

## 최종 보고서

이 보고서를 『보습 전임상 시험 및 평가』 시험의 최종  
보고서로 제출합니다.

제출일 : 2017년 11월 17일

시험기관 : 한림대학교 산학협력단 지역혁신센터 (RIC)  
식약처의 효능평가 및 기능성소재개발센터

시험책임자 : 김 은지 (인)

시험수행자 : 정 재인 (인)  
김 소마 (인)

최 미란 (인)

임 수민 (인)



## I. 시험 목적

본 시험은 보비씨엔이㈜의 기능성 칼슘의 피부 보습 개선 효능을 평가하기 위해 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험물질

보비씨엔이㈜가 제조하여 제공한 기능성 칼슘을 시험물질로 사용하였다.

### 2. 각질형성세포의 세포배양 및 분화 유도

인간 각질형성 세포주인 HaCaT 세포는 CLS Cell Line Service GmbH에서 구입하여 사용하였다. HaCaT 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Welgene)에 10% FBS, 100 units/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin을 첨가한 세포배양액을 사용하여 37°C 습윤한 CO<sub>2</sub> 배양기 (5% CO<sub>2</sub>/95% air)에서 배양하였다. 세포가 배양접시의 80% 정도 찼을 때, phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)으로 세포 단층을 씻어낸 후 세포배양액을 첨가하여 세포를 떼어내어 계대 배양하였고, 배지는 2일마다 교환하였다.

### 3. 세포 생존율 측정

HaCaT 세포의 세포 생존율은 MTT Assay 방법 (Denizot F and Lang R. *J Immunological Method* 89: 271-277, 1986)으로 측정하였다. HaCaT 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well로 24-well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 다양한 농도 (0, 200, 400, 600 µg/mL)의 시험물질이 함유된 배지로 세포 배양액을 교환하여 세포를 24, 48시간 배양하였다. 그 후 1 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Amresco) 용액으로 세포배양액을 교환하여 2시간 동안 추가 배양한 후 살아있는 세포에서 형성된 formazan을 isopropanol로 용출하여 SpectraMaxM2 Microplate reader (Molecular Devices)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 측정하였다.

#### 4. Hyaluronic Acid (HA) 생성 측정

HaCaT 세포가 생성한 HA를 측정하기 위해 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well로 24-well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. 이 후 다양한 농도 (0, 200, 400 및 600  $\mu$ g/mL)의 시험물질이 함유된 배지로 세포배양액을 교환하여 24시간 배양하였다. 세포 배양액을 수거하여 5,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 취해  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 세포 배양액 내의 HA 함량은 HA 측정용 ELISA kit (R&D Systems)을 사용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 측정하였다.

#### 5. Hyaluronic acid synthase (HAS)2 및 HAS3 mRNA 발현 측정

HaCaT 세포에서 HA 생성에 관여하는 유전자인 HAS2와 HAS3 mRNA의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 세포를  $2 \times 10^5$  cells/well로 6-well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. 이 후 다양한 농도 (0, 200, 400 및 600  $\mu$ g/mL)의 시험물질이 함유된 배지로 세포배양액을 교환하여 24시간 배양하였다. 세포에서 RNA를 추출하기 위해 RNeasy kit (Qiagen)을 사용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 RNA를 추출하였다. Total RNA (2  $\mu$ g)로부터 HyperScript™ RT master mix kit (GeneAll biotechnology)을 이용하여 cDNA를 얻은 후, Rotor-Gene™ SYBR Green Kit (Qiagen)을 사용하여 real-time PCR을 수행하여 HAS2, HAS3의 mRNA 발현 수준을 조사하였다. 실험에 사용한 primer 정보는 표 1에 나타난 바와 같으며 유전자의 정량 분석은 Rotor gene 6000 series system software 1.7 program (Corbett Research)을 이용하였다.

#### 6. 통계처리

모든 분석 수치는 mean  $\pm$  SEM으로 나타내었다. 대조군과 시험물질처리군의 차이를 비교하기 위하여 분산분석 (ANOVA)로 분석 후 SAS software version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA)에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검증하였다.  $p < 0.05$  이상일 때만 통계적으로 유의성 있는 것으로 판단하였다.

### III. 연구 결과

#### 1. 기능성 칼슘이 HaCaT 세포의 세포 생존율 (cell viability) 에 미치는 영향

HaCaT 세포에서 기능성칼슘의 세포독성을 조사하기 위해 다양한 농도 (0, 200, 400 및 600  $\mu\text{g/mL}$ )의 기능성칼슘을 세포배양액에 처리하여 세포를 각각 24시간, 48시간 배양한 후 MTT assay를 실시하여 살아있는 세포수를 측정하였다. 각각의 기능성칼슘을 24시간 처리하였을 때 기능성칼슘을 처리하지 않은 대조군 (0  $\mu\text{g/mL}$ )과 비교하여 600  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 세포증식이 유의적으로 증가하였다. 48시간 처리하였을 때 대조군과 비교하여 기능성칼슘의 처리는 살아있는 세포수에 유의적인 차이를 보이지 않았다 (표 2). 이 결과는 HaCaT 세포에서 시험물질을 600  $\mu\text{g/mL}$  이하의 농도로 처리한 경우 세포 독성이 나타나지 않음을 제시한다.

