

세포투과 펩티드를 이용한 주름개선 펩티드 GHKs의 피부흡수 증진

박수인 · 안규민 · 김민기 · 허수현 · 신문삼[†]

을지대학교 대학원 시니어헬스케어학과 화장품약리학 전공
13135 경기도 성남시 수정구 산성대로 553
(2019년 7월 8일 접수, 2019년 9월 24일 수정본 접수, 2019년 9월 26일 채택)

Enhancement of Skin Permeation of Anti-wrinkle Peptide GHKs Using Cell Penetrating Peptides

Su In Park, Gyu Min An, Min Gi Kim, Soo Hyeon Heo and Moon Sam Shin[†]

Department of Senior Healthcare, majored in Cosmetic Pharmacology, Eulji University, 553, Sanseong-daero, Sujeong-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 13135, Korea

(Received 8 July 2019; Received in revised form 24 September 2019; accepted 26 September 2019)

요 약

본 연구에서는 경피흡수가 잘 안되는 주름개선 펩티드인 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 대하여 세포투과 펩티드인 알르기닌 올리고머(tetra-D-arginine, R4)와 hexa-D-arginine, R6)를 첨가한 후 경피 투과도를 측정하여 그 결과를 다음 6 가지 경우로 분석하였다. 첫번째로 주름개선 펩티드만 함유한 경우는 구리이온(Cu₂⁺)과 팔미트산이 경피 투과율을 증진시키는 것을 알 수 있다. 두번째로, GHK에 알르기닌 올리고머(R4, R6)를 첨가한 경우는 알르기닌 올리고머(R4, R6)가 경피 투과율을 증가시켰으며, R4에서 더 좋은 경피 투과율 증가를 나타냈다. 세번째로, GHK-Cu에 R4, R6를 첨가한 경우는 경피 투과율 증가가 나타났으며, R6 < R4 경피 투과율 순서로 나타났다. 네번째로 Pal-GHK에 R4, R6를 첨가한 경우에도 경피 투과율 증가가 나타났으며, R6 < R4 경피 투과율 순서로 나타났다. 다섯번째로, R4를 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 첨가한 경우에는 GHK+R4 < GHK-Cu+R4 < Pal-GHK+R4 순서로 경피 투과율 증가가 나타났다. 마지막으로 R6를 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 첨가한 경우에는 GHK+R4 < GHK-Cu+R4 < Pal-GHK+R4 순서로 경피 투과율 증가가 나타났다. 이를 통하여 주름 개선 펩티드인 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK의 피부 투과를 증가를 위한 최적의 조건을 제시하여 그 효능을 극대화할 수 있는 방안을 제시함으로써 주름 개선 기능성 화장품에서의 폭넓은 활용과 응용을 제안하고자 한다.

Abstract – In this study, the skin permeability was measured by adding cell penetrating peptides, arginine oligomers; (tetra-D-arginine (R4) and hexa-D-arginine (R6)) to little skin-permeable anti-wrinkle peptides (GHK, GHK-Cu, and Pal-GHK), and the results were analyzed by the following six cases. First, in cases where only anti-wrinkle peptides were contained, copper ions (Cu₂⁺) and palmitic acid enhanced the transdermal permeability. Second, when arginine oligomers (R4, R6) were added to GHK, arginine oligomers (R4, R6) increased percutaneous permeability, and R4 showed better percutaneous permeability. Third, the addition of R4 and R6 to GHK-Cu resulted in increased percutaneous transmittance, followed by R6 < R4 percutaneous transmittance. Fourth, when R4 and R6 were added to Pal-GHK, the percutaneous permeability increased with results in R6 < R4 order. Fifth, when R4 was added to GHK, GHK-Cu, and Pal-GHK, the transdermal permeability increased in the order of GHK+R4 < GHK-Cu+R4 < Pal-GHK+R4. Finally, the addition of R6 to GHK, GHK-Cu and Pal-GHK also resulted in increased percutaneous transmittance in the order of GHK+R4 < GHK-Cu+R4 < Pal-GHK+R4. This study provides optimal conditions for enhancing skin absorption of anti-wrinkle peptides GHK, GHK-Cu, and Pal-GHK, and propose a wide range of applications in anti-wrinkle functional cosmetics by suggesting ways to maximize their efficacy.

Key words: Anti-wrinkle peptide, Cell penetrating peptide, Skin Permeation, GHKs, Arginine oligomer

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: msshin@eulji.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서 론

우리나라는 세계적으로도 그 유례를 찾아보기 힘든 속도로 고령화가 진행되어 2017년 기준 65세 이상 인구 비율이 14% 이상인 고령사회에 진입하였다. 이러한 고령자의 증가는 다양한 사회적 문제를 야기하지만 한편으로는 시니어 산업의 성장을 가져오기도 한다[1]. 이에 따라 화장품 시장에서 시니어 세대 여성들이 소비 영향력과 구매력이 큰 계층으로 부상하여 화장품 시장의 중요한 소비자로 큰 비중을 차지하고 있다[2]. 이렇게 젊고 탄력적인 피부를 원하는 시니어 세대 여성들의 증가로 유효성이 뛰어난 주름 개선 기능성 화장품에 대한 수요가 증가하여 화장품 업계에서도 이에 대한 연구개발이 활발히 진행되고 있다[3].

