

Cedrol 및 펩타이드 3 종 Complex 의 *In Vitro* 효능 및 적용 제형의 입술 주름 개선 및 Volumization 효과에 대한 연구

강 성 수[†] · 전 승 현 · 이 진 용 · 안 명 진 · 강 내 규

LG 생활건강 기술연구원 R&I 연구소
(2023년 11월 21일 접수, 2023년 12월 13일 수정, 2023년 12월 18일 채택)

In Vitro Efficacies of Complex of Cedrol and Three Peptides, and Wrinkle Improvements and Lips Volumization effects of Applied Formulations

Seongsu Kang[†], Seung-Hyun Jun, Jinyong Lee, Myoung Jin An, and Nae Gyu Kang

LG Household & Health Care Ltd., LG Science Park, 70 Magokjungang10ro, Gagnseo-gu, Seoul 07795, Korea
(Received November 21, 2023; Revised December 13, 2023; Accepted December 18, 2023)

요약: 입술은 인간의 매력을 표현할 수 있는 대표적인 안면부 부위로서, 이에 대한 미적 관심은 인류 역사에서 항상 존재해왔다. 그러나 입술은 노화가 진행됨에 따라, 주름이 형성되고, 얇아지고, 그 볼륨이 감소하는 경향을 가지며, 이를 대처하기 위해 필러나 지방 이식 등 시술이 시행되곤 한다. 본 연구에서는 립세린[®]에 적용된 주효능 콤플렉스인 cedrol과 펩타이드 3 종(acetyl hexapeptide-8, acetyl tetrapeptide-9, desamidocollagen)의 조합이 광노화 방어 및 입술 주름을 개선할 수 있음을 *in vitro*상에서 검증하였다. 피부 섬유아세포의 콜라겐과 엘라스틴 발현량을 향상, 광노화 조건에서 MMP 발현을 경감하는 효과를 검증하였다. 또한 지방 줄기 세포 분화 실험에서 지방 줄기 세포 분화 촉진 및 지방 생성량을 증대시킴으로, 입술 내 지방 조직량을 증가시킬 수 있음을 *in vitro*상에서 그 가능성을 확인하였다. 2 주간 사용된 인체 적용 시험에서도, 입술의 주름, 결, 탄력, 볼륨이 개선되는 효과를 확인하였다. 본 연구는 cedrol 및 펩타이드 3 종 조합이 입술의 다양한 노화 징후를 해결할 수 있는 효과적인 립케어 소재로서 활용 가능성을 검증하였다.

Abstract: Since the lips are a representative facial part that can express human attraction, aesthetic interest in them has always existed in human history. However, as lips age, they tend to form wrinkles, become thinner, and lose their volume. To counteract this phenomenon, medical procedures such as fillers or fat transplantation have been suggested. In this study, we verified that the one of main effective material complex of LG H&H LIPCERIN[®], combination of cedrol, a sesquiterpene found in cedarwood, and three peptides (acetyl hexapeptide-8, acetyl tetrapeptide-9, and desamidocollagen) could ameliorate the photo-aging and reduce the wrinkles through *in vitro* experiments. The possibility of improving collagen and elastin expression in skin fibroblasts and reducing MMP expression under photoaging conditions was verified. In addition, it was confirmed that the amount of fat tissue in the lips can be increased by promoting adipose stem cell differentiation and increasing the amount of fat produced in the *in vitro* adipose stem cell differentiation experiment. Two weeks of human application tests confirmed that a combination of cedrol and peptides can improve the wrinkles, texture, elasticity, and volume of the lips. This study verified that the combination of cedrol and three peptides can be used as effective cosmetic materials to decrease the various signs of aging in the lips.

Keywords: lips, wrinkle, elasticity, volumization, lip care

[†] 주 저자 (e-mail: franck.kang@lghnh.com)
call: 02-6980-1209

1. 서 론

입술은 안면부에 위치한 부위로서, 발음, 저작, 표정 (facial expression) 등 다양한 기능을 가지고 있다. 특히 입술 그 자체가 신체적 매력(physical attraction) 요소로서, 입술의 형태 및 붉기가 신체 매력도와 직결됨이 보고 된 바 있다[1]. 입술에 대한 인류의 미적 관심과 인지는 기원전 5,000 년 전 수메르 문명에서 립스틱이 사용되었다는 기록에서도 확인이 가능하며, 현대에 이르기까지 립스틱 포함 다양한 형태의 립케어 제품들이 반증하고 있다.

입술은 해부학적으로 일반적인 피부와 다소 다르다. 입술은 윗 입술(labium superius oris)과 아래 입술(labium inferius oris)로 구성되며, 각각 흔히 입술로 인지되는 붉은 부분인 vermilion, 구강 내 점막으로 이어지는 intraoral labial mucosa (ILM), 바깥 피부가 연결되어 있다. Vermilion는 케라틴화 및 각질화가 불완전하게 일어난 상태의 편평 상피(squamous epithelium)로 구성되어 있으며, 3 ~ 5 층의 세포층으로 구성되어 있다. 또한 vermilion은 모공과 땀샘이 결여되어 있는 특징도 가지고 있다. Vermilion 내부는 혈관망을 가지는 진피층이 존재하고, 그 아래에는 orbicularis oris muscle (입둘레근, 구륜근)로 불리는 근육이 존재한다. 이 근육이 실제 입술의 움직임을 관장하고 입술의 대부분의 부피를 차지하고 있다. ILM 및 vermilion과 연결된 외부 피부 아래에는 피하지방층(hypodermal fat)이 위치한다.

