

Amino propane sulfonic acid의 임상적 개선효과 및 새로운 Opticoprofilometry 방법에 의한 정량분석

선보경, 이해광, 김은정, 천지민, 김종일, 박원재
(주)태평양 기술연구원

Clinical improvement of amino propane sulfonic acid and it's quantitative measurement with a new opticoprofilometry

Bo-kyoung Sun, Hae-kwang Lee, Eun-jeong Kim,
Ji-min Cheon, Jong-il Kim, Won-jae Park
(Pacific R&D Center)

요 약

Amino propane sulfonic acid(APSA)가 피부에 미치는 영향을 non-invasive technique으로 사람의 피부를 이용하여 비교분석하여 보았다. 측정변수로는 보습, 탄력, 피부색, 피부주름 등 4가지 측면에서 실험을 수행하였다. *In vitro* culture에서는 fibroblast의 증식은 촉진하였으나 keratinocyte의 증식에는 영향을 주지 못하였다. 또한 raft culture법을 이용해 APSA를 처리하였을 때도 keratinocyte에서 유사한 결과를 얻을수 있었으므로 *in vitro* 상에서 표피보다는 진피부분에 영향을 주는 것으로 보인다. 임상시험 결과, 피부 보습에는 영향을 주지 않았으며 피부색, 탄력, 잔주름 등이 개선된 효과를 얻을 수 있었다. 특히 New Opticoprofilometry 법인 Visiometer법을 이용하였을 때 피부 주름 변화에 대해 더 유의한 결과를 얻을 수 있었다.

1. 서 론

피부는 단순한 신체 구성조직이 아니라 사람의 몸에서 가장 활동적인 기관이라 할 수 있다. 또한 체내에서 가장 중요한 일들을 담당하고 있으나 나이가 들어감에 따라 그 기능은 점차 약해져 가게된다. 그래서 항노화효과를 소구하는 많은 제품들이 여러 화장품회사에서 만들어져 왔다. 특히 최근의 화장품 개발동향이 점점 고기능성을 추구하는 방향으로 나아가고 있으며 각 화장품회사들은 피부노화를 예방할 수 있는 원료개발에 더욱 연구를 집중하고 있다. 이런 연구방향의 일환으로 최근 개발된 원료의 하나인 APSA가 피부에 미치는 영향에 관해 알아보려고 한다.

APSA는 taurine계열 유도체로서 탄소 하나가 추가된 구조를 갖는 물질이다. APSA의 효능은 아직 밝혀지지 않았으나 taurine의 효능으로 미루어 짐작해 볼 수 있다. Taurine은 주로 신경조직에 존재하는 GABA(gamma aminobutyric acid)를 통한 간접적 신경활성 조절 물질로 알려져 있다⁽¹⁾. 또한, 독성물질제거작용, 항산화작용, 막안정화작용등에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다⁽²⁾. APSA는 유사 유도체로서 기능면에서도 taurine과 유사한 효과를 보일 것으로 기대되며⁽³⁾ 현재 GABA를 이용한 화장품도 출시되고 있는 바 본보에서는 APSA가 이러한 효능 즉, 산소대사의 촉진, free radical에 대한 방어능, 혈류량 증가⁽⁴⁾ 등의 여러가지 효과가 피부에서는 어떤 효과를 나타내는지 알아보려고 하였다. 특히 anti-wrinkle effects 측면에서 조사하여 보았는데 피부의 주름을 분석함에 있어서 기존의 방법인 Silflo replica를 이용한 화상분석법으로 측정된 결과와 최근에 새로운 분석법으로 나온 optiscopofilometry 법인 Skin Visiometer를 이용한 2가지 방법을 비교하여 더 나은 분석법을 확립해 보고자 하였다. 실험내용으로는 먼저 monolayer와 raft culture를 이용한 실험에서 APSA가 cell proliferation과 differentiation에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위하여 fibroblast와 keratinocyte를 이용하였다. 두번째로, 여성 피험자를 선정하여 얼굴에 (특히 crow's feet region) cream을 바르게 하고 그 변화를 피부보습, 피부색, 탄력, 주름변화의 측면에서 비파괴적으로 검사하였다.

2. 시험 방법

1. In vitro cell culture

Fibroblast와 keratinocyte를 96 microwell plate에 well당 4,000cell을 seeding 한후

2일 간격으로 APSA를 7일동안 처리한후 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)(Sigma) assay를 수행하였다⁽⁵⁾.

2. Raft culture of keratinocyte

Collagen에 NIH3T3 fibroblast를 embed하여 dermal equivalent를 준비하였다. 2일 후에, 표면에 keratinocyte를 seeding하고 E-media에서 일주일간 culture한 후 표면에 노출된 부위에 APSA를 2일간격으로 7일간 처리하였다^(6,7).

3. Immunohistochemistry

Carnoy's fixative에 sample을 고정시키고, 탈수 및 포매과정을 거친후 section하여 H&E staining과 immunostaining을 행하였다⁽⁸⁾. 이 때 사용한 antiserum은 rabbit polyclonal anti-human keratin 14 antisera(1:100)(ICN Biomedicals Inc.), mouse polyclonal anti-human keratin 1(1:400)(Enzo Diagnostics), mouse monoclonal anti-human filaggrin(1:200)(Biomedical Technologies Inc.)으로 하였다. 위의 antiserum으로 incubation후 immunogold enhancement(Janssen Chemica)를 처리하여 관찰하였다.

4. Clinical test

35-55세 사이의 이전의 병력이 없는 건강한 여성 20명을 선발하여 실험에 임하였다. 사용한 시료는 0.7% APSA가 함유된 cream과 APSA가 들어있지 않은 cream을 대조군으로 사용하였다.

