글루코스아미노글리칸 생합성 기전을 이용한 피부주름개선 화장품의 효력시험 평가방법 연구

김 성 진
전남의대 피부과학교실

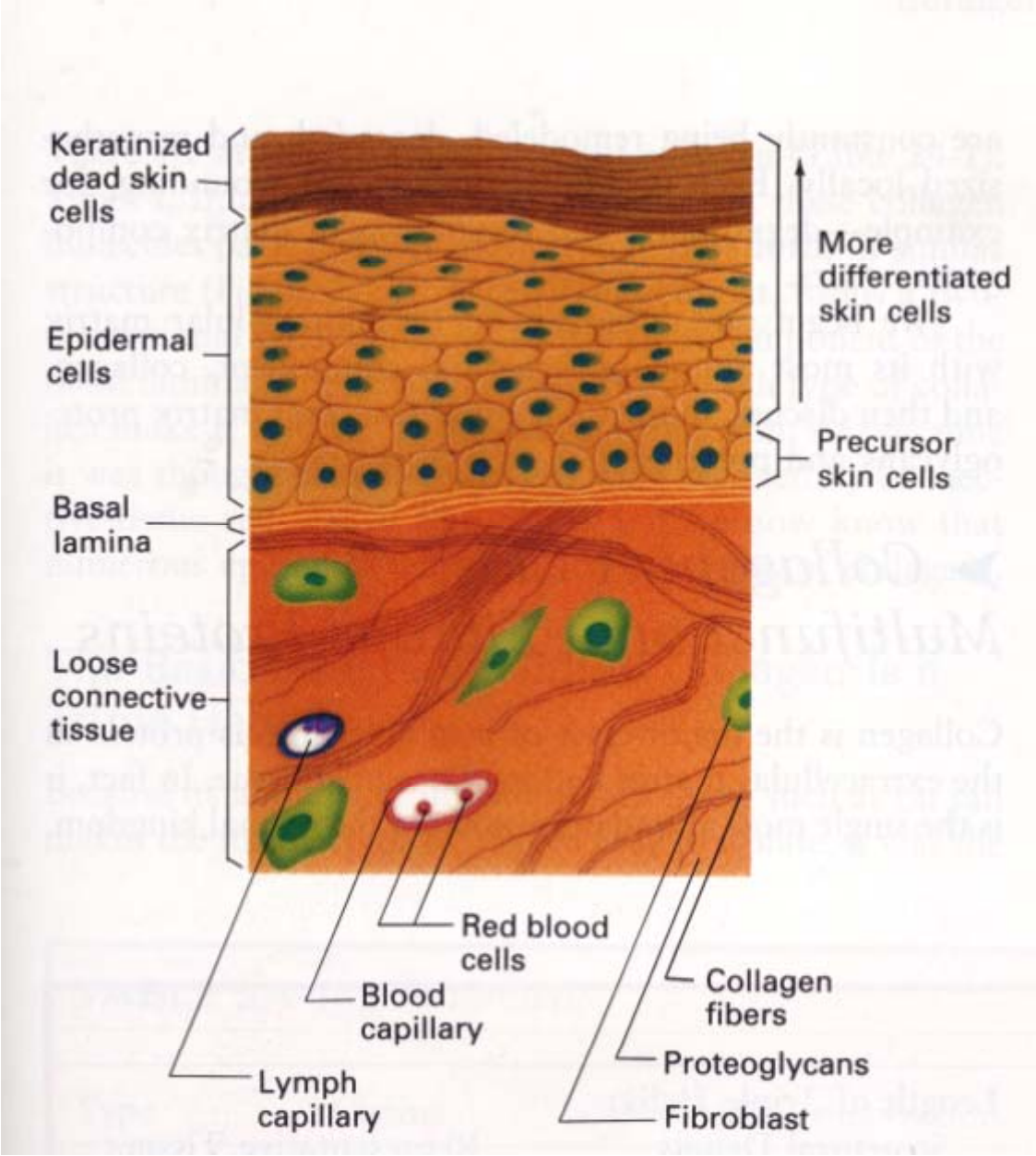
Portrait of an Old Woman
Denner, Balthasar.
Oil on copperplate. 37.5x31.5 cm
Germany
First half of the 18th century

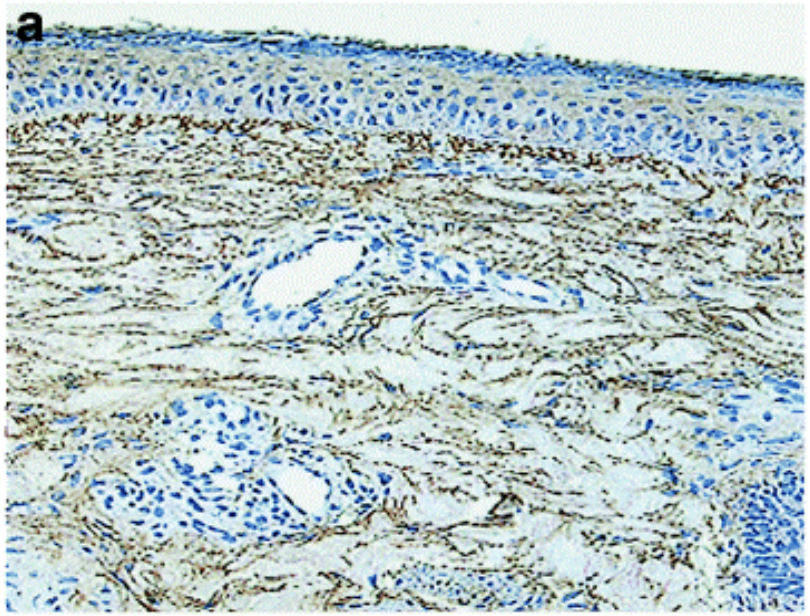
2003년 기준 국내 전체 화장품 시장규모는 약 6조2000 억원 그 중 주름개선 화장품 시장규모는 8000 억원 대로 추산

최근 5년(99년 2003년)간 주름개선 화장품 특허출원이 이전 5년(94년 98년)에 비해 2.5배

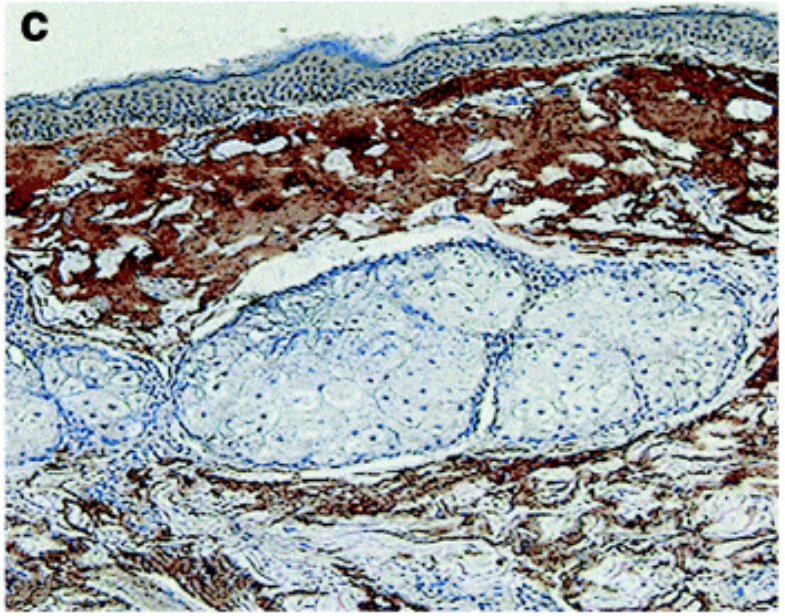
주름개선 작용기전 별로 보면 콜라겐 합성증진을 통한 제품이 32%로 가장 많은 비율