입술은 각질화가 완벽히 이루어지지 않은 피부 상피 조직으로, 외부 요인 및 노화에 더 취약하게 반응한다. 수분 보유 능력이 일반 피부에 비해 낮아 쉽게 건조되고 트는(chapped) 현상이 발생한다[2]. 노화 현상에 진행됨에 따라 입술의 형태도 달라지게 되는데, 입술이 점차 얇아지고 건조해지며, 주름이 심화되고, 색이 흐려지는 특징을 갖게 된다[3]. 실제 입술의 해부학적 연구에서, 노인의 입술 조직상 진피 두께/입술 두께가 젊은 사람 대비 약 3분의 1 수준이며, 엘라스틴과 콜라겐 섬유의 절편화(fragmentation) 및 분해가 관찰된 바 있다[4]. 이를 극복하기 위해, 노화에 진행 됨에 따라 감소하는 콜라겐을 증가시켜주는 유효성 소재 개발을 통한 입술 주름 개선 방법이 보고된 바 있다 [5,6]. 노화에 따른 피하 지방의 감소가 안면부의 인지 나이 및 주름 형성에 지대한 영향을 미침을 다양한 연구에서 보여진 바 있다[7]. 입술 역시 비록 뚜렷한 결론은 나지는 않았으나, 노화와 지방 간 다양한 연구가 현재 진행 중이다. 그러나 노화에 따른 입술 볼륨의 감소를 대처하기 위해, 히

알루론산 및 지방 이식을 이용한 조직 수복(argumentation)은 임상에서 상당히 만족스러운 결과를 보여준 바 있다[8]. 이를 기반으로, 입술 볼륨 개선과 지방 줄기세포 분화능 간의 관계를 보인 연구도 있다[6]. 각 방법에 장단점이 뚜렷하기 때문에, 이를 보완하기 위한 기술개발이 현재도 진행 중이다.

본 연구에서는 cedrol과 펩타이드 3 종(acetyl hexapeptide-8, acetyl tetrapeptide-9, desamidocollagen)을 포함하는 원료의 복합 콤플렉스를 적용한 제형이 입술 주름의 개선, 광노화 보호, 입술의 볼륨을 개선하는데 도움을 줄 수 있음을 확인하였다. Cedrol는 세다우드(cedarwood)로부터 발견되는 sesquiterpene로서, 향료나 화장품 원료로 사용되어 왔다. 과거 연구에서 섬유아 세포의 세포의 기질의 합성량 증대, 염증성 사이토카인 발현 경감을 통한 항염 효과, 모발 성장 촉진을 통한 탈모 억제 효과 등이 보고 된바 있다[9-11]. Acetyl hexapeptide-8는 보툴리눔 독소의 타겟 부위인 SNAP-25의 절편으로 다양한 주름 개선 효과가 보고된 바 있으며, acetyl tetrapeptide-9는 피부의 콜라겐과 lumican의 생성을 촉진하여 주름을 개선시킬 수 있음이 보고된 바 있다[12]. Desamidocollagen은 일반 콜라겐 분자에서 일부 asparagine, glutamine 아미노산 제거를 통해 용해도 등을 개선시킨 분자로서, 피부 수분 촉진, 콜라겐 합성 촉진 효과 등이 보고된 바 있다[13].

본 연구에서 cedrol과 펩타이드 3 종(acetyl hexapeptide-8, acetyl tetrapeptide-9, desamidocollagen)이 *in vitro* 상에서, 콜라겐 엘라스틴의 발현량을 촉진시키고, 자외선으로 유도된 콜라겐 엘라스틴의 발현을 경감시키며, matrix metalloproteinase 1 (MMP-1)의 과발현을 효과적으로 억제 할 수 있음을 확인하였다. 자외선에 의한 MMP-1의 발현은 피부 진표피 노화의 주 원인임은 다양한 논문에 의하여 규명된 바 있다 [14]. 특히 이러한 효과는 4 가지 원료의 조합에서 가장 큰 시너지 효과가 발생함을 관찰하였다. 지방세포 분화 촉진 실험에서도 지방의 축적이 촉진됨을 규명하였으며, 실제 입술에 적용 시, 입술의 볼륨 개선 및 증진에 도움이 줄 수 있음을 실험적으로 확인하였다. 실제 인체 적용 실험에서도 본 조합이 포함된 립케어 제품을 적용 시, 입술 주름 및 볼륨이 개선됨을 확인하였다. 본 연구를 통하여, cedrol 과 펩타이드 3 종의 입술 조직의 항노화 효과 및 조직 볼륨 개선 효과를 규명하고, 향후 입술 관련 연구의 초석 역할을 할 것이다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1. 세포 배양

섬유아 세포는 HS68 세포주(ATCC, USA)를 사용했으며, 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Scientific, USA)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Solbio, Korea) 배지를 사용하여, 37 °C 5% CO₂가 유지되는 인큐베이터를 사용하였다. 80 ~ 90% confluence가 확인되면, 세포를 탈착하여 seeding 작업을 진행한다. 이를 위하여, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Solbio Korea)으로 1회 세척, 트립신(Trypsin-EDTA (0.25%), Thermo Scientific, USA)을 투여하여 세포를 탈착시킨다. 실험 수행 하루 전달, 12 well plate에 0.1 × 10⁶ cells/well 조건으로 seeding 한다. 실험 당일, 배지를 제거 후, 실험 물질이 포함된 FBS 1% DMEM을 세포에 처리한다. 24 h 후 유전자 발현량을 확인한다.

