

Medimin A 를 함유한 O/W 에멀전의 주름 개선 효과

박선규, 장민열, 김영득, 정봉열*, 원영호**, 김진준, 강세훈
(LG 생활건강 화장품 연구소, LG 화학 바이오텍 연구소*, 전남의대 피부과**)

Changes of Facial Wrinkle after Topical Application of O/W Emulsion Containing Medimin A

Sun-gyoo Park, Min-young Chang, Young-deuk Kim, Bong-young Chung*,
Young-ho Won**, Jin-jun Kim, and Seh-hoon Kang

(Cosmetics R&D Center, Biotech R&D Center*, LG Chemical Ltd.,
Dept. of Dermatology, Chonnam Univ. Medical School**)

요 약

Medimin A는 경피 흡수성과 안정성을 높이기 위해 retinoic acid와 polyethylene glycol(PEG)를 결합시켜 개발한 비타민 A 유도체이다. Medimin A의 주름 완화 효과를 확인하기 위하여 콜라겐 합성능 및 임상 평가를 실시하였다. *In vitro* 콜라겐 합성능은 섬유아세포를 배양하여 생산되는 단백질 중에서, collagenase에만 특이적으로 분해되는 단백질에 함유된 [³H]-proline의 양을 측정하여 평가하였으며, 임상 평가는 피부주형(replica)의 영상분석, 주름의 육안적 관찰, 피시험자의 자가 판단에 의하여 평가하였다. Medimin A를 섬유아세포에 처리한 결과 10⁻⁶% 농도에서 약 40%의 콜라겐 합성 증진을 보였다. Medimin A가 0.2%함유된 O/W 에멀전을 10주간 피시험자에 도포한 결과, 피부 주형에서 가장 깊은 주름이 약 38.4%가 감소되었으며, 육안적 관찰에 의한 눈가 주름은 25.5% - 44.1%가 감소되었다. 또한 피시험자의 자가 진단에 의하면 전체 피시험자 중 93%가 10주간 도포 후 주름이 호전되었다고 응답하였다. 이상과 같은 결과에서, Medimin A는 객관적

평가법(*in vitro* 콜라겐 합성능, 피부 주형의 영상분석) 및 주관적 평가법(육안적 관찰, 피시험자의 자가 진단)에서 모두 유의하게 주름을 완화시키는 물질임이 확인되었다.

1. 서 론

사람의 피부는 끊임없이 변화를 겪게 되는데 그 중 가장 대표적인 것이 노화에 의한 피부 기능의 저하 및 시각적인 아름다움의 감소이다. 피부 노화는 크게 내적 노화와 외적 노화로 구분되며(1), 내적 노화는 유전적인 요소에 영향을 많이 받아 인위적으로 조절이 어려운 반면, 외적 노화는 환경적인 요인에 주로 영향을 받기 때문에 인위적인 조절이 내적 노화보다는 용이하다. 대표적인 외적 노화 인자로서 자외선을 들 수 있으며 가장 두드러진 현상은 주름의 형성이다(2-4). 이러한 자외선에 의한 노화를 방지하기 위하여 자외선 차단제가 함유된 제품을 피부에 도포하는 방법이 가장 일반화되어 왔으나, 1988년 Weiss 등(5)은 retinoic acid가 노화 피부의 거칠기 및 잔주름 완화에 효과가 있다고 보고하였고, 전세계적으로 피부 노화를 억제 혹은 개선시키는 물질을 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이후 비타민 A 유도체 및 AHAs(α -hydroxy acids)는 현재까지 알려진 노화 피부 개선의 대표적인 물질(6-8)이며, 이들을 함유한 제품은 항노화 화장품으로 선도하고 있다. 비타민 A 혹은 그 유도체는 피부내 섬유아세포의 증식 및 콜라겐 합성을 증진시켜 주름을 완화하는 것으로 알려져 있으며(9-11), AHAs 역시 콜라겐 합성을 증진시키는 것으로 알려져 있으나(12) 비타민 A에 비해 작용기작이 정확히 밝혀지지 않았다. 그러나 AHAs는 비타민 A에 비해 월등한 안정성을 갖고 있는 장점이 있다. 비타민 A는 지용성으로서 빛, 산소, 열, 지질 과산화, 물에 의하여 불안정한 단점이 있어 노화 피부 개선을 위해서는 비타민 A의 안정화가 필수적이다.

이에 본 연구자들은 비타민 A의 안정화를 연구하던 중 retinoic acid와 polyethylene glycol(PEG)을 결합하여 polyethoxylated retinamide(Medimin A, 평균 분자량 : 831)를 개발하게 되었다(Fig.1.). Medimin A는 기존의 비타민 A 유도체들에 비해 안정성을 증진시켰고 경피 흡수능도 높은 물질이다. 따라서 Medimin A의

콜라겐 합성능 및 주름완화 효과를 임상시험을 통해 확인하였다.

