

Effect of Oil in Water Nanoemulsion Containing a Mixture of Lactic Acid and Gluconolactone for Skin Barrier Improvement

Ji-Hye Hong¹, Young Duck Choi², Gye Won Lee^{1*} and Young Ho Cho^{1*}

¹Department of Pharmaceutics & Biotechnology, Konyang University, Daejeon 35365, Republic of Korea

²R&D Team, CNKCOSMEDICAL Co., Ltd, Incheon 21693, Republic of Korea

Received August 29, 2023 /Revised October 16, 2023 /Accepted October 16, 2023

To evaluate the effectiveness of the skin barrier improvement of lactic acid (LA) and gluconolactone (GL), the expression of filaggrin, loricrin, hyaluronic acid (HA), hyaluronan synthase-2 (HAS2), and aquaporin-3 (AQP3) in keratinocytes, and the moisture content and transepidermal water loss (TEWL) by clinical trials were evaluated. The expression levels of filaggrin and loricrin, which are the main factors affecting the proper functioning of skin barrier function, and HA, HAS2, and AQP3, which are skin moisturizing-related proteins measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and western blotting. The results showed that the expression levels of the factors that decreased by H₂O₂ treatment were significantly increased by LA, GL, and a mixture of LA and GL at the mRNA and protein levels ($p < 0.05$). The nanoemulsion containing a mixture of LA and GL was prepared using the emulsion inversion method, and the average particle size was 299.9 ± 0.287 nm. After measuring the TEWL of nanoemulsion using Vapometer, it was found that TEWL significantly decreased by 15.53% and 26.73% after two weeks and four weeks of product use, respectively, compared to TEWL before product use ($p < 0.001$). Similarly, the skin moisture content of the nanoemulsion significantly increased by 15.40% and 26.59% after two weeks and four weeks of product use, respectively, compared to skin moisture content before product use ($p < 0.001$). Therefore, the skin barrier function and moisturizing effect of a mixture of LA and GL are shown by increasing the moisture content and decreasing the TEWL by increasing the expression of filaggrin, loricrin, HA, HAS2, and AQP3. This suggests the possibility for the development of functional cosmetic ingredients in the future.

Key words : Gluconolactone, lactic acid, nanoemulsion, skin barrier, skin hydration

서 론

피부는 신체의 가장 바깥에서 외부 환경 및 유해균으로부터 항상성을 유지하는 가장 중요한 기관으로, 자외선 및 스트레스 등의 환경적 요인에 대한 장벽 역할과 체내의 수분을 유지하는 기능을 담당한다[5]. 각질형성세포는 표피세포의 95%를 차지하는 세포로 기저층, 유극층, 과립층을 거쳐 핵이 없는 납작한 모양의 각질세포로 최종 분화하며[12], 과립층과 각질층에서는 이들의 분화를 촉진하는 인자들인 필라그린(filaggrin), 로리크린(loricrin), 인볼루크린(involucrin) 등을 발현한다[7, 10, 22]. 피부의 장

벽기능은 분화된 각질세포를 구성하는 필라그린, 로리크린 등의 다양한 단백질과 세포 간의 연결 및 세포간지질 등에 의해 유지된다[18]. 따라서 정상적인 피부 항상성 유지를 확인하는 주요 타겟 단백질인 필라그린, 로리크린, 인볼루크린 등의 발현 조절에 영향을 미치는 소재는 피부의 장벽기능 개선에 도움을 줄 수 있는 것으로 보고되고 있다[13].

일반적으로 피부 보습력 감소, 세린 프로테아제의 발현량 감소, 자외선, 세포 활성 저하 등의 요인에 의해 유발되는 각질층증화를 해소하기 위해 일반적으로 물리적 스크럽 제제 등을 통한 각질 박피, 화학적 제제에 의한 각질 박리, 생리적인 세포 활성 증가 등의 방법이 사용되고 있다. 화학적 각질 박리 방식은 AHA (α -hydroxy acid)를 이용하는 방법을 비롯하여 BHA (β -hydroxy acid), PHA (poly hydroxyl acid) 등이 대표적으로 사용되고 있는 방법이다 [19, 24, 25].

유산(lactic acid, LA)은 AHA의 일종으로 고체 상태에서 흰색이며, 물과 섞일 수 있으며, 물에 용해된 상태에서는 무색 용액을 형성한다. 산도를 조절하고 살균 및 각질 용

*Corresponding author

Tel : +82-42-600-8503, Fax : +82-42-600-8503

E-mail : pckmon@konyang.ac.kr (Gye Won Lee)

micael@konyang.ac.kr (Young Ho Cho)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

해 특성을 위해 국소 제제 및 화장품에서 많이 사용되고 있다. 모든 AHA는 각질을 제거하고 피부 결을 개선하지만 유산에는 글리콜산 및 만델산과 같은 다른 AHA에서 얻을 수 없는 추가적인 이점이 있다. 또한, 피부가 자체적으로 수분을 유지하도록 하는 천연보습인자를 개선하는데 도움을 주며, 피부를 단단하게 유지하는데 도움을 주는 콜라겐과 엘라스틴 단백질을 자극하여 피부를 탄력 있게 한다[1, 20].

글루코노락톤(gluconolactone, GL)은 PHA의 일종으로 무취의 미세한 결정성 흰색 파우더로 물에 완전히 용해되며, 알코올에는 거의 녹지 않으며 상온에서 안정하다. 수용액 상태에서 GL은 글루콘산으로 가수분해되어 pH가 점차 감소하며, 농도와 용매 온도에 따라 다르지만 대략 40~60분 이후에 가장 낮은 pH를 나타낸다. AHA 성분과 유사하며, 동일한 작용을 하지만 AHA가 피부 표면을 개선하는데 약간 더 효과적이고 GL은 분자의 크기가 더 크기 때문에 피부에 쉽게 흡수가 되지 않아 자극이 적은 것으로 알려져 있다[2]. 그렇지만 LA 및 GL의 경우 대부분이 산성이므로 일반적으로 화장품에 다량 함유하게 되면 제품의 안정성을 저해하고 제형을 무너뜨리는 결과를 초래하며, 극소량의 함량을 사용하면 제품의 안정성을 확보할 수 있으나 그 효능이 발현되기 부적합하여 다량을 함유할 수 있는 안정한 제형의 개발이 필요하다.

