

## 알로에 형성층 유래 줄기세포 추출물의 항산화 활성 및 피부탄력 개선 효과

김 동 명<sup>\*,\*\*\*,†</sup> · 김 원 진<sup>\*\*</sup> · 이 형 곤<sup>\*</sup> · 권 용 성<sup>\*</sup> · 최 연 매<sup>\*\*\*,†</sup>

<sup>\*</sup>(주)케이제이엠바이오 연구소

<sup>\*\*</sup>KAIST 생명과학과, 연구원

<sup>\*\*\*</sup>(주)김정문알로에

(2023년 5월 24일 접수, 2023년 6월 28일 수정, 2023년 6월 30일 채택)

### Effect of Skin Elasticity Improvement and Anti-oxidant Activity of Stem Cells Extract Derived from Cambium of Aloe

Dong-Myong Kim<sup>1,3</sup>, Won-Jin Kim<sup>2</sup>, Hyung-Kon Lee<sup>1</sup>, Yong-Seong Kwon<sup>1</sup>, and Yeon-Mea Choi<sup>3,†</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Research Institute, KJMBIO Ltd., 5F, 17 Saimdang-ro, Seocho-gu, Seoul, 06649, Korea

<sup>2</sup>Department of Biological Science, KAIST

<sup>3</sup>KimJeongMoon Aloe Ltd.

(Received May 24, 2023; Revised June 28, 2023; Accepted June 30, 2023)

**요약:** 본 연구는 알로에 형성층으로부터 유도된 캘러스에서 줄기세포를 추출하고, 이에 대한 항산화 활성 및 피부 탄력 개선효과를 확인하고자 하였다. 알로에 형성층 유래 줄기세포 추출물 AloStem과 캘러스의 세포 생존율을 확인한 결과, AloStem은 98.27%, 캘러스는 71.31%의 세포가 생존하는 것으로 확인되었다. AloStem의 DPPH 항산화 활성을 측정한 결과, 알로에 추출물보다 AloStem에서 2 배 이상의 항산화 효과를 가지는 것으로 확인되었다. AloStem이 함유된 겔에 대한 인간진피섬유아세포의 독성을 확인한 결과, 0.25% 농도까지 영향을 미치지 않았으며, elastin, COL1A1 및 HAS2 mRNA 발현량을 증가시켰다. 또한, AloStem이 함유된 시트마스크를 이용하여 피부 탄력 리프팅 효과에 대한 임상적 연구를 성인남녀 21 명을 대상으로 2 주간 진행한 결과, 피부 길이가 시트마스크 사용 전에는 116.75 ± 5.58 mm로 나타났으나, 2 주 사용 후에는 117.44 ± 5.17 mm 로 0.59%가 증가된 것으로 확인되어 AloStem을 함유한 시트마스크는 탄력 개선에 의한 리프팅 효과에 도움을 주는 것으로 최종 확인되었다.

**Abstract:** In this study, stem cells were extracted from the callus derived from the aloe cambium, and the antioxidant activity and effect of skin elasticity improvement were assessed. The aloe cambium-derived stem cell extract, AloStem and callus showed the survival rate of each 98.27% and 71.31%. In the results of the DPPH antioxidant activity of AloStem and aloe extract, it was confirmed that the antioxidant effect of AloStem was more than twice that of Aloe extract. AloStem did not affect the cytotoxicity of normal human dermal fibroblasts (NHDF) cells up to 0.25% concentration. Also, AloStem increased elastin, COL1A1 and HAS2 mRNA expression levels dose-dependently. Furthermore, to examine lifting effect of skin elasticity using a sheet mask containing AloStem, 21 adult men and women applied the sheet mask in the face, once a day for 2 weeks. As a result, after 2 weeks the skin length was 116.75 ± 5.58 mm before the use of the sheet mask, but after 2 weeks of use, it was confirmed that 0.59% increased to 117.44 ± 5.17 mm. Thus, we concluded that the sheet mask containing AloStem can help the lifting effect of skin elasticity.

**Keywords:** aloe, cambium, stem cell, antioxidant activity, skin elasticity

† 교신저자 (e-mail: davidkim@aloe.co.kr)  
call: 02-405-6167

## 1. 서 론

급속도로 발전한 경제 성장, 생활 수준의 향상 및 보건 의료 기술의 발달로 인해 인간의 수명이 연장되면서 이제는 단순히 오래 사는 삶이 아니라 건강하게 오래 사는 삶에 대한 관심이 늘어나고 있다[1]. 특히, 피부 노화는 인간이면 누구나 피할 수 없는 신체의 자연적인 현상이기 때문에 사람들은 피부 미용에 많은 관심을 두고 아름답고 건강한 삶을 유지하려고 한다. 이에, 화장품 분야에서는 노화로 인한 피부의 기능저하를 지연시키거나, 노화과정에서 손상된 피부의 기능을 재생시키기 위한 안티에이징과 같은 고기능성 화장품의 선호도가 증가하고 있다[2]. 이에 따라 제약 및 바이오 기업들은 줄기세포 배양기술이나 엑소좀 추출기술 등과 같은 바이오 기술력을 바탕으로 유전자, 단백질, 세포 등을 이용한 고기능성 제품 개발에 초점을 두고 있다[3-5]. 특히, 줄기세포배양액에는 다양한 성장 인자가 포함되어 있어 주름 개선 및 상처 치유에도 효과가 있다고 알려져 있다[6,7]. 그러나 줄기세포배양액을 화장품 원료로 이용한 연구는 아직 미진한 실정이며, 기존에 보고된 연구들 또한 세포실험 수준에서의 효능 평가가 대부분으로 인체적용시험은 거의 전무한 실정이다.