피부주름 발생인자: extracellular matrix origin

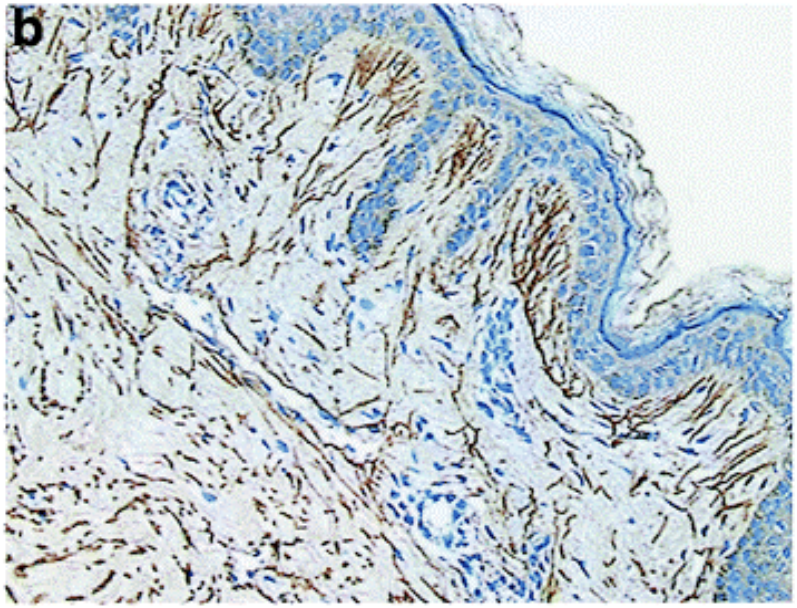




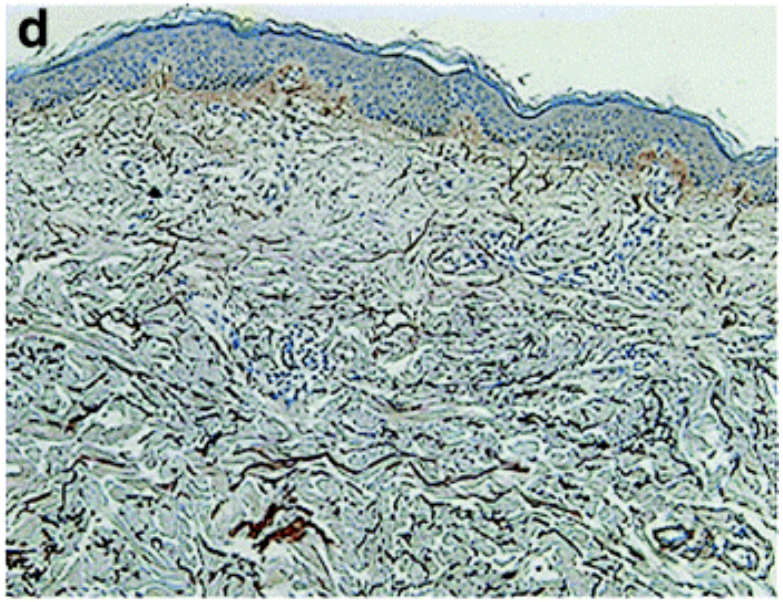
Facial skin, 1st decade.



Facial skin, 8th decade.

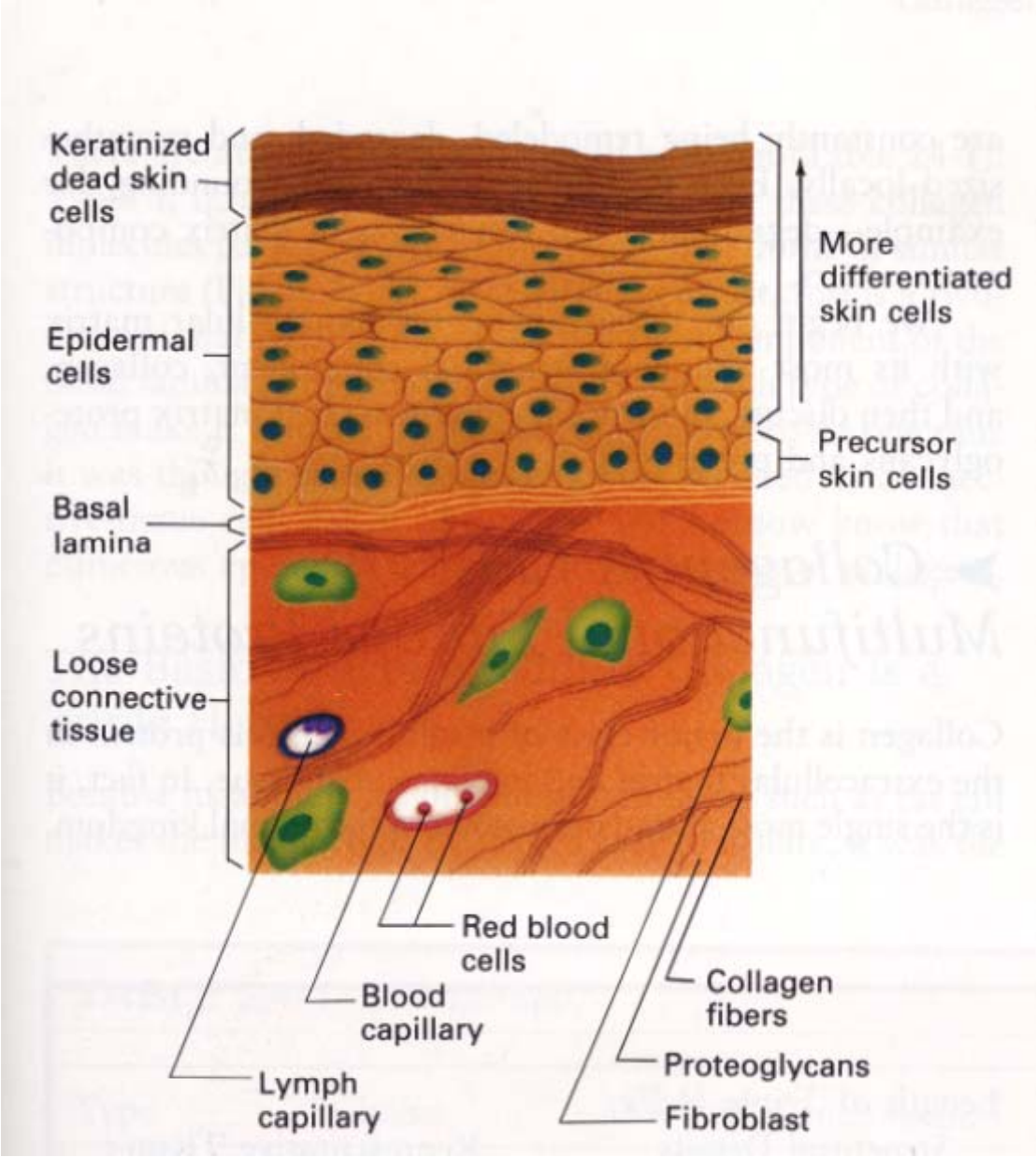


Abdominal skin, 1st decade.



Abdominal skin, 8th decade.

피부주름 관련인자: extracellular matrix origin



Collagen (o)
Elastic fiber (o)

Proteoglycan ?