2개의 시료중 한 시료는 피험자의 왼쪽안면부에 도포하고 다른 하나는 오른쪽에 도포하였다. 시료는 1일 2회 도포하고 도포 개시전 최초의 피부상태를 측정한후 3개월, 6개월 경과 후 각각 재측정하였다. 보습측정을 위해서 Corneometer CM820(C+K)과 Skicon-100(IFS)을 이용하였고, 피부색 측정을 위해서 Chromameter CR-300(Minolta)을 사용하였다.

피부의 biomechanical property를 보기 위하여 Fermometer SEM 474(C+K)를 사용하였고 피부주름분석을 위해서 Skin Visiometer SV400(C+K)과 Silflo replica의 Image Analysis(Joyce Loeb)등 2가지 방법을 이용하여 비교하였다. 위의 모든실험은 온도 23-24℃와 상대습도 35-40%의 조건이 유지되는 항온항습실에서 실시하였다.

측정한 모든 결과는 Student t-test를 이용하여 통계적 유의성(p<0.05)을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

1. In vitro results

(1) Fibroblasts와 keratinocytes의 proliferation에 대한 영향

APSA의 농도를 달리해가면서 fibroblasts와 keratinocytes에 처리한 결과 Fig.1에 나타난 것처럼 fibroblasts에 0.0002% 처리했을때 cell viability가 약 20% 정도 증가함을 알 수 있었다. 그러나 keratinocytes의 proliferation에는 어떤 영향도 나타내지 않았으므로 APSA는 *in vitro* 상에서 진피 부분에 더 영향을 주는 것으로 사료된다.

$$\text{cell viability} = \frac{\text{Optical density of treated}}{\text{Optical density of non-treated}} \times 100 (\%)$$

(2) Epidermal differentiation에 대한 영향

APSA가 epidermal differentiation에 미치는 영향을 알아보기 위하여 raft culture를 한 후 epidermis의 여러 layer의 많은 marker 중 K14(basal layer), K1(suprabasal layer), filaggrin(suprabasal, granular layer)을 marker로 선정하여 anti-K14, anti-K1, anti-filaggrin antiserum을 이용해 immunohistology를 행하였다. 그 결과(Fig.2.) anti-K14 immuno staining은 basal layer에만 국한되어 관찰되었고 anti-K1 staining은 suprabasal layer에, anti-filaggrin staining은 basal layer에는 관찰되지 않으면서 suprabasal과 granular layer에서 관찰되었다. 이상의 결과로부터 APSA는 epidermal layer의 정상적인 differentiation에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다.

2. Clinical test results

(1) Skin hydration

Skin hydration은 앞서 언급된 것처럼 conductance를 측정하는 Skicon과 capacitance를 측정하는 Corneometer를 사용해 측정하였다.

그 결과는 Table 1과 Fig.3.에 나타난 것처럼 APSA를 함유한 제품을 바른 부위가 APSA가 들어있지 않은 제품을 바른 부위보다 피부 수분 증가율은 크게 나타났으나 통계적 유의차는 나타나지 않았다. 또, 두가지 사용 기기중 Corneometer보다는 Skicon이 변화량이 크게 나타났는데 이것은 아마도 두 측정기기 간의 측정 원리와 sensitivity가 다르기 때문이라고 생각되어진다. 특히 본 제품들처럼 높은 수분 함량을 부여할 수 있는 제품들의 경우에는, 높은 수분상태나 제품을 바른 후 측정할 때 더 정확한 차이를 나타내는 Skicon의 사용이 바람직할 것으로 사료된다. 본 실험결과에 나타난 모든 clinical test 결과는 다음 식으로 구하였다.

$$\% \text{ changes} = \frac{\text{value of time T} - \text{value of time 0}}{\text{value of time 0}} \times 100 (\%)$$

(2) Skin color

본 실험에 사용된 Chromameter는 L value((+)white ↔ black(-)), a value ((+)red ↔ green(-)), b value((+)yellow ↔ blue(-))를 측정해 피부의 색상 변화를 측정하는 기기이다.

본 실험에서는 초기값을 측정 후 각 value의 변화를 검토했는데 L값에 있어서는 APSA 함유 제품을 바른 곳이 그 증가량이 더 컸으나 통계적 유의차는 없었다(Fig.4. , Table 1) 반면 a value와 b value는 APSA 함유 제품, APSA 비함유 제품 모두 증가되었으며 두 군간에 사용 후 6개월에서 유의차가 존재했다(Table 1).

즉, APSA가 피부의 색을 (white)-red-yellow 쪽으로 변화시켰으며 사용자들도 여드름이 줄고 피부색이 균일해 졌다는 사용감을 나타내었다(data not shown). 이것은 아마도 APSA가 피부호흡을 증대시켜주고 혈행을 촉진시키며 피로와 stress를 방어하는 기작이 있을 것이라는 보고와 관련지어 생각해 볼 때 피부 조직의 대사가 원활해져 혈색이 좋아지는 경향을 나타낸 것으로 사료되어진다.

(3) Skin biomechanical properties

본 실험에 사용된 측정 기기는 2mm probe를 가진 Fermometer로서 측정된 초기값은 서양인의 피부⁽⁹⁾와는 조금 다르게 나타났다. 측정된 항목은 plasticity,

suppleness, tonicity, extensibility, elasticity로서 그 계산방법은 측정된 curve의 정해진 point들의 값을 가지고 일반적인 분석 방법에 따라 행하였다.