알로에(*Aloe vera*)는 백합과(Liliaceae)에 속하는 열대 또는 아열대 다년생 식물로서 세계 전역에서 재배되고 있으며, 그 종류만도 300 ~ 360 여 종에 달하고 있다. 국내에서 주로 재배되고 있는 품종은 알로에 베라(*Aloe vera*)와 알로에 아보레센스(*Alloe avoresence*)이다[8-10]. 알로에 짙은 99%가 수분이며, 영양성분은 만노오스(mannose), 글루코오스(glucose)가 주성분인 다당류와 글루탐산(glutamic acid), 아르기닌(arginine), 아스파라진(asparagine) 등의 아미노산 그리고  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$  등의 무기질 등을 함유하고 있다. 또한, 생리활성 물질로는 알로에 에모딘(aloe emodine), 바발로인(barbaloin), 알로에신(aloesin) 등의 페놀화합물과 스테롤(sterol) 및 테페노이드(terpenoid) 등이 있으며[11,12], 항산화 활성, 항균 작용, 항종양 작용, 살균 작용, 소염 작용, 조직 형성 작용 등이 있는 것으로 알려져 있어 예로부터 민간요법으로 화상, 피부 질환, 소화기계 질병 치료로 사용되고 있고 난치성 성인병의 예방 및 개선치료에 효능이 있는 것으로 알려져 있다[13,14].

따라서 본 연구진은 알로에 줄기세포로부터 형성층을 채취하여 캘러스를 유도 후 균질화한 세포주를 분리함으로써 유용한 알로에 줄기세포가 안정적으로 증식되고, 다양한

조직 또는 세포로의 분화능을 확인함과 동시에 배양 시 변이가 없음을 확인하고, 탈분화에 의한 변이의 문제를 해결하고 안정적으로 증식이 가능한 유전적 안정성이 높은 알로에 줄기세포를 확보하였다. 더불어 알로에 형성층 유래 줄기세포 배양액 및 이의 추출물을 이용하여 항산화 활성 및 *in vitro*와 임상연구를 통해 피부탄력 개선에 대한 시험을 진행하고자 하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 알로에 형성층 유래 줄기세포 유도

#### 2.1.1. 알로에 줄기세포로부터 형성층 채취단계

제주도 성산읍에 위치한 (주)김정문알로에 제주 농공장(Korea)으로부터 3 내지 5 개월 생육한 알로에 유묘를 20 척 정도 샘플로 수집하여 충남대학교 식물조직배양실에서 알로에 유묘의 줄기세포로부터 형성층을 채취하였다. 채취한 재료들은 NaOCl (30%클로락스) +  $H_2O_2$  (10% 과산화수소수)에 1 ~ 3 min간 표면살균을 수행한 후 1% 하이포아염소산나트륨 용액에 48 h 침적시킨 후 멸균수로 3 ~ 4 회 세척하여 알로에 줄기세포로부터 형성층만을 채취하여 실험재료로 사용하였다. 이때 알로에 유묘의 줄기는 0.5 ~ 1 cm 정도의 크기로 횡단하여 자른 후 디스크로 만들어 형성층의 횡단면이 배지의 표면에 닿도록 하였다(Figure 1).

#### 2.1.2. 캘러스 유도배지에서 알로에 형성층으로부터

##### 캘러스 유도단계

알로에의 유묘 줄기에서 채취한 형성층에서 캘러스를 유도하기 위하여 MS 기본배지[15]에 제조하고 3% sucrose와 0.7% agar를 첨가한 후, 0.25% gelrite와 식물생장조절물질인 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (1 ~ 2 mg/mL)와 indole-3-acetic acid (IAA)를 첨가하여 시험배지를 조제하여 pH 5.7로 조정하였다. 실험에 사용한 모든 배지는 121 °C, 1.2 기압에서 15 min간 고압 멸균하여 사용하였고, 멸균된 배지는 약 25 ~ 30 mL씩 페트리디쉬(petridish)에 분주하여 굳힌 후, 표면살균 과정을 거친 알로에 형성층 절편을 치상하였다. 실험재료의 배양은 25 ± 3 °C의 암배양 조건하에서 수행하였다(Figure 1).