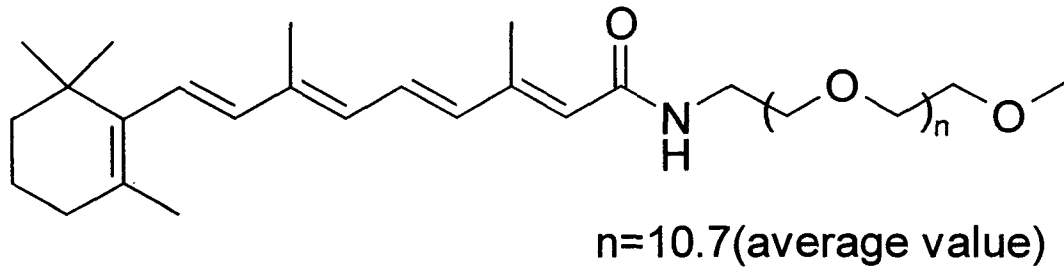


Figure 1. Chemical structure of Medimin A

2. 실험 및 재료

2.1 *In vitro* 콜라겐 합성능 측정

콜라겐 합성능 측정은 Webster(13)등의 방법에 따라 시행하였다. 먼저 사람의 섬유아세포(WI-38)를 FBS(10%), streptomycin(100 $\mu\text{g/ml}$), penicillin(100 $\mu\text{g/ml}$)이 함유된 DMEM 배지에서 배양하였다(5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$). 배양된 세포를 microplate(Costar, USA)의 well 에 5×10^4 씩 분주 후 24 시간 동안 다시 배양하였다. $3 \mu\text{Ci L}^{-1}$ [2, 3- ^3H] -proline 이 함유된 배지에서 배양된 세포를 retinoic acid 혹은 Medimine A 로 처리한 후 24 시간 동안 더 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지 상층액을 모아 정제된 collagenase 로 처리한 후 liquid scintillation counter 로 방사성 동위원소 양을 측정하였다.

2.2 피시험자 선정

피시험자는 전남대학교 병원신문은 통해 모집한 자원 여성들과 전남대학병원 피부과 관리대장에 등록된 여성을 대상으로 하였다. 외견상 전신적인 질환이 없는 건강한 사람으로서, 연령은 25 세 이상 60 세 이하의 경우로, 총 29 명을 선정하여 동의서에 동의를 얻은 후 본 연구에 포함시켰다.

2.3 시료 도포 방법

Medimin A 가 0.2% 함유된 에멀전을 하루에 2 회씩 눈가 주변에 바르도록 하였

다. 사용 방법은 취침전과 아침에 기존에 사용하고 있는 크림이나 로션 등의 기초제품 대신 본 시료를 잘 문질러 바르도록 하였다. 효과 판정을 위하여 시료 사용 전, 4 주, 8 주, 10 주후에 각각 내원하도록 하였으며, 본 연구 종료 시 시료 적용 기간 동안 피시험자들이 느낀 주름 개선 정도를 설문지를 통하여 조사하였다.

2.4 피부주형(replica)의 영상 분석

효과의 객관적 판정을 위하여 눈가 부위의 주름 형태를 실리콘 폴리머(Provil®, Germany)로 채취하였다. 먼저 시료 도포 전의 주름주형(replica)을 채취한 후 피시험자가 내원할 때마다(4, 8, 10 주) replica 를 채취하여 시료 도포에 따른 주름의 변화를 Corcuff 등(14)의 방법에 따라 영상 분석법을 이용하여 측정하였다. 획득된 영상에서 가장 큰 주름을 선택하여 영상 분석용 software 인 Ultimege(USA)로 주름의 면적을 분석하였다.

2.5 주름의 육안적 평가

본 연구에서는 관찰 방법에 따라서 임의의 기준으로 주름을 3 가지 종류로 각각 정의하였으며, 이들의 수에 입각하여 등급을 표시하였다. 방법 1에서는 평상시의 무표정한 상태에서 측정하였는데, 굵은 주름(deep wrinkle)은 육안으로 쉽게 확인할 수 있는 깊은 주름, 잔주름(fine wrinkle)은 근접하지 않아도 육안으로 구분되는 주름, 얇은 주름은 근접(약 30cm)하여야 식별이 가능한 주름으로 정의하였다(Table I A). 방법 2에서는 평상시 상태에다 안면에 표정을 지은 상태에서 오는 변화를 참고하여 등급을 정하였는데, 굵은 주름은 찡그리지 않아도 확실한 깊은 주름, 잔주름은 가늘게 보이지만 찡그리면 분명해지는 주름, 얇은 주름은 평상시 보이지 않으나 찡그리면 형태를 알아볼 수 있는 주름으로 정의하였다(Table I B). 양자의 방법에서 모두 큰 주름이 있는 경우는 작은 주름의 여부는 무시하고 평가하였다.

3.결과 및 고찰

3.1 *In vitro* 콜라겐 합성능

Retinoic acid 및 Medimin A 의 농도별 콜라겐 합성능을 Fig. 2.에 나타내었다.

Table I. 육안적 주름평가 방법의 기준

평가방법 1(A)				평가방법 2(B)			
평 점	굵은주름	잔주름	얇은주름	평 점	굵은주름	잔주름	얇은주름
1				0			
2		1-2	1-2 다수	1			1-2 다수
3		1-2 3-5	* *	2		1-2	* 1-2
4	1-2	3-5	*			1-2	다수
5	3이상	*	*	3		다수	*
				4	1-2	*	*
					1-2	1-2	*
				5	3이상	*	*

* 더 심한 주름이 있는 경우에 무시함

비록 10⁻⁷%이상의 농도에서는 Medimin A가 retinoic acid에 비해 약 10% 낮은 콜라겐 합성을 보였으나 Medimin A는 섬유아세포의 콜라겐 합성을 상당히 증진시키는 것으로 판단되어 Medimin A가 주름 개선에 효과가 있는지를 살펴보기로 하였다.

3.2 대상인원에 대한 조사

본 연구는 총 29명이 참여하였으며 대상인원의 평균 연령은 41.8세였고, 분포는 27세부터 55세 사이였다(Fig.3.).