최근 화장품의 주름 개선 기능성 소재로 아미노산 중합체인 펩티드를 이용하고자 하는 관심이 높아지고 있다. 펩티드는 우수한 생리 활성을 가지고 있고, 생체 내 물질이므로 안전하며, 빛과 공기에 안정적이고, 또한 단백질보다 크기가 작아 합성이 가능하므로 화장품 소재로 활용 가능성이 높기 때문이다[4,5]. 대표적인 주름 개선 기능성 펩티드로는 GHK(glycyl-histidyl-lysine)가 있다. GHK는 사람의 혈청에서 처음 분리되었고, 간세포 성장인자로 알려져 있다. 이는 혈액 내에서 20세에는 약 200 mg/mL 정도 존재하지만 노화가 진행됨에 따라 감소하여 60세에는 약 80 mg/mL 정도 존재한다. 이러한 GHK는 extracellular matrix인 교원섬유, 탄력섬유, 기질 같은 물질의 합성을 증가시켜 피부 재생 및 상처 치유 작용을 한다. GHK는 구리 이온에 높은 친화력을 가져 GHK-Cu 형태로 흔히 존재하며, GHK의 투과성 및 안정성을 높이기 위해 지방산인 palmitate와 결합시킨 형태의 Pal-GHK도 존재한다. 이러한 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK는 주름 개선 기능성 화장품 소재로 각광받고 있다. 하지만 펩티드는 친수성 성질로 각질층을 투과하는 데 어려움이 있어 실제로 피부에서 효능을 나타내기 어렵다는 문제가 있다[6-11].

한편 효과적인 세포 내 약물 전달을 위하여 세포막을 파괴하지 않고, 세포 독성을 나타내지 않으면서 친수성 거대 분자를 전달하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이와 관련하여 세포투과 펩티드(cell penetrating peptide)에 관한 많은 연구가 수행되고 있다. 세포투과 펩티드는 일반적으로 10-30개의 짧은 아미노산으로 구성되어 있으며, 아미노산 서열은 각각의 세포투과 펩티드마다 다양하지만 대부분 염기성의 아미노산인 lysine(K)과 arginine(R)을 많이 포함하고 있다. HIV-1에서 유래된 Tat 펩티드는 가장 연구가 많이 되고 있는 세포투과 펩티드 중 하나이다. Tat 펩티드는 86개의 아미노산으로 구성되어 있고, RKKKRRQR의 서열이 세포투과 펩티드의 역할을 하는 최소 부위로 알려져 있다. Tat 펩티드의 아미노산 서열을 치환하거나 결실시키는 실험을 통해 lysine과 arginine이 Tat 펩티드가 세포투과 펩티드로써 세포내 투과능을 가지는 핵심 역할을 하는 것이 밝혀졌다[12-16]. 이를 응용하면, 세포막과 피부 각질세포간 지질은 모두 지질 이중층 구조로 구조적 유사성 가지므로 세포투과 펩티드를 기능성 화장품 소재의 피부 각질세포간 지질 투과에 적용시킬 수 있을 것이라 사료된다[17,18].

본 연구에서는 주름 개선 펩티드인 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 세포투과 펩티드인 R4(tetra-D-arginine), R6(hexa-D-arginine)를 첨가하여 경피 투과도를 측정하였다. 이를 다음의 6가지 구분; (1) 주름개선 펩티드(GHK, GHK-Cu, Pal-GHK)만 함유, (2) GHK에 알르기닌 올리고머(R4, R6)를 첨가, (3) GHK-Cu에 R4, R6를 첨가,

(4) Pal-GHK에 R4, R6를 첨가, (5) R4를 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 각각 첨가, (6) R6를 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 각각 첨가한 경우에서 경피흡수도를 비교하고자 하였다. 또한 주름개선 펩티드 자체의 경피 투과도에 대한 해석, 세포투과 펩티드를 함께 함유시 경피투과도의 증가효과에 대한 검토 및 분자량이 상대적으로 낮은 주름 개선 펩티드에 대해, 알르기닌 수(R4, R6)에 따른 경피 투과도를 해석하고자 한다.

2. 시 험

2-1. 재료

본 연구에 사용된 주름 개선 펩티드 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK 및 세포투과 펩티드 R4, R6는 Dermafirm Co.(Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 이를 이용하여 Table 1의 9가지 시료를 증류수에 희석하여 제조하였고, 각각 펩티드 농도는 1%(10ml/mL), R4 농도는 0.5%(5ml/mL), R6 농도는 0.5%(5ml/mL)이다.

2-2. 경피 투과도 측정 방법

경피 투과도 측정은 Franz의 방법을 이용한 Franz Diffusion Cells and Systems (PermeGear, USA)를 이용하여 측정하였다[19]. 실험용 피부는 Neoderm®-E (Tegoscience, Korea)를 사용하였다. 피부를 receptor chamber 위에 각질층이 위를 향하도록 올리고, donor chamber를 각질층 위에 고정시킨 후 receptor chamber에 receptor medium인 PBS (Sigma Aldrich, USA)를 8.5 mL 채워 피부와 receptor medium이 맞닿도록 하였다. 온도는 항온수조(LabHouse, Korea)를 이용하여 체온과 유사한 37 °C를 유지하였고, 30분간 안정화시킨 후 2.1에서 제조한 시료용액 0.5 ml을 1.326665 cm² 면적의 피부에 적하하였다. 피부를 투과한 시료가 receptor medium에 균일하게 혼합되도록 stirring bar는 500 rpm을 유지하면서 4, 8, 12, 16, 20, 24시간 후에 각각 sampling port를 통해 receptor medium을

Table 1. Sample list used in this study

S1	GHK 10 mg/mL
S2	GHK-Cu 10 mg/mL
S3	Pal-GHK 10 mg/mL
S4	GHK 10 mg + R4, 5 mg/mL
S5	GHK-Cu 10 mg + R4, 5 mg/mL
S6	Pal-GHK 10 mg + R4, 5 mg/mL
S7	GHK 10 mg + R6, 5 mg/mL
S8	GHK-Cu 10 mg + R6, 5 mg/mL
S9	Pal-GHK 10 mg + R6, 5 mg/mL