인간지방유래줄기세포는 (주세포바이오(Korea))으로부터 공급받았으며, 10% FBS, DMEM 배지 및 37 °C 5% CO₂가 유지되는 인큐베이터를 사용하여 배양하였다. 세포의 탈부착 및 seeding은 섬유아세포와 동일한 과정으로 진행한다. 지방 줄기세포 분화 실험을 위하여, 24 well plate에 5 × 10⁴ cells/well 조건으로 seeding 한다. 100% confluence가 확인이 된 후, 실험 물질이 포함된 지방 줄기 세포 분화 배지로 교체한다. 지방 줄기 세포 분화 배지는 preadipocyte basal medium-2 (PBM-2, Lonza, USA)에 fetal bovine serum, L-glutamine, recombinant human insulin 0.1%, dexamethasone, IBMX, indomethacin, GA-1000로 구성된 분화 추가 조성물(PGM-2 Bullet kit, Lonza, USA)를 첨가하여 제조한다. 3 ~ 4 일에 한 번씩 미디어를 교체해주며, 10 ~ 14 일간 배양을 진행한다.

Spheroid는 다음과 같은 방법으로 제작하였다. 96 well culture plate에 가운데에 액상이 된 low melting agarose 1% 100 μL를 첨가한다. 냉각 및 응고 진행 후, 그 위에 지방

유래 줄기세포 5,000 개씩을 seeding 한다. 10% FBS, DMEM 배지 및 37 °C 5% CO₂가 유지되는 인큐베이터에서 3 ~ 5 일간 배양 후, spheroid가 형성되었는지 확인 후, 분화 유도를 시작하였다.

실험에 사용된 펩타이드 3 종은 원료의 형태로 사용했으며, acetyl hexapeptide-8, acetyl tetrapeptide-9, desamidocollagen에 대해 각각, argireline solution C (Lubrizol, USA), dermican SPB LS 9837 (Cognis, USA), collagen type 3+ vegan (액티브론, Korea)를 사용했다. 이들의 비율은 1 : 10 : 10으로 사용했으며, 세포 실험에서 사용한 농도 조건 4 가지는 Table 1과 같다.

2.2. 유전자 발현량 확인

Collagen type I alpha 1 chain (COL1A1), MMP-1, elastin (ELN) 유전자 발현량을 확인하기 위하여 Real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR, Applied Biosystems™ StepOne™ Real-Time PCR System, Thermo Fisher, USA)을 수행하였다. 24 h 물질 처리가 완료된 세포 샘플에서, RNA 추출키트를 이용하여 RNA를 추출하였다(AccuPrep® Universal RNA Extraction Kit, 바이오니아, Korea). 추출한 RNA를 정량 후, cDNA를 제작하였다(TOPscript™ cDNA Synthesis Kit (dN6 Mix), 엔지노믹스, Korea). 분석 대상에 해당되는 유전자들의 프라이머와 cDNA 적정량을 RT-qPCR 키트(AccuPower® GreenStar™ RT-qPCR PreMix, 바이오니아, Korea) 제조사의 매뉴얼에 따라 혼합 후, thermal cycler을 이용하여 RT- qPCR을 수행하였다.

2.3. 지질 염색

지방 유래 줄기세포 분화가 끝난 세포 시료를 DPBS (Solbio, Korea)으로 1 회 세척 후, 10% 포르말린 (Formaldehyde solution, Sigma Aldrich, USA)에 30 min간 고정한다. 증류수로 1 회 세척 후, 60% 이소프로판올 (Sigma Aldrich, USA)

Table 1. Concentrations of peptide complex which were applied to *in vitro* experiments. Each concentration refers to ingredient's (in parenthesis) concentration. All units are ppm

	Acetyl hexapeptide-8 (Argireline solution C)	Acetyl tetrapeptide-9 (Dermican SPB LS 9837)	Desamidocollagen (Collagen type 3+ vegan)
Conc. 1	0.25	2.5	2.5
Conc. 2	0.5	5	5
Conc. 3	1	10	10
Conc. 4	2	20	20
Conc. 5	5	50	50

에 2 min 동안 반응시킨다. 상층액을 제거 후, 60% oil red O (D.W. 40%)에 20 min 동안 반응한다. 이후 상층액을 제거, 증류수로 2 회 세척 후 현미경 (EVOS™ M7000, Thermo Fisher Scientific, USA)으로 관찰한다. 색소 용출을 위해서 100% 이소프로판올을 10 min 동안 반응 후, 수거하여, 515 nm 에서 흡광도를 측정한다.

2.4. 인체 적용 시험 및 분석

20 ~ 56 세 여성 24 명을 모집(평균 38.14 ± 15.10 세)하여 2 주간 평가하였다. 입술에 대한 미적 관심이 높은 대상을 구인하였으나, 신청한 피험자 대부분이 여성이었으며, 남녀 동등 비율로 맞추어 실험을 수행하는 것이 불가능하였다. 이로 인하여, 실험의 통제성 및 일관성을 위하여, 여성 대상으로 실험을 진행하게 되었다. 주름, 탄력, 탄성복원력, 볼륨을 분석하였으며, 1 일 3 회(아침/점심/취침 전) 다음과 같이 제품을 사용한다.