#### 2.1.3. 세포 증식배지에서 캘러스의 현탁배양을 통한

##### 세포증식 단계

배양 30 일 경과 후부터 배양된 형성층과 캘러스층으로

분리되기 시작하였다. 두 층이 자연스럽게 분리될 때까지 기다려 완벽히 분리가 되면 각기 다른 페트리디쉬에 분리 배양하였고 분리 후, 생장률이 좋은 신생 캘러스 부분을 떼어내어 새로운 배지에서 7 ~ 10 일 정도 계대배양 하였다. 고체배지에서 계대배양 후 분리한 형성층 유래 줄기세포를 아래의 MS현탁액배지가 함유된 플라스크에 넣어 암조건에서 25 ± 3 °C에서 100 rpm의 회전 교반기(shaker)에서 배양하였다. 계대배양 주기는 45 일 내외로 하여 배양세포가 항상 대수성장기 상태에서 높은 활력을 유지할 수 있도록 하였다(Figure 1).

2.2. 증식된 알로에 줄기세포 추출물 및 원료화 샘플 제조

45일 내외로 현탁배양한 알로에 줄기세포를 수거하기 위해서 배양액을 80 ~ 90 °C로 3 ~ 4 h 가온 추출 후 3,000 × g에서 10 min간 원심 분리시켜 상층액을 취함으로써 추출물을 회수하였다. 얻어진 줄기세포 추출물은 회전진공농축기를 이용하여 농축하고 동결건조하여 건조 후 원료화 샘플을 제조하였고 제형실험을 위해서 보존제(예; 1,2 hexanediol 2% + ethylhexylglycerin 0.1%) 처리 후 보관하여 사용하였으며, AloStem이라 명명하였다(Figure 1).

2.3. 알로에 줄기세포 추출물의 DPPH 항산화 활성 측정

시료의 항산화 효과를 측정하기 위해 1.0 mg/mL의 알로에 추출물과 알로에 줄기세포 추출물 AloStem을 각각 500 μL에 0.2 mM DPPH 500 μL를 첨가하여 섞은 후 상온에서 30 min간 반응시키고, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 아스코르브산(ascorbic acid)을 사용하였으며, 음성 대조군으로는 추출용매 30% 에탄올을 사용하였다. DPPH 저해활성은 아래의 식에 따라 샘플용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 저해율을 %로 나타내었다.

$$\text{저해율 (\%)} = \frac{(1 - \text{샘플 첨가군 흡광도} / \text{샘플 무첨가군 흡광도}) \times 100}{1}$$

2.4. AloStem이 함유된 시트 마스크에 대한 피부 탄력 평가(In Vitro)

2.4.1. 세포 독성 평가(In Vitro)

피부 탄력 효능을 확인하기 위해 먼저 서울대학교 의과대학 피부과 실험실에서 보유한 cell line인 인간진피섬유아세포 normal human dermal fibroblast (NHDF) cell line (USA)을 이용하여 세포독성을 확인하였다. NHDF 세포를 96 well plate에 5 × 10<sup>3</sup> cells/well로 분주하고 24 h 배양 후,

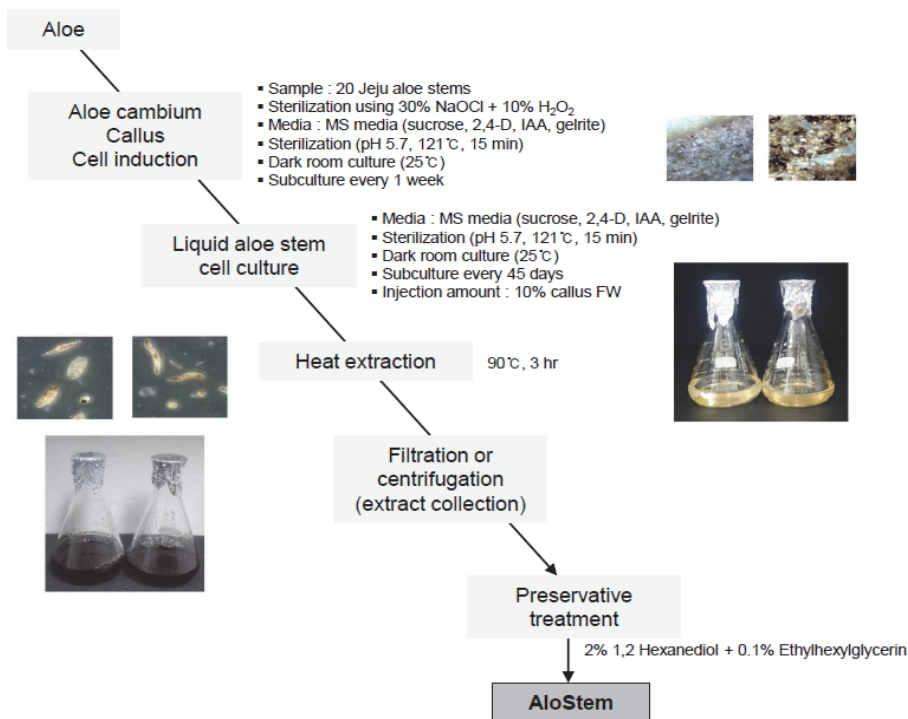


Figure 1. Manufacturing process of AloStem (Aloe stem cell extract).

