In Vitro Assessment of Irritation Potential of an Anti-Melanogenic Agent, PF3758309, in a Reconstructed Human Epidermis Model

Ayeong Lee¹, Yu Rim Lee¹, Ji Yea Kim^{1,2}, Jin Hyuk Jung², Young Kum Park³, Yu-Jung Kim⁴, Sung-Nae Lee⁵, Sungkwan An¹, Seunghee Bae^{1*}

¹Research Institute for Molecular-Targeted Drugs, Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University, Seoul, Korea

²Korea Institute of Dermatological Sciences, Seoul, Korea

³Gragem Corporation, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do, Korea

⁴Department of Beauty Yakson Care, Yeoju Institute of Technology, Yeoju-si, Gyeonggi-do, Korea

⁵Department of Cosmetology, Kyung-In Women's University, Incheon, Korea

*Corresponding author: Seunghee Bae,
Research Institute for Molecular-Targeted
Drugs, Department of Cosmetics Engineering,
Konkuk University, 120 Neungdong-ro,
Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea
Tel.: +82 2 450 0463
Email: sbae@konkuk.ac.kr

Received July 4, 2018

Revised July 13, 2018

Accepted July 23, 2018

Published September 30, 2018

Abstract

Purpose: This study was designed to determine whether a novel anti-melanogenic agent, PF3758309, has the potential to cause acute cutaneous irritation using a human skin equivalent model (HSEM). **Methods:** Human skin equivalent was constructed through incubation of normal human derived epidermal keratinocytes (HEKs) on collagen matrix insert with proliferation media. Using constructed human skin equivalent, the irritation potential of PF3758309 were investigated whether the viability of this agent-treated HSEM is under 50% (irritant) or not (non-irritant) using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay after applying the agent to the epidermal surface of the HSEM. Also, the PF3758309-mediated anti-pigmentation effects were analyzed using Fontana-Masson staining in the HSEM. **Results:** The integrity of the constructed HSEM was confirmed using immunohistochemical staining with differentiation markers of epidermis, and observed that Keratin 5, Keratin 1 and Involucrin were stained in basal, supra-basal and granular layers, respectively. *In vitro* irritation assay showed that the mean viabilities of the PF3758309 was 83.6%, 78.8% and 77.8% at the treatment doses of 0.2, 0.5 and 1 mg, respectively; however, the mean viability of the positive control (5% sodium dodecyl sulfate)-treated HSEM was 2.8%. Also, *in vitro* corrosion assay showed that the mean viabilities of the PF3758309 was 95.3%, 95.0% and 94.2% at the treatment doses of 0.2, 0.5 and 1 mg, respectively. Furthermore, using a Fontana-Masson staining assay, the melanin levels in the PF3758309-treated HSEM was significantly decreased compared with the levels in control HSEM. **Conclusion:** The anti-melanogenic agent, PF3758309, has no skin irritation potential under the conditions used in this study.

Keywords: Human skin equivalent, PF3758309, Irritation, Skin, Anti-melanogenesis

Introduction

최근 기능성 화장품 소재 개발을 위하여 인체에 부작용이 경미한 천연 유래 생리활성 물질을 찾으려는 시도가 활발히 진행되고 있다(Kerdudo *et al.*, 2016). 하지만 화장품이나 피부용 의약품 등은 피부 접촉에 의해 피부자극을 일으킬 수 있으므로 이에 대한 안전성 평가는 필수적이다. 대부분의 화장품 또는 의약

품의 피부 안정성 평가는 사람을 대상으로 하는 임상실험을 수행하기 전에 일차적으로 동물실험을 통해 피부 자극성을 평가한다(Vinardell, 2015). 그러나 최근 동물실험에 대한 윤리적 개념이 강화되고, 특히 2009년 화장품 원료에 대한 동물실험 금지에 대한 규정이 EU 연합을 중심으로 전 세계적으로 퍼져나가고 있기 때문에 이러한 동물대체시험법의 개발은 매우 중요한 사안이다(Vinardell & Mitjans, 2017).