나노에멀전은 통상 유상을 분산상으로 하는 수중유형 에멀전 형태로 제조되어 20~200 nm 정도의 입자 크기를 가지며, 오일 성분의 우수한 연화력 뿐만 아니라 난용성 활성 물질의 가용화가 가능하여 피부 침투 또는 표적 침투가 필요한 의학 분야에서 응용되어 왔다[6, 23]. 또한, 최근에는 화장품 시장이 급속하게 성장하여 피부에 유효 성분을 전달하기 위한 고급 기술의 개발이 시급해지고 있는 가운데, 기능성 화장품에 필수적으로 이용되고 있는 활성 물질을 담지할 수 있는 나노에멀전은 특유의 흡수감과 효능 발현력을 동시에 구현할 수 있어 화장품, 의약품 및 식품 분야에서 다양하게 응용되고 있다[8, 26].

따라서 본 연구에서는 LA 및 GL의 피부 장벽기능 개선 효능을 피부세포에서 확인하고 이들 성분을 함유하는 안정한 수중유형 나노에멀전을 제조하여 사람을 대상으로 하는 임상실험을 통하여 수분함유량 및 경표피수분손실량을 평가하여 피부 장벽 기능 개선을 위한 기능성 화장품 소재로서의 활용가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

시약 및 세포배양

본 실험에 사용된 LA와 GL은 Seil International (Seoul, Korea)과 Zico 사(Eumseong-gun, Korea)에서, Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS),

penicillin-streptomycin은 Gibco BRL (Eggenstein, Germany)에서, iQ SYBR Green Supermix는 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)에서, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 그 외에 사용된 시약들은 특급 및 일급 시약을 구입하여 사용하였다.

본 연구에 사용된 human keratinocyte인 HaCaT 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA) 사에서 구입하여 사용하였다. 구입한 HaCaT 세포는 DMEM에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 함유된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-170AIC, Panasonic, Osaka, Japan)에서 배양하였으며, 2~3일에 한 번씩 계대 배양을 실시하였다.

세포 생존율

HaCaT 세포에 대한 LA와 GL의 독성을 측정하기 위하여 MTT 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosmann의 방법[16]을 변형하여 실시하였다. 세포를 96-well plate에 각각 1×10⁴ cells/ml의 농도로 동일하게 분주하고, 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 자극원으로 2.5 mM H₂O₂를 첨가한 다음 CO₂ incubator에서 5시간 추가 배양하였다. 5 mg/ml 농도의 MTT 용액 10 µl를 첨가하여 반응시킨 뒤 dimethylsulfoxide (DMSO) 100 µl를 첨가하여 생성된 formazan을 녹여낸 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Western blot

LA와 GL의 피부보습과 장벽 기능 개선 효과를 확인하기 위하여 피부보습에 관련된 hyaluronic acid (HA), hyaluronan synthase-2 (HAS2), aquaporin-3 (AQP3) 단백질과 장벽 기능 개선에 관련된 필라그린과 로리크린 단백질의 발현을 Western blot 분석으로 확인하였다. HaCaT 세포를 6-well plate에 2×10⁴ cells/ml의 농도로 분주하고, 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 자극원으로 2.5 mM H₂O₂를 첨가한 다음 CO₂ incubator에서 5시간 추가 배양하였다. 그 후 상등액을 제거하고 세포를 PBS로 세척한 후 cell scraper로 수확하였다. 수확된 세포 내 단백질을 passive lysis buffer로 추출하여 BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)로 정량하여 세포 용해물의 단백질 농도를 측정하였다. 단백질은 6~10% mini gel sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 분리한 후, 단백질을 90 V에서 1시간 30분 동안 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. 5% skim milk로 1~2시간 동안 blocking 하였다. 그 후 적정 농도로 희석한 1차 항체와 membrane을 4°C에서 24시간 동안 반응시키고 세척한 후 1시간 동안 실온에서 horse

radish peroxidase (HRP)가 컨주게이션된 2차 항체와 반응시켰다. SuperSignal™ WestFemto kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다. 이 때 단백질 발현은 Amersham ImageQuant 800 (Cytiva, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다.

Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

LA와 GL이 피부보습과 장벽 기능 개선에 관여하는 단백질인 HA, HAS2, AQP3, 필라그린, 로리크린의 mRNA 발현에 미치는 영향을 측정하기 위해서 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)을 실시하였다. HaCaT 세포를 6-well plate에 2×10⁴ cells/ml의 농도로 분주하고, 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 후 자극원으로 2.5 mM H₂O₂를 첨가한 다음 CO₂ incubator에서 5시간 추가 배양하였다. 그 후 세포를 TRIzol 시약을 사용하여 세포벽을 깨고 chloroform을 넣어 수용액층과 유기용매층으로 분리하여 페놀 성분을 제거한 뒤, isopropanol로 RNA를 침전시켜 75% 에탄올로 세척하였다. 그 후 에탄올을 제거하고 RNA pellet만 남겨 air-dry 하여 RNase free DW를 넣고 pellet을 녹여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA를 QuickDrop spectrophotometer (Molecular Devices, MA, USA)를 이용하여 정량하고, PCR thermal cycler device (Takara Bio, Shiga, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하고, QuantStudio 1 Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)에서 iQ SYBR Green Supermix를 사용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. HA, HAS2, AQP3, 필라그린, 로리크린 및 GAPDH의 PCR 프라이머는 Cosmo Genetech (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였고, 각각의 프라이머 서열은 Table 1에 나타내었다.

LA 및 GL 혼합물을 함유하는 수중유형 나노에멀전 제조

나노에멀전 제조 과정에서 구성성분을 오일상(oil phase), 수상(water phase), 첨가제(additive)로 구분하였으며, 나노에멀전 제조에 사용된 구성성분과 조성은 Table 2에 나타내었다. 먼저, 수상 성분과 오일상 성분을 각각 비커에 넣고 78℃에서 균일하게 용해시킨 후 오일상에 수상을 서서히 가하며 78℃에서 15분간 교반(3,000 rpm)함으로써

연속상을 수상으로 반전시켜 O/W 마이크로에멀전을 제조하였다. 그 후 교반속도를 3,500 rpm으로 높여 6분간 교반시켜 나노에멀전을 제조하였다. 45℃로 냉각한 후 첨가제를 넣고 충분히 혼합하였다. 제조된 나노에멀전 입자의 크기는 일본 Otsuka 사의 입도분석기(ELS-Z-2000)로 측정하였다.

인체 임상시험

건강한 피부를 가진 만 19~60세의 여성 피험자 21명을 대상으로 4주간 인체적용시험을 진행하였다(시험기관: (주)KC피부임상연구센터, 시험기간: 2023. 04. 10~2023. 05. 09, IRB 승인 번호: 1-70005235-AB-N-01-202304-HR-KC-230410-C1-02).