3.3 영상분석에 의한 주름 평가

피시험자의 눈 아래부위 및 외측 가장자리의 주름을 주형(replica)으로 채취하여 가장 깊은 주름의 2차원적 면적을 측정하였다. 주름의 퍼센트는 시료 도포 전 9.48 ± 3.92였고 10주후에는 5.67 ± 2.35로 38.4%의 감소를 보였으며 4주후에는 유의차가 없었으나, 8주이후부터는 사용전과 비교하여 유의차 있는 주름감소를 보

였다($p < 0.01$, Fig.4). 그러나 모든 피시험자가 시료 적용에 따라 주름감소 효과를 보인 것은 아니며, 따라서 주름 감소 정도에 따라 피시험자를 4개의 집단으로 나누어 살펴보았다(Fig.5). 15%미만의 효과를 보인 집단(group I)은 5명(전체의 17%)으로 이 집단에 속하는 피시험자는 Medimin A에 대하여 피부 혹은 피부세포의 반응이 느리거나 약한 것으로 사료되며 결과적으로 주름 감소 효과를 보이지 않는 것으로 판정하였다. 15-30%의 효과를 보인 집단(group II)은 6명(전체의 21%), 30-50%의 효과를 보인 집단(group III)은 10명(전체의 34%), 50%이상의 효과를 보인 집단(group IV)은 8명(전체의 28%)으로 이들 집단에 속하는 피시험자들은 Medimin A에 대한 주름 감소 효과가 있는 것으로 사료된다. 따라서 Medimin A에 대한 주름 감소효과를 영상분석법으로 평가한 결과, 전체 피시험자의 83%가 효과를 보였다. Fig.6.은 시료 도포에 따른 주름의 변화를 보인 대표적인 예이다.

3.4 육안적 평가에 의한 주름 평가

평가 방법 1에서 시료 도포 전 점수는 3.04 ± 1.14 였으나 10주간 시료 도포 후에는 2.07 ± 0.54 로 감소되어 전체적으로는 처음에 비하여 25.5%가 감소되었다. 평가 방법 2에서 시료 도포 전 점수는 3.29 ± 1.19 였고 10주후에는 1.96 ± 0.93 으로 평균 44.1%의 큰 감소를 보였다. 결론적으로 Medimin A가 함유된 O/W 에멀전의 사용은 주름의 정도를 의의 있게 감소시켰으며, 특히 8주후부터는 사용전과 비교하여 통계학적으로 의의 있는 감소를 보였다($p < 0.01$, t-test, Fig.7.).

3.5 피시험자가 느끼는 주름개선 정도

본 연구 기간이 끝난 후에(10주 경과 후) 주름의 상태가 호전을 보였는지의 여부(예,아니오)에 대한 질문에 호전을 보였다고 답한 경우는 26명이었다. 그러나 나머지 3명 중 1명에서도 주름의 평점에서 우수한 효과가 있다고 하였기 때문에 최종적으로 27명(전체의 93%)이 호전을 보였다고 할 수 있었다. 좀 더 구체적인 주름의 호전 정도를 알기 위하여 개선 정도를 6등급(①더 나빠졌다 ②처음과 같다 ③약간 호전된 듯하나 육안적으로 구분할 수 없다 ④약간 호전된 듯하며 육안적으로 나아졌다 ⑤많이 호전되었으며 육안적으로 확인할 수 있다 ⑥실제로 잔주름이 사라진 것을 알 수 있다)으로 구분하여 답하도록 하였다. 더 악화된 경

우와 변화가 없는 경우는 없었으며, 평균 점수는 3.76 ± 0.68 로 대부분에서 호전되었다고 답하였다(Fig.8.).

4. 결 론

본 연구자들은 Medimin A 의 주름 개선 효과를 확인하고자, in vitro 콜라겐 합성능을 확인한 후 Medimin A 가 0.2% 함유된 O/W 에멀전에 대한 임상 시험을 전남대 피부과에 의뢰한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- 1) 섬유아세포에 Medimin A 를 10^{-6} % 농도로 처리한 결과, 약 40%의 콜라겐 합성 증진을 보였다.
- 2) 피부의 주형(replica)에서 가장 깊은 주름의 변화를 분석한 결과, 주름의 면적은 처음 9.48 ± 3.92 에서 10 주간 치료 도포 후에는 5.67 ± 2.35 로 유의차 있게 감소하였고($p < 0.01$), 전체적인 감소율은 38.4%였다. 또한 주름 감소 정도에 따라 4 개의 집단으로 분류한 결과 15%미만의 주름 감소 효과를 보이는 집단은 5 명으로 전체의 17%를 차지하였으며 15%이상의 효과를 보인 집단은 24 명으로 전체의 83%를 차지하며 10 명중 8 명 정도는 주름 감소 효과를 보였다.
- 3) 육안적인 주름 관찰 평가에서 25.5-44.1%의 주름 개선 효과가 있었다($p < 0.01$).
- 4) 설문조사에 의한 피시험자의 평가에 있어서 27 명이 호전되었다고 응답하였으며(전체의 93%), 주름 개선 정도를 6 등급으로 구분하여 답하게 한 결과 대부분에서 호전되었다고 답하였다.

이상과 같은 결과에서 Medimin A 는 객관적인 평가(콜라겐 합성능, 피부주형의 영상분석) 및 주관적인 평가(주름 변화의 육안적 관찰, 피시험자의 자가 진단)에서 모두 유의하게 주름이 감소됨을 보여 향후 주름 개선 화장품의 원료로 매우 유용할 것으로 기대된다.