0 ~ 0.25% (w/v)의 농도로 시료를 처리하여 다시 24 h 배양하였다. 그 후, WST-1 assay solution (EZ-CYTOX, DOGEN, Korea)을 10배 희석하여 200  $\mu$ L씩 첨가하여 30 min ~ 1 h 정도 반응시킨 뒤 microplate reader system (SpectraMax i3x Multi-Mode Detection Platform; Molecular Devices, USA)을 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2.4.2. qRT-PCR (*In Vitro*)

피부 탄력과 관련있는 유전자 elastin, COL1A1, HAS2 mRNA의 발현수준을 quantitative real-time (qRT-PCR) 분석법을 통해 확인하고자 먼저 NHDF 세포를 6 well culture plate에  $3 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 24 h 배양하였다. 그 후, 다양한 농도의 시험용액을 처리하여 다시 24 h 배양한 후 배양된 세포를 회수하여 1 mL TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 첨가하여 세포 용해 및 total mRNA 추출을 진행하였다. 추출된 total mRNA는 MaestroNano Micro-Volume Spectrophotometer (Maestrogen, USA)를 이용하여 농도 및 순도를 확인하였다. total mRNA는 MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, USA)를 이용하여 cDNA로 전환하여 qRT-PCR에 사용하였다. qRT-PCR은 SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였으며, StepOnePlus™ Systems software (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 해당 유전자 발현을 분석하였다. PCR 반응 조건은 94 °C에서 20 s (denaturation) → 60 °C에서 30 s (annealing) → 72 °C에서 30 s (polymerization) 로 40 cycles 증폭시켰다. 각 유전자의  $C_T$  값을  $\beta$ -actin의  $C_T$  값으로 normalization하였으며,  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  법을 통해 유전자의 발현 정도를 계산하였다. 이 때 사용된 각 primer의 서열은 다음과 같다.  $\beta$ -actin; Forward 5'-GGATTCCTATGTGGCGACGA-3', Reverse 5'-CGCTCGGTGAGGATCTTCATG-3', Elastin; Forward 5'-GGCCATTCTGGTGGAGTTC-3', Reverse 5'-AACTGGCTTAAGAGGTTTGCC-3', COL1A1; Forward 5'-AGGGCCAAGACGAAGACATC-3', Reverse 5'-AGATCACGTCATCGCAACA-3', HAS2; Forward 5'-GAAAGGGCTGTCAGTCTTATT-3', Reverse 5'-TTCGTGAGATGCTGTCATCACC-3'.

### 2.5. VECTRA-XT를 이용한 탄력 개선에 의한 리프팅 효과의 임상적 연구

#### 2.5.1. 시료

AloStem이 첨가된 연한 녹색의 투명한 겔을 함유한 시트마스크를 제조하여 본 시험에 적용하였다.

#### 2.5.2. 연구대상

한국피부과학연구원서 2022. 2. 11.부터 2022. 3. 31.까지 성인남녀 21 명을 대상 (평균나이  $51.9 \pm 7.03$  세)으로 진행하였으며(시험번호: KIDS-BBB007-KJM), 시험담당자는 시험에 대한 모든 정보를 피시험자에게 충분히 설명하였고, 피시험자는 자의에 따라 동의서를 작성하고 시험에 참가하였다. 피시험자는 시험기간인 2 주 동안 1 일 1 회 세안 및 세정 후 시트마스크를 안면부위와 왼쪽 전완부위에 고르게 부착하여 20 min 동안 적용한 후, 남은 에센스는 두드려 흡수시켰으며, 시험기간에는 시험결과에 영향을 미칠 수 있는 아이크림, 미백크림과 같은 각종 기능성 화장품 및 팩이나 마사지 등의 시술도 금지하도록 하였다. 피시험자는 동일한 세정제로 세안 및 세정 후 실내온도  $22.0 \pm 2$  °C, 습도 50 ~ 55%의 항온·항습 조건에서 30 min 간 대기한 다음 측정하였다.

#### 2.5.3. 탄력 개선에 의한 리프팅 효과 평가

AloStem이 함유된 시트마스크의 탄력 개선에 의한 리프팅효과를 평가하기 위해 VECTRA-XT 3D Imaging System (Canfield Scientific, Inc., USA)을 적용하였다. 시험 물질 사용 전과 2 주 사용 후에 시험담당자가 피시험자의 안면부위를 각각 2 회 촬영하였으며, VECTRA-XT의 가이드라인에 맞춰 조정 후 측정하도록 하였다. 촬영된 이미지는 VECTRA-XT 전용 소프트웨어(Version 5.5)를 이용하여 이미지를 3D 매칭시켜 일치된 안면부위를 분석하였다. 탄력 개선에 의한 리프팅 효과 분석은 왼쪽 귀(트라거스)에서 콧볼까지의 피부 길이를 계산하였으며, 측정단위는 mm이다.

#### 2.5.4. 이상반응 평가

시험담당자는 시험부위에서 피부이상반응인 홍반, 부종, 가려움, 따끔거림, 뺨뺨함에 대하여 연구자가 육안으로 관찰하여 증상 유무를 평가하였다.