피부 장벽 기능 개선에 대한 임상시험으로 경표피수분손실량 측정기(Vapometer, Delfine, Finland)를 이용하여 시험 제품 사용 전, 제품 사용 2주 후 및 제품 사용 4주 후 얼굴 부위의 경표피수분손실량(transepidermal water loss, TEWL)을 측정하였다. 1회 측정된 값을 TEWL 평가 자료로 사용하였고, 그 단위는 g/m²h이다. 측정 값은 TEWL 정도로 비례하므로 측정 값이 낮아질수록 TEWL이 개선됨을 의미한다.

피부보습에 대한 임상시험으로 피부 수분 측정기(Cornometer, Courage+Khazaka electronic GmbH, Germany)를 이용하여 시험 제품 사용 전, 제품 사용 2주 후 및 제품 사용 4주 후 얼굴 부위의 피부 수분 함유량을 측정하였고, 3회 측정된 평균 값을 피부 수분 함유량 평가 자료로 사용하였다. 측정된 피부 수분 함유량의 단위는 arbitrary unit (A.U.)이며, 측정값과 피부 보습 개선 정도는 비례한다.

기기적 피부 측정을 위해 시험대상자는 준비된 세안제로 세안 후 항온항습조건(온도 20~24℃, 습도 40~60%)의 공간에서 약 30분간 피부 안정을 취해 측정 환경에 적응하도록 하였다. 시험 제품 적용(2회/1일) 부위를 측정하였고 매번 같은 조건에서 동일한 연구자에 의해 진행되었다.

통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 각 군간의 통계적 유의성 검증은 SPSS 18.0 (SPSS Inc., IL, USA)을 이용한 one-way ANOVA로 하였으며, p 값이 0.05

Table 1. The primer sequences used for quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Gene	Forward sequence	Reverse sequence
HA	5'-TACCCATACGTCCCAGA-3'	5'-TCTGGGACGTCGTATGGGTA-3'
HAS2	5'-CAGAATCCAAACAGACAGTTC-3'	5'-TAAGGTGTTGTGTGTGACTG-3'
AQP3	5'-AGACAGCCCCTTCAGGATTT-3'	5'-TCCCTTGCCCTGAATATCTG-3'
Filaggrin	5'-CAAATCCTGAAGAATCCAGATGAC-3'	5'-TGCTTGAGCCAACCTGAATACC-3'
Loricrin	5'-GAGGTGTTTTCCAGGGGCA-3'	5'-TGGGGTTGGGAGGTAGTTGTA-3'
GAPDH	5'-ACATCGCTCAGACACCATG-3'	5'-TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG-3'

Table 2. Components and formulations of nanoemulsion

Components	Content (w/w%)	Phase
1,3-Butylene glycol	5.000	Oil phase
Bis-PEG-18 methyl ether dimethyl silane	1.500	
Caprylhydroxamic acid	0.700	
Sodium acrylate/Sodium acryloyldimethyl taurate copolymer	0.510	
Isohexadecane	0.680	
Polysorbate 80	0.510	
Caprylic/Capric triglyceride	0.500	
Dimethicone	6.000	
Polysilicone-11	0.500	
Hydrogenated polydecene	3.000	
Tocopheryl acetate	0.050	
Psidium guajava fruit extract	qs to 100	Water phase
Lactic acid	2.500	
Gluconolactone	2.500	
Sodium carbomer	0.100	
Ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer	0.200	
Disodium EDTA	0.030	
Allantoin	0.100	
Trehalose	0.500	
Glycerin	2.000	
Sodium hyaluronate (1%)	0.200	
Lavandula angustifolia (Lavender) oil	0.035	
Ipomoea hederacea callus culture extract	0.100	
Blue complex	0.200	

미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

세포 독성에 미치는 영향

LA와 GL을 0~100 µg/ml 농도로 조정하여 HaCaT 세포에 처리하고 24시간 경과 후 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정함으로써 세포 내 독성 유무를 확인하였다.

그 결과 Fig. 1A에 나타난 바와 같이 LA와 GL은 대조군과 유사하게 세포독성을 나타내지 않았다. 또한, 세포 내 산화적 스트레스 유도 시 LA와 GL이 세포 생존율에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1B에 나타난 바와 같이 2.5 mM H₂O₂를 처리하여 산화적 스트레스를 유도하였을 때 세포 생존율이 60.4±2.4%로, 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 약 40% 정도 감소되었다. 반면에 LA와 GL을 단독 또는 다른 비율로 처리하였을 때에는 H₂O₂

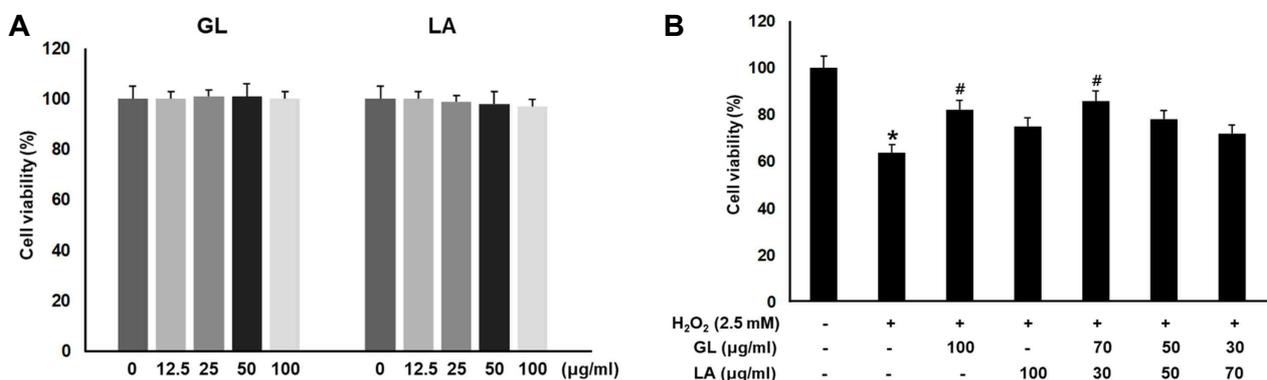


Fig. 1. Effect of lactic acid (LA) and gluconolactone (GL) on HaCaT cell viability. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. All data are shown as the mean±SD of three independent experiments ($p < 0.05$ vs Control; # $p < 0.05$ vs H₂O₂ only treatment).

단독 처리군과는 달리 세포 생존율이 증가하는 것으로 나타났다. 특히, GL 100 µg/ml 혹은 GL과 LA를 7:3의 비율로 처리하였을 때에는 세포 생존율이 각각 82.1±1.8% 및 84.2±1.7%로 유의적으로 회복되는 것으로 나타났다.