그 결과를 보면(Table 1) plasticity와 suppleness는 감소되는 경향을 나타내었으나 통계적 유의차는 관찰되지 않았다. 일반적으로 연령이 증가함에 따라 plasticity는 거의 변화가 없거나 아주 약간 증가하며 suppleness도 증가되는 경향을 나타낸다고 보고되어 있다. 반면 tonicity와 extensibility, elasticity는 연령이 증가함에 따라 감소하는 경향이 있다고 보고되어 있는데 본 실험결과에서는 제품을 지속적으로 사용한 결과 두 가지 제품 모두에서 tonicity와 extensibility, elasticity가 증가되는 경향을 나타내었고 elasticity는 APSA 함유 제품과 비함유 제품간에 (사용 후 3개월, 6개월에서 모두)유의차가 있게 변화되었다(Fig.5., Table 1). 이상의 결과로부터 APSA가 함유된 제품은 APSA가 함유되지 않은 제품에 비해 더 큰 피부 biomechanical property의 개선을 나타내며 특히 피부 탄력 (elasticity)의 개선에 현저한 효과를 나타냄을 알수 있었다.

이것은 *in vitro* 상의 결과에서 APSA가 dermal fibroblasts의 proliferation에 영향을 주는 것과 연관되어지는 결과로 APSA가 진피 부분의 cell들에 영향을 주어 피부의 biomechanical property가 개선되어 진다고 생각된다.

(4) Skin wrinkle

본 실험의 여러 목적중 가장 큰 목적이 피부 주름을 측정하는데 있어서 종래에 주로 사용되어졌던 Silflo replica의 Image analysis 이용 분석법을 새로운 opticoprofilometry 법인 Visiometer법으로 대체하는 것이 바람직한지를 검증하는 것이었다.

기존의 Image analysis 법은 replica에 쪼여주는 빛의 각도와 방향에 따라 image가 다르게 입혀지므로 통상 4-8방향의 값을 읽어서 평균을 내어 계산을 해야 하는 번거로움이 있었고, 같은 replica를 가지고 같은 값을 재현해 내기가 쉽지않다는 문제점이 있었다. 이에 반해 Visiometer 법은 색깔을 띤 투명한 silicone replica에 수직하게 쪼여주는 빛을 통해 입혀지는 image를 CCD camera로 포착해 그 상을 분석하는 방법으로서 하나의 replica를 다시 분석하여도 같은 값을 나타내는 좋은 재현성을 부여하는 방법이다(Fig.8.). 그러나 silicone replica를 만들 때 replica의 두께와 기포의 존재가 측정값에 영향을 주므로 균일한 replica의 채취 기술이 필요하다.

본 실험 결과를 분석하는데 있어서 피부 주름 replica를 분석하는 여러 parameter 중 가장 보편적으로 사용되는 Rz(average roughness)와 Ra(arithmetic average roughness)를 위주로 분석하였다.

그 결과를 보면 Visiometer나 Silflo 법 모두 제품을 사용함에 따라 피부 주름이 약간씩 감소되는 경향을 나타내었으나 Visiometer의 Ra값은 3개월과 6개월에, Rz값은 사용 후 6개월에 APSA 함유제품과 비함유제품간에 유의한 차이가 나타났다 (Fig.6., Table 1). 그러나 Silflo replica Image analysis 방법에서는 유의차가 존재하지 않았는데 이것은 아마도 Silflo 방법의 결과가 변화량의 평균에 비해 편차가 컸고 (Fig.7., Table 1), 피부 주름 변화를 측정하는 감도가 Visiometer에 비해 낮기 때문인것으로 생각되어진다.

따라서 두가지 방법이 분석방법이 서로 다르므로 각각의 장단점이 있겠으나 본 실험 결과를 통해 볼 때 정확한 silicone replica를 채취한다면 Visiometer법이 기존의 Image analysis법에 비해 사용이 간편하고 분석이 용이하며 더 정확한 차이를 얻을 수 있는 방법으로 평가된다. 아울러 APSA가 피부의 진피 부분에 미치는 영향을 collagen이나 extracellular matrix 구성성분을 통해서 검증할 예정이다.

Abstract

We had tested the effect of amino propane sulfonic acid(APSA) on the human skin with non-invasive technique. It was tested with four parameters that were hydration, elasticity, color and skin wrinkles.

In *in vitro* culture systems, APSA stimulated the proliferation of fibroblasts but it didn't stimulate that of keratinocyte. Also we obtained the similar effects in the raft culture method. So we concluded that APSA affected the dermal region than the epidermal region. In clinical tests, APSA changed the skin color, biomechanical properties(especially elasticity) and reduced skin wrinkles of the volunteers.

And we could get the better results of skin wrinkle improvement by use of Skin Visiometer than Silflo Image analysis systems.

참 고 문 헌

1. R.W.Chesney : Adv. Pediatr., 32, pp 1-42, 1985
2. R.J.Huxtable : Physi. Rev., 72, pp 101-163, 1992
3. Fariello, R.G. : Neurology, 32, pp 241-245, 1982
4. Kushiku K. and Furukawa T. : Ganryu Aminosan, 8, pp 329-335, 1985
5. Mosmann, T., J.Immunol. : Methods, 63, p 55, 1983
6. Choi Y., Fuchs E. : Cell Regulation, 1, pp 791-809, 1990
7. Kopan R., and Fuchs E. : J. Cell Biol., 105, pp 427-440, 1987
8. Varani J., and et al. : Amer J Pathol., 142, pp 189-198, 1993
9. V.Couturaud, J.Coutable and A.Khaiat : Skin Research and Technology, 1, pp 68-73, 1995

Table 1. Data of α differences between 0 and 3, 6 month after application & value at initial time