Table 2. Franz diffusion cells and systems operation conditions

Instrument	PermeGear V6A-02
Skin	Neoderm®-E
Area of skin	1.326665 cm ²
Volume of sample solution	0.5 ml
Weight of peptide	5 mg
Receptor medium	PBS
Volume of receptor medium	8.5 ml
Temperature	37 °C
Stirbar speed	500 rpm
Sampling aliquot	0.5 ml
Sampling time	4, 8, 12, 16, 20, 24 h

Table 3. HPLC operation conditions for determination of GHK, GHK-Cu, Pal-GHK

Instrument		Agilent 1100	
Column		Shiseido C18 (4.6*250 mm, 5 μm)	
	Time	0	50
Mobile phase	0.1% TFA in water	100	0
	0.1% TFA in acetonitrile	0	100
Detector wavelength		UV 220 nm	
Injection volume		20 μl	
Flow rate		1 ml/min	
Column temperature		25 °C	
Run time		50 min	

0.5 ml씩 채취한 후 동량의 receptor medium을 보충하였다. 채취한 receptor medium은 HPLC (Agilent, USA)를 이용하여 정량 분석하였다. 실험 조건은 Table 2에 정리하였다[20,21].

2-3. 경피 투과도 정량 방법

GHK, GHK-Cu, Pal-GHK의 경피 투과도 정량을 위해 HPLC (Agilent, USA)를 이용하여 앞서 채취한 receptor medium을 분석하였다. 칼럼은 Shiseido C18 (4.6×250 mm, 5 μm), 이동상은 trifluoroacetic acid (Sigma Aldrich, USA) 0.1% 함유 증류수와 trifluoroacetic acid 0.1% 함유 acetonitrile (Samchun Chemicals, Korea)의 gradient, 검출 파장은 220 nm, 시료 투입량은 20 μL, 유속은 1 ml/min, 칼럼 온도는 25 °C의 조건으로 각 시료 당 50분간 분석을 진행하였다. 실험 조건은 Table 3에 정리하였다.

경피흡수율을 측정하기 위한 Franz의 방법에서 사용된 시료용액은 각각 5 ml을 사용하였고, 이 용액에는 1% 펩티드 농도를 함유하여 펩티드의 무게는 5 mg을 지니고 있다. 피부면적 1.326665 cm²을 고려하면, 초기 펩티드 투여량 3.77 mg/cm²에 대비하여 receptor chamber에 투과된 펩티드 비율을 측정하여 누적 경피 흡수율 (Cumulative release)을 각각 Table과 Figure에 제시하였다.

2-4. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하여 평균과 표준편차를 산출하였고, SPSS 통계프로그램으로 일원배치 분산분석을 Duncan의 방법을 이용하여 진행하여 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. GHK(S1), GHK-Cu(S2), Pal-GHK(S3)의 경피 투과도 비교

GHK, GHK-Cu, Pal-GHK의 경피 투과도를 분석하여 그 결과를 Table 4 및 Fig. 1에 제시하였다. GHK, GHK-Cu, Pal-GHK 모두 4

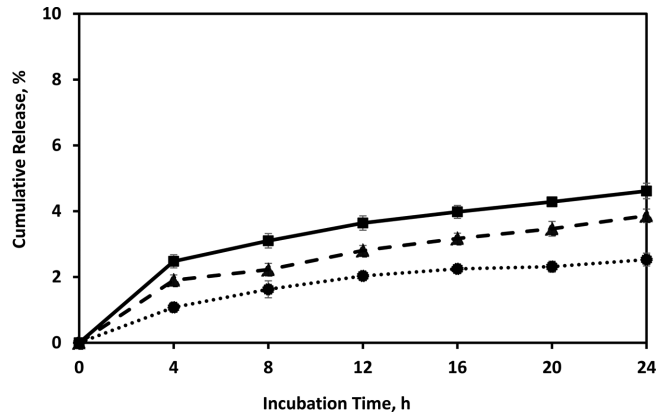


Fig. 1. Cumulative release (%) of GHK, GHK-Cu, Pal-GHK: ●, GHK; ▲, GHK-Cu; ■, Pal-GHK.

시간까지 투과도가 급격히 상승한 후 24시간까지는 완만한 상승세를 보였다. 4시간에서의 누적 투과율을 비교하면, GHK는 1.08%, GHK-Cu는 1.9%, Pal-GHK는 2.48%의 투과율을 보여 GHK-Cu는 GHK에 비해 약 1.76배, Pal-GHK는 GHK에 비해 약 2.3배 많은 양이 투과되었다. 또한 24시간에서의 최종 누적 투과율을 비교하면, GHK는 2.53%, GHK-Cu는 3.86%, Pal-GHK는 4.61%의 투과율을 보여 GHK-Cu는 GHK에 비해 약 1.53배, Pal-GHK는 GHK에 비해 약 1.82배 많은 양이 투과되었다. 즉 Pal-GHK, GHK-Cu, GHK 순으로 높은 투과도를 보였으며, 이 결과는 구리이온(Cu₂⁺)과 팔미트산이 경피 투과율을 증진시키는 것을 알 수 있다.