Proteoglycan

- a class of glycosylated proteins which have covalently linked (un)sulfated glycosaminoglycans (chondroitin sulfate, dermatan sulfate, heparan sulfate, heparin, keratan sulfate, hyaluronan)
- Glu(y)cosaminoglycan: (un)sulfated polysaccharides made of repeating disaccharides (typically a repeat of 40-100 times)

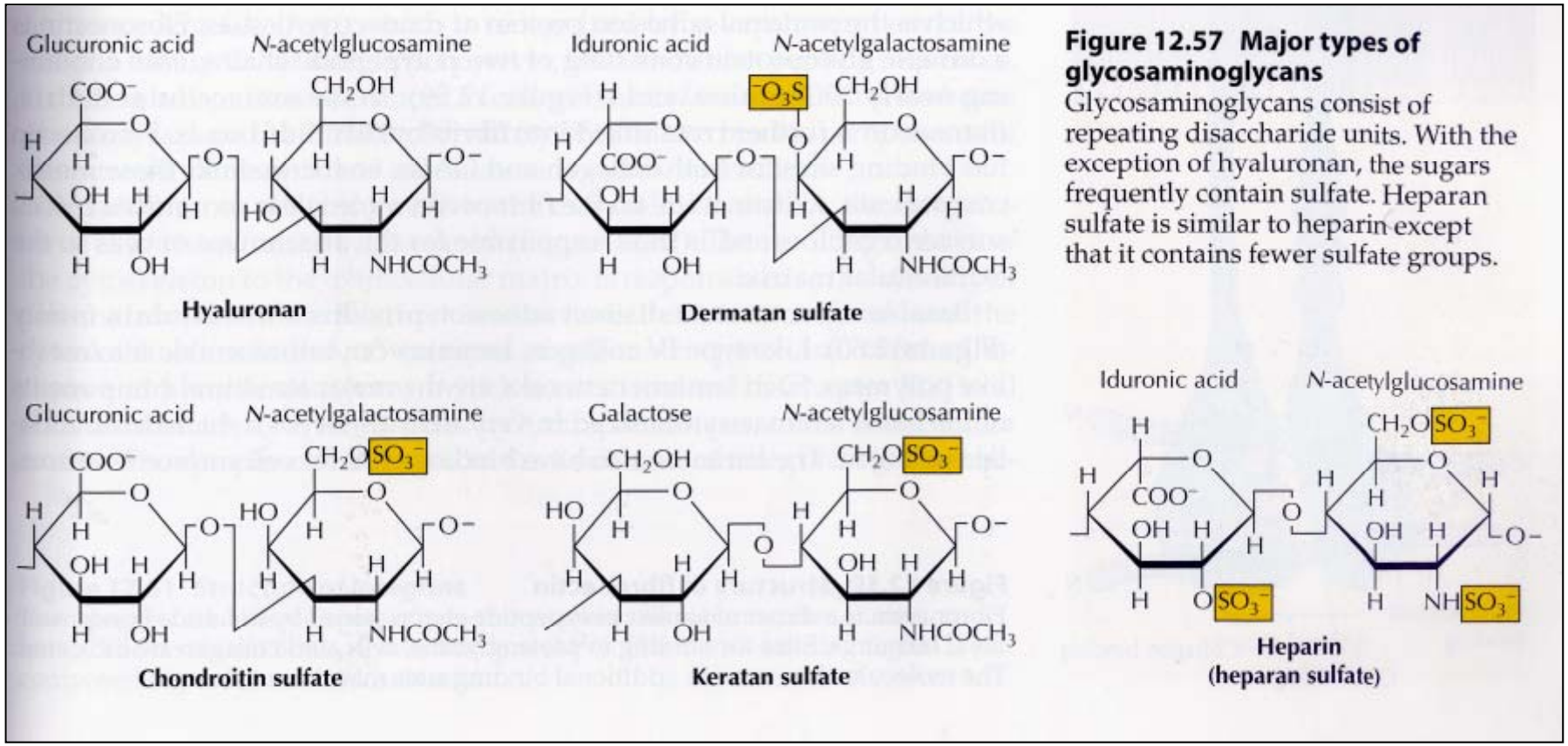


Figure 12.57 Major types of glycosaminoglycans
Glycosaminoglycans consist of repeating disaccharide units. With the exception of hyaluronan, the sugars frequently contain sulfate. Heparan sulfate is similar to heparin except that it contains fewer sulfate groups.

The components of disaccharides

chondroitin sulfate and dermatan sulfate :

glucuronic acid/iduronic acid -N-acetylgalactosamine,

heparan sulfate and heparin :

glucuronic acid/iduronic acid -N-acetylglucosamine

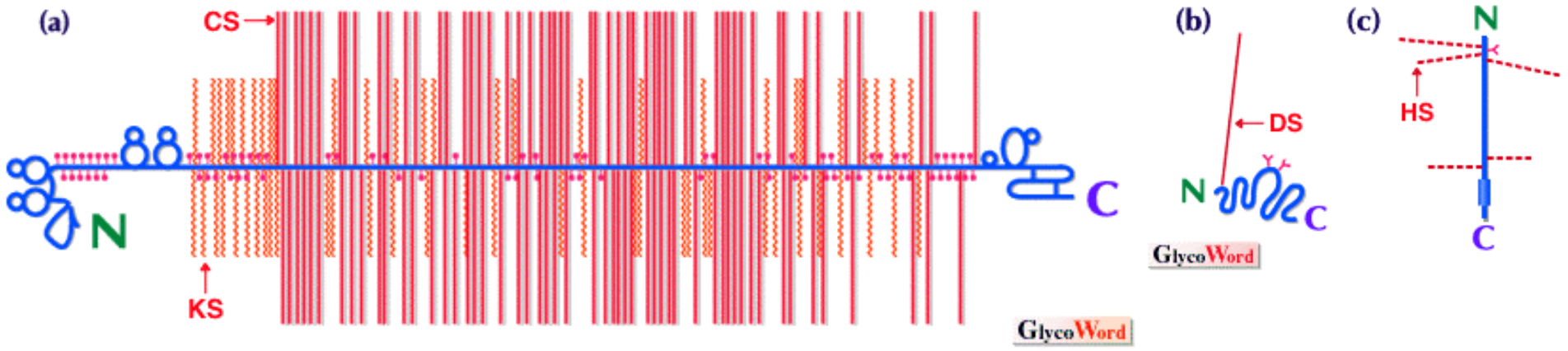
keratan sulfate :

galactose -N-acetylglucosamine.

Proteoglycans

- glycosylated “core protein” backbone
- more than 20 genetically different species of core proteins have been identified :

  (a) aggrecan, (b) decorin, (c) syndecan

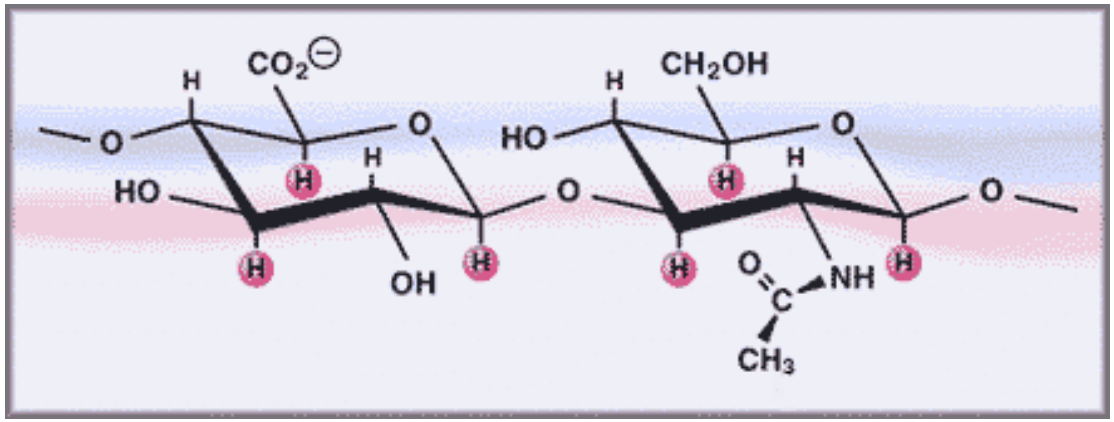


Glycosaminoglycan in skin

- Sulfated glycosaminoglycans – core protein
- most abundant unsulfated glycosaminoglycans

  Hyaluronic acid (HA, Hyaluronan) :