### 2.6. 통계분석

본 실험의 항산화 효능에 대한 통계 분석은 SPSS statistics 21.0 (IBM, USA) 프로그램을 이용, 각 그룹간의 비교 분석을 위해 Duncan's multiple range test를 실시하여 검정하였으며,  $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다. 반면, 피부 탄력 효능에 대한 통계 분석은 Microsoft Office Excel 2007 프로그램을 이용하여 분석하였다. 실험 결과 분석을 위하여 반복 실험결과에 대해서 평

균, 표준편차, 백분율을 실시하였고, student's *t*-test 분석을 실시하였다.

### 3. 결과 및 고찰

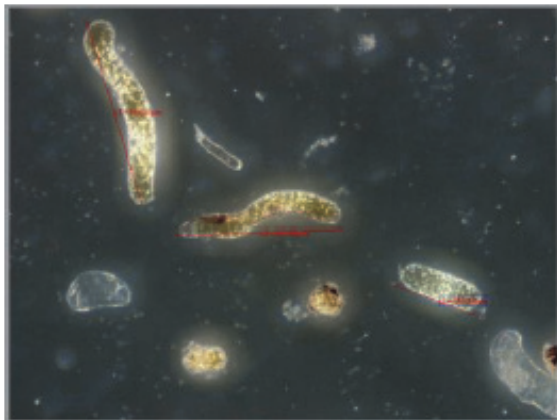
#### 3.1. 알로에 형성층 유래 줄기세포의 크기 및 생존율 확인

알로에 형성층 유래 줄기세포를 현탁배양 배지에서 계대 배양 후 세포 응집도를 현미경(Microscope OTM75, Olympus, Japan)으로 검정한 결과, 알로에 줄기세포는 Figure 2에 나타난 바와 같이, 현탁배양 시 많은 수의 단세포를 포함하며, 일부는 매우 작은 사이즈(100 ~ 500  $\mu$ m)의 세포 집합체로 존재하는 것을 확인할 수 있었다(Table 1).

추가적으로 증식배양 완료 후 계대배양 되기 전에 알로에 형성층 유래 줄기세포 추출물 AloStem과 알로에 캘러스의 세포를 샘플링하여 2% Evan's blue staining (5 min) method를 이용[16]하여 세포 생존율(%)을 비교확인하였다. 그 결과, Table 1에 나타난 바와 같이, 알로에 형성층 유래 줄기세포 추출물 AloStem은 98.27%가 살아있는 세포인 반면에, 알로에 캘러스에는 71.31%만 살아있는 세포로 확인되어 알로에 캘러스보다 알로에 형성층 유래 줄기세포 추출

**Table 1.** Survival Rate and Size of Aloe Callus and Aloe Stem Cell Extract

Sample name	Size ( $\mu$ m)	Survival rate (%)
Aloe callus	10000 ~ 20000	71.31
AloStem	100 ~ 500	98.27



**Figure 2.** Photography of stem cell derived from Aloe.

물 AloStem이 세포 생존율이 더 우수하다는 것을 확인하였다.

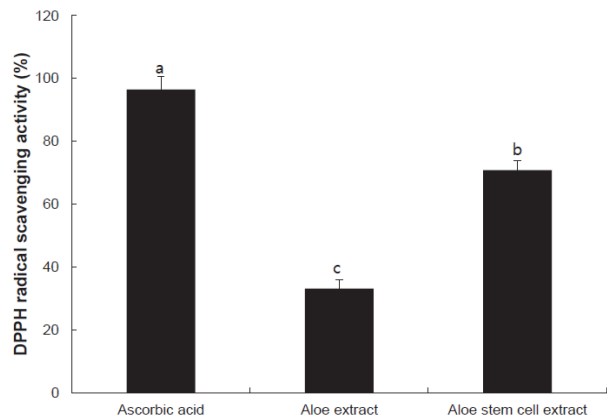
#### 3.2. 알로에 줄기세포 추출물의 DPPH 항산화 활성 측정

피부의 노화는 산화작용과 밀접한 관련이 있다고 이미 많은 연구에서 보고된 바 있다[17]. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 항산화 물질로부터 전자나 수소를 받아 비가역적으로 안정한 분자를 형성하므로 전자공여능으로부터 항산화 활성을 측정할 수 있는데, 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 자유 라디칼이 소거되며 이때의 DPPH 고유의 청남색이 옅어지는 특성이 있어 이 색차를 비색 정량하여 전자공여능력을 측정하는 대표적인 항산화 활성 측정 방법[18]이다. 알로에 열수 추출물 및 알로에 줄기세포 추출물의 DPPH 항산화 활성을 측정한 결과, 양성대조군인 아스코르빅산은 0.01 mg/mL의 농도에서 95.3% 활성을 나타냈으며, 알로에 추출물(2.0 mg/mL)은 33.1%의 활성을 나타냈으며, 알로에 줄기세포 추출물(2.0 mg/mL)의 경우, 항산화 활성이 70.8%로 항산화 활성을 나타냄으로써 알로에 형성층 유래 줄기세포 추출물이 2 배 이상의 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 확인되었다(Figure 3).