필라그린 및 로리크린의 발현에 미치는 영향

피부 장벽은 각질형성세포의 분화 말기과정에서 분비되는 분화 촉진인자들에 의해 각질세포막을 형성함으로써 외부의 물리적 손상과 자극적 물질로부터 인체를 보호하는 역할을 수행한다. 각질형성세포의 분화 촉진인자인 필라그린, 로리크린, 인볼루크린 등의 발현 감소는 피부 장벽 기능을 저하시키는 것으로 알려져 있다[4, 9]. LA 및 GL이 피부 장벽 기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각질형성세포 분화 촉진 시에 분비되는 필라그린 및 로리크린의 발현을 qRT-PCR과 Western blot을 이용하여 측정하였다. 그 결과 필라그린의 경우 GL 단독, LA 단독, LA : GL = 3:7, LA : GL = 5:5 및 LA : GL = 7:3 처리군에서 mRNA 발현율이 각각 210%, 170%, 190%, 170%, 160%로 측정되어 H₂O₂ 처리에 의해 감소된 필라그린의 전사를 유의적으로 회복시키는 것으로 나타났다 (Fig. 2A). 또한, 로리크린의 경우 GL 단독, LA 단독, LA : GL = 3:7 및 LA : GL = 5:5 처리군에서 mRNA 발현율이 각각 360%, 150%, 300%, 240%로 측정되어 H₂O₂ 처리에 의해 감소된 로리크린의 전사를 유의적으로 회복시키는 것으로 나타났으나, LA : GL = 7:3 처리군에서는 유의적인 효과를 나타내지 않았다(Fig. 2B)

단백질 발현에서 필라그린은 GL 단독, LA 단독, LA : GL = 3:7, LA : GL = 5:5 및 LA : GL = 7:3 처리군에서 각각 140%, 120%, 150%, 110%, 110%로 측정되어 H₂O₂ 처리에 의해 감소된 필라그린의 발현을 모든 처리군에서 회복시키는 것으로 나타났으나, GL 단독 처리군과 LA : GL = 3:7 처리군에서만 유의적으로 증가한 것으로 나타났

다(Fig. 3A). 또한, 로리크린의 경우 GL 단독, LA 단독, LA : GL = 3:7 및 LA : GL = 5:5 처리군에서 각각 350%, 310%, 330%, 270%로 측정되어 H₂O₂ 처리에 의해 감소된 로리크린의 발현을 유의적으로 회복시키는 것으로 나타났으나, LA : GL = 7:3 처리군에서는 유의적인 효과를 나타내지 않았다(Fig. 3B).

이러한 결과는 LA 및 GL이 각질형성세포의 분화를 촉진하여 피부의 물리적 장벽을 개선할 수 있음을 시사한다.

Hyaluronic acid, hyaluronan synthase-2 및 aquaporin-3 발현에 미치는 영향

HA는 피부에 존재하는 세포외기질로 보습 작용을 담당하고 있으며, 여러가지 요인에 의하여 HA의 생성량이 감소하면 피부의 주름 및 탄력을 감소시켜 노화, 건선 및 피부염 등을 일으키는 것으로 알려져 있다[3]. 피부는 적절한 보습 상태를 유지하기 위하여 HA를 생성하는 효소인 HAS2와 외부의 수분을 세포막에서 세포 내로 수송하는 막 단백질 역할을 하는 AQP3의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다[14, 21]. 따라서 LA 및 GL이 피부 보습에 관련된 HA, HAS2 및 AQP3의 발현에 미치는 영향을 qRT-PCR과 Western blot을 이용하여 확인하였다. HA mRNA 발현을 조사한 결과 GL 단독, LA 단독, LA : GL = 3:7, LA : GL = 5:5 및 LA : GL = 7:3 처리군에서 mRNA 발현율이 각각 150%, 160%, 300%, 280%, 280%로 측정되어 H₂O₂ 처리에 의해 감소된 HA 단백질의 전사과정을 회복시키는 것으로 나타났으며, 특히 단독 처리군에 비해 혼합 처리군에서 유의적으로 mRNA 발현을 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 4A). HAS2 mRNA 발현을 조사한 결과 GL 단독, LA 단독, LA : GL = 3:7, LA : GL = 5:5 및 LA : GL = 7:3 처리군에서 mRNA 발현율이 각각 190%, 140%, 230%, 220%, 200%로 측정되어 H₂O₂ 처리에 의해 감소된 HAS2 단백질의 전사과정을 모든 처리군에서 유의적으로

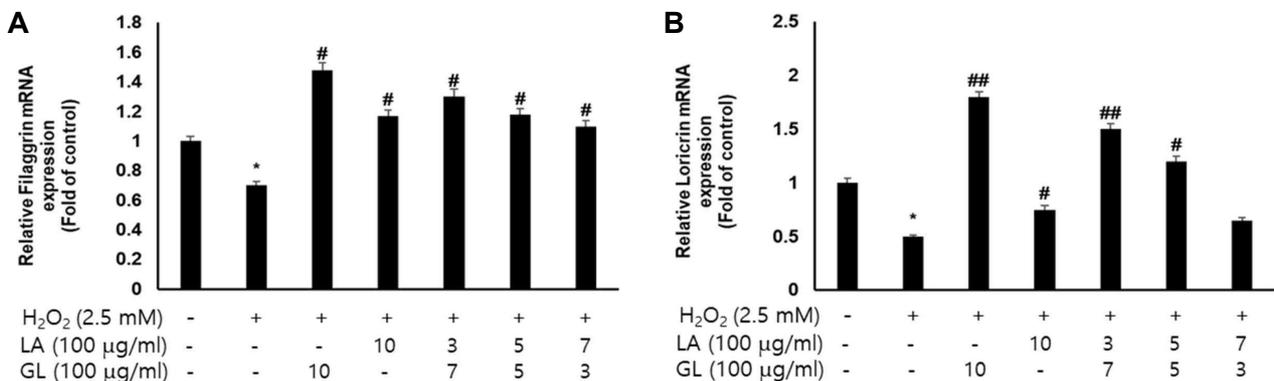


Fig. 2. Effect of LA and GL on mRNA expression of filaggrin and loricrin in H₂O₂-induced HaCaT cells. Cells were treated with LA and GL for 24 hr and H₂O₂ for 5 hr. mRNA expression was measured by qRT-PCR. GAPDH was used as an internal control. All data are shown as the mean±SD of three independent experiments (*p<0.05 vs control; #p<0.05 and ##p<0.01 vs only H₂O₂ treatment). LA: lactic acid, GL: gluconolactone.

회복시키는 것으로 나타났다(Fig. 4B). AQP3 mRNA 발현을 조사한 결과 GL 단독, LA 단독, LA : GL = 3:7, LA : GL = 5:5 및 LA : GL = 7:3 처리군에서 mRNA 발현율이 각각 190%, 170%, 300%, 270%, 270%로 측정되어 H₂O₂ 처리에 의해 감소된 AQP3 단백질의 전사과정을 회복시키는 것으로 나타났으며, 특히 단독 처리군에 비해 혼합 처리군에서 유의적으로 mRNA 발현을 증가시키는 나타났다(Fig. 4C).