	Δ month	With APSA		Without APSA		Initial value (0 time)	
		Δ 3	Δ 6	Δ 3	Δ 6	With APSA	Without APSA
SKIN	Corneometer	2.42(0.675)	5.65(0.666)	2.05(0.704)	4.59(0.704)	84.44(1.402)	82.46(1.196)
	Skicon	16.94(0.832)	22.03(1.078)	16.33(0.897)	19.74(1.216)	88.88(3.549)	87.10(3.426)
Skin Color	L*	0.72(0.188)	1.54(0.136)	0.39(0.116)	1.14(0.107)	60.98(0.546)	60.20(0.595)
	a*	3.78(0.659)	*7.73(0.546)	2.86(0.702)	*4.62(0.673)	11.12(0.295)	10.83(0.253)
	b*	2.34(0.452)	*4.47(0.409)	1.28(0.391)	*2.29(0.458)	18.35(0.233)	18.71(0.250)
Skin Rheology	Placticity	-1.42(0.143)	-2.75(0.254)	0.12(0.123)	-1.20(0.189)	0.048(0.004)	0.049(0.004)
	Suppleness	-16.01(1.351)	-24.12(1.201)	-8.69(1.898)	-13.02(1.469)	0.025(0.017)	0.023(0.018)
	Tonicity	11.38(1.438)	17.93(1.203)	6.61(1.346)	9.94(1.881)	0.123(0.008)	0.121(0.008)
	Extensibility	9.66(0.877)	16.61(0.776)	6.47(1.046)	9.37(0.950)	0.145(0.005)	0.144(0.005)
	Elasticity	*19.09(1.152)	*27.22(1.429)	*8.77(0.948)	*14.40(1.854)	0.482(0.029)	0.479(0.025)
Skin Wrinkle	Ra(SV400)	*-9.76(0.881)	*-17.1(0.780)	*-4.65(0.740)	*-9.33(0.924)	0.041(0.017)	0.043(0.019)
	Rz(SV400)	-5.53(0.731)	*-14.9(0.836)	-2.95(0.532)	*-7.22(0.678)	0.235(0.009)	0.237(0.009)
	Ra(SIiflo)	-2.44(0.666)	-4.90(0.443)	-1.23(0.780)	-2.50(0.472)	0.082(0.006)	0.081(0.006)
	Rz(SIiflo)	-3.21(0.579)	-5.05(0.702)	-2.28(0.481)	-3.05(0.769)	0.436(0.018)	0.438(0.019)

(* : $p < 0.05$, Mean(SE))