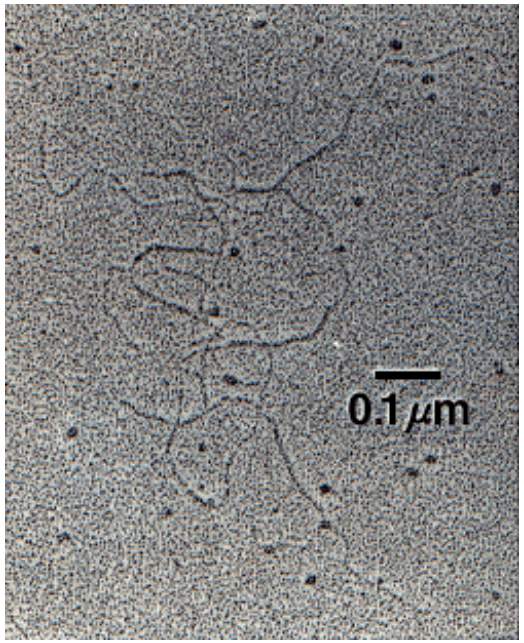
  glucuronic acid - N - acetylglucosamine



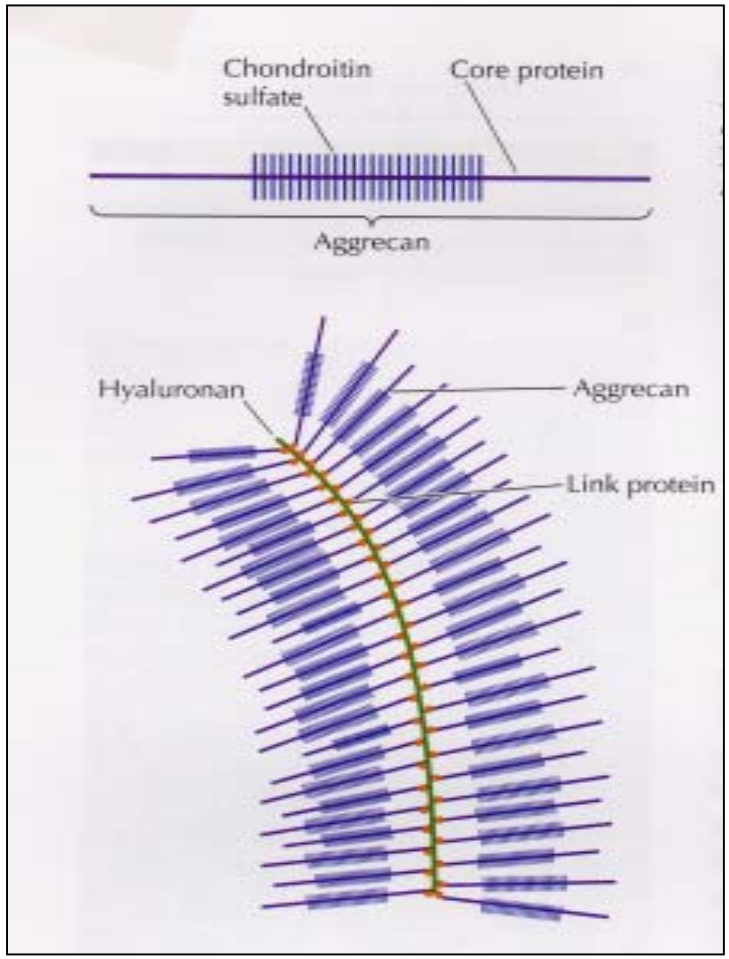
Hyaluronan

- Hyaluronan is a major constituent of the extracellular matrix in which most tissues differentiate
- The largest amount of hyaluronan resides in skin tissue (7-8 g per average adult human, ~50% of the total in the body), where it is present in both the dermis (~0.5 mg/g wet tissue) and the epidermis (~0.1 mg/g wet tissue)

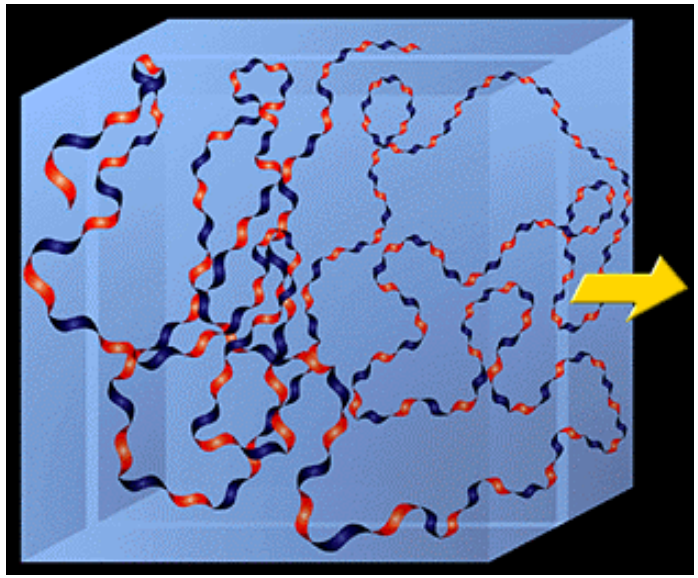
The number of repeat disaccharides, in a completed hyaluronan molecule can reach 10,000 or more, a molecular mass of ~4 million daltons (each disaccharide is ~400 daltons). The average length of a disaccharide is ~1 nm. Thus, a hyaluronan molecule of 10,000 repeats could extend 10 μm if stretched from end to end.



electron micrograph of a few intertwined hyaluronan molecules

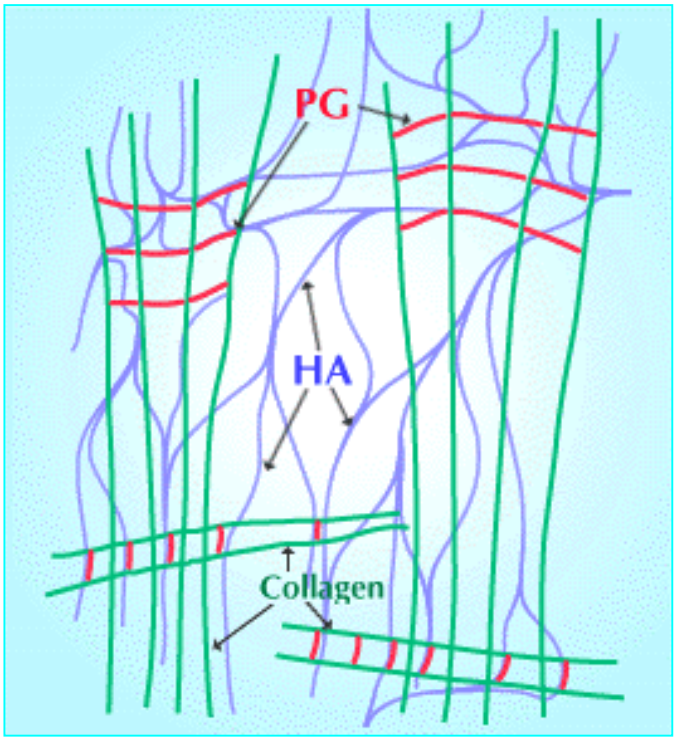


Covalent cross-links in hyaluronan matrices have been developed to create stable networks and semi-solid materials exhibiting pronounced viscoelastic properties



hyaluronan meshwork in aqueous solution

Proteoglycans (PGs) bridge the collagen fibrils, via specific binding sites on the collagen fibrils, and the collagen-PG structures are held apart by a hyaluronan meshwork that interacts with the chondroitin sulfate components of the PG bridges.



Amount and distribution of hyaluronan in the dermis might related to aging skin change.

Proteoglycans detected in human skin extracts are decorin and versican.