- (1) 아침/점심: 내용물을 적당량 덜어내어 얇게 도포해준다.
- (2) 취침 전: 세안 후 입술 위에 도톰한 막을 씌우듯 발라준다.

효능 분석을 위하여, DSLR 카메라를 이용한 입술 부위 사진촬영, Antera 3D® CS (Miravex, Ireland)를 이용한 입술 주름, 결, 및 볼륨 평가, cutometer (Cutometer® Dual MPA 580, Courage + Khazaka electronic, Germany) 를 이용한 입술 걸탄력 및 탄성복원력 평가를 수행하였다. 연구 대상자에 의한 주관적 설문 평가에 대해서도 평가를 수행하였다.

Antera 3D® CS는 3차원 이미지 변환 및 다양한 지표의 데이터 추출로 정량화가 가능하다. 매 측정 시 연구 대상자의 동일한 부위를 측정하기 위해 장비를 시험 부위에 일치하도록 고정하고 측정하였다. 입술 주름 평가를 위한 변수는 length, average width, average depth, maximum depth며 입술 결 평가를 위한 변수는 Ra이며, 입술 볼륨은 elevation 모드를 이용하여 얻어진 volume (mm³)을 분석하였다.

Cutometer를 이용하여 Cutometer 상 R0 (total elongation), R8 (total recovery) 수치를 측정하였다. 본 시험에서는 측정 조건으로 Mode 1을 사용하며 일정하게 유지되는 450 mbar의 음압, suction time 2 s, relaxation time 2 s의 조건으로 연속 3 번 측정된 뒤 산술평균을 구하여 측정결과를 얻었다. 제조사의 설명에 따르면, R0는 외부 외력에 대한 피부의 수동적 거동 (passive behaviour)를 의미하며, 일련의 연구에서 피부의 견고성 (skin firmness)과 연관성이 있음이 보여진 바 있다[15]. R8은 원래 정상 상태로 돌아가려는 탄성복원력을 의미하며, 다양한 연구에서 피부의 탄력의 척도

Table 2. Ingredients for lip balm formulation

Ingredients
Hydrogenated Polyisobutene
Bis-Diglyceryl Polyacyladipate-2
Caprylic/Capric Triglyceride
Diisostearyl Malate
Microcrystalline Wax
Sorbitan Olivat
Glycerin
Silica Dimethyl Silylate
1,2-Hexanediol
Sorbitan Stearate
Simethicone
Cetearyl Alcohol
Distilled water

로 사용되어 왔다[16].

임상 실험 결과에 대한 통계는 다음과 같이 진행하였다. 정규성 검증을 위해 Kolmogorov-Smirnov test를 이용하여 데이터가 정규 분포를 만족하는지 하였고, 전, 후 비교를 위해서 입술 톤, 볼륨, 걸탄력, 탄성복원력은 paired *t*-test를 이용하여 분석, 입술 주름은 Friedman test를 이용하여 분석하였다. 유의한 차이가 있었으므로 Wilcoxon signed-rank test를 실시하여 시점 간 차이를 확인하였으며 Holm-Bonferroni Method를 이용하여 *p*-value를 보정하였다.

입술 주름 개선에 대한 임상시험은 생명윤리위원회(IRB)의 기관생명윤리위원회((주)엘리드, IRB-230808T009)의 표준 운영지침 및 임상시험 기준에 따라 실시되었다. 피험자 전원에게 관련 실험의 목적 및 개요 등을 사전에 설명하고 동의 의사 확인 후 실험이 수행되었다.

본 연구에 사용된 모든 종류의 립밤은 LG H&H R&D 센터(Korea)에서 자체 프로토콜로 생산되었다. 기존에 연구소에서 개발된 W/O타입 립밤에 해당하는 양의 cedrol, 펩타이드 3 종을 첨가하였다. 립밤 제형에 사용된 성분은 Table 2에 표기하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Cedrol 및 펩타이드 3 종 Complex의 *In Vitro* 상 주름 개선 및 광노화 방어 효과

Cedrol 및 3 가지 펩타이드 조합이 피부 섬유아세포의 콜

라겐 및 엘라스틴 발현에 미치는 영향을 분석하였다(Figure 1A). Cedrol 농도 1 ppm 및 5 ppm 처리가 콜라겐 및 엘라스틴 발현량 향상에 긍정적인 효과를 나타냄을 확인하였으나, Cedrol 및 펩타이드 3 종의 조합에서는 발현량 증폭의 시너지 효과를 관찰하였다. 콜라겐의 경우, Cedrol 1 ppm, 농도 2 (Conc. 2, Table 1) 조건에서 무처리군 대비 2 배의 발현 효과를 확인했으며, 엘라스틴의 경우 Cedrol 1 ppm, 농도 1 (Conc. 1, Table 1) 조건에서 무처리군 대비 1.73 배 발현 증대 효과를 확인 하였다. Cedrol 5 ppm 에서는 이러한 시너지 효과가 비교적 약하게 확인됨을 확인하였다.