Abstract

Medimin A is a derivative of vitamin A which has been developed by coupling retinoic acid with polyethylene glycol(PEG) to enhance skin permeability and stability. We carried out the collagen synthesis and clinical test to examine the reducing effect of wrinkles by Medimin A. *In vitro* collagen synthesis was evaluated by quantitative assay of [³H]-proline incorporation into collagenase sensitive protein in fibroblast cultures. Clinical test was evaluated by image analysis of skin replica, visual observation and self-estimated response of volunteers for 10 weeks. Medimin A stimulated about 40% in collagen synthesis. The area of main deep wrinkle on the skin replica was reduced 38.4% with topical application of O/W emulsion containing 0.2% Medimin A. The wrinkles on the eye region was also reduced 25.4%-44.1% by the visual observation and 93% of all volunteers responded that topical application of the O/W emulsion was showed some reducing effect of wrinkles after 10weeks. From these results, we suggest that Medimin A is a potent anti-wrinkle agent by objective evaluation methods(*in vitro* collagen synthesis and image analysis of skin replica) and subjective evaluation methods(visual observation and self-estimated response of volunteers).

참고문헌

1. Doris E.B., Cosmetics for elderly people, *Cosm. & Toil.*, 111, 31-37(July 1996)
2. H.M.Daniell, A study in the epidemiology of "crow's feet", *Ann.Intern.Med.*, 75, 873-880(1971)
3. Grove, M.J. Grove, and J.J. Leyden, Optical profilometry: An objective method for quantification of facial wrinkles, *J.Am.Acad.Dermatol.*, 21, 631-637(1989)
4. Griffiths, T.S. Wang, T.A. Hamiton, and J.J. Voorhees, A photonumeric scale for the assessment of cutaneous photodamage, *Arch.Dermatol.*, 128,347-351(1992)
5. Weiss, C.N. Ellis, J.T.Headington, Topical tretinoin improves photoaged skin. A double blind vehicle-controlled study, *JAMA*,259,527-532(1988)
6. Hermitte, Aged skin, retinoids, and alpha hydroxy acids, *Cosm. & Toil.*, 107, 63-67(July 1992)
7. Rosenthal, D.R. Roop, C.A. Huff, J.S. Weiss, C.N. Ellis, T. Hamilton, J.J> Voorhees, and

- S.H. Yuspa, Changes in photo-aged human skin following topical application of all-trans retinoic acid, *J.Invest.Dermatol.*, 95(5), 510-515(1990)
8. Ditre, T.D. Griffin, G.F. Murphy, H. Sueki, B. Telegan, W.C. Johnson, R.Y. Yu, and E.J. Van Scott, Effects of α -hydroxy acids on photoaged skin: A pilot clinical, histologic, and ultrastructural study, *J.Am.Acad.Dermatol.*, 34, 187-195(1996)
 9. Schwartz, F.A. Cruickshank, J.A. Mezick, and L.H. Kligman, Topical all-trans retinoic acid stimulates collagen synthesis in vivo, *J.Invest.Dermatol.*, 96(6), 975-978(1991)
 10. Varani, J. Shayevitz, D. Perry, R.S. Mitra, B.J. Nickoloff, and J.J. Voorhees, Retinoic acid stimulation of human dermal fibroblast proliferation is dependent on suboptimal extracellular Ca^{2+} concentration, *Am.J.Pathol.*, 136, 1275-1281(1990)
 11. J.Varani, R.S. Mitra, D. Gibbs, S.H. Phan, V.M. Dixit, R. S. Mitra Jr, et al, All-trans retinoic acid stimulates growth and extracellular matrix production in growth-inhibited cultured human skin fibroblasts, *J.Invest.Dermatol.*, 94(5), 717-723(1990)
 12. Moy, K. Howe, and R.L. Moy, Glycolic acid modulation of collagen production in human fibroblast cultures in vitro, *Dermatol. Surg.*, 22, 439-441(1996)
 13. Webster and W. Harvey, A quantitative assay for collagen synthesis in microwell fibroblast cultures, *Anal. Biochem.*, 96(1), 220-224(1979)
 14. Corcuff, J. Rigal, and J.L. Leveque, Skin relief and aging, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 34, 177-190(1983)