연구목적

- 피부주름개선 성분의 유효성을 객관적으로 평가할 수 있는 in vitro 시험방법을 추가

- 진피기질의 주된 glycosaminoglycan (GAG)인 hyaluronan이 피부주름개선 성분들에 의해 정량적인 변화(예, 생합성 증가)를 보이는지 확인

- GAG 정량과정의 복잡한 생화학적 검출기법을 간편하게 대체하여 효력시험으로 공유할 만한 시험기준을 탐색

연구방법

- 시료: vitamine A 유도체, all-trans retinol, retinyl palmitate, polyethoxyretinide retinamide 및 hydroxyproline

- 측정: 배양 인체섬유모세포와 마우스 유래 표준섬유모세포주에서 hyaluronan(HA)의 정량적 평가

- 평가방법의 용이성 및 유용성: 최근 개발된 HABP ELISA assay를 적용시켜 배양시험 방법 및 조건을 검토

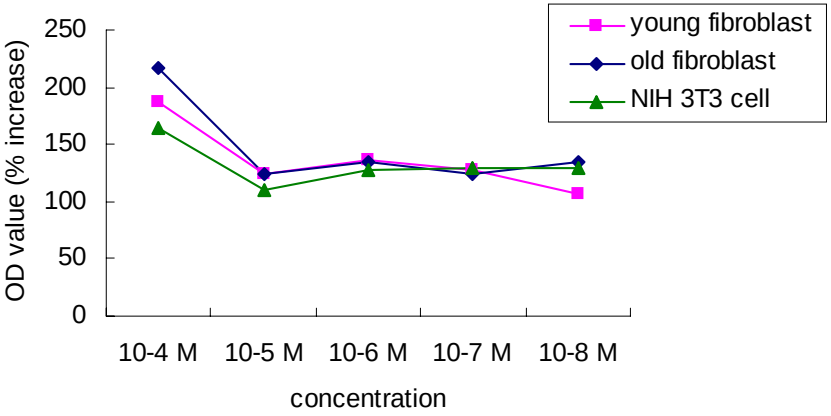
연구진행

- MTT assay *: in vitro* 배양실험의 적용조건 탐색
- Hyaluronan Binding Protein ELISA

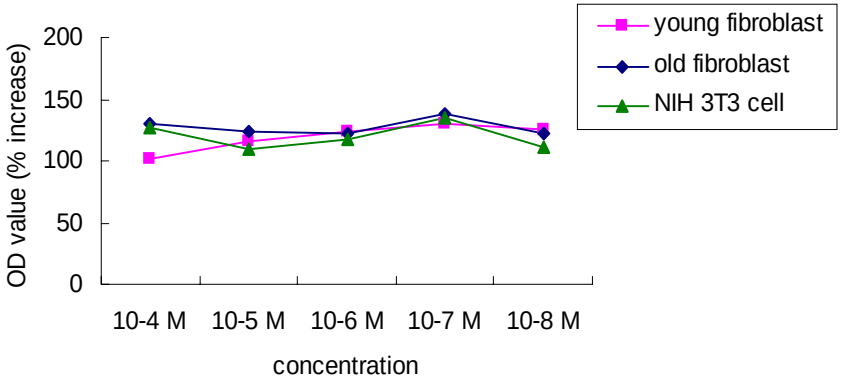
- 시료 / 처치방법
  농도 $10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$ M,
  처치시간 8 - 24시간
- 배양세포의 선택기준 탐색
  인체피부 유래 섬유모세포 2종 (신생아 vs. 장년)
  표준세포주(NIH 3T3 fibroblast, mouse origin)

MTT assay

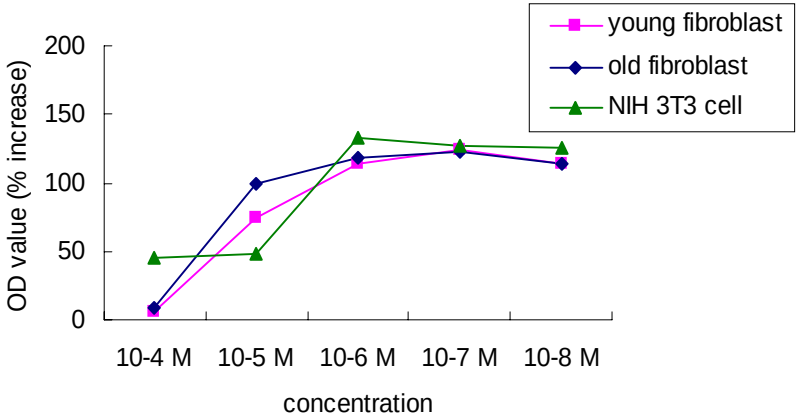
A. MTT assay with **all trans retinol**



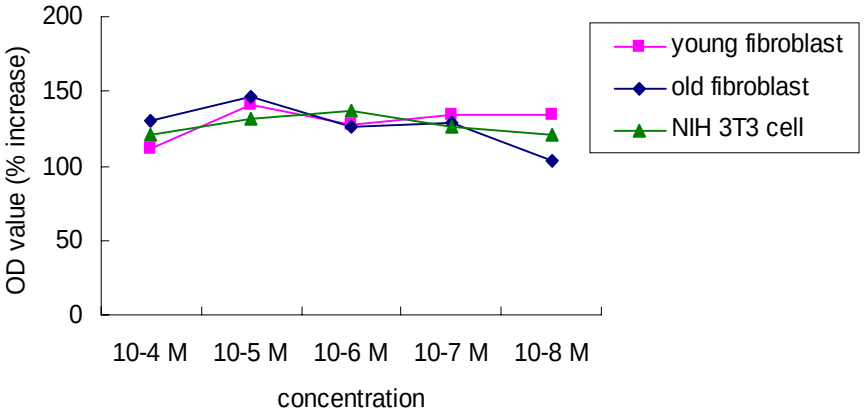
B. MTT assay with **retinyl palmitate**



C. MTT assay with **polyethoxyretinide retinamide**

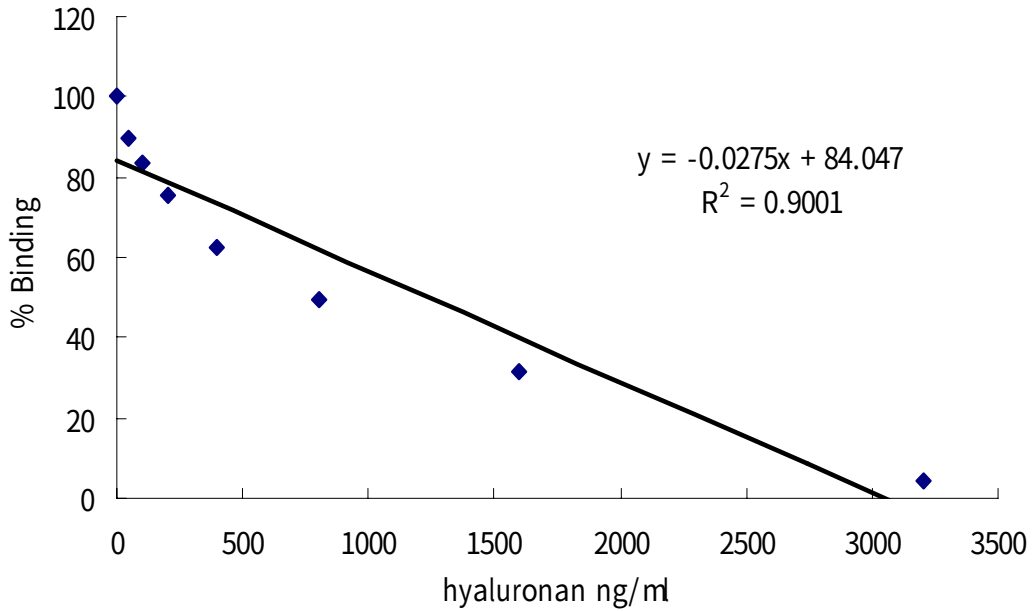


D. MTT assay with **hydroxyproline**



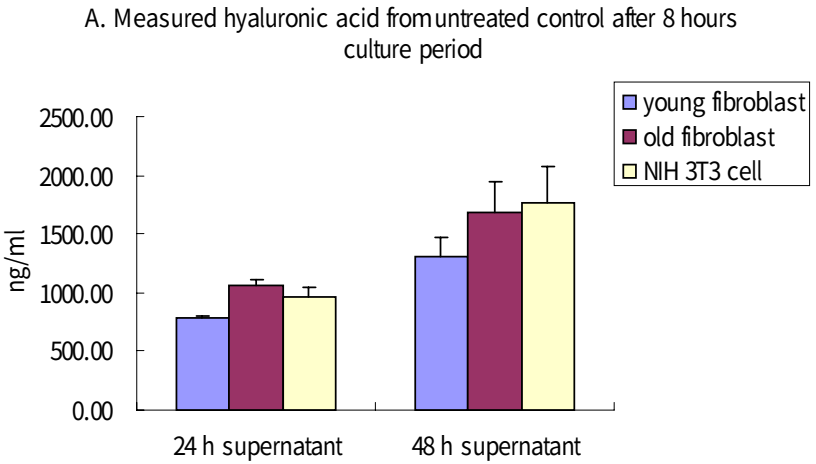
Hyaluronan level detection;