#### 2. 기능성 칼슘이 hyaluronic acid (HA) 생성에 미치는 영향

HA는 분자량이 20 ~ 40만에 이르는 고분자 화합물로서 표피의 수분증발을 막아 피부의 탄력성을 유지할 뿐만 아니라, 영양성분의 저장과 확산, 세포 이동 등에 관여한다. HA가 피부 보습에 중요한 역할을 담당하므로 기능성칼슘의 피부 보습 개선 효능을 평가하기 위해 HaCaT 세포에서 기능성칼슘이 HA의 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 표 3에 나타난 바와 같이 대조군 (0  $\mu\text{g/mL}$ )의 HA 함량은  $92.6 \pm 2.3$  ng/mL이었으며, 기능성칼슘의 처리농도 증가에 따라  $99.3 \pm 6.2$  ng/mL,  $119.4 \pm 4.5$  ng/mL,  $123.7 \pm 6.7$  ng/mL로 HA 생성이 유의적으로 증가하였다.

#### 3. 기능성 칼슘이 HAS2 및 HAS3 mRNA 발현 수준에 미치는 영향

HAS는 세포막에 존재하여 glucuronic acid 와 N-acetyl-glucosamine 구성단위들을 교대로 배열하여  $\beta$ -1,3 결합을 할 수 있도록 매개하여 HA를 합성하는 역할을 하는 효소이다. HAS-1과 HAS-2는  $2 \sim 4 \times 10^6$  Da 크기의 HA를 생성하고 HAS-3는  $0.4 \sim 2.5 \times 10^5$  Da 크기의 HA를 형성한다. HAS가 활성화 되면 진피층 내 보습인자인 HA의 함량이 늘어나 피부 보습력이 증가되므로, 보습 효과 검증에 중요한 효소라고 할 수 있다. 따라서 기능성칼슘 처리에 의한 HAS2, HAS3 mRNA 발현 수준에 미치는 영향을 평가하기 위해 real-time RT-PCR을 수행하였다. 표 4에 나타난 바와 같이 HAS2 mRNA 수준은 대조군 (0  $\mu\text{g/mL}$ )과 비교하여 200  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에

서 18.16배로 현저히 증가하였고, 처리농도가 증가함에 따라 mRNA 수준이 감소되었다. HAS3 mRNA 수준은 기능성칼슘의 처리농도 증가에 따라 증가하였고, 600  $\mu$ g/mL의 농도에서 119.1배 증가하여 HAS3 mRNA 수준이 현저히 증가하였다.

#### IV. 요약 및 결론

본 시험은 보비씨엔이(주)의 기능성 칼슘의 피부보습 효능을 평가하기 위해 실시하였다. 시험물질인 기능성칼슘이 HaCaT 각질형성세포의 세포 독성을 나타내지 않는 농도에서 피부보습인자 hyaluronic acid (HA) 생성 및 HA의 합성효소인 HAS2와 HAS3 mRNA 발현 수준에 미치는 영향을 평가하였다.

기능성칼슘 처리는 100  $\mu$ g/mL의 농도에서 HAS2 mRNA 발현 수준을 증가시키고, 600  $\mu$ g/mL 의 농도에서 HAS3 mRNA 발현 수준을 증가시켰으며, 기능성칼슘의 처리농도 증가에 따라 HA의 생성량을 증가시켰다.

이는 기능성칼슘이 HAS2와 HAS3 mRNA 발현 수준을 증가시켜 HA 생성증가를 유도함을 나타낸다. 따라서 기능성칼슘은 피부보습소재로 화장품에 활용이 가능하다고 사료된다.

**표 1. Real-time RT-PCR용 PCR primer정보**

Gene	Primer	Product length
HAS2	(Sense) 5'-ATCCCATGGTTGGAGGTGTT-3' (Antisense) 5'-TGCCTGTCATCACCAAAGCT-3'	252 bp
HAS3	(Sense) 5'-AGCCTTTTGCCTTCCTGGA-3' (Antisense) 5'-AAGTTGCTGCGCCACACAA-3'	286 bp
GAPDH	(Sense) 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (Antisense) 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	140 bp

**표 2. HaCaT 세포의 세포 생존율에 미치는 영향**

Hours of treatment	Cell viability (Absorbance at 570 nm)			
	0 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL	600 µg/mL
0 h	0.299 ± 0.011	0.299 ± 0.011	0.299 ± 0.011	0.299 ± 0.011
24 h	0.423 ± 0.011 <sup>b</sup>	0.445 ± 0.012 <sup>b</sup>	0.437 ± 0.006 <sup>b</sup>	0.483 ± 0.007 <sup>a</sup>
48 h	0.797 ± 0.011	0.769 ± 0.012	0.775 ± 0.014	0.800 ± 0.004

Values are expressed as mean ± SEM.

Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

표 3. Hyaluronic acid 생성에 미치는 영향

	0 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	400 $\mu\text{g/mL}$	600 $\mu\text{g/mL}$
<b>Hyaluronic Acid (ng/mL)</b>	92.6 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>	99.3 $\pm$ 6.2 <sup>b</sup>	119.4 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>	123.7 $\pm$ 6.7 <sup>a</sup>

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



표 4. HAS2 및 HAS3 mRNA 발현 수준에 미치는 영향

	0 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	400 $\mu\text{g/mL}$	600 $\mu\text{g/mL}$
HAS2 mRNA	1 <sup>b</sup>	18.16 $\pm$ 4.62 <sup>a</sup>	6.51 $\pm$ 4.01 <sup>b</sup>	3.37 $\pm$ 1.86 <sup>b</sup>
HAS3 mRNA	1 <sup>b</sup>	5.01 $\pm$ 1.62 <sup>b</sup>	18.94 $\pm$ 6.40 <sup>b</sup>	119.08 $\pm$ 57.16 <sup>a</sup>

Each of the control levels (0  $\mu\text{g/mL}$ ) was set to 1.

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.