단백질 발현에서 HA는 GL 단독, LA 단독, LA : GL = 3:7, LA : GL = 5:5 및 LA : GL = 7:3 처리군에서 각각

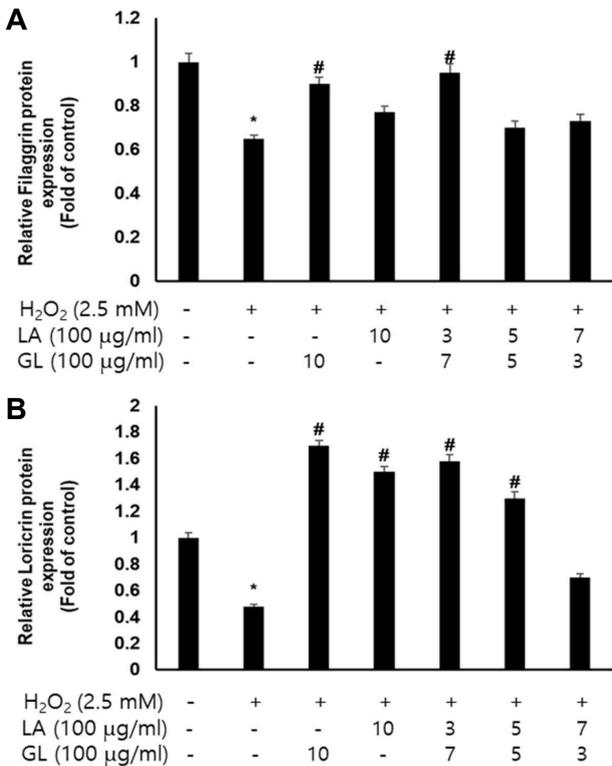
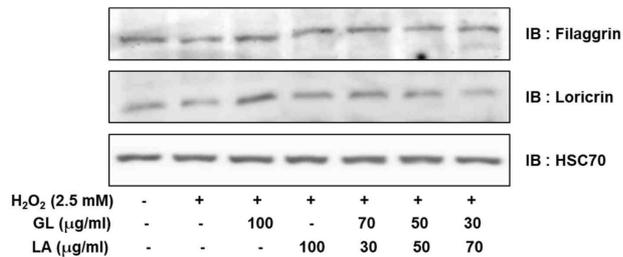


Fig. 3. Effect of LA and GL on protein expression of filaggrin and loricrin in H₂O₂-induced HaCaT cells. Cells were treated with LA and GL for 24 hr and H₂O₂ for 5 hr. Protein expression was measured by Western blot analysis. HSC70 was used as an internal control. Protein expression was quantified with image J program. All data are shown as the mean±SD of three independent experiments (**p*<0.05 vs control; #*p*<0.05 vs only H₂O₂ treatment). LA: lactic acid, GL: gluconolactone.

110%, 100%, 200%, 190%, 190%로 측정되어 H₂O₂ 처리에 의해 감소된 HA의 발현을 혼합 처리군에서만 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 5A). 또한, HAS2의 경우 GL 단독, LA 단독, LA : GL = 3:7 및 LA : GL = 5:5 처리군에서 각각 250%, 200%, 430%, 460%, 400%로 측정되어 H₂O₂ 처리에 의해 감소된 HAS2의 발현을 모든 처리

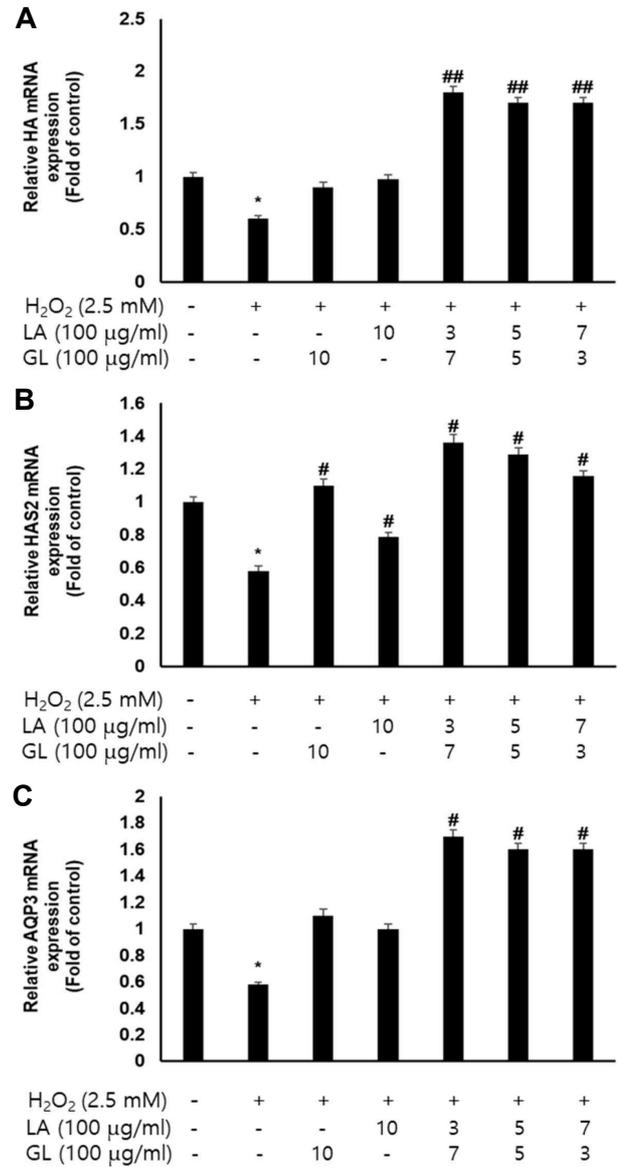


Fig. 4. Effect of LA and GL on mRNA expression of HA, HAS2 and AQP3 in H₂O₂-induced HaCaT cells. Cells were treated with LA and GL for 24 hr and H₂O₂ for 5 hr. mRNA expression was measured by qRT-PCR. GAPDH was used as an internal control. All data are shown as the mean±SD of three independent experiments (**p*<0.05 vs control; #*p*<0.05 and ##*p*<0.01 vs only H₂O₂ treatment). LA: lactic acid, GL: gluconolactone, HA: hyaluronic acid, HAS2: hyaluronan synthase-2, AQP3: aquaporin-3.

