I. M. Cuccovia, and B. D. G. M. Franco, Inhibition of *Listeria monocytogenes* *in vitro* and in goat milk by liposomal nanovesicles containing bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, *Food Control*, **63**, 158 (2016).
13. R. Laridi, E. E. Kheadr, R. O. Benech, J. C. Vuilleumard, C. Lacroix, and I. Fliss, Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation, *Int. Dairy J.*, **13**(4), 325 (2003).
14. H. J. Johansson, H. Vallhov, T. Holm, U. Gehrman, A. Andersson, C. Johansson, H. Blom, M. Carroni, J. Lehtio, and A. Scheynius, Extracellular nanovesicles released from the commensal yeast *Malassezia sympodialis* are enriched in allergens and interact with cells in human skin, *Sci. Rep.*, **8**, 9182 (2018).
15. L. Macia, R. Nanan, E. Hosseini-Beheshti, and G. E. Grau, Host- and microbiota-derived extracellular vesicles, immune function, and disease development, *Int J Mol Sci*, **21**(1), 107 (2019).
16. D. S. Choi, J. S. Yang, E. J. Choi, S. C. Jang, S. Park, O. Y. Kim, D. Hwang, K. P. Kim, Y. K. Kim, S. Kim, and Y. S. Gho, The protein interaction network of extracellular vesicles derived from human colorectal cancer cells, *J. Proteome Res.*, **11**(2), 1144 (2012).
17. A. Bobrie, M. Colombo, G. Raposo, and C. Théry, Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses, *Traffic*, **12**(12), 1659 (2011).
18. K. W. Knox, M. Vesik, and E. Work, Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*, *J Bacteriol.*, **92**(4), 1206 (1966).
19. E. Y. Lee, D. Y. Choi, D. K. Kim, J. W. Kim, J. O. Park, S. Kim, S. H. Kim, D. M. Desiderio, Y. K. Kim, K. P. Kim, and Y. S. Gho, Gram-positive bacteria produce

- membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles, *Proteomics*, **9**(24), 5425 (2009).
20. J. Choi, Y. K. Kim, and P. L. Han, Extracellular vesicles derived from *Lactobacillus plantarum* increase BDNF expression in cultured hippocampal neurons and produce antidepressant-like effects in mice, *Exp. Neurobiol.*, **28**(2), 158 (2019).
 21. M. H. Kim, S. J. Choi, H. I. Choi, J. P. Choi, H. K. Park, E. K. Kim, M. J. Kim, B. S. Moon, T. K. Min, M. Rho, Y. J. Cho, S. Yang, Y. K. Kim, Y. Y. Kim, and B. Y. Pyun, *Lactobacillus plantarum*-derived extracellular vesicles protect atopic dermatitis induced by *Staphylococcus aureus*-derived extracellular vesicles, *Allergy Asthma Immunol Res.*, **10**(5), 516 (2018).
 22. J. H. Kim, E. J. Jeun, C. P. Hong, S. H. Kim, M. S. Jang, E. J. Lee, S. J. Moon, C. H. Yun, S. H. Im, S. G. Jeong, B. Y. Park, K. T. Kim, J. Y. Seob, Y. K. Kim, S. J. Oh, J. S. Ham, B. G. Yang, and M. H. Jang, Extracellular vesicle-derived protein from *Bifidobacterium longum* alleviates food allergy through mast cell suppression, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **137**(2), 507 (2016).
 23. E. Behzadi, H. M. Hosseini, and A. A. I. Fooladi, The inhibitory impacts of *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived extracellular vesicles on the growth of hepatic cancer cells, *Microb. Pathog.*, **110**, 1 (2017).
 24. E. F. Bernstein, Y. Q. Chen, K. Tamai, K. J. Shepley, K. S. Resnik, H. Zhang, R. Tuan, A. Mauviel, and J. Uitto, Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin, *J Invest Dermatol.*, **103**(2), 182 (1994).
 25. L. Y. Sakai, D. R. Keene, and E. Engvall, Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils, *J. Cell Biol.*, **103**(6), 2499 (1986).
 26. M. B. Johnson, B. Pang, D. J. Gardner, S. Niknam-Benia, V. Soundarajan, A. Bramos, D. P. Perrault, K. Banks, G. K. Lee, R. Y. Baker, G. H. Kim, S. Lee, Y. Chai, M. Chen, W. Li, L. Kaong, Y. K. Hong, and A. K. Wong, Topical fibronectin improves wound healing of irradiated skin, *Sci Rep.*, **7**(1), 1 (2017).
 27. F. Samad, K. Yamamoto, M. Pandey, and D. J. Loskutoff, Elevated expression of transforming growth factor- β in adipose tissue from obese mice, *Mol. Med.*, **3**(1), 37 (1997).
 28. A. P. M. Serezani, G. Bozdogan, S. Sehra, D. Walsh, P. Krishnamurthy, E. A. S. Potchanant, G. Nalepa, S. Goenka, M. J. Turner, D. F. Spandau, and M. H. Kaplan, IL-4 impairs wound healing potential in the skin by repressing fibronectin expression, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **139**(1), 142 (2017).
 29. A. Sandilands, C. Sutherland, A. D. Irvine, and W. H. I. McLean, Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease, *J. Cell Sci.*, **122**(9), 1285 (2009).
 30. S. Kezic and I. Jakasa, Filaggrin and skin barrier function, *Curr Probl Dermatol.*, **49**, 1 (2016).
 31. A. S. Wang and O. Dreesen, Biomarkers of cellular senescence and skin aging, *Front. genet.*, **9**, 247 (2018).
 32. J. Y. Ryu, S. J. Rhie, K. H. Lim, Y. E. Choi, H. S. Han, H. O. Yang, and E. J. Na, Inhibitory effects of prunin on photo-aging in human keratinocytes (HaCaT) damaged by UVB radiation, *Asian J Beauty Cosmetol.*, **17**(1), 139 (2019).
 33. E. J. Na, H. O. Yang, Y. E. Choi, H. S. Han, S. J. Rhie, and J. Y. Ryu, Anti-inflammatory and collagen production effect of syringic acid on human keratinocyte (HaCaT) damaged by ultraviolet B, *Asian J Beauty Cosmetol.*, **16**(4), 523 (2018).
 34. A. C. Steven and P. M. Steinert, Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes, *J. Cell Sci.*, **107**(Pt2), 693 (1994).
 35. W. S. Choi, H. S. Kwon, H. W. Lim, R. W. No, H. Y. Lee, Whitening effects of *Lactobacillus rhamnosus* associated with its antioxidative activities, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **41**(2), 183 (2013).
 36. S. Puebla-Barragan and G. Reid, Probiotics in cosmetic and personal care products: trends and challenges, *Molecules*, **26**(5), 1249 (2021).