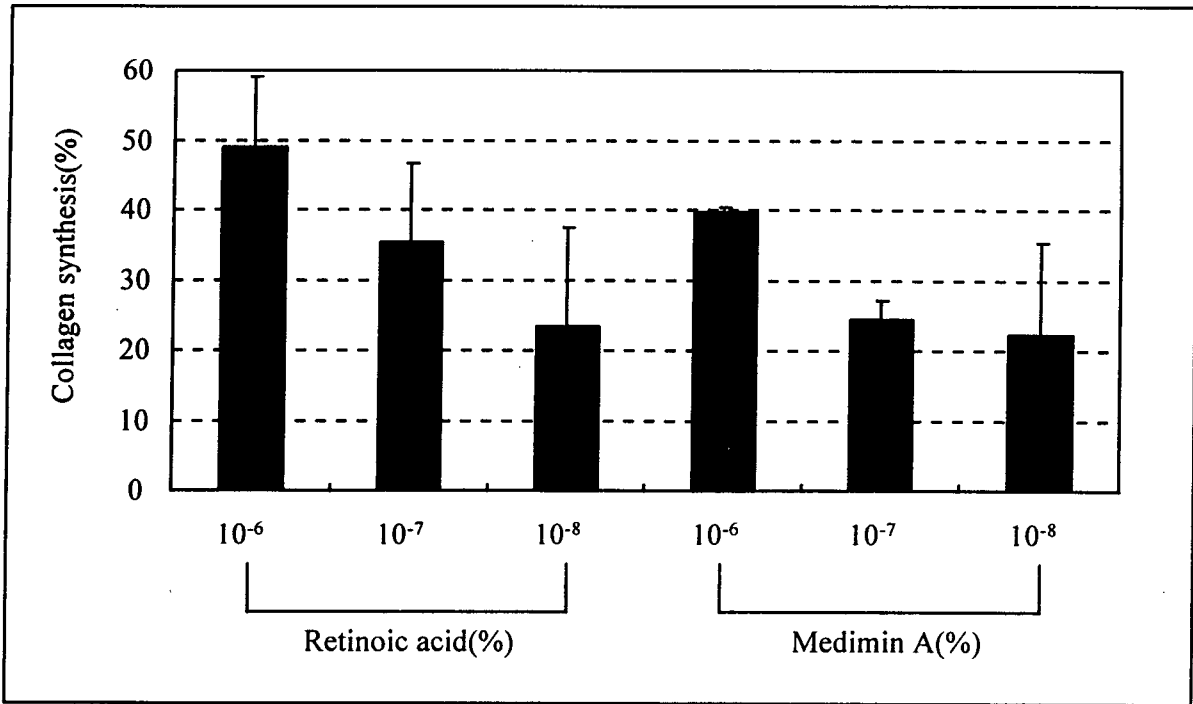


Figure 2. Collagen synthesis increased after retinoic acid and Medimine A treatment

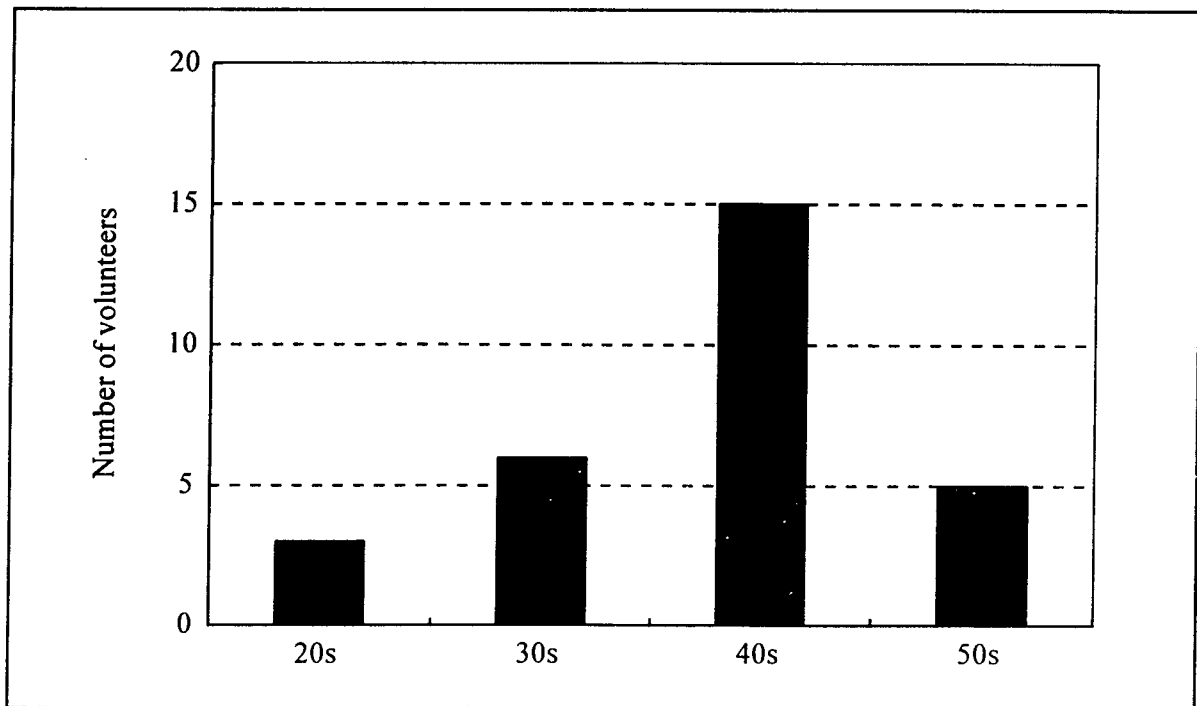


Figure 3. Histogram showing number of volunteers participated in this study with age.