3-2. GHK(S1)에 R4 첨가(S4), R6 첨가(S7)에 따른 경피 투과도 비교

Table 5 및 Fig. 2에 GHK, GHK에 R4첨가(GHK+R4), GHK에 R6첨가(GHK+R6)의 GHK 경피투과도 결과는 제시하였고, 경피투과도 결과는 모두 4시간까지 투과도가 크게 상승한 후에 24시간까지는 완만하게 상승하였다. 4시간까지 누적 투과율을 살펴보면, GHK는 1.08%, GHK+R4는 2.73%, GHK+R6는 1.31%의 투과율을 보여 GHK+R4는 GHK에 비해 약 2.53배, GHK+R6는 GHK에 비해 약 1.21배 많은 양이 투과되었다. 또한 24시간에서의 최종 누적 투과율에서는 GHK는 2.53%, GHK+R4는 7.61%, GHK+R6는 3.54%의 투과율을 보여 GHK+R4는 GHK에 비해 약 3.01배, GHK+R6는 GHK에 비해 약 1.40배 많은 양이 투과되었다. 즉 GHK에 R4첨가, GHK에 R6첨가, GHK 순으로 높은 GHK 투과도를 보였다.

3-3. GHK-Cu(S2)에 R4 첨가(S5), R6 첨가(S8)에 따른 경피 투과도 비교

GHK-Cu, GHK-Cu에 R4첨가, GHK-Cu에 R6첨가의 GHK-Cu

Table 4. Cumulative release (%) of GHK, GHK-Cu, Pal-GHK

Sample	Time		0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h
			GHK (%)	mean	0	1.08	1.63	2.03	2.25
		SD	0	0.15	0.26	0.12	0.09	0.17	0.19
GHK-Cu (%)	mean	0	1.9	2.22	2.8	3.17	3.47	3.86	
	SD	0	0.16	0.19	0.16	0.16	0.23	0.21	
Pal-GHK (%)	mean	0	2.48	3.1	3.64	3.98	4.28	4.61	
	SD	0	0.2	0.22	0.22	0.19	0.12	0.23	
one-way ANOVA			-	.000	.001	.000	.000	.000	.000

Table 5. Cumulative release (%) of GHK, GHK+R4, GHK+R6 (%)

Time		0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h	
Sample	GHK (%)	mean	0	1.08	1.63	2.03	2.25	2.31	2.53
		SD	0	0.15	0.26	0.12	0.09	0.17	0.19
	GHK+R4 (%)	mean	0	2.73	3.98	5.12	6.11	6.95	7.61
		SD	0	0.18	0.23	0.19	0.23	0.21	0.27
	GHK+R6 (%)	mean	0	1.31	2.14	2.64	2.84	3.16	3.54
		SD	0	0.18	0.2	0.26	0.21	0.2	0.21
one-way ANOVA		-	.000	.000	.000	.000	.000	.000	

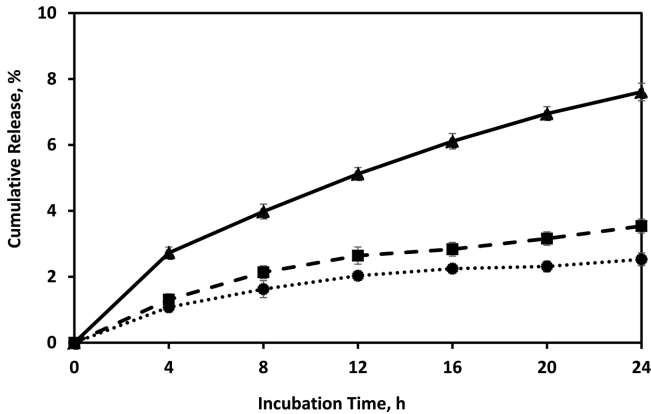


Fig. 2. Cumulative release (%) of GHK, GHK+R4, GHK+R6: ●, GHK; ▲, GHK+R4; ■, GHK+R6.

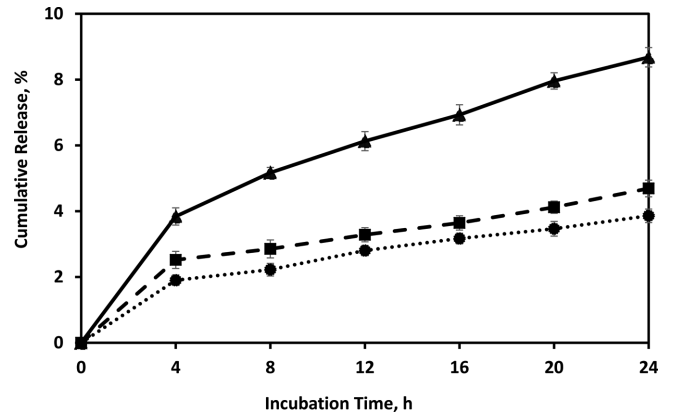


Fig. 3. Cumulative release (%) of GHK-Cu, GHK-Cu+R4, GHK-Cu+R6: ●, GHK-Cu; ▲, GHK-Cu+R4; ■, GHK-Cu+R6.

경피 투과도 결과를 Table 6과 Fig. 3에 나타냈다. GHK-Cu, GHK-Cu+R4, GHK-Cu+R6 모두 4시간까지 투과도가 급격히 상승한 후 24시간까지는 완만한 상승세를 나타내는 S자 형태의 곡선을 나타냈다. 4시간에서의 누적 투과율을 비교해보면, GHK-Cu는 1.9%, GHK-Cu+R4는 3.84%, GHK-Cu+R6는 2.52%의 투과율을 보여 GHK-Cu+R4는 GHK-Cu에 비해 약 2.02배, GHK-Cu+R6는 GHK-Cu에 비해 약 1.33배 많은 양이 투과되었다. 24시간에서의 최종 누적 투과율을 비교해보면, GHK-Cu는 3.86%, GHK-Cu+R4는 8.68%, GHK-Cu+R6는 4.69%의 투과율을 보여 GHK-Cu+R4는 GHK-Cu

에 비해 약 2.25배, GHK-Cu+R6는 GHK-Cu에 비해 약 1.22배 많은 양이 투과되었다. 즉 GHK-Cu에 R4첨가, GHK-Cu에 R6첨가, GHK-Cu 순으로 높은 GHK-Cu 투과도를 보였다.