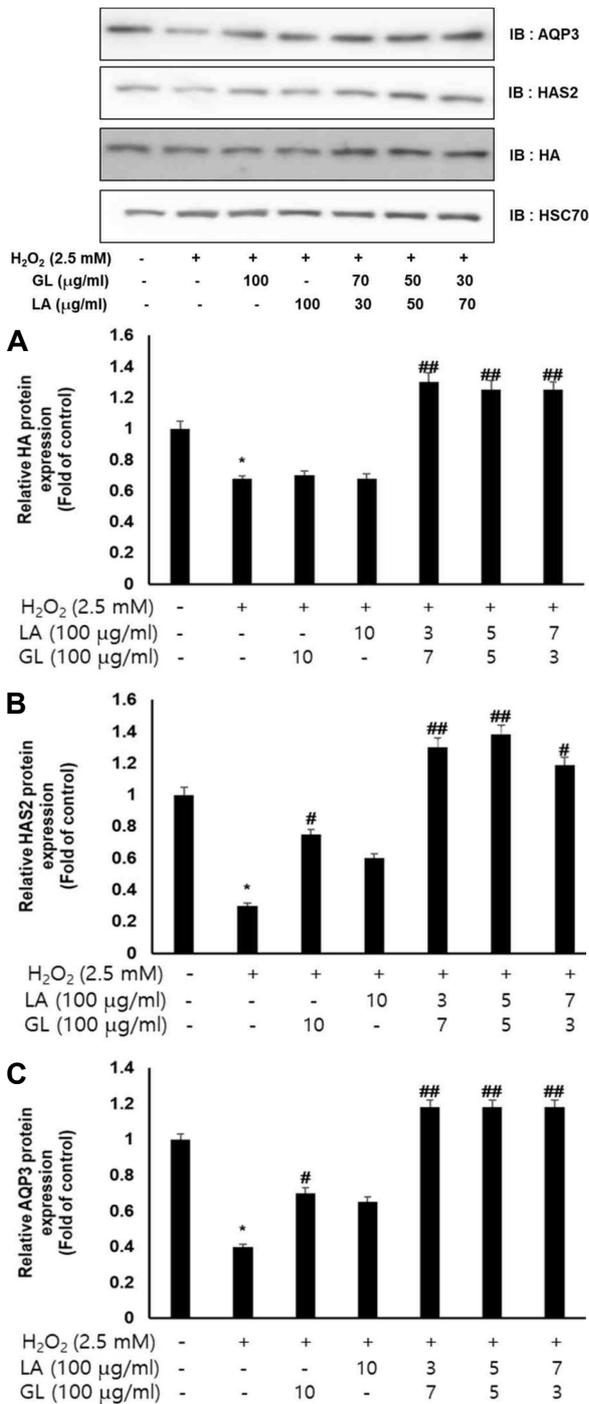


Fig. 5. Effect of LA and GL on protein expression of HA, HAS2 and AQP3 in H₂O₂-induced HaCaT cells. Cells were treated with LA and GL for 24 hr and H₂O₂ for 5 hr. Protein expression was measured by Western blot analysis. HSC70 was used as an internal control. Protein expression was quantified with image J program. All data are shown as the mean±SD of three independent experiments (**p*<0.05 vs control; #*p*<0.05 and ##*p*<0.01 vs only H₂O₂ treatment). LA: lactic acid, GL: gluconolactone, HA: hyaluronic acid, HAS2: hyaluronan synthase-2, AQP3: aquaporin-3.

군에서 회복시키는 것으로 나타났으나, LA 단독 처리군에서는 유의적인 효과를 나타내지 않았다(Fig. 5B). AQP3의 경우 GL 단독, LA 단독, LA : GL = 3:7 및 LA : GL = 5:5 처리군에서 각각 180%, 160%, 300%, 300%, 300%로 측정되어 H₂O₂ 처리에 의해 감소된 AQP3의 발현을 모든 처리군에서 회복시키는 것으로 나타났으나, HAS2의 경우와 동일하게 LA 단독 처리군에서는 유의적인 효과를 나타내지 않았다(Fig. 5C). HA 합성에 관여하는 효소인 HAS는 HAS-1, -2, -3의 세가지 형태가 존재하며, 이 중 HAS2가 HA의 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다[15]. 이에 많은 연구자들에 의해 HA의 생성을 촉진하기 위한 일환으로 HAS의 발현을 증가시키려는 연구가 진행되고 있다[17]. 따라서 GL과 LA의 혼합물은 HA, HAS2, AQP3의 전사 및 단백질 발현을 증가시켜 피부 보습 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

나노에멀전의 입자 크기 및 입도 분포

에멀전 반전법으로 제조된 LA 및 GL 혼합물을 함유하는 나노에멀전의 입자 크기와 입도 분포를 입도분석기로 측정된 결과 Fig. 6에 나타난 바와 같이 100~1,000 nm 사이에 분포하였으며, 3가지 제조 샘플의 평균 입자 크기는 299.9±0.287 nm로 확인되었다. 또한, 제조한 나노에멀전의 안정성을 평가하기 위하여 식약처 화장품 안정성 시험 가이드라인에 따라 냉장, 25°C, 45°C에서 보관하면서 3개월 동안 상분리, pH, 점도 등을 측정하였다. 그 결과 시험 개시 때와 동일한 상태로 외형상의 변화는 없었으며, pH와 점도도 기준치 이내로 유지되어 안정한 것으로 나타났다. 즉, 제조 직후 제품의 pH와 점도는 각각 6.31과 13,860 cps이었으며, 3개월 후 냉장 보관 제품의 pH와 점도는 6.27과 14,350 cps이었으며, 25°C 보관 제품의 pH와 점도는 6.30과 13,910 cps이었으며, 45°C 보관 제품의 pH와 점도는 6.26과 12,140 cps이었다.

LA 및 GL 혼합물을 함유하는 나노에멀전의 TEWL 개선 효과

LA 및 GL 혼합물을 함유한 나노에멀전을 4주간 사용하게 한 후 제품 사용 전, 사용 2주 후, 4주 후에 각각 얼굴 부위의 TEWL을 측정하였다. 그 결과 Fig. 7A에 나타난 바와 같이 TEWL 측정값이 제품 사용 전에 비해 제품 사용 2주 후 및 제품 사용 4주 후 모두 통계적으로 유의하게 감소하였다(*p*<0.001). 즉, 제품 사용 2주 후에는 제품 사용 전에 비해 15.53% 정도 TEWL이 감소하였으며, 제품 사용 4주 후에는 제품 사용 전에 비해 26.37% 정도 TEWL이 감소하였다. 피부의 장벽 기능은 분화된 각질세포를 구성하는 다양한 단백질과 세포 간 지질 등의 작용으로 유지된다. 이 중 필라그린 단백질은 각화과정 중에 케라틴 섬유의 형성을 돕고, pyrrolidine carboxylic acid (PCA)나