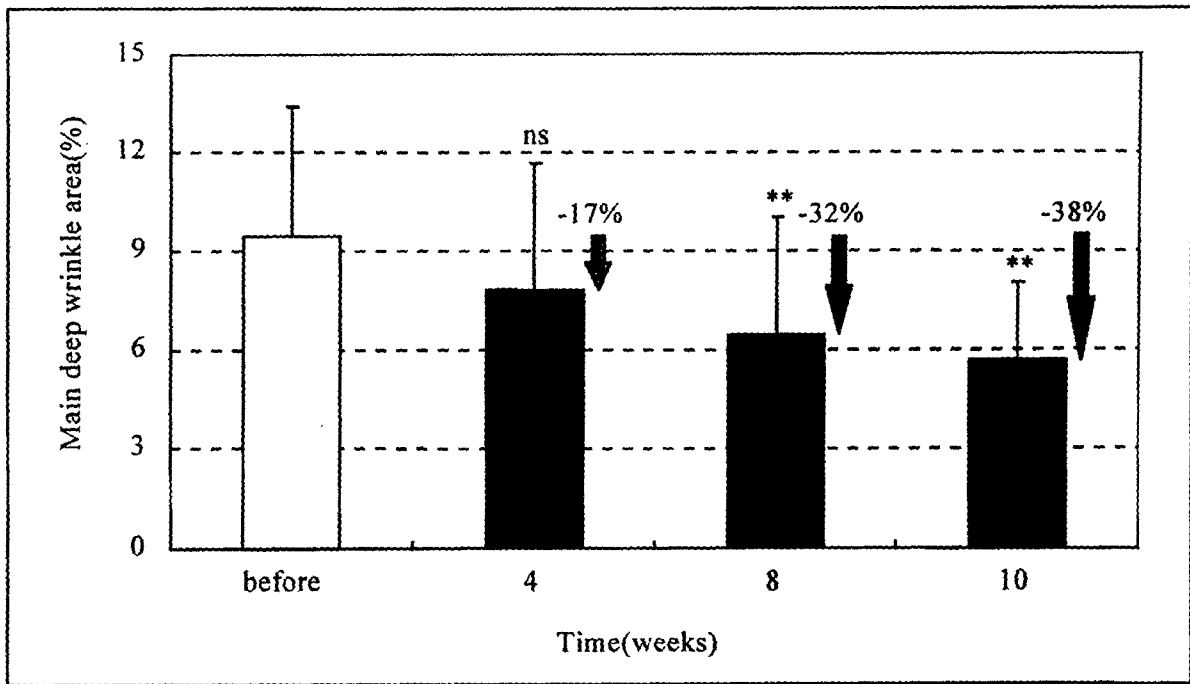


Figure 4. Change of main deep wrinkle area after application of O/W emulsion containing Medimin A for 10 weeks.
 ns: not significant, ** P < 0.01 (compared to before)

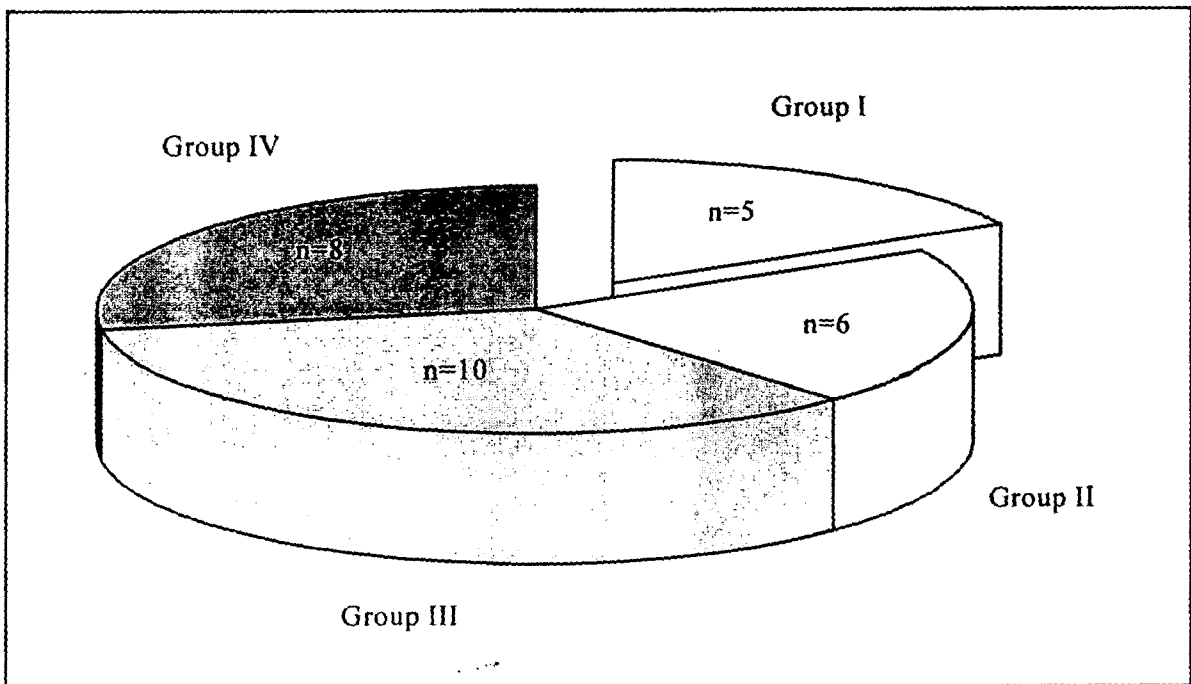


Figure 5. Classification of all volunteers according to the ratio of reducing effect.

Group I: No effect (Under 15%)	Group II: slightly effect (15-30%)
Group III: mild effect (30-50%)	Group IV: valid effect (over 50%)