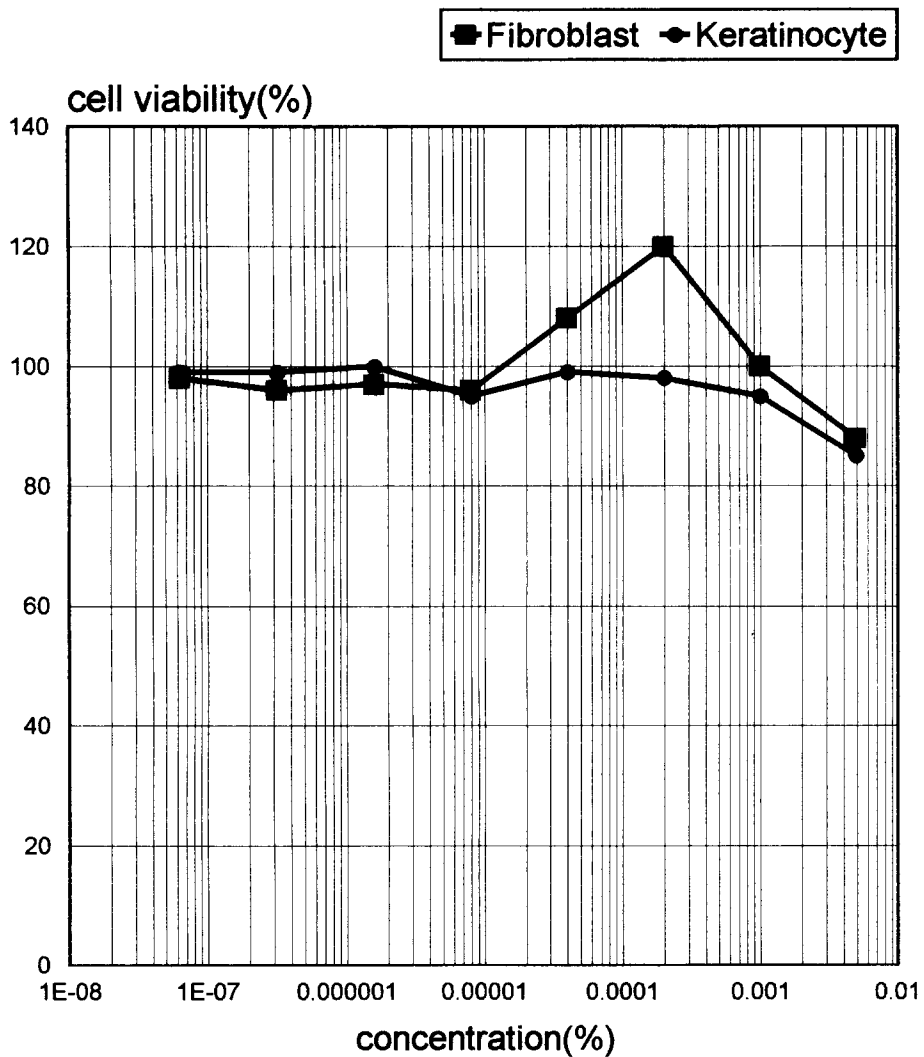
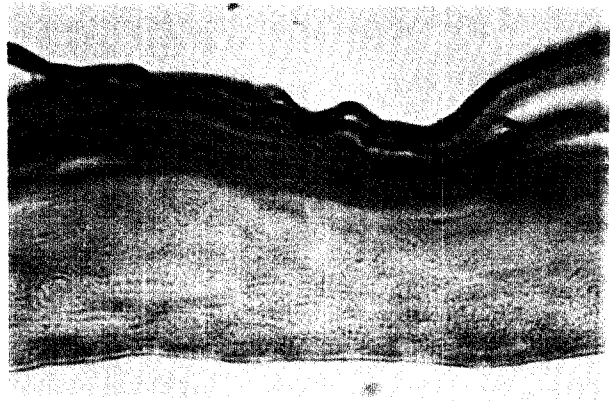
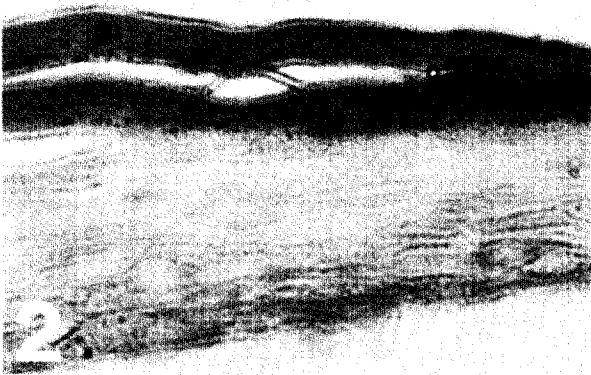
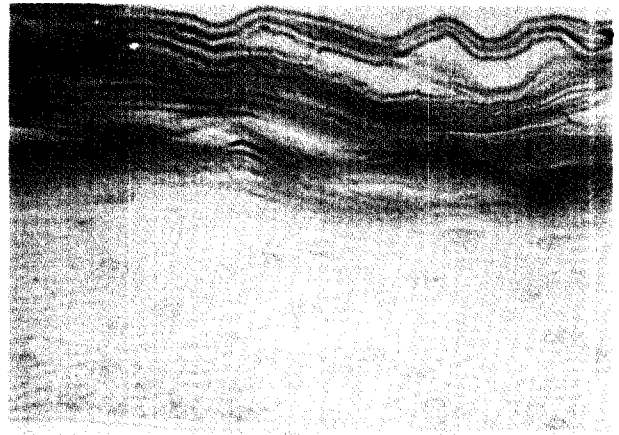
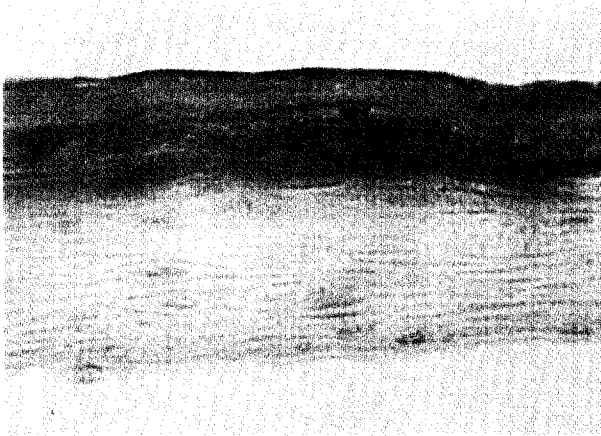
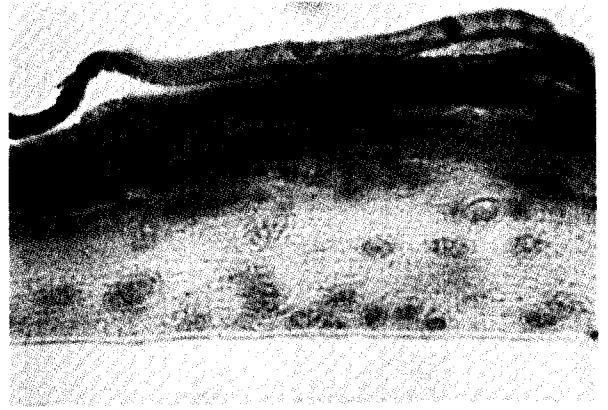
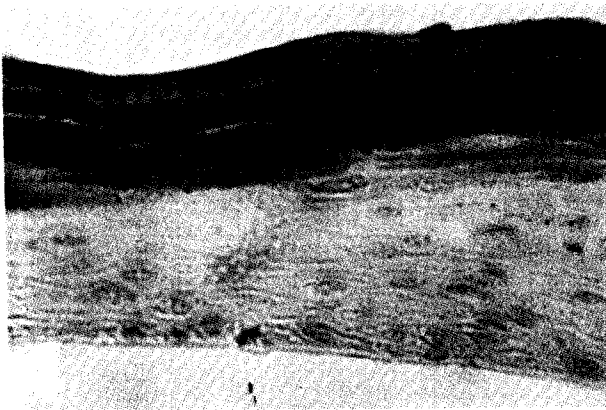
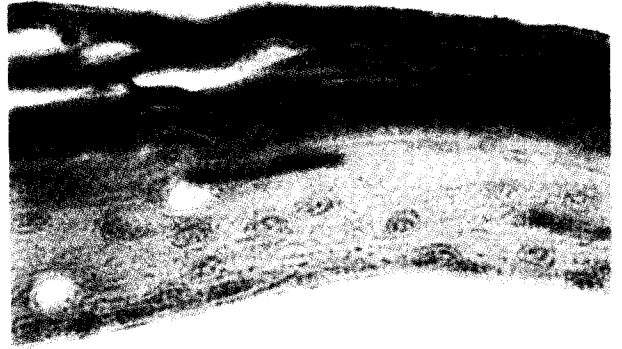
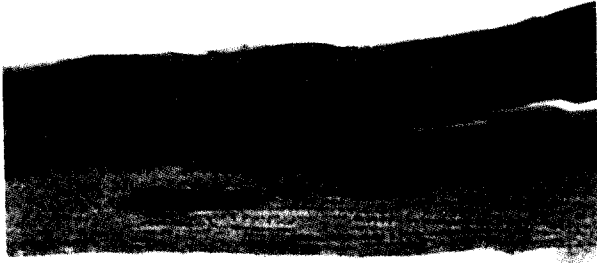