3-4. Pal-GHK(S3)에 R4 첨가(S6), R6 첨가(S9)에 따른 경피 투과도 비교

Pal-GHK, Pal-GHK에 R4첨가, Pal-GHK에 R6첨가의 Pal-GHK 경피 투과도 측정결과를 Table 7 및 Fig. 4에 제시하였으며, 모두 4시간까지 투과도가 급격히 상승한 후 24시간까지는 완만한 상승세

Table 6. Cumulative release (%) of GHK-Cu, GHK-Cu+R4, GHK-Cu+R6

Time		0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h	
Sample	GHK-Cu (%)	mean	0	1.9	2.22	2.8	3.17	3.47	3.86
		SD	0	0.16	0.19	0.16	0.16	0.23	0.21
	GHK-Cu+R4 (%)	mean	0	3.84	5.17	6.13	6.93	7.96	8.68
		SD	0	0.26	0.16	0.29	0.31	0.25	0.29
	GHK-Cu+R6 (%)	mean	0	2.52	2.85	3.28	3.64	4.12	4.69
		SD	0	0.26	0.27	0.21	0.22	0.19	0.25
one-way ANOVA		-	.000	.000	.000	.000	.000	.000	

Table 7. Cumulative release (%) of Pal-GHK, Pal-GHK+R4, Pal-GHK+R6

Time		0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h	
Sample	Pal-GHK (%)	mean	0	2.48	3.1	3.64	3.98	4.28	4.61
		SD	0	0.2	0.22	0.22	0.19	0.12	0.23
	Pal-GHK+R4 (%)	mean	0	4.61	6.27	7.3	8.3	9.11	9.79
		SD	0	0.21	0.31	0.28	0.25	0.2	0.2
	Pal-GHK+R6 (%)	mean	0	3.18	3.79	4.29	4.93	5.62	6.11
		SD	0	0.19	0.22	0.31	0.22	0.33	0.24
one-way ANOVA		-	.000	.000	.000	.000	.000	.000	

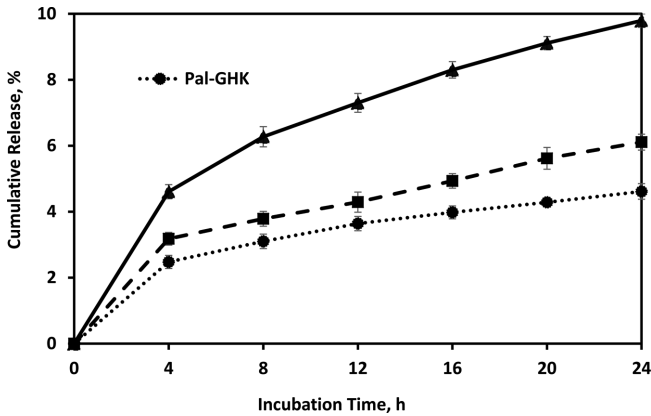


Fig. 4. Cumulative release (%) of Pal-GHK, Pal-GHK+R4, Pal-GHK+R6: ●, Pal-GHK; ▲, Pal-GHK+R4; ■, Pal-GHK+R6.

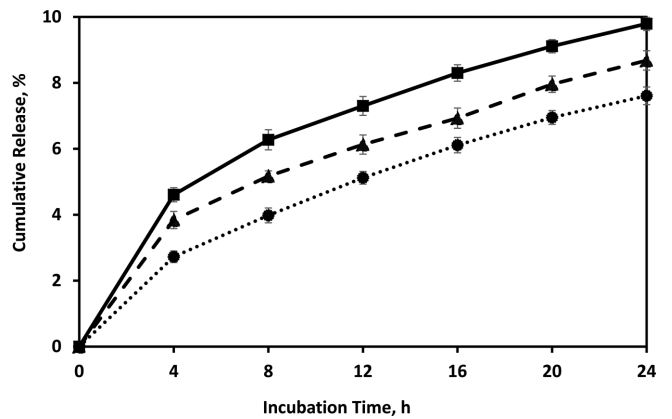


Fig. 5. Cumulative release (%) of GHK+R4, GHK-Cu+R4, Pal-GHK+R4: ●, GHK+R4; ▲, GHK-Cu+R4; ■, Pal-GHK+R4.

를 보이는 S자 형태의 곡선을 나타냈다. 4시간에서의 누적 투과율 결과를 비교하면, Pal-GHK는 2.48%, Pal-GHK+R4는 4.61%, Pal-GHK+R6는 3.18%의 투과율을 보여 Pal-GHK+R4는 Pal-GHK에 비해 약 1.86배, Pal-GHK+R6는 Pal-GHK에 비해 약 1.28배 많은 양이 투과되었다. 24시간에서의 최종 누적 투과율을 비교하면, Pal-GHK는 4.61%, Pal-GHK+R4는 9.79%, Pal-GHK+R6는 6.11%의 투과율을 보여 Pal-GHK+R4는 Pal-GHK에 비해 약 2.12배, Pal-GHK+R6는 Pal-GHK에 비해 약 1.33배 많은 양이 투과되었다. 즉 Pal-GHK에 R4첨가, Pal-GHK에 R6첨가, Pal-GHK 순으로 높은 Pal-GHK 투과도를 보였다.