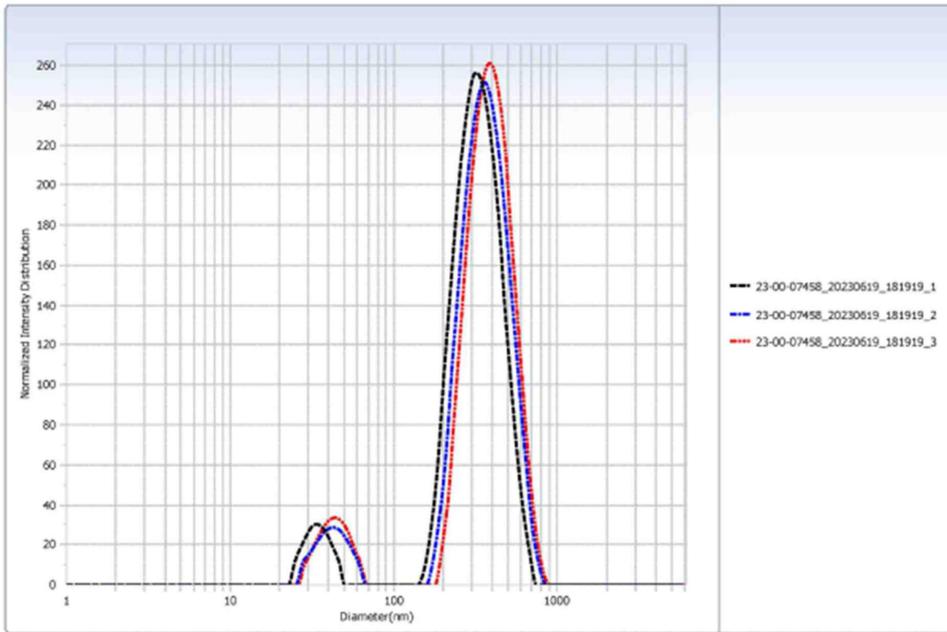


Fig. 6. Particle size and droplet size distribution of nanoemulsion.

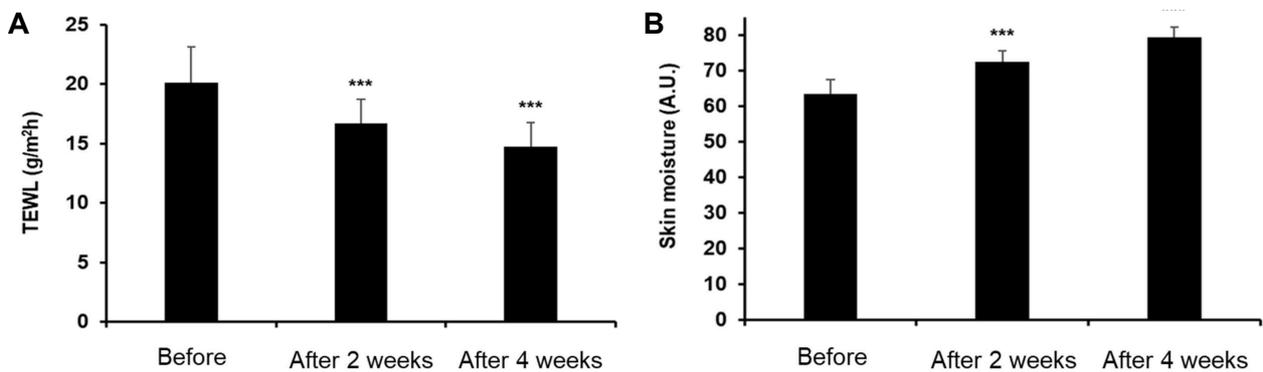


Fig. 7. The effect of nanoemulsion with LA and GL on TEWL (A) and skin moisturizing improvement (B). All data are shown as the mean±SD (***p*<0.001 vs Before). LA: lactic acid, GL: gluconolactone, TEWL; transepidermal water loss.

transurocanic acid (UCA)로 분해되어 천연보습인자(natural moisturizing factor, NMF)로 작용하는 것으로 알려져 있다 [18]. TEWL은 피부 장벽 기능의 유지 여부를 알려주는 지표로서 제품 사용 전에 비하여 통계학적으로 유의미한 차이를 보여 LA 및 GL 혼합물을 함유하는 나노에멀전은 피부 장벽 기능 회복에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

LA 및 GL 혼합물을 함유하는 나노에멀전의 피부 보습 개선 효과

LA 및 GL 혼합물을 함유한 나노에멀전을 4주간 사용하게 한 후 제품 사용 전, 사용 2주 후, 4주 후에 각각 얼굴 부위의 피부 수분 함유량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 7B에 나타난 바와 같이 피부 수분 함유량 측정값이 제품 사용 전에 비해 제품 사용 2주 후 및 제품 사용 4주

후 모두 통계적으로 유의하게 증가하였다(*p*<0.001). 즉, 제품 사용 2주 후에는 제품 사용 전에 비해 15.40% 정도 피부 수분 함유량이 증가하였으며, 제품 사용 4주 후에는 제품 사용 전에 비해 26.59% 정도 수분 함유량이 증가하였다. 각질층의 수분량은 표피에 존재하는 NMF와 지질에 의해 결정되며, 표피의 수분 증발은 각질층의 세라마이드와 NMF의 함량 변화와 관련이 있는 것으로 알려져 있다 [11, 21]. 따라서 LA 및 GL혼합물을 함유하는 나노에멀전의 경우 피부의 수분량은 증가시키고 TEWL은 감소시켜 피부 보습 기능을 회복시키는 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서 LA 및 GL의 피부 장벽 기능 및 보습 효과는 피부 보습 관련 단백질인 HA, HAS2 및 AQP3 발현 증가, 피부 장벽 기능의 주요인자인 필라그린과 로리크린의 발현 증가를 통한 수분 함유량 증가와 TEWL