Fig.1 Effect on the proliferation of fibroblasts and keratinocytes

Fig.2 The effects on the epidermal differentiation

- No.1. H&E staining (control/APSA treated)
- 2. K14 staining (control/APSA treated)
- 3. K1 staining (control/APSA treated)
- 4. Filaggrin staining (control/APSA treated)





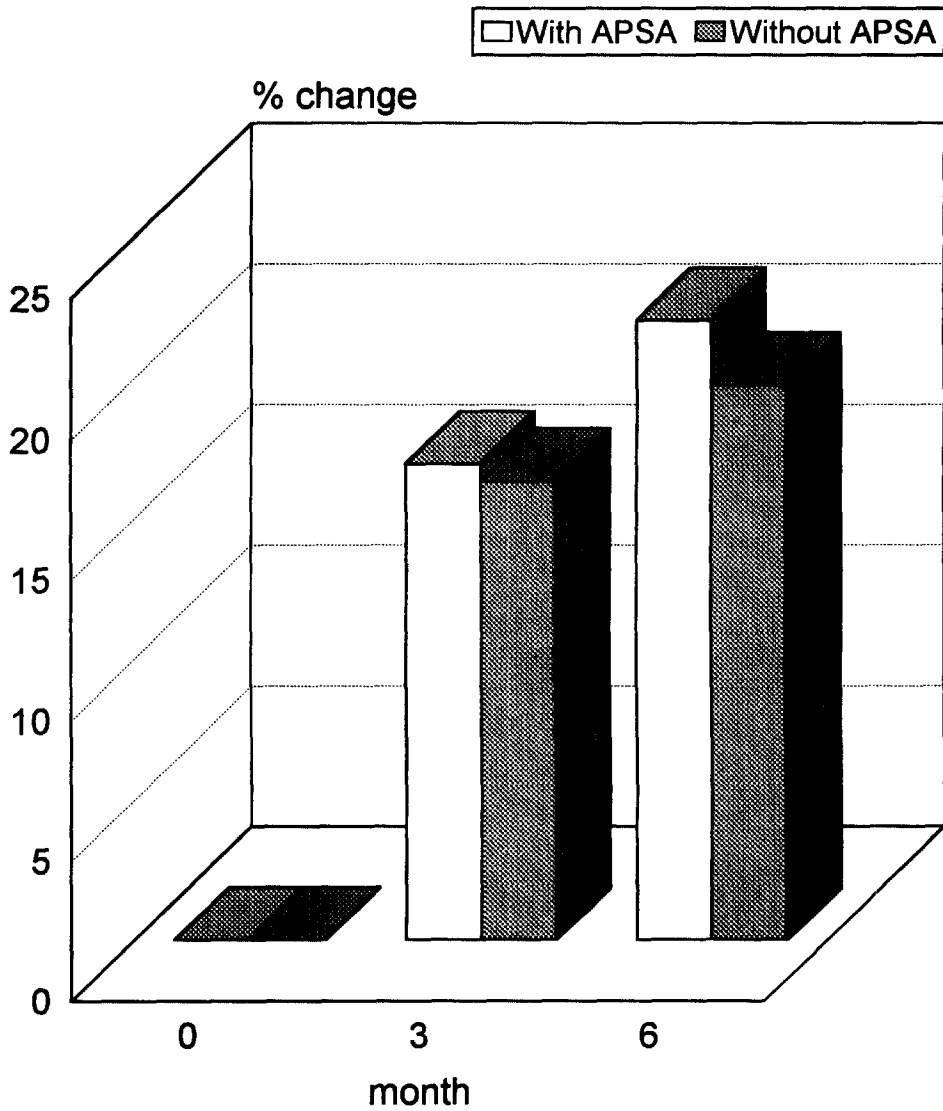


Fig.3 % changes of hydration(Skicon)