#### 3.3. AloStem이 첨가된 겔을 함유한 시트마스크의 *In Vitro* 평가 및 임상적 연구

##### 3.3.1. NHDF세포 독성 평가

AloStem이 첨가된 겔 시료 처리에 의한 인간진피섬유아 세포 NHDF의 세포독성을 확인하기 위해 WST-1 assay를 이용하여 실시하였다. 그 결과(Figure 4A), 0.25% 이하 농



**Figure 3.** DPPH radical scavenging activity of aloe extract and AloStem (Aloe stem cell extract).

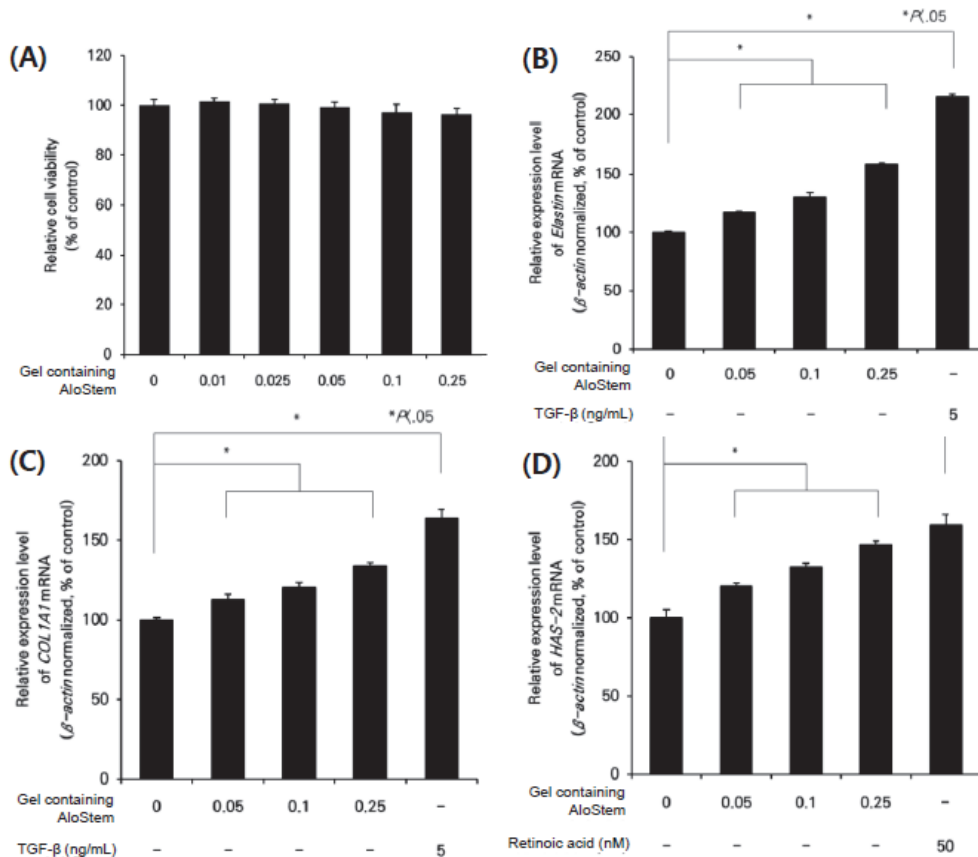
도로 처리하였을 시, 세포 생존율은 음성대조군 대비 각각 101.57%, 100.57%, 99.35%, 97.39%, 96.58%로 나타나 세포 독성에 직접적인 영향은 없는 것으로 확인되었다. 따라서, 이후 효능평가는 0.25% 이하 농도의 시료를 이용하여 실험하고자 하였다.

### 3.3.2. COL1A1, Elastin 및 HAS2 mRNA 유전자 발현량 확인

피부 노화가 진행되면 표피층에서는 수분 부족이 발생하고, 수분 이동이 원활하지 않게 되어 피부가 거칠어지면서 비정상적인 각질층이 형성된다. 반면, 진피층은 피부의 구조와 탄력을 유지하는데 중요한 역할을 하며, 콜라겐과 엘라스틴이 섬유 주변을 교차하고 glycosaminoglycans (GAGs)이 진피층의 구조를 지탱하고 있다. GAGs는 주로 히알루론산과 뮤코다당류들로 이루어져 있는데, 피부 노화가 일어나면 히알루론산이 감소하여 콜라겐과 엘라스틴의

해리가 일어나 진피망상층의 구조가 변형되어 수분 결합이 감소하여 피부에 주름이 생기고 탄력이 줄어들게 된다 [19,20]. 따라서 이러한 피부 노화 현상을 방지하기 위해 피부 진피층에 존재하는 진피섬유아세포의 기능을 활성화시켜 콜라겐, 엘라스틴과 히알루론산 합성 효소 생산을 촉진시킴으로써 진피층의 구조를 회복시킬수 있는지 알아보하고자 하였다.

AloStem이 첨가된 겔 시료 처리에 의한 유전자 발현량을 확인하기 위해 피부 탄력과 관련이 있는 엘라스틴 생성에 관여하는 유전자 *elastin*, Type I Collagen의 유전자 COL1A1, 히알루론산 합성효소 생성에 관여하는 유전자 HAS2 mRNA 발현량 변화를 측정하고자 하였다. 그 결과, *elastin* mRNA의 경우(Figure 4B), 농도의존적으로 증가되는 것을 확인하였으며, 특히 AloStem이 첨가된 겔 시료 0.25% 농도에서 음성대조군과 비교하여  $58.17 \pm 1.49\%$ 가 증가됨을 확인하였으며, 양성대조군으로 사용된 TGF- $\beta$  (5 ng/mL)



**Figure 4.** Cell cytotoxicity (A) of NHDF cells and Elastin (B), COL1A1 (C), and HAS2 (D) mRNA gene expression of gel containing AloStem (Aloe stem cell extract).