3-5. R4를 GHK(S4), GHK-Cu(S5), Pal-GHK(S6)에 첨가에 따른 경피 투과도 비교

Table 8 및 Fig. 5에서 보는 바와 같이, R4를 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 첨가한 GHK+R4(S4), GHK-Cu+R4(S5), Pal-GHK+R4(S6)의 경피 투과도는 4시간까지 빠른 상승 후에 24시간까지 완만한 증가를 보이는 S자 곡선을 보였다. 4시간에서의 누적 투과율을 비교해보면, GHK+R4는 2.73%, GHK-Cu+R4는 3.84%, Pal-GHK+R4는

4.61%의 경피 투과율을 나타냈고, GHK-Cu+R4는 GHK+R4에 비해 약 1.41배, Pal-GHK+R4는 GHK+R4에 비해 약 1.69배 많은 양이 투과되었다. 24시간에서의 최종 누적 투과율을 비교하면, GHK+R4는 7.61%, GHK-Cu+R4는 8.68%, Pal-GHK+R4는 9.79%의 투과율을 보여 GHK-Cu+R4는 GHK+R4에 비해 약 1.14배, Pal-GHK+R4는 GHK+R4에 비해 약 1.29배 많은 양이 투과되었다. 즉 Pal-GHK+R4, GHK-Cu+R4, GHK+R4 순으로 높은 경피 투과도를 보였다.

3-6. R6를 GHK(S7), GHK-Cu(S8), Pal-GHK(S9)에 첨가에 따른 경피 투과도 비교

R6를 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 첨가에 따른 GHK+R6 (S7), GHK-Cu+R6 (S8), Pal-GHK+R6(S9)의 경피 투과도 결과를 Table 9 및 Fig. 6에 제시하였고, 모두 4시간까지 투과도가 급격히 상승한 후 24시간까지는 완만한 상승세를 보였다. 4시간에서의 누적 투과율을 비교해보면, GHK+R6는 1.31%, GHK-Cu+R6는 2.52%, Pal-GHK+R6는 3.18%의 투과율을 보여 GHK-Cu+R6는 GHK+R6에 비해 약 1.92배, Pal-GHK+R6는 GHK+R6에 비해 약 2.43배 많은 양이 투과되었다. 24시간에서의 최종 누적 투과율을 비교해보면,

Table 8. Cumulative release (%) of GHK+R4, GHK-Cu+R4, Pal-GHK+R4

Time		0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h	
Sample	GHK+R4 (%)	mean	0	2.73	3.98	5.12	6.11	6.95	7.61
		SD	0	0.18	0.23	0.19	0.23	0.21	0.27
	GHK-Cu+R4 (%)	mean	0	3.84	5.17	6.13	6.93	7.96	8.68
		SD	0	0.26	0.16	0.29	0.31	0.25	0.29
	Pal-GHK+R4 (%)	mean	0	4.61	6.27	7.3	8.3	9.11	9.79
		SD	0	0.21	0.31	0.28	0.25	0.2	0.2
one-way ANOVA		-	.000	.000	.000	.000	.000	.000	

Table 9. Cumulative release (%) of GHK+R6, GHK-Cu+R6, Pal-GHK+R6

Time		0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h	
Sample	GHK+R6 (%)	mean	0	1.31	2.14	2.64	2.84	3.16	3.54
		SD	0	0.18	0.2	0.26	0.21	0.2	0.21
	GHK-Cu+R6 (%)	mean	0	2.52	2.85	3.28	3.64	4.12	4.69
		SD	0	0.26	0.27	0.21	0.22	0.19	0.25
	Pal-GHK+R6 (%)	mean	0	3.18	3.79	4.29	4.93	5.62	6.11
		SD	0	0.19	0.22	0.31	0.22	0.33	0.24
one-way ANOVA		-	.000	.000	.001	.000	.000	.000	

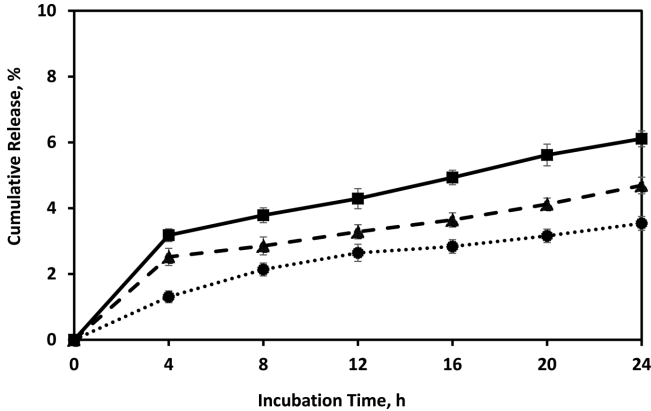


Fig. 6. Cumulative release (%) of GHK+R6, GHK-Cu+R6, Pal-GHK+R6: ●, GHK+R6; ▲, GHK-Cu+R6; ■, Pal-GHK+R6.

GHK+R6는 3.54%, GHK-Cu+R6는 4.69%, Pal-GHK+R6는 6.11%의 투과율을 보여 GHK-Cu+R6는 GHK+R6에 비해 약 1.32배, Pal-GHK+R6는 GHK+R6에 비해 약 1.73배 많은 양이 투과되었다. 즉 Pal-GHK+R6, GHK-Cu+R6, GHK+R6 순으로 높은 Pal-GHK, GHK-Cu, GHK 투과도를 보였다.