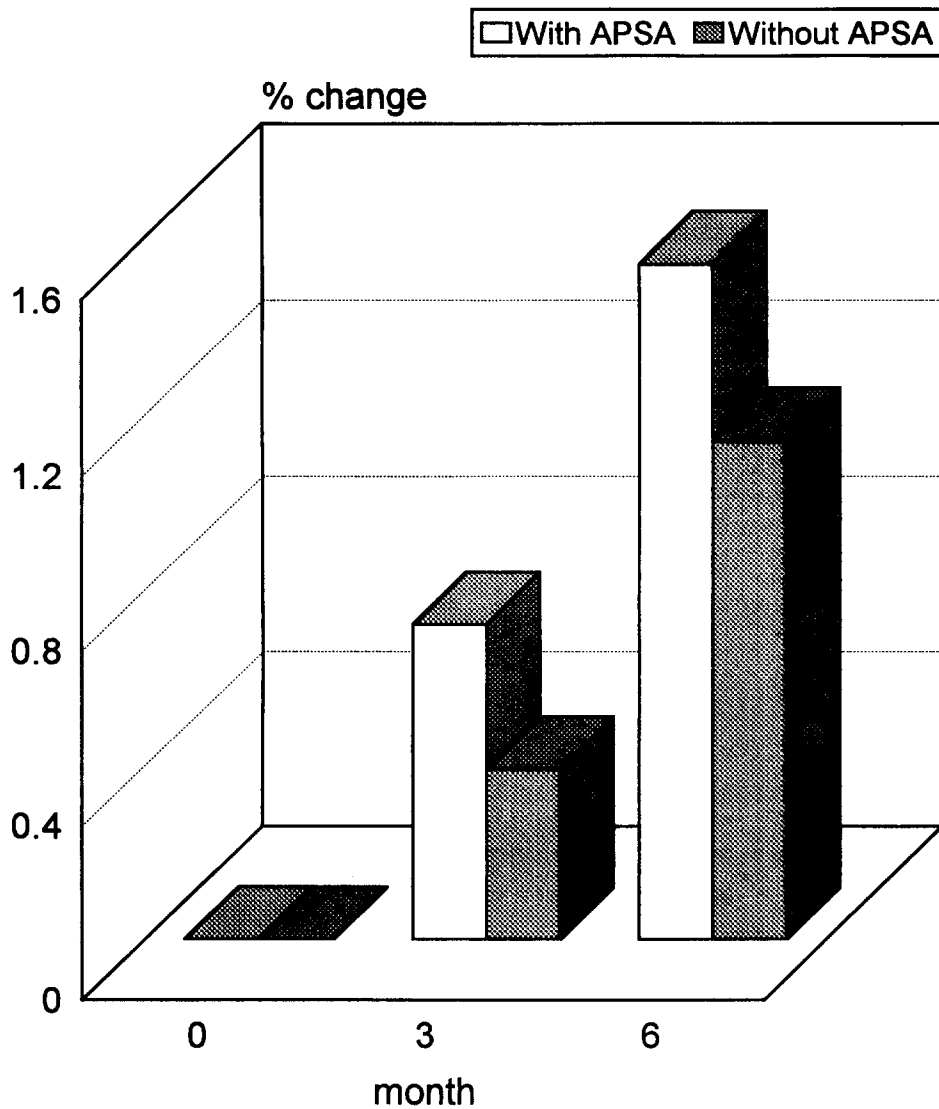


Fig.4 % changes of skin color(L*)

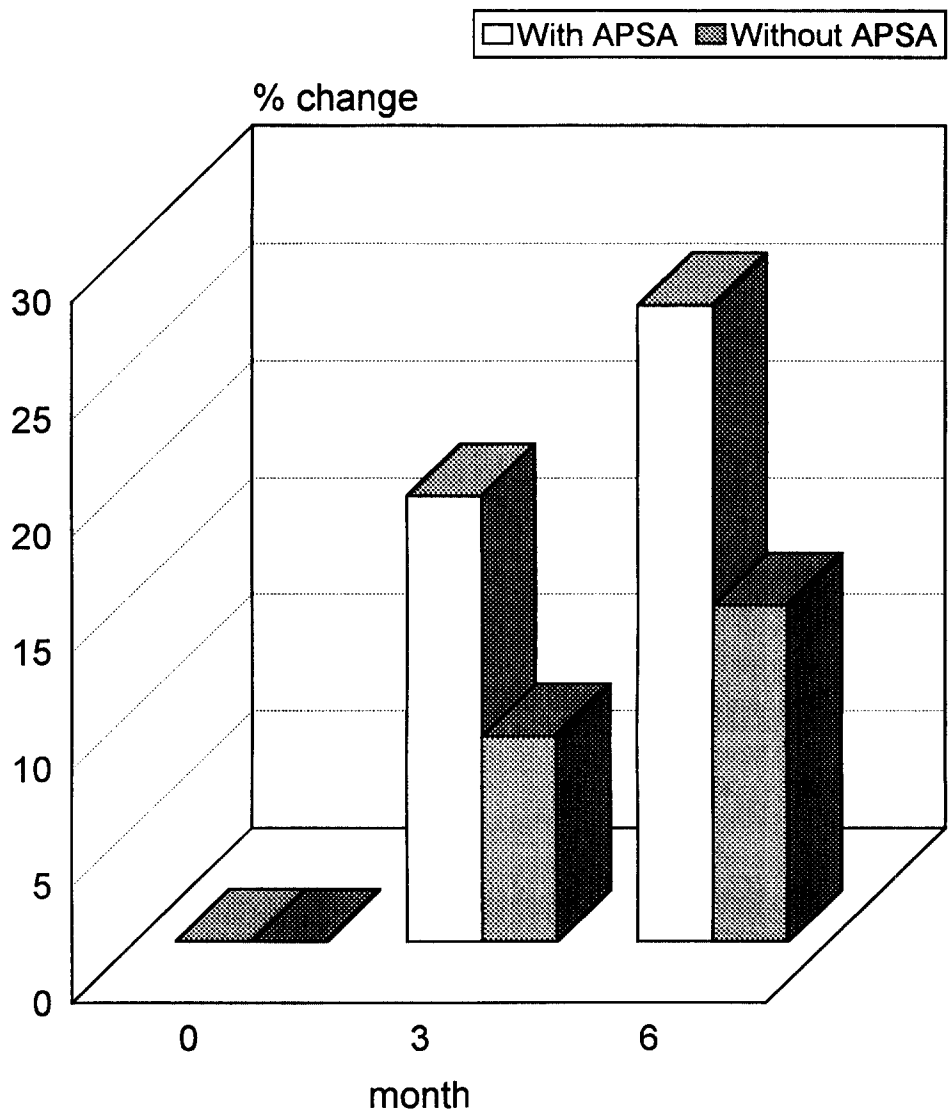
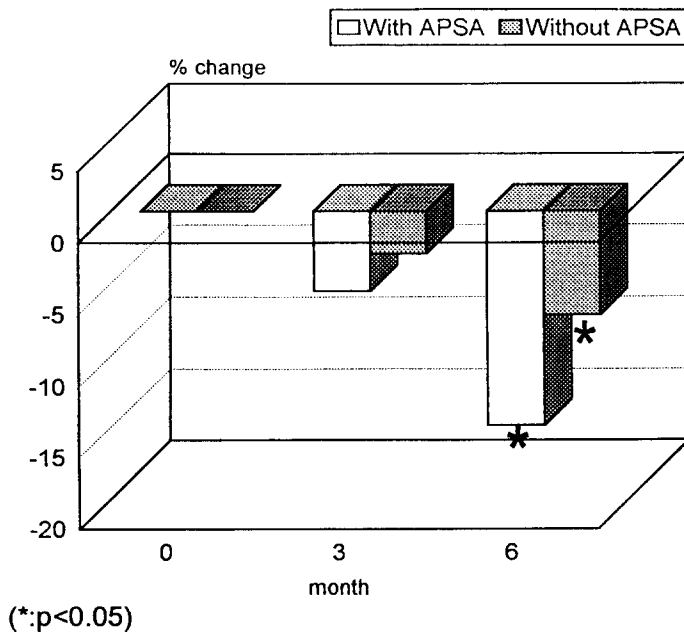