hyaluronan의 양은 항원-항체 결합 분획(percentile)에 역비례하며, 이미 알고 있는 표준농도곡선 (at OD 405nm)으로 부터 계산되어 얻어짐

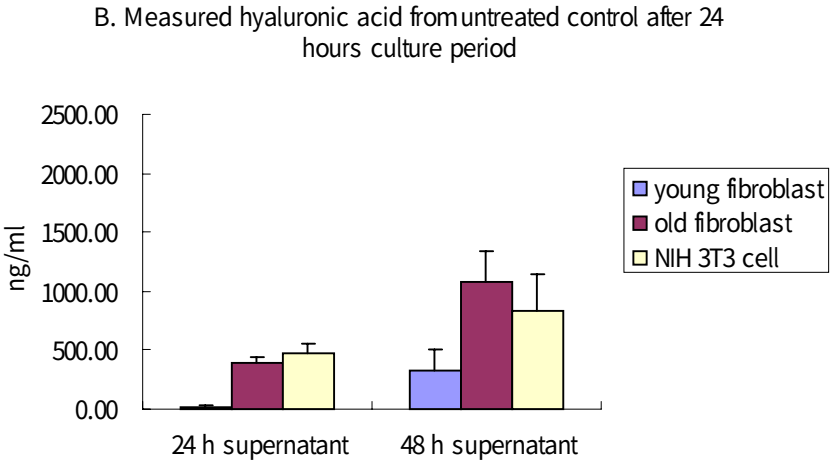


(Echelon bioscience, Salt Lake, UT, USA)

- Hyaluronan ELISA :
  정량적 측정시험에 적합한 배양조건확립을 위해 처치시간 8 - 24시간, 배양상청액의 회수시점 24 - 48시간, 세포 접종조건 $5x10^4$ cells in 24 well 등



- 정상 무처치 대조군의 HA 생합성의 특성 : NIH 3T3 cell과 old fibroblast 가 neonatal fibrobalst 보다 우세한 경향/ 초기배양시점에서 HA 생합성 절대량이 증가되어 있음



결 과

배양조건에서 배양시점에 따른 hyaluronan 생합성의 특성 :

1. 초기 배양시점에서 hyaluronan 생성이 증가되어 있음 (8h vs. 24h)

2. 배양세포간 차이 특히, old fibroblast와 NIH 3T3 cell에서 neonatal fibroblast에 비해 hyaluronan 생합성 정도가 상대적으로 높음

→ 초기시점에서 HA 정량적 분석결과는 세포배양과정의 생리적 특성에 의해 좌우될 수 있음 (cell attach or confluency without contact inhibition, lack of degrading enzyme 등); 일정시간(24시간) 배양경과 후 측정하는 것이 중요

시료처치에 따른 hyaluronan 생합성 차이: 24시간 처치

concentration		hyaluronan (ng/ml) at 24 h supernatant			hyaluronan (ng/ml) at 48 h supernatant		
		young fibroblast	old fibroblast	NIH 3T3	young fibroblast	old fibroblast	NIH 3T3
retinol	10^{-4}M	737±445	2135±354	1333±451	531±279	1557±421	857±263
	10^{-5}M	411±213	1679±231	1173±198	402±102	1233±256	523±202
	10^{-6}M	331±159	1410±188	1210±338	391±49	1486±112	616±139
	10^{-7}M	301±99	1555±169	1354±224	344±52	1439±172	499±182
	10^{-8}M	325±124	1561±133	1063±351	342±87	1701±143	633±143
retinyl palmitate	10^{-4}M	252±47	1105±351	651±153	319±114	1021±224	723±251
	10^{-5}M	601±55	1233±463	831±227	388±142	885±332	855±247
	10^{-6}M	489±171	1038±115	938±121	341±79	1014±211	714±161
	10^{-7}M	858±67	1659±353	1344±252	398±62	986±125	676±165
	10^{-8}M	710±154	1354±255	1122±189	375±147	935±87	555±145
polyethoxyretinide retinamide	10^{-4}M	< 50 *	< 50 *	< 50 *	< 50 *	< 50 *	< 50 *
	10^{-5}M	844±199	635±131	885±257	218±32	865±247	689±345
	10^{-6}M	1434±147	1952±189	1611±219	586±63	1589±279	1733±377
	10^{-7}M	1681±155	1657±237	1453±237	499±133	3828±475	2565±263
	10^{-8}M	1363±178	1944±335	1546±299	363±102	4119±662	3115±361
hydroxyproline	10^{-4}M	484±67	1241±302	649±115	257±34	1233±366	459±222
	10^{-5}M	552±86	1442±356	1238±169	355±79	1058±341	751±172
	10^{-6}M	407±154	1391±188	1012±188	384±91	1115±255	681±121
	10^{-7}M	977±213	1105±245	1233±195	422±57	981±333	729±95
	10^{-8}M	883±258	908±212	1123±255	353±65	953±165	558±125
controls	10^{-4}M	1127±211	1867±259	1154±191	391±72	1198±122	493±89
	10^{-5}M	935±152	1798±122	1005±232	299±101	1075±231	599±67
	10^{-6}M	1093±235	1501±148	1163±155	267±35	967±77	667±78
	10^{-7}M	1187±98	1411±159	1242±187	321±119	988±103	521±101
	10^{-8}M	1243±211	1522±255	1088±132	347±35	1152±266	747±132

동일한 배양기간, 시료처치에 의해 배양액으로부터 획득한 단백질 양 (average level of protein, ug/ul)

24 h supernatant	10^{-4} M	10^{-5} M	10^{-6} M	10^{-7} M	10^{-8} M
retinol	0.491	0.462	0.435	0.572	0.645
retinyl palmitate	0.311	0.396	0.349	0.368	0.371
polyethoxyretinide retinamide	0.489	0.478	0.452	0.511	0.513
hydroxyproline	0.298	0.491	0.520	0.524	0.546
48 h supernatant	10^{-4} M	10^{-5} M	10^{-6} M	10^{-7} M	10^{-8} M
retinol	0.491	0.647	0.604	0.620	0.664
retinyl palmitate	0.483	0.482	0.530	0.557	0.550
polyethoxyretinide retinamide	0.470	0.516	0.541	0.469	0.548
hydroxyproline	0.485	0.523	0.530	0.577	0.571