감소에 의해 나타나는 것으로 기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부의 재원으로 한국산업단지 공단의 산업집적지 경쟁력 강화사업의 지원을 받아 수행된 연구결과입니다(IRIC2202).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Algiert-Zielinska, B., Mucha, P. and Rotsztein, H. 2018. Lactic and lactobionic acids as typically moisturizing compounds. *Int. J. Dermatol.* **58**(3), 374-379.
- Bernstein, E. F., Brown, D. B., Schwartz, M. D., Kaidbey, K. and Ksenzenko, S. M. 2004. The polyhydroxy acid gluconolactone protects against ultraviolet radiation in an in vitro model of cutaneous photoaging. *Dermatol. Surg.* **30**, 189-195.
- Dahiya, P. and Kamal, R. 2013. Hyaluronic acid: a boon in periodontal therapy. *N. Am. J. Med. Sci.* **5**, 309-315.
- Donald, Y. M. L. and Thomas, B. 2003. Atopic dermatitis. *Lancet.* **361**, 151-160.
- Feingold, K. R. and Elias, P. M. 2003. Role of lipid in the formation and maintenance of cutaneous permeability barrier. *Biochim. Biophys. Acta.* **1841**(3), 280-294.
- Forgiarini, A., Esquena, J., Gonzalez, J. and Solans, C. 2000. Formation and stability of nano-emulsions in mixed nonionic surfactant systems. *Prog. Colloid Polym. Sci.* **115**, 36-39.
- Fuchs, E. 1993. Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J. Cell Sci.* **17**, 197-208.
- Gutierrez, J. M., Gonzalez, C., Maestro, A., Sole, I., Pey, C. M. and Nolla, J. 2008. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **13**, 245-251.
- Howell, M. D., Kim, B. E., Gao, P., Grant, A. V., Boguniewicz, M., De Benedetto, A., Schneider, L., Beck, L. A., Barnes, K. C. and Leung, D. Y. 2007. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J. Allergy Clin. Immunol.* **120**, 150-155.
- Ishida-Yamamoto, A., Kartasova, T., Matsuo, S., Kuroki, T. and Izuka, H. 1997. Involucrin and SPRR are synthesized sequentially in differentiating cultured epidermal cells. *J. Invest. Dermatol.* **108**, 12-16.
- Jacobi, O. T. 1959. About the mechanism of moisture regulation in the horny layer of the skin. *Pro. Sci. Sect. Good Assoc.* **31**, 22-24.
- Kim, H. J., Shin, J. U. and Lee, K. H. 2013. Atopic dermatitis and skin barrier dysfunction. *Allergy Asthma Respir. Dis.* **1**, 20-28.
- Lee, W. J., Park, K. H., Cha, H. W., Sohn, M. Y., Park, K. D., Lee, S. J. and Kim, D. W. 2014. The expression of involucrin, loricrin, and filaggrin in cultured sebocytes. *Ann. Dermatol.* **26**(1), 134-137.
- Li, J., Tang, H., Hu, X., Chen, M. and Xie, H. 2010. Aquaporin-3 gene and protein expression in sun-protected human skin decreases with skin ageing. *Australas J. Dermatol.* **51**, 106-112.
- Malaisse, J., Bourguignon, V., De Vuyst, E., Lambert de Rouvroit, C., Nikkels, A. F., Flamion, B. and Poumay, Y. 2014. Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2174-2182.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- Pienimaki, J. P., Rilla, K., Fulop, C., Sironen, R. K., Karvinen, S., Pasonen, S., Lammi, M. J., Tammi, R., Hascall, V. C. and Tammi, M. I. 2001. Epidermal growth factor activates hyaluronan synthase 2 in epidermal keratinocytes and increases pericellular and intracellular hyaluronan. *J. Biol. Chem.* **276**, 20428-20435.
- Scott, I. R. and Harding, C. R. 1986. Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment. *Dev. Biol.* **115**(1), 84-92.
- Sharad, J. 2013. Glycolic acid peel therapy-a current review. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **6**, 281-288.
- Smith, W. P. 1996. Epidermal and dermal effects of topical lactic acid. *J. Am. Acad. Dermatol.* **35**(3), 388-391.
- So, Y., Hwang, J. Y., Kim, H. W., Jo, H. N. and Lee, T. B. 2019. Skin hydration and skin barrier effects of *Cymbopogon citratus* and *Perilla frutescens* extracts. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **45**, 225-235.
- Steven, A. C. and Steiner, P. M. 1994. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocyte. *J. Cell Sci.* **107**, 693-700.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J. and Solans, C. 2004. Formation and stability of nanoemulsions. *Adv. Colloid. Interface Sci.* **180**, 303-318.
- Van Scott, E. J. and Yu, R. J. 1984. Hyperkeratinization, corneocyte cohesion, and alpha hydroxyl acids. *J. Am. Acad. Dermatol.* **11**(5), 867-879.
- Van Scott, E. J. and Yu, R. J. 1989. Alpha hydroxyl acids: procedures for use in clinical practice. *Cutis.* **43**(3), 222-228.
- Won, B. R., Kang, M. K., Ahn, Y. J. and Park, S. N. 2009. The effects of ethanol on nano-emulsions containing quercetin prepared by emulsion inversion point method. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **35**, 79-89.

초록 : 유산 및 글루코노락톤 혼합물을 함유하는 수중유형 나노에멀전의 피부장벽개선 효과

홍지혜¹ · 최영덕² · 이계원^{1*} · 조영호^{1*}

(¹건양대학교 제약생명공학과, ²씨엔케이코스메디칼)

본 연구에서는 lactic acid (LA) 및 gluconolactone (GL)의 피부 장벽 개선 효능을 평가하기 위하여 피부세포에서 필라그린, 로리크린, hyaluronic acid (HA), hyaluronan synthase-2 (HAS2), aquaporin-3 (AQP3)의 발현량 및 임상시험을 통한 수분 함유량과 경표피수분손실량(transepidermal water loss, TEWL)을 평가하였다. 장벽 기능(필라그린, 로리크린)과 보습 기능(HA, HAS2, AQP3)에 관련된 인자들의 발현량을 qRT-PCR과 Western blot으로 측정된 결과, H₂O₂ 처리에 의해 감소된 인자들의 발현량이 LA, GL 및 혼합물 처리로 mRNA 전사량과 단백질 발현량을 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다($p < 0.05$). LA와 GL 혼합물을 함유하는 나노에멀전을 에멀전 반전법으로 제조한 결과 평균 입자 크기는 299.9 ± 0.287 nm로 확인되었다. 나노에멀전의 TEWL을 Vapometer로 측정된 결과, 제품 사용 2주 후 및 제품 사용 4주 후에 제품 사용 전에 비하여 각각 15.53%, 26.73% 정도 TEWL이 감소하는 것으로 나타났다($p < 0.001$). 나노에멀전의 피부 수분 함유량을 Corneometer로 측정된 결과, 제품 사용 2주 후 및 제품 사용 4주 후에 제품 사용 전에 비하여 각각 15.40%, 26.59% 정도 수분 함유량이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다($p < 0.001$). 따라서 LA 및 GL의 피부 장벽 기능 및 보습 효과는 피부 보습 관련 단백질인 HA, HAS2 및 AQP3 발현 증가와 피부 장벽 기능의 주요인자인 필라그린과 로리크린의 발현 증가를 통한 수분 함유량 증가 및 TEWL 감소에 의해 나타나는 것으로 기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성을 제시한다.