는 elastin mRNA 발현량을  $115.58 \pm 1.80\%$ 로 증가시켰다. COL1A1 mRNA의 경우(Figure 4C) 농도의존적으로 증가함을 확인하였으며, 특히 AloStem이 첨가된 겔 시료 0.25% 농도에서 음성대조군과 비교하여  $33.93 \pm 1.88\%$  증가됨을 확인하였다. 반면, 양성대조군인 TGF- $\beta$  (5 ng/mL)는 음성대조군 대비  $63.38 \pm 5.55\%$ 됨을 확인하였다. HAS2 mRNA의 경우(Figure 4D), 앞선 결과와 마찬가지로 농도의존적으로 증가되었으며 특히 AloStem이 첨가된 겔 시료 0.25% 농도에서 음성대조군 대비  $46.44 \pm 2.59\%$ 가 증가됨을 확인하였다. 반면 양성대조군으로 사용된 retinoic acid (50 nM)는 음성대조군 대비  $59.55 \pm 6.28\%$ 가 증가됨을 확인하였다.

위의 결과를 종합해보면, 피부 탄력에 영향을 주는 대표적인 유전자 elastin, COL1A1, HAS2는 AloStem이 첨가된 겔 시료 0.25% 농도에서 양성대조군 대비 각각 53.5%, 50.3% 및 78.0%의 유전자 발현량을 증가시켰으므로 콜라겐 생성, 엘라스틴 생성 증가 및 히알루론산 합성 효소 생성 증가에 도움을 주어 피부 탄력 개선에 효과적일 것이라 판단되어 AloStem이 함유된 겔 타임 시트마스크를 제작하여 임상시험을 진행하였다.

3.3.3. 탄력 개선에 의한 리프팅 효과의 임상적 연구

AloStem이 첨가된 시트마스크의 리프팅 효과를 평가하기 위해 VECTRA-XT를 이용하여 사용전과 2 주 사용후의 안면부위의 탄력 개선에 의한 리프팅 효과 개선도를 분석한 결과(Figure 5), 피부 길이가 시험물질 사용 전에는 평균  $116.75 \pm 5.58$  mm로 나타났으나, 2 주 사용 후에는 평균  $117.44 \pm 5.17$  mm 로 0.59%가 증가됨이 통계적으로 유의

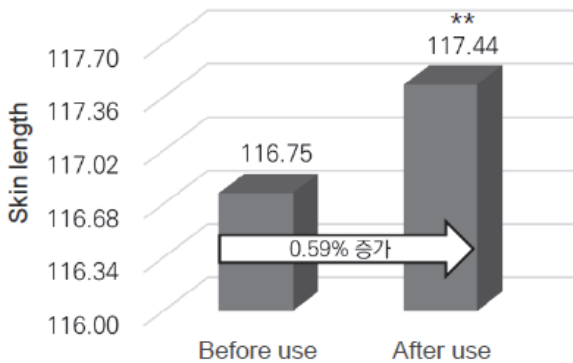


Figure 5. The lifting effect for before and after use of the sheet mask containing AloStem.

하게 나타나( $p < 0.01$ ) 시험물질이 탄력 개선에 의한 리프팅 효과에 도움을 주는 것으로 판단되었다.

3.3.4. 이상반응 평가

2 주의 시험기간 동안 발생한 이상반응은 1 건도 발견되지 않았으며, 피시험자의 피부증상 평가에서도 제품 사용 전과 제품 사용 후에 관찰된 홍반, 부종, 가려움, 따끔거림, 뻣뻣함 증상 또한 관찰되지 않았다.

4. 결론

본 연구에서는 알로에 유묘 줄기의 형성층으로부터 MS 배지를 이용하여 캘러스를 유도한 후, 배양된 형성층과 캘러스층으로 분리하여 현탁액배지에 넣어 회전 교반기에서 배양하였다. 그후, 현탁배양액에서 알로에 줄기세포만을 분리하기 위해 가운추출 후 원심분리하여 상층액을 회수하고 동결건조하여 원료화 샘플을 제조하고, 이에 대한 항산화 활성 및 피부 탄력 개선효과를 *in vitro* 및 임상적 연구를 통해 확인하고자 하였다. 먼저, 알로에 형성층 유래 줄기세포 추출물 AloStem과 캘러스의 세포 생존율을 확인한 결과, AloStem은 98.27%, 캘러스는 71.31%의 세포가 생존하는 것으로 확인되었다. AloStem과 알로에 추출물의 DPPH 항산화 활성을 비교, 측정한 결과, 알로에 추출물보다 AloStem에서 2 배 이상의 항산화 효과를 가지는 것으로 확인되었다. 또한, AloStem이 함유된 겔 제형에 대한 인간진피섬유아세포의 직접적인 세포독성을 확인한 결과, 0.25% 농도까지 영향을 미치지 않았으며, elastin, COL1A1 및 HAS2 mRNA 발현량을 증가시켰다. 위 결과를 바탕으로, AloStem이 함유된 시트마스크를 이용하여 피부 탄력 리프팅 효과에 대한 임상적 연구를 성인남녀 21 명을 대상으로 2주간 진행한 결과, 피부 길이가 시트마스크 사용 전에는  $116.75 \pm 5.58$  mm로 나타났으나, 2 주 사용 후에는  $117.44 \pm 5.17$  mm 로 0.59%가 증가된 것으로 확인되어 AloStem을 함유한 시트마스크는 탄력 개선에 의한 리프팅 효과에 도움을 주는 것으로 최종 확인되었다.