자외선 처리 시, 섬유아세포의 콜라겐과 엘라스틴의 발현량이 감소하고 MMP-1 발현이 증가함을 확인하였다

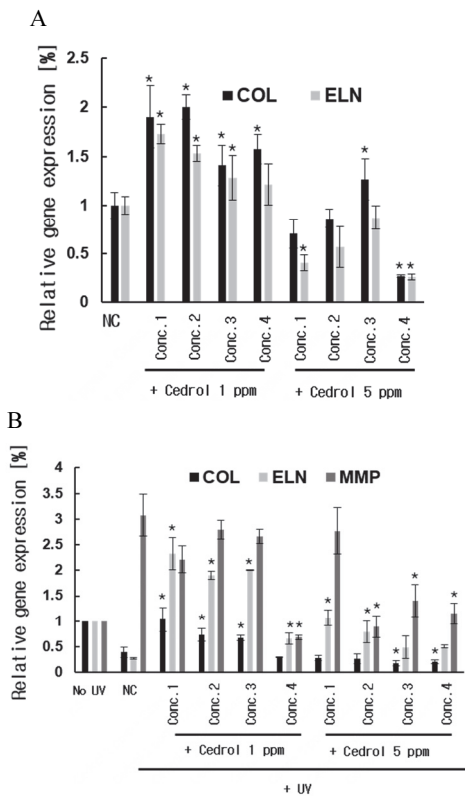


Figure 1. *In vitro* efficacy of cedrol and peptides complex to skin fibroblast. (A) Collagen type I alpha 1 chain (COL) and elastin (ELN) gene expressions of HS68 when cedrol & peptides complex was treated. (B) Collagen type I alpha 1 chain (COL), elastin (ELN), matrix metalloproteinases 1 (MMP) gene expressions of HS68 under photo-aging model. Ultraviolet (UVA 15 mJ/cm², UVB 20 mJ/cm²) was irradiated. After treatment of 24 hours, cells were harvested and analyzed. **p* < 0.05; error bar was shown; ppm, parts per million.

(Figure 1B). 콜라겐의 경우 60%, 엘라스틴은 약 70%의 발현 감소 효과를 보였으며, MMP-1은 3 배 가량 발현이 증가하였다. Cedrol과 펩타이드 3 종 조합의 처리 시, 콜라겐과 엘라스틴의 발현량 감소효과를 회복시키고, MMP-1의 발현량을 감소시킴을 확인하였다. 콜라겐과 엘라스틴의 발현 회복 측면에서 가장 우수한 효과는 Cedrol 1 ppm 및 농도 1 (Conc. 1, Table 1)에서 무처리군(NC) 대비 166.67%, 759.26% 증가를 각각 확인하였다. MMP-1의 과발현 경감 효과는 Cedrol 1 ppm 및 농도 4 (Conc. 4, Table 1)에서 무처리군(NC) 대비 77.92% 최대 경감효과를 확인하였다.

3.2. Cedrol 및 펩타이드 3 종의 지방줄기세포 분화 촉진 및 지질 축적 촉진 효능

노화에 따른 피하 지방의 감소가 안면부의 인지 나이 및 주름 형성에 지대한 영향을 미침을 다양한 연구에서 보

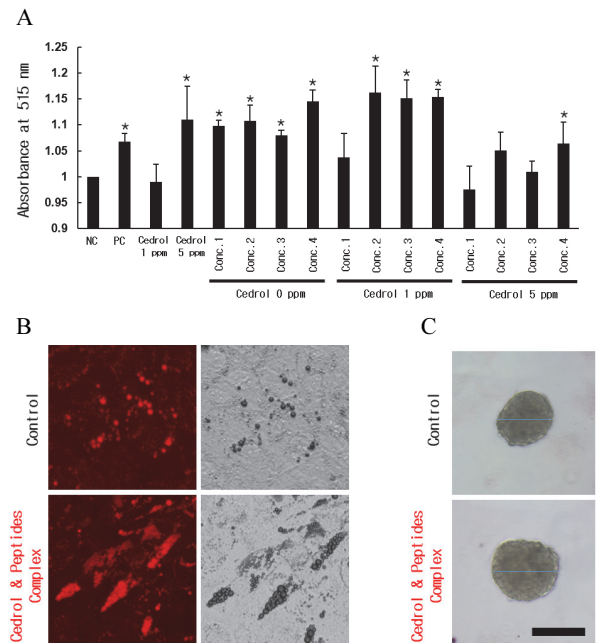


Figure 2. Effect of cedrol and peptides complex on adipogenesis in human adipose-derived stem cells. Cedrol and peptides complexes and positive control rosiglitazone (1 μM) were treated for 10 days. After differentiation, adipocytes were stained with Oil red O. (A) Quantification of adipocytes stained with Oil red O. Absorbance at 515 nm were measured. (B) Fluorescence microscopy image to verify adipogenesis and lipid droplets. The data of cedrol 1 ppm and Conc. 2 was shown. (C) Adipocyte spheroids cultured and differentiated for 10 days. The data of cedrol 1 ppm and Conc. 2 was shown. 50 μm scale bar (white) was shown. **p* < 0.05; error bar was shown; ppm, parts per million.

여진 바 있다[7].

Cedrol 및 펩타이드 3 종 성분 조합이 인간 지방 유래 줄기세포를 유도 및 지질 축적을 유도하는지 확인해보았다. 실험 방법 파트에서 서술하였듯이, 인간 지방 유래 줄기세포를 분화용 미디어와 실험 물질을 약 10 일간 처리 및 배양 하였다. 분화 유도 10 일 후 세포를 고정, oil red O를 이용하여 지질 방울을 염색, 정량, 정성 분석을 실시 하였다.