현재 많은 연구를 통해 새로운 동물대체시험법들이 개발되고 있다. 그 중에서 피부일차자극 시험의 대체시험법으로 가장 많은 연구가 되고 있는 부분은 사람 피부의 표피를 이루는 주요 세포인 각질형성세포(keratinocyte)를 air-liquid interphase 상태에서 분화를 유도하여 3차원적으로 실제 사람 피부 표피(epidermis)와 유사하게 생화학적, 생리학적 특성을 재구성하여 만든 인공피부모델(reconstructed human skin equivalent model)이다(Vinardell & Mitjans, 2017).

이 모델은 기존의 2차원 단층배양 세포에 비해 각질세포의 분화와 피부의 장벽기능을 잘 모사하여 정상적인 사람의 피부에서 보이는 표피(epidermis)의 각질층을 포함한 4개의 층(각질층, 과립층, 유극층, 기저층)을 관찰할 수 있으며, 피부 장벽능력은 외부 물질에 대하여 기능적으로 방어할 수 있는 능력을 가진다(Wickett & Visscher, 2006). 이러한 3차원 인체피부조직 유사모델을 이용할 경우, 기존 동물시험보다 빠른 시간 내에 많은 시험물질을 재현성있게 평가할 수 있으며 동물실험을 대체할 수 있어 많은 연구가 진행되고 있다(Kim, 2011; Vinardell & Mitjans, 2017).

따라서 본 논문은 피부 자극에 대한 안전성 검증을 위하여 3차원 인체피부조직 유사모델을 활용하여 평가하였으며, 특히 실제 피부와 더욱 유사하게 모사하기 위해 각질피부형성세포와 멜라닌형성세포를 동시에 배양하여 멜라닌형성능력을 가지는 3차원 인체피부색소화모델을 확립하여 시료의 미백효능을 평가하였다.

PF3758309은 p21-activated kinase (PAK)를 특이적으로 억제하는 물질로 처음 발견되었다(Murray *et al.*, 2011). Wnt/ β -catenin signaling은 멜라닌 합성에 중요한 효소인 tyrosinase의 발현 증가에 관여하고 있다(Bellei *et al.*, 2011; Lee, 2017). 세부적으로 Wnt/ β -catenin signaling은 microphthalmia associated transcription factor (MITF)/ β -catenin/lymphoid-enhancing factor-1 복합체 형성을 유도하며, 이 복합체는 tyrosinase 프로모터(promoter)에 결합하여 tyrosinase의 발현을 증가시킨다(Bellei *et al.*, 2011; Schepsky *et al.*, 2006). 이러한 tyrosinase 발현 조절 기전은 β -catenin의 stabilization이 중요하며(Hino *et al.*, 2005), PAK4가 β -catenin 내 S675 부분에 인산화를 유도하여 β -catenin의 stabilization을 유도하는 것으로 알려져 있다(Li *et al.*, 2012; Yun *et al.*, 2015). 뿐만 아니라, PAK4는 CREB에 영향을 주어 MITF의 발현증가에도 관여하고 있다(Yun *et al.*, 2015). 따라서, PF3758309는 CREB/MITF 및 β -catenin/MITF pathways를 억제하여 tyrosinase 발현 억제를 통한 멜라닌 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다(Yun *et al.*, 2015).

본 논문에서는 PF3758309에 의한 미백효능을 검증하기 위하여 실제 인간 피부와 유사하게 제작된 3차원 인체피부조직유사모델을 활용하여 멜라닌 합성 저해 효능을 평가함으로써 새로운 미

Figure 1. Immunostaining of epidermal differentiation makers on HSEM.

The reconstructed HSEM was fixed for 10 min at RT by placing the insert in a separate 24-well plate and filling the well and the inside of the insert with 4% paraformaldehyde/PBS. The HSEM was proceed for paraffin embedding and H&E staining. Immunohistochemical analysis was performed via staining epidermal differentiation markers including Keratin 5, Keratin 1, Keratin 10, Loricrin and Involucrin. HSEM, human skin equivalent model; PBS, phosphate-buffered saline; H&E, hematoxylin and eosin.

백 화장품으로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

Methods

1. 세포 배양 및 재료

PF3758309 (Sigma-Aldrich, USA)는 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich)를 용매로 사용하여 200 mg/mL 농도로 희석한 후, -20°C 에 보관하여 사용하였다. 인간 각질피부형성세포(Human epidermal keratinocyte, HEK)는 ATCC (USA)에서 구입하였으며, Dermal Cell Basal Medium (ATCC) 및 Keratinocyte Growth Kit Components (ATCC)을 사용하여 37°C , humidified 5% CO_2 incubator를 이용하여 배양하였다.