Fig.5 % changes of elasticity

Rz : SV400



Rz : Silflo

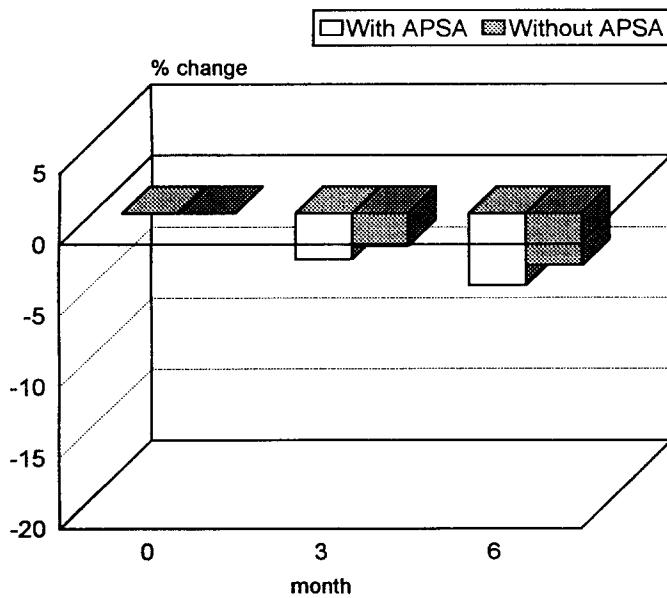
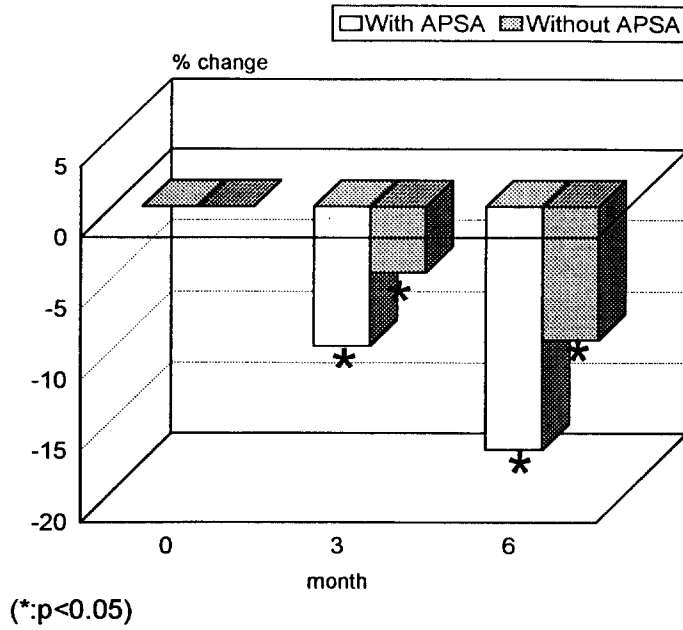


Fig.6 % changes of wrinkle (Rz)

Ra : SV400



Ra : Silflo

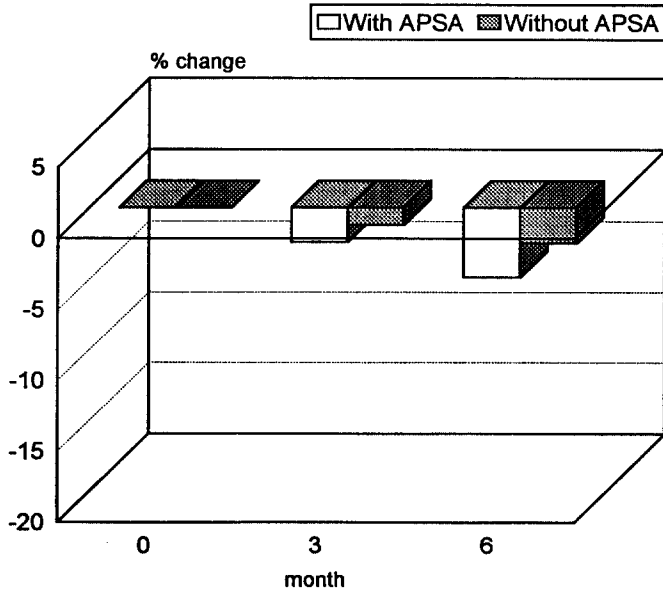


Fig.7 % changes of wrinkle (Ra)

Fig.8 Images from

1. Skin Visiometer SV400 silicone replica Opticoprofilometry
2. Silflo replica from Shadowing method