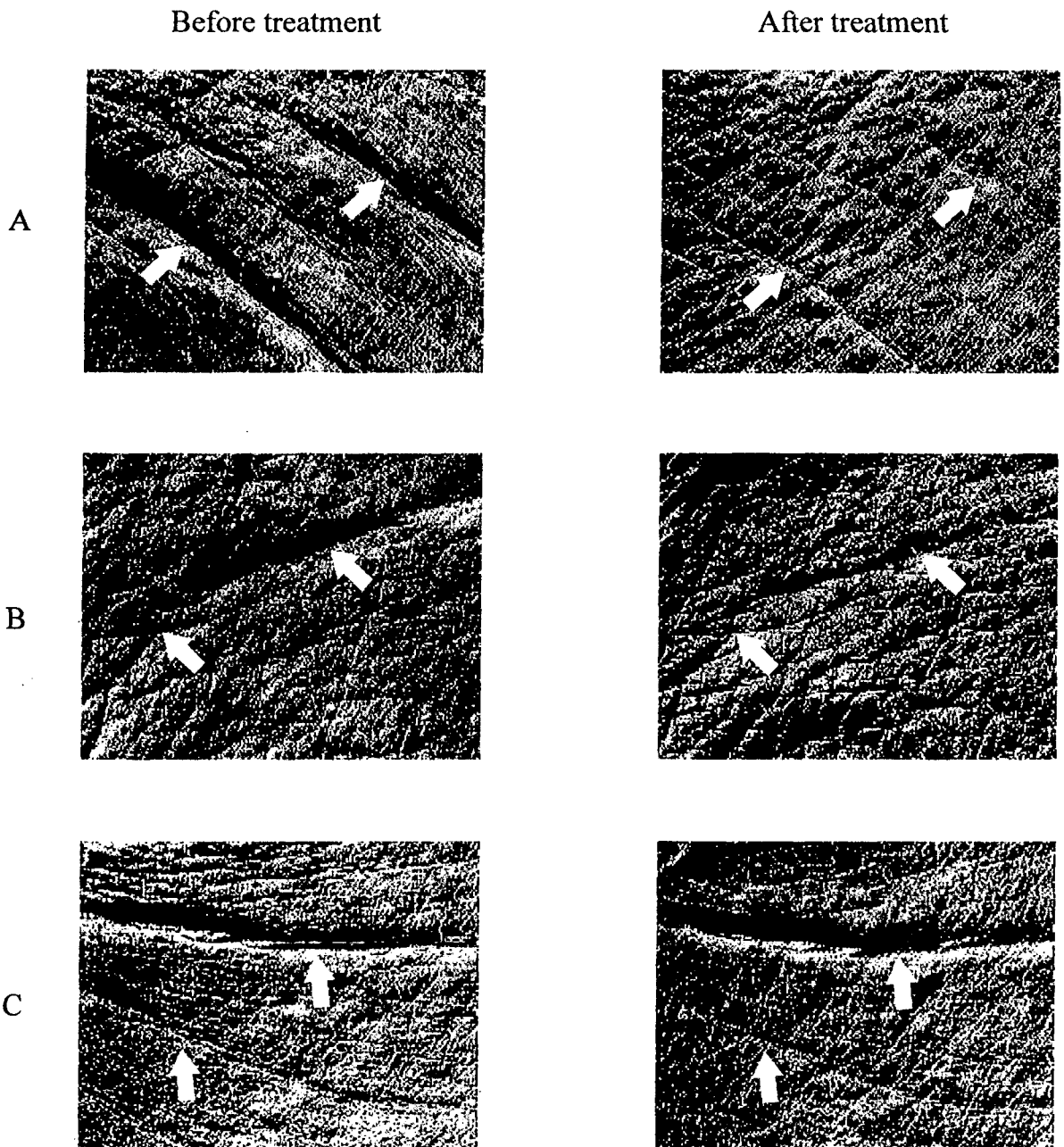
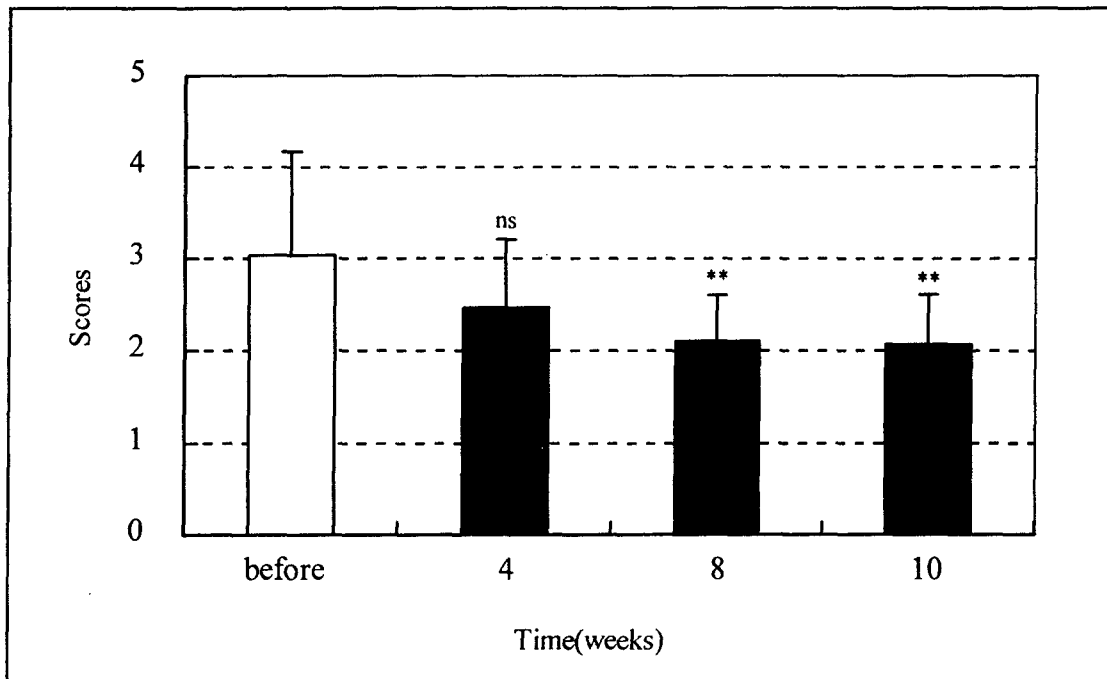


Figure 6. Typical examples of reduced deep wrinkle after application of O/W emulsion containing Medimine A for 10 weeks. White arrows indicate the same area.