Figure 2와 같이 cedrol 및 펩타이드 3 종으로 이루어진 실험 물질 조합 처리 시 지방 줄기세포가 지방 세포로 효과적으로 분화가 유도되어 지방량이 유의미하게 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 정량 분석에서, 양성대조군을 사용한 rosiglitazone 보다 더 큰 분화 효능임을 확인할 수 있었다. Cedrol 1 ppm 및 농도 2 (Conc. 2, Table 1)에서 무처리군 대비 1.16 배의 향상된 지방축적을 확인하였다. Spheroid 배양은 *in vitro* 배양과 *ex vivo* 및 *in vivo* 실험 사이를 이어주는 중요한 실험 기법으로, 일반적인 *in vitro* 2차원 세포 배양에 비해 좀 더 실제 3 차원 조직의 환경을 잘 반영한다[17]. 지방 유래 줄기 세포로 형성한 spheroid를 분화 및 adipogenesis를 유도하였을 때, cedrol 및 펩타이드 3 종 처리 시 volume이 좀더 증가한 것을 확인할 수 있었다(Figure 2C). Spheroid를 구형으로 가정하여 volume을 비교하였을 때, 무처리군 대비 1.79 배 부피가 증가하였음을 확인하였다.

3.3. 입술 주름 및 볼륨 개선 효능

입술은 노화 할수록 주름이 형성되고, 그 볼륨과 본연의 색이 감소되는 경향이 있다. Cedrol 및 펩타이드 3 종이 포함된 립 케어 제품을 2 주간 사용하여, 입술의 주름, 결, 탄력 및 탄성, 그리고 볼륨에 개선 효과가 있는지 인체 적용시험을 수행하였다.

입술 주름 변수 별 측정값을 분석한 결과 length값은 시험 제품 사용 전에 비하여, 사용 직후, 2 주 후 통계적으로 유의한 수준($p < 0.001$)으로 감소하였으며 각각 27.991%, 30.045%의 감소율을 나타냈다. Average width값은 시험 제품 사용 전에 비하여, 시험 제품 적용 직후 및 적용 2주 후 각각 15.833%, 14.180%의 감소율을 나타냈고, average depth값은 각각 22.110%, 14.344%의 감소율을 나타냈다. Maximum depth값은 각각 28.003%, 21.268%의 감소율을 나타냈다(Figure 3A). 한가지 두드러지는 점은, 실험 시료가 포함된 립케어 제품이 도포 및 사용 직후 유의미한 주름 개선 효과를 나타내는 것이다. 이는 생물학적으로 항주름 관련 기작이 관여하는 것뿐만 아니라, 수분량에 따라 조직의 볼륨이 크게

영향을 받는 입술의 특성 상, 일시적인 보습 효과 및 피부 표면 요철을 평평하게 해주는 효과가 작용했음을 추측할 수 있다.

입술 결 및 거칠기를 측정값을 분석한 결과, Ra값은 제품 적용 전에 비하여 적용 직후 및 적용 2 주 후 통계적으로 유의한 수준($p < 0.001$)으로 감소하였으며 각각 38.893%, 24.600%의 감소율을 나타냈다(Figure 3B). 2 주 후 Ra 값이 적용 직후 수치보다 유의미하진 않지만 다소 증가한 경향이 관찰되는데, 이는 2 주 간 조직 재생 및 수복으로 인한 효과가 다소 기여했을 것으로 보인다.

Cutometer를 이용한 입술 탄력 및 탄성복원력 관련 변수를 측정하였다(Figure 3C). R0값이 감소되면 입술 피부의 견고성 (firmness) 내지 외력에 의한 저항도, 즉 탄력이 개선되었다고 판단하였고, R8값이 증가되면 입술 탄성복원력이 개선되었다고 판단하였다[18]. 입술 탄력 및 탄성복원력 변수별 측정값을 분석한 결과, R0값은 제품 적용 전에 비하여 적용 2 주 후 통계적으로 유의한 수준($p < 0.001$)으로 감소하였으며 11.499%의 감소율을 나타냈다. R8값은 제품 적용 전에 비하여 적용 2주 후 통계적으로 유의한 수준($p < 0.001$)으로 증가하였으며 11.574%의 증가율을 나타냈다. 이는 피부 조직 탄성과 관련된 콜라겐 및 엘라스틴의 발현이 증가했던 *in vitro* 실험결과와 일치하다고 볼 수 있다.

Antera 3D[®] CS 모드를 이용한 입술 볼륨 측정값을 분석한 결과 volume값은 제품 적용 전에 비하여 적용 직후 통계적으로 유의한 수준($p < 0.001$)으로 증가하였으며 15.850%의 증가율을 나타냈다. Figure 3D 에서 보이듯이, 윗입술과 아랫입술의 너비가 증가하고, 음영이 짙어지는 분석결과를 확인할 수 있다.

피험자들 대상으로 체감 효과 및 효능에 대하여 자가 설문을 수행하였고, 그 결과를 Figure 4에 나타내었다. 전반적인 입술 주름의 개선, 탄력의 개선, 그리고 안티에이징 효과에 대한 체감 정도를 분석하였다. 피험자 24 명 전원 모두 주름 개선과 탄력 개선 효과에 긍정적인 응답을 하였으며, 2 주 사용 기간 이후 전반적인 만족도가 상승함을 확인하였다. 제품 사용 후 입술이 “젊어보이는지”에 대한 rejuvenation 효과에 대한 설문에서, 95.5% 피험자가 긍정적인 응답을 하였고, 전반적 만족도 역시 2 주 사용 기간 이후 상승함을 확인하였다. 본 인체 실험을 통해, cedrol 및 펩타이드 3 종 조합이 객관적 지표 분석, 주관적 체감 분석 모두에서 입술의 주름 및 볼륨 개선에 유의미한 효능이 있음을 확인하였다.