Acknowledgement

본 논문은 2021년도 중소벤처기업부의 재원으로 창업성장기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구이다(과제번호: S3049433).

## References

1. K. H. Kim, S. Lee, S. Bae, and S. An, Effects of cream containing three-dimensional human adipose-derived mesenchymal stem cell conditioned medium secreting growth factors on skin elasticity, *Asian J. Beauty Cosmetol.*, **20**(1), 121 (2022).
2. E. J. Choi, H. B. Cho, and H. S. Yoon, Developments of culture media for human skin stem cell, and evaluation of efficacy of cosmetics containing culture media, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **10**(4), 949 (2012).
3. Z. Li, C. Hu, J. Jia, Y. Xia, H. Xie, M. Shen, R. Huang, L. He, C. Liu, S. Wang, B. Chen, and N. He, Establishment and evaluation of a simple size-selective method for exosome enrichment and purification, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **15**(5), 1090 (2019).
4. G. K. Patel, M. A. Khan, H. Zubair, S. K. Srivastava, M. Khushman, S. Singh, and A. P. Singh, Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications, *Sci. Rep.*, **9**(1), 1 (2019).
5. K. H. Kim, S. Lee, H. S. Park, K. H. Kim, S. Lee, and H. S. Park, Inhibitory effects of three dimensional adipose tissue-derived mesenchymal stem cell conditioned medium on immune response and efficacy evaluation of its cream, *Asian J. Beauty Cosmetol.*, **17**(1), 25 (2019).
6. W. S. Kim, B. S. Park, and J. H. Sung, Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging, *Arch. Dermatol. Res.*, **301**(5), 329 (2009).
7. H. Nakagawa, S. Akita, M. Fukui, T. Fujii, and K. Akino, Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing, *Br. J. Dermatol.*, **153**(1), 29 (2005).
8. B. K. Vogler and E. Ernst, Aloe vera: a systematic review of its clinical effectiveness, *Br. J. Gen. Pract.*, **49**(447), 823 (1999).
9. Y. Hu, J. Xu, and Q. Hu, Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) extracts, *J. Agric. Food Chem.*, **51**(26), 7788 (2003).
10. J. Y. Rhim, Y. S. Moon, S. H. Jung, K. Y. Lee, S. Y. Lyu, C. S. Shim, and W. B. Park, Antimicrobial activities of combined extract of *Aloe vera* with propolis against oral pathogens, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **31**(5), 899 (2002).
11. T. Reynolds, The compounds in Aloe leaf exudates: a review, *Bot. J. Linn. Soc.*, **90**(3), 157 (1985).
12. N. Okamura, N. Hine, Y. Tateyama, M. Nakazawa, T. Fujioka, K. Mirmhi, A. Yagi, Three chromones of *Aloe vera* leaves, *Phytochemistry*, **45**(7), 1511 (1997).
13. H. T. Kim, T. J. Kim, E. H. Kim, and B. M. Kwak, Anti-oxidant and anti-aging effect of extracts from seed of *Camellia japonica* L. by supercritical fluid extraction, *J. Korean Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.*, **33**(4), 32 (2020).
14. S. Subasree and K. Murthykumar, Effect of *Aloe vera* in oral health-a review, *Res. J. Pharm. Technol.*, **9**(5), 609 (2016).
15. T. Murashige and F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, **15**(3), 473 (1962).
16. C. J. Baker and N. M. Mock, An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue, *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, **39**(1), 7 (1994).
17. E. A. Mohamad, A. A. Aly, A. A. Khalaf, M. I. Ahmed, R. M. Kamel, S. M. Abdelnaby, and S. A. Mousa, Evaluation of natural bioactive-derived punicalagin niosomes in skin-aging processes accelerated by oxidant and ultraviolet radiation, *Drug Des., Development and Therapy*, **15**, 3151 (2021).
18. W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Sci. Technol.*, **28**(1), 25 (1995).
19. J. C. Pittet, O. Freis, M. D. Vazquez-Duchêne, G. Périé, and G. Pauly, Evaluation of elastin/collagen content in human dermis in-vivo by multiphoton tomography—variation with depth and correlation with aging, *Cosmetics*, **1**(3), 211 (2014).
20. M. P. Jacob, M. Sauvage, and M. Osborne-Pellegrin, Regulation of elastin synthesis, *J. Soc. Biol.*, **195**(2), 131 (2001).