- A. over 50% efficacy
- B. 10-30% efficacy
- C. under 10% efficacy

A) Visual evaluation 1



B) Visual evaluation 2

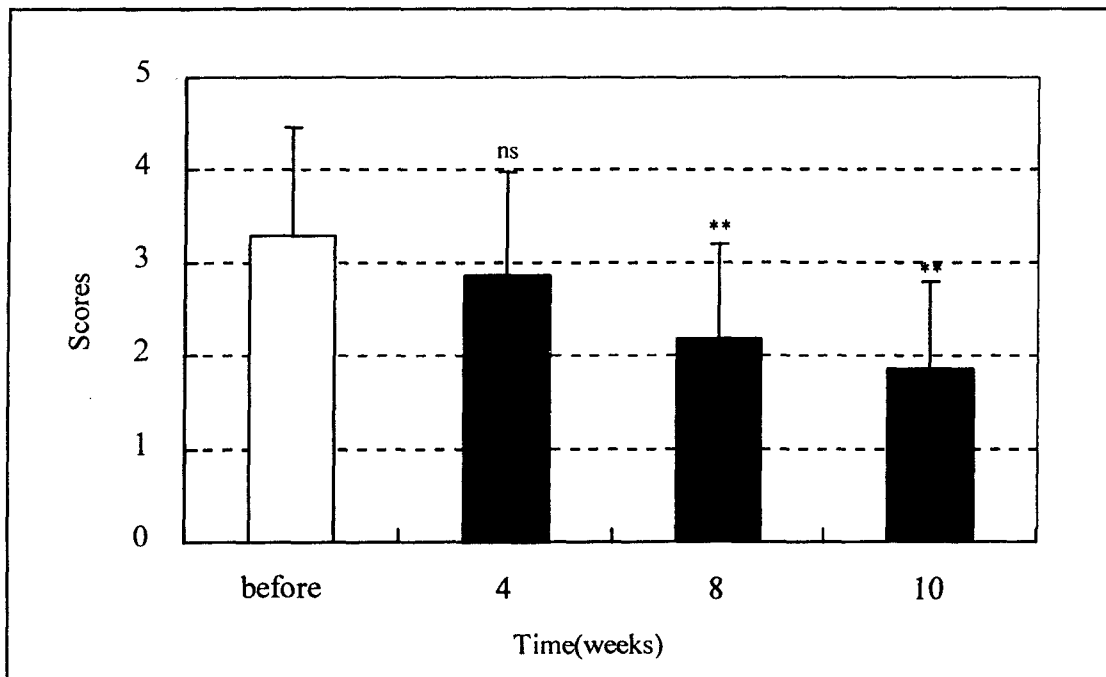


Figure 7. Changes of wrinkles in the eye region during the experiment by two visual methods

A) Visual evaluation 1: evaluate the number of wrinkles on the noarmal

B) Visual evaluation 2: evaluate the number of wrinkles on the frown

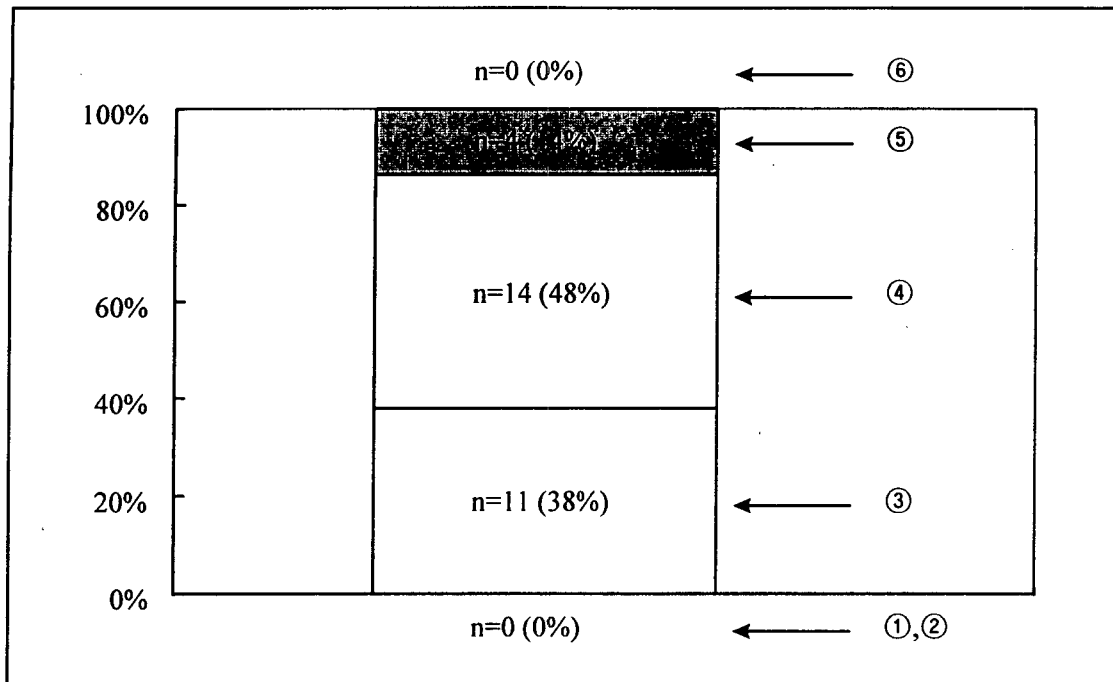


Figure 8. Self-estimated evaluation of facial wrinkles after 10 weeks

- ① getting worse
- ② no change
- ③ looks like a little improved but could not distinguish by naked eye
- ④ more or less improved and could distinguished by naked eye
- ⑤ looks like much improved and could distinguish by naked eye
- ⑥ ascertain the reducing of wrinkles