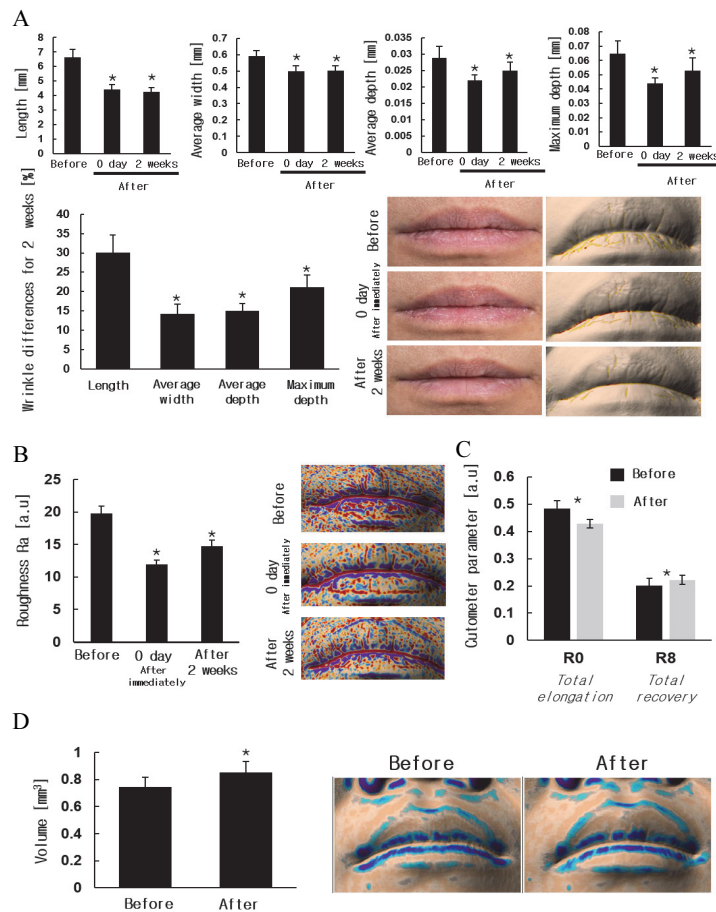


Figure 3. *In vivo* human application test and clinical assessments. Twenty four women had tested lip balm including cedrol and peptides complex for 2 weeks. Lips were analyzed by DSLR camera, antera 3D and cutometer. (A) Wrinkle improvements of lips. Lengths, average widths, average depths, and maximum depths were analyzed. The percentage differences were shown as bar graph. DSLR camera images and antera 3D's wrinkle analyzing mode image were shown. (B) Texture improvements of lips. Roughness (Ra) was measured using antera 3D. (C) Elasticity improvements of lips. R0 and R8 were measured to evaluate external elasticity and elastic restoring force using cutometer. (D) Volumization effects of cedrol & peptides complex. Using antera 3D's elevation mode, the volume of lips were analyzed. Statistical analysis were performed as described in material and method section.

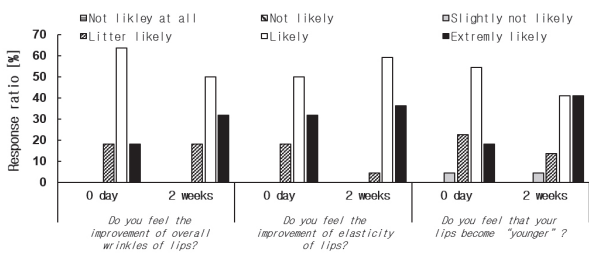


Figure 4. Self-assessment for lip balm including cedrol and peptides complex. Twenty four women had tested lip balm including cedrol and peptides complex for 2 weeks. After 2 weeks, subjects were asked how they recognized and satisfied the benefits and efficacies.

본 연구에서는 cedrol 및 펩타이드 3 종 complex의 *in vitro* 효능을 연구하고, 이를 인체 입술에 적용하여, 효능 소재로서의 가능성을 검증하였다는데 의의가 있다. 본 연구의 한계점으로, 제한된 연구 재원 및 자원으로 인하여, vehicle 제형에 대한 비교 실험을 진행하지 못한 것을 들 수 있다. 그러나 과거 연구들에서, 단순 vehicle 립밤 제형을 인체 입술에 2 주간 적용하였을 때, 입술 주름과 거칠기에는 유의미한 변화가 없고[19], 마찬가지로 입술 볼륨도 유의미한 변화가 없음을 고려하였을 때[5], 본 연구에서 적용된 소재의 효능이 유효함을 간접적으로 추론할 수 있

다. 또한 향후 후속 연구에서 초음파 및 전산화 단층촬영 (computed tomography)을 활용하여, 실제 입술 조직 내 진 피치밀도 및 지방량을 직접적으로 정량, 정성 분석함으로써 좀더 엄밀하게 효능을 검증할 수 있을 것으로 기대된다.