본 실험의 결과를 크게 3가지 관점으로 검토해보고자 한다. 첫째, 주름개선 펩티드(GHK, GHK-Cu, Pal-GHK)만은 함유한 경우에는 Pal-GHK > GHK-Cu > GHK 순으로 높은 투과도를 보였는데, 이는 지방산인 팔미트산과 구리이온이 경피투과 효과를 증진시킨 것으로 판단된다. 둘째, 본 연구에서 주름개선 펩티드(GHK, GHK-Cu, Pal-GHK)에 세포투과 펩티드(R4, R6)를 첨가하였을 때 경피투과의 증가효과를 확인할 수 있었다. 마지막으로, 세포투과 펩티드(R4, R6)의 경피투과를 상세하게 살펴보면, 알르기닌 수가 작은 R4가 R6에 비해 더 좋은 투과율을 나타냈다. 세포투과 펩티드의 경피침투에 대한 기존 연구를 살펴보면, 생체효소인 카탈라제(Catalase)에 세포투과 펩티드를 접합한 Tat-Catalase와 R9-Catalase의 경우, 표피를 침투하는 것을 확인하였으며[22], 항염증 약물인 사이클로스포린 A(Cyclosporin A)에 R7를 접합한 R7-Cyclosporin A의 경우, 피부장벽을 통과한 결과를 제시하였다[23]. 분자량이 상대적으로 큰 거대분자인 카탈라제, 사이클로스포린 A의 경우에는 상대적으로 알르기닌 수가 많은 R7, R9이 더 좋은 경피 침투율을 나타냈다. 본 연구에서는 세포투과 펩티드를 접합한 것이 아니라 혼합한 경우라 직접적인 비교는 어렵지만, 분자량이 크지 않은 주름개선 펩티드(GHK, GHK-Cu, Pal-GHK)의 경우에는 알르기닌 수가 작은 R4가 R6보다 더 좋은 경피 흡수율을 보였다. 추후 연구에서는 주름개선 펩티드에 알르기닌 올리고머를 접합한 경우에 알르기닌 수에 의한 경피 흡수율을 측정하여 이를 해석하는 실험을 진행할 예정이다.

4. 결 론

본 연구에서는 주름 개선 펩티드인 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 세포투과 펩티드인 R4, R6를 첨가하여 경피 투과도를 측정하여 주름 개선 펩티드의 피부 흡수율을 증가를 확인할 수 있었다. 24시간 최종 누적 경피 투과율을 기준으로, 주름개선 펩티드만 함유한 경우에는 Pal-GHK (4.61%) > GHK-Cu (3.86%) > GHK (2.53%) 순으로

투과도를 나타냈지만, 여전히 낮은 투과율을 나타냈다.

GHK에 세포투과 펩티드 (R4, R6)를 함께 함유한 경피 투과도는 GHK+R4는 7.61%, GHK+R6는 3.54%로 GHK를 단독 함유한 경우보다 우수한 경피 투과도를 증진을 보였다. GHK-Cu에 R4, R6를 첨가한 경우에 경피 투과도는 각각 8.68%, 4.69%이며, GHK-Cu에 비해 경피 투과도가 크게 개선되었다. Pal-GHK에 R4, R6를 첨가한 경우도 경피 투과율은 각각 9.79%, 6.11%이며, Pal-GHK에 비해 경피 투과도가 훨씬 개선되었으며 가장 많은 경피 투과율을 나타냈다.

세포투과 펩티드 R4를 기준으로 주름개선 펩티드 (GHK, GHK-Cu, Pal-GHK)에 각각 첨가한 경우를 살펴보면, GHK+R4, GHK-Cu+R4, Pal-GHK+R4의 24시간 최종 누적 경피 투과율은 7.61%, 8.68%, 9.79%를 나타냈다. 마지막으로 세포투과 펩티드 R6를 기준으로 주름개선 펩티드에 각각 첨가한 경우에는 GHK+R6, GHK-Cu+R6, Pal-GHK+R6의 24시간에서의 최종 누적 경피 투과율은 3.54%, 4.69%, 6.11%를 나타냈다.

본 연구에서는 주름개선 펩티드인 GHK, GHK-Cu, Pal-GHK에 세포투과 펩티드인 R4, R6를 첨가하여 경피 투과도를 측정 후 주름개선 펩티드의 피부흡수 증가를 확인하였으며, 주름개선 펩티드 중에서는 구리이온과 지방산이 존재하는 GHK-Cu, Pal-GHK의 경피 흡수가 증가하였으며, 분자량이 크지 않은 주름개선 펩티드 (GHK, GHK-Cu, Pal-GHK)에는 알르기닌 수가 작은 R4가 R6보다 더 좋은 경피 흡수율을 보였다. 향후 연구에서는 주름개선 펩티드(GHK, GHK-Cu, Pal-GHK)에 알르기닌 올리고머(R4, R6)를 첨가한 임상평가를 진행할 예정이며 주름 개선 기능성 화장품에 응용하고자 한다.

감 사

본 연구는 2017년도 과기정통부의 재원으로 한국연구재단 바이오·의료기기개발사업의 지원을 받아 수행되었음(No. 2017M3A9D8048416).