Hyaluronan 생합성 평가:
Ratio of hyaluronic acid (HA) per total protein from supernatants

concentration		24 h supernatant (HA/protein)			48 h supernatant (HA/protein)		
		young fibroblast	old fibroblast	NIH 3T3	young fibroblast	old fibroblast	NIH 3T3
retinol	10^{-4}M	0.15	0.43	0.27	0.11	0.32	0.17
	10^{-5}M	0.09	0.36	0.25	0.06	0.19	0.08
	10^{-6}M	0.08	0.32	0.28	0.06	0.24	0.10
	10^{-7}M	0.05	0.27	0.24	0.06	0.23	0.08
	10^{-8}M	0.05	0.24	0.16	0.05	0.25	0.09
retinyl palmitate	10^{-4}M	0.08	0.35	0.21	0.06	0.21	0.15
	10^{-5}M	0.15	0.31	0.21	0.08	0.18	0.18
	10^{-6}M	0.14	0.29	0.27	0.06	0.19	0.13
	10^{-7}M	0.23	0.45	0.36	0.07	0.18	0.12
	10^{-8}M	0.19	0.36	0.30	0.07	0.17	0.10
polyethoxyretinide retinamide	10^{-4}M	nd *	nd *	nd *	nd *	nd *	nd *
	10^{-5}M	0.18	0.13	0.18	0.04	0.17	0.13
	10^{-6}M	0.32	0.43	0.36	0.11	0.29	0.32
	10^{-7}M	0.33	0.32	0.28	0.11	0.82	0.55
	10^{-8}M	0.26	0.38	0.30	0.07	0.75	0.57
hydroxyproline	10^{-4}M	0.16	0.42	0.22	0.05	0.25	0.09
	10^{-5}M	0.11	0.29	0.25	0.07	0.20	0.14
	10^{-6}M	0.08	0.27	0.19	0.07	0.21	0.13
	10^{-7}M	0.19	0.21	0.24	0.07	0.17	0.13
	10^{-8}M	0.16	0.17	0.21	0.06	0.17	0.10

HA정량측정을 위한 세포배양실험의 필수적 조건들

가. 배양세포의 선택 :

인체 유래 섬유모세포의 배양시 연령에 따른 세포배양 속도의 차이가 존재할 뿐 아니라 초기 세포 증식과정에서 hyaluronic acid의 생산량이 서로 다르게 출현하므로 이는 서로 다른 연령군에서 섬유모세포를 채취할 경우 실험실간 혹은 검사자간 오차를 초래할 수 있는 일차적인 요인이 될 수 있음.

이를 피하기 위해서 마우스 유래의 표준세포주 NIH 3T3 cell을 이용하는 것이 바람직한데, 이 세포주는 세포증식속도는 신생아 유래의 인체피부 섬유모세포와 유사하고 약물을 처치하지 않는 생리적 상태에서 hyaluronic acid의 생합성 정도는 old fibroblast와 비슷하므로 개별 실험시 재현성을 확보할 수 있는 수준으로 간주됨.

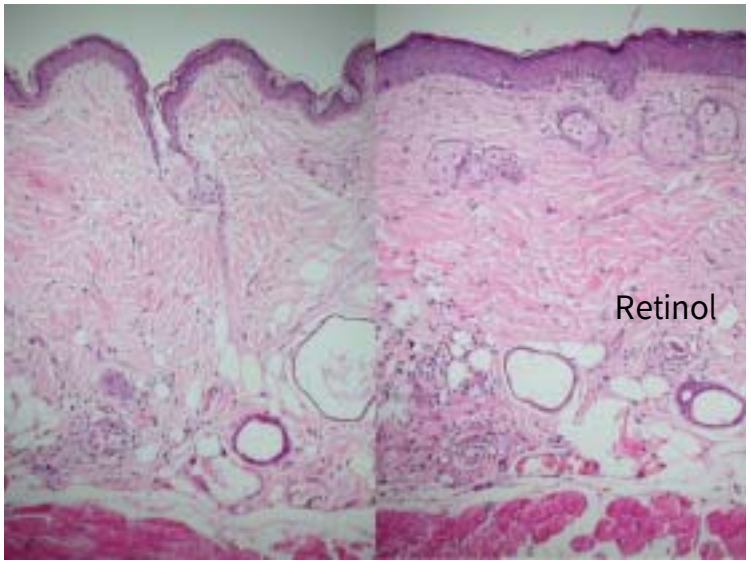
나. 배양조건의 선택 :

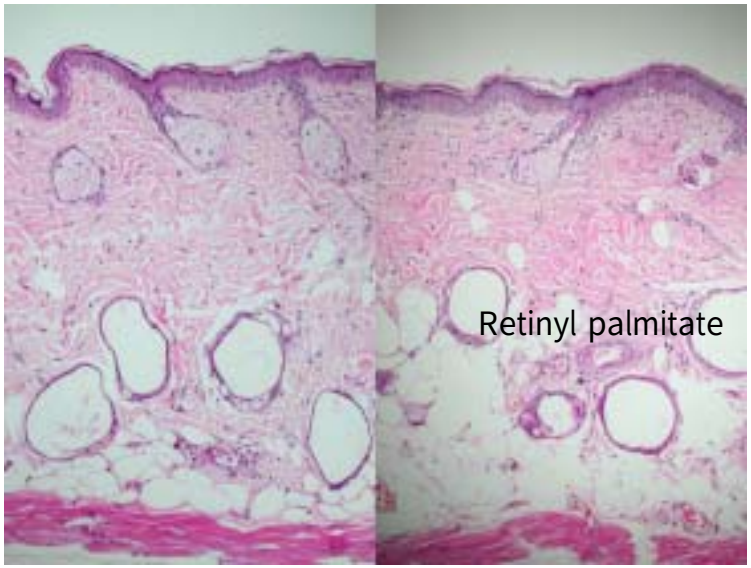
초기 12시간 이내의 배양과정에서 생합성이 증가된 hyaluronic acid는 생리적으로 세포증식과 이동을 촉진하는 작용을 나타내므로 마우스유래 표준세포주로 배양실험을 수행할 때에는 먼저 배양시기(예, 12시간, 24시간, 48시간)에 따른 cell kinetic 차이를 알아보는 선행실험이 필요함.

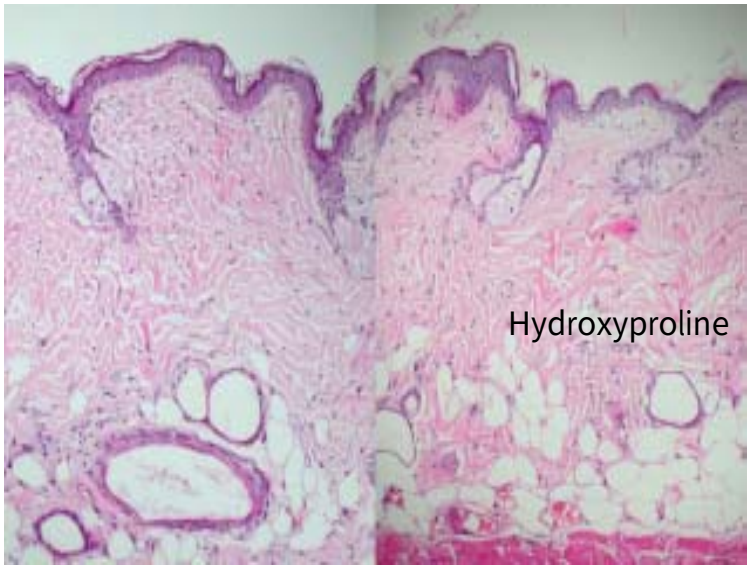
다. 측정시기와 방법의 선택:

세포배양-시료처치 이후 24시간과 48시간에 회수한 배양상청액에서 비록 세포주는 같더라도 서로 다른 수준의 hyaluronic acid 합성정도 (예, 배양상청액을 늦게 회수할수록 측정치가 낮아지는 경향)를 보였지만 polyethoxyretinide retinamide처럼 hyaluronic acid 생합성을 현저히 촉진시키는 시료는 영향을 크게 받지 않음.
또한 측정된 총 단백질 양에 포함되는 hyaluronic acid의 비율을 분석할 수 있으므로 HA의 상대지표물질로서 총 단백질 정량 혹은 교원섬유 정량을 선택하여 함께 분석하는 것도 유용함.