4. 결 론

입술에 대한 미적 관심은 오랜 역사속에서 확인할 수 있듯이, 소비자의 니즈는 항상 존재, 점차 증가하고 있다. 구조학적 특징으로 인해, 노화가 진행됨에 따라 주름 생성, 붉은기 손실, 볼륨 감소 등이 관찰된다. 입술은 매력적 요소로 작용함이 과학적으로 검증된 바 있기에, 효과적인 안면부 안티에이징 효과를 거두기 위해서는 입술에 대한 항노화 관리가 수반되어야 한다. 본 연구에서는 cedrol 및 펩타이드 3 종 조합이 섬유아세포의 콜라겐과 엘라스틴 발현량을 증대, 광노화를 방어할 수 있음을 보였으며, 지방줄기세포 분화 실험에서 지방줄기세포 분화 촉진 및 지방생성과 축적이 증가함을 실험적으로 확인하였다. 2 주 간 실시된 인체적용시험에서는 *in vitro* 실험 결과와 일치하게, 입술 주름, 결, 탄력, 볼륨 개선 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 cedrol 및 펩타이드 3 종 조합이 입술의 다양한 노화 징후를 해결할 수 있는 효과적인 소재로써, 실제 립케어 관련 제품의 소재로써 활용가능함을 확인하였다는 측면에서 의의가 있다.

References

1. I. D. Stephen and A. M. McKeegan, Lip colour affects perceived sex typicality and attractiveness of human faces, *Perception*, **39**(8), 1104 (2010).
2. H. Kobayashi and H. Tagami, Functional properties of the surface of the vermilion border of the lips are distinct from those of the facial skin, *Br J Dermatol*, **150**(3), 563 (2004).
3. J. L. Lévêque, E. Goubanova, Influence of age on the lips and perioral skin, *Dermatology*, **208**(4), 307 (2004).
4. V. Penna, G. B. Stark, S. U. Eisenhardt, H. Bannasch, and N. Iblher, The aging lip: a comparative histological analysis of age-related changes in the upper lip complex, *Plast Reconstr Surg*, **124**(2), 624 (2009).
5. V. Nobile, D. Buonocore, A. Michelotti, and F. Marzatico, Anti-aging and filling efficacy of six types hyaluronic acid based dermo-cosmetic treatment: double blind, randomized clinical trial of efficacy and safety, *J Cosmet Dermatol*, **13**(4), 277 (2014).
6. S. Lee, M. Kim, S. B. Park, K. Y. Kim, S. G. Park, M-S. Kim, and N. G. Kang, Effects of magnolia officinalis bark extract on improvement of lip wrinkles, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **45**(1), 95 (2019).
7. R. J. Rohrich and J. E. Pessa, The anatomy and clinical implications of perioral submuscular fat, *Plast Reconstr Surg*, **124**(1), 266 (2009).
8. S. J. Wall and P. A. Adamson, Augmentation, enhancement, and implantation procedures for the lips, *Otolaryngol Clin North Am*, **35**(1), 87 (2002).
9. M.H. Jin, S.G. Park, Y. L. Hwang, M. H. Lee, N. J. Jeong, S. S. Roh, Y. Lee, C.D. Kim, and J. H. Lee, Cedrol enhances extracellular matrix production in dermal fibroblasts in a MAPK-dependent manner, *Ann Dermatol*, **24**(1), 16 (2012).
10. F. Forouzanfar, A. M. Pourbagher-Shahri, and H. Ghazavi, Evaluation of antiarthritic and antinociceptive effects of cedrol in a rat model of arthritis, *Oxid Med Cell Longev.*, **2022** (2022).
11. Y. Zhang, L. Han, S. S. Chen, J. Guan, F. Z. Qu, and Y. Q. Zhao, Hair growth promoting activity of cedrol isolated from the leaves of *Platycladus orientalis*, *Biomed Pharmacother*, **83**, 641 (2016).
12. F. Gorouhi and H. Maibach, Role of topical peptides in preventing or treating aged skin, *Int J Cosmet Sci*, **31**(5), 327 (2009).
13. P. Morgantii, S. D. Randazzo, and A. Cardillo, Role of insoluble and soluble collagen as skin moisturizer, *J. Appl. Cosmetol*, **4**(4), 141 (1986).
14. A. Vierkötter, T. Schikowski, D. Sugiri, M.S. Matsui, U. Krämer, and J. Krutmann, MMP-1 and-3 promoter variants are indicative of a common susceptibility for skin and lung aging: results from a cohort of elderly women (SALIA), *J Invest Dermatol*, **135**(5), 1268 (2015).
15. M. Kim, E. Kim, and H. Lee, Use of SkinFibrometer[®] to measure skin elasticity and its correlation with Cutometer[®]

- and DUB[®] Skinscanner, *Skin Res Technol*, **24**(3), 466 (2018).
16. H. P. Dobrev, A study of human skin mechanical properties by means of Cutometer, *Folia med*, **44**(3), 5 (2002).
 17. B. Pinto, A. C. Henriques, P. M. Silva, and H. Bousbaa, Three-dimensional spheroids as *in vitro* preclinical models for cancer research, *Pharmaceutics*, **12**(12), 1186 (2020).
 18. E. Tamura, J. Ishikawa, K. Sugata, K. Tsukahara, H. Yasumori, and T. Yamamoto, Age-related differences in the functional properties of lips compared with skin, *Skin Res Technol*, **24**(3), 472 (2018).
 19. E. Tamura, H. Yasumori, and T. Yamamoto, The efficacy of a highly occlusive formulation for dry lips, *Int J Cosmet Sci*, **42**(1), 46 (2020).