References

- Jung, D. Y., "Golyeongchinhwasaneob Sijanghyeonhwang Mich Jeonmang," *Magazine IEEE*, **44**(12), 16-24(2017).
- Oh, J. S., "A Study on the Usage and Purchase Intention of Basic Cosmetics for Silver Generation Women," *J. Cult. Exchange*, **6**(3), 77-97(2017).
- Kang, K. S., Kim, I. D., Kwon, R. H., Heo, Y. Y. Oh, S. H., Kim, M. A., Jung, H. J., Kang, H. Y. and Ha, B. J., "The Evaluation of Anti-wrinkle Effects in Oriental Herb Extract," *J. Life Sci.*, **17**(8), 1147-1151(2007).
- Moh, S. H., Jung, D. H., Kim, H. S., Cho, M. J., Seo, H. H. and Kim, S. J., "Characteristics and Applications of Bioactive Peptides in Skin Care," *Kor. Soc. Biotech. Bioeng.*, **26**(6), 483-490(2011).
- Yoo, B. J. and Yeon, J. J., "Hwajangpum Wonlyoyong Peptide-ui Hyomo Balhyo Saengsan Gisul," *BT News*, **24**(2), 52-56(2017).
- Li, H., Low, Y. S. J., Chong, H. P., Zin, M. T., Lee, C. Y., Li, B., Leolukman M. and Kang L., "Microneedle-Mediated Delivery of Copper Peptide Through Skin," *Pharmaceu. Res.*, **32**(8), 2678-2689(2015).
- Maquart, F.X., Pickart, L., Laurent, M., Gillery, P., Monboisse, J. C. and Borel, J. P., "Stimulation of Collagen Synthesis in Fibro-

- blast Cultures by the Tripeptide-copper Complex Glycyl-L-Histidyl-L-Lysine-Cu₂⁺,” *FEBS Letters*, **238**(2), 343-346(1988).
8. Pickart, L., “The Human Tri-peptide GHK and Tissue Remodeling,” *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.*, **19**(8), 969-988(2008).
 9. Maquart, F.X., Bellon, G., Chaqour, B., Wegrowski, J., Patt, L. M., Trachy, R. E., Monboisse J. C., Chastang F., Birembaut P. and Gillery P., “In Vivo Stimulation of Connective Tissue Accumulation by the Tripeptide-copper Complex Glycyl-L-Histidyl-L-Lysine-Cu₂⁺ in Rat Experimental Wounds,” *J. Clinical Invest.*, **92**(5), 2368-2376(1993).
 10. Godet, D. and Marie, P. J., “Effects of the Tripeptide Glycyl-L-Histidyl-L-Lysine Copper Complex on Osteoblastic Cell Spreading, Attachment and Phenotype,” *Cell. Mol. Biol.*, **41**(8), 1081-1091(1995).
 11. Pickart, L., Freedman, J. H. and Loker W. J., “Growth-modulating Plasma Tripeptide may Function by Facilitating Copper Uptake into Cells,” *Nature*, **288**(5792), 715-717(1980).
 12. Lee, H. J., Huang, Y. W., Chiou, S. H., Aronstam, R. S., “Poly-histidine Facilitates Direct Membrane Translocation of Cell-penetrating Peptides into Cells,” *Sci. Reports*, **9**(1), 93-98 (2019).
 13. Vive, E., Brodin, P. and Lebleu, B., “A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus,” *J. Biol. Chem.*, **272**(25), 16010-16017(1997).
 14. Wang, K., Zhao, X., Yang, F., Liu, P. and Xing, J., “Percutaneous Delivery Application of Acylated Steric Acid-9-P(arginine) Cell Penetrating Peptides Used as Transdermal Penetration Enhancer,” *J. Biomed. Nanotech.*, **15**(3), 417-430(2019).
 15. Yi, D., Guoming, L., Gao, L. and Wei, L., “Interaction of Arginine Oligomer with Model Membrane,” *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **359**(4), 1024-1029(2007).
 16. Liang, W., Davalian, D. and Torchilin, V. P., “Interaction of a Novel Peptoid Enhancer-Arginine Oligomer with Bovine Submaxillary Mucin,” *Yao Xue Xue Bao*, **39**(12), 1011-1017(2004).
 17. Mazurowska, L. and Mojski, L. M., “Biological Activities of Selected Peptides: Skin Penetration Ability of Copper Complexes with Peptides,” *Int. J. Cosmet. Sci.*, **59**(1), 59-69(2008).
 18. Kim, M. H., “Skin Barrier and Protein,” *J. Skin Barrier Res.*, **11**(1), 28-34(2009).
 19. Franz, T. J., “Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data,” *J. Invest. Dermatol.*, **64**(3), 190-195(1975).
 20. Kim, E. N., Park, K. H., Kim, B. H. and Jeong, G. S., “Permeation Characteristics of Transdermal Preparations Containing Artemisia Capillaris Herba in Franz Diffusion Cell,” *Kor. J. Pharma.*, **49**(2), 165-171(2018).
 21. Kim, J. H., Yang, H. J., Won, B. R., Ahn, Y. J., Kang, M. K. and Park, S. N., “Preparation of Vitamin E Acetate Nano-emulsion and In Vitro Research Regarding Vitamin E Acetate Transdermal Delivery System Which Use Franz Diffusion Cell,” *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.*, **35**(2), 91-101(2009).
 22. Jin, L. H., Bahn, J. H., Eum, W. S., Kwon, H. Y., Jang, S.H., Han, K. H., Kang, T. C., Won, M. H., Kang, J. H., Cho, S. W., Park, J. and Chio, S. Y., “Transduction of Human Catalase Mediated by an HIV-1 TAT Protein Basic Domain and Arginine-rich Peptides into Mammalian Cells, Free Radic,” *Biol. Med.*, **31**, 1509-1519(2001).
 23. Rothbard, J. B., Garlington, S., Lin, Q., Kirschberg, T., Kreider, E., McGrane, P. L., Wender, P. A. and Khavari, P. A., “Conjugation of Arginine Oligomers to Cyclosporin A Facilitates Topical Delivery and Inhibition of Inflammation,” *Nat. Med.*, **6**(11), 1253-1257(2000).