Histopathological changes after topical application (hairless mouse, twice daily, 38 treatments, H-E 200 X)







Changes of histopathological parameters with topical treatment

	epidermal thickness (um)		dermal thickness (um)		dermal deposition pattern
	before*	after	before	after	
retinol (0.286%)	14.8 ± 0.3	24.8 ± 0.5	225 ± 15	195 ± 25	some thick collagen bundles
retinyl palmitate (0.525%)	16.5 ± 0.5	19.5 ± 0.7	187 ± 23	205 ± 15	not apparent
polyethoxyretinide retinamide (0.831%)	15.5 ± 0.3	22.5 ± 0.7	203 ± 27	211 ± 34	not apparent
hydroxyproline (0.131%)	15.8 ± 0.5	14.5 ± 0.3	185 ± 15	210 ± 25	not apparent
control	13.8 ± 0.5	12.8 ± 0.5	195 ± 25	175 ± 35	not apparent

측정된 표피의 두께변화는 대조군과 비교할 때 vitamine-A 유도체 3종의 처치에 의해 모두 유의하게 증가되는 것이 관찰되었고 retinol, polyethoxyretinide retinamide, retinyl palmitate 의 순으로 나타났다. 그러나 진피의 변화는 저명하지 않았으며 GAG 생산 증가에 따라 흔히 관찰되는 표피기저막 하부의 기질침착정도 역시 대조군에 비해 명확하게 구분할 수 없었음.

Changes of skin parameters reflecting the wrinkle profiles

	R4 (smoothness)		R5* (depth)	
	before	after	before	after
retinol 0.286%	0.113 ± 0.13	0.121 ± 0.08	0.04	0.05
retinyl palmitate 0.525%	0.108 ± 0.10	0.101 ± 0.05	0.05	0.05
polyethoxyretinide retinamide 0.831%	0.105 ± 0.09	0.096 ± 0.03	0.04	0.05
hydroxyproline 0.131%	0.122 ± 0.19	0.115 ± 0.06	0.03	0.03
control	0.118 ± 0.17	0.114 ± 0.05	0.04	0.05

Microrelief analysis (replica) by Skin Visiometer (SV600, Courage-Khazaka, Germany), * inappropriate depth for compare

피부표면주름이 개선되면 일반적으로 R4, R5값은 낮아지는데 통계적인 차이는 없었으나 polyethoxy retinide retinamide와 retinyl palmitate 처치에 의해 R4 값이 다소 변화하였다. 한편 retinol은 이와 반대로 처치 전에 비해 높은 R4값을 보였는데, 이는 비록 표피 두께가 증가되어도 다른 한편으로 불규칙한 표면의 거칠기를 초래하여 볼 수 있는 일시적인 결과로 의심되었음.

생체피부적용시험에서 polyethoxyretinide retinamide를 비롯한 vitamine-A 유도체의 효과가 hydroxyproline보다 상대적으로 의의있는 결과를 나타내었는데, 이는 배양실험에서 관찰된 hyaluronic acid 정량측정의 결과와 관련되어 있는 것으로 보임.

그러나 생체피부 평가시험의 경우 잘 조절된 시험관내 실험에 비해 많은 인자들이 관여하므로 상기 평가방법들 외에 다양한 방법들을 시도하여 측정자간 오류를 최소화하는 노력이 바람직함.

결 론

① 글루코스아미노글리칸 생합성 정도를 평가하는데 hyaluronic acid의 정량적 측정이 유용한 지침으로 응용될 수 있다.

② 섬유모세포배양에 따른 hyaluronic acid 측정조건으로 표준 시험세포주로서 NIH 3T3 cell이 연령대가 다른 인체피부유래 일차배양세포에 비해 일정한 수준의 정량적 발현을 유도한다.

③ 세포배양기간과 hyaluronic acid 분석을 위한 배양상청액의 회수시기에 따라 결과의 편차를 보일 수 있으므로 본 시험을 시작하기 전 표준세포주를 이용한 예비시험에서 이 점을 먼저 확인할 필요가 있다.

④ 비교적 간단하고 빠른 정량적 검사법으로서 hyaluronic acid 효소면역측정법의 유의성과 재현성을 확인할 수 있었다.

⑤ 생체피부 주름평가시험을 병행할 경우 다양한 방법을 시도하여 연관성이 높은 방법을 선택하고, 이를 통해 hyaluronic acid 정량적 측정의 유용성을 재확인 할 수 있다.

Wrinkle’ Free™ in Fabrics

Rapid growing trendy market,
Mechanism of cross-linking the cellulose fibers in cotton fabrics; DMDHEU (free formaldehyde release), BTCA, citric acid, polymers of maleic acid, etc.

New technology: Nano-tech based

연구배경

GAG와 피부주름 (외인성 및 내인성 피부노화의 진행)

Koshiishi I, Horikoshi E, Mitani H, Imanari T. Quantitative alterations of hyaluronan and dermatan sulfate in the hairless mouse dorsal skin exposed to chronic UV irradiation. Biochim Biophys Acta 1428:327-333, 1999

Margelin D, Fourtanier A, Thevenin T, Medaisko C, Breton M, Picard J. Alterations of proteoglycans in ultraviolet-irradiated skin. Photochem Photobiol 58:211-218, 1993

Ghersetich I, Lotti T, Campanile G, Grappone C, Dini G. Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging. Int J Dermatol. 33:119-122, 1994

Bernstein EF, Underhill CB, Hahn PJ, Brown DB, Uitto J. Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans. Br J Dermatol 135:255-262, 1996

Age-related changes in the proteoglycans of human skin

- As a function of age, there is a decrease in the proportion of large chondroitin sulfate proteoglycans (versican) and a concomitant increase in the proportion of small dermatan sulfate proteoglycans (decorin). Based on reactivity with antibodies to various chondroitin sulfate epitopes, fetal versican differs from the versican found in older skin with respect to the chondroitin sulfate chains. Also, the decorin of fetal skin is slightly larger, while the decorin of older skin shows greater polydispersity in both its size and its charge to mass ratio. There are also age-related differences in the size and polydispersity of the core proteins of decorin. The most pronounced change in skin proteoglycans is the appearance in mature skin of a proteoglycan which is smaller than decorin, but which has the same amino terminal amino acid sequence as decorin. This small proteoglycan is abundant in mature skin and may be a catabolic fragment of decorin or an alternatively spliced form of decorin. In light of the known ability of decorin to influence collagen fibrillogenesis and fibril diameter, the appearance of this small decorin-related proteoglycan may have a significant effect on skin elasticity. The observation that proteoglycans in skin show dramatic age-related differences suggests that these changes may be involved in the age-related changes in the physical properties of skin.

- Arch Biochem Biophys. 2000 Jan 1;373(1):91-101.

Hyaluronic acid and dermatan sulfate are selectively stimulated by retinoic acid in irradiated and nonirradiated hairless mouse skin.

- When assessed at the end of 10 wk of UVB irradiation, the GAG content had doubled, without a change in the hyaluronic acid (HA) to dermatan sulfate (DS) ratio. When irradiation was discontinued, the GAG content decreased progressively until the end of the experimental period. This decline was totally inhibited by RA treatment and could be ascribed to a marked increase in hyaluronic acid (78%), whereas no significant change in DS was observed. In nonirradiated skin, however, topical RA increased GAG levels mainly by a pronounced increase in the content (50%) and the synthesis (40%) of DS. In untreated mice, the HA/DS ratio decreased significantly with age in both irradiated and nonirradiated mice.
- J Invest Dermatol. 1996 Mar;106(3):505-9.

El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, Ahmad H, Uitto J. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. Exp Dermatol. 2002 Oct;11(5):398-405.

Kim SJ, Park JH, Kim DH, Won YH, Maibach HI. Increased in vivo collagen synthesis and in vitro cell proliferative effect of glycolic acid. Dermatol Surg. 1998 Oct;24(10):1054-8.

Kim SJ, Won YH. The effect of glycolic acid on cultured human skin fibroblasts: cell proliferative effect and increased collagen synthesis. J Dermatol. 1998 Feb;25(2):85-9.