2. Reconstructed HSEM 및 HPEM

본 실험에 사용된 HSEM은 HEK를 Type I collagen matrix로 코팅된 polycarbonate Membrane Insert (Millipore, USA)에 분주하고 37°C , humidified 5% CO_2 incubator에서 3일 동안 배양시킨 후, 분화 유도하였다. 분화 유도가 완료된 HSEM은 4% paraformaldehyde (Bio-sesang, Seongnam, Korea)를 사용하여 조직을 고정시킨 뒤, 70% ethanol에 1 h, 80% ethanol 1 h, 90% ethanol 1 h, 100% ethanol 1 h씩 3회 처리 한 후, xylene 1 h, 3회 및 paraffin 2 h, 2회 순서대로 조직을 탈수하였다. 각각의 조직은 파라핀 포매(embedding) 과정을 수행

Figure 2. Treatment with PF3758309 decrease the level of melanin in HPEM.

The reconstructed HPEM were exposed to PF3758309 every 2 day for 14 days in the presence or absence α-MSH (100 nM). Pigmentation levels were observed upon Fontana-Masson staining and images were obtained using a microscope. Quantitative levels of the staining were analyzed using the Image-J software. The data were presented as the mean±S.D. of three independent experiments. * $p<0.05$ compared with the vehicle treated group. # $p<0.05$ compared with α-MSH treated group. HPEM, human pigmented epidermis model; α-MSH, α-melanocyte stimulating hormone; S.D., standard deviation.

한 뒤, 이후 실험에 사용하였다. 미백 효능 검증을 위한 인체 피부색소화모델(human pigmented epidermis model, HPEM)은 HEK와 인간 멜라닌형성세포(human epidermal melanocytes, HEM)를 사용하여, 상기의 방법을 통해 구축하였다.

3. H&E 염색

HSEM의 형태학적 구조를 분석하기 위하여 hematoxylin & eosin (H&E) 염색 시험을 실시하였다. 각각의 파라핀 조직을 xylene (Sigma-Aldrich)과 ethanol (Sigma-Aldrich)을 처리하여 탈파라핀화(de-paraffination) 한 후, hematoxylin (Mayer's hemalum solution; Merck, Germany)에서 1 min 동안 염색하고 흐르는 물에 5 min 동안 수세한 뒤, Eosin Y-solution (Eosin; Merck)에서 1 min 동안 염색하였다. 다시 80% ethanol, 90% ethanol, 100% ethanol, xylene의 순서로 30 s씩 수세하여 탈수과정을 거친 후, mounting solution으로 슬라이드 위에 조직을 고정하였다. 염색된 조직은 microscope (Olympus CKX 41 microscope; Olympus, Japan)을 사용하여 분석하였다.

4. 면역조직화학염색(immunohistochemistry)

본 연구에서 구축된 HSEM의 integrity를 확인하기 위해, 면역조직화학염색법을 통해 각질층 분화 마커 발현 유무와 위치를 분석하였다. 먼저 각각의 파라핀 조직을 xylene 5 min씩 3회, 100% ethanol, 95% ethanol, 90% ethanol, 80% ethanol, 70% ethanol 순서로 2 min씩 수세하여 조직을 탈파라핀화(de-paraffination) 하였다. 이후 조직은 0.01 M sodium-citrate buffer (Sigma-Aldrich)에서 90 s 동안 가열한 뒤, 상온에서 20 min 동안 식힌다. PBS를 이용하여 5 min씩 3회 세척하고

을 사용하여 분석하였다. 이후 80% ethanol, 90% ethanol, 100% ethanol, xylene의 순서로 30 s씩 수세하여 탈수과정을 거친 뒤, mounting solution (Sigma-Aldrich)으로 슬라이드 위에 조직을 고정하여 사용하였다.

5. *In vitro* irritation assay using HSEM

본 실험은 OECD 가이드라인(TG439)을 기반으로 HSEM에서 시료의 피부 자극성을 평가하였다. 분화가 유도된 HSEM의 표피 조직 표면에 시료를 농도 별로 희석하여 각각 30 μL씩 처리하고, 15 min 동안 실온에서 배양하였다. 이후 DPBS (Sigma-Aldrich)를 이용하여 조직 표면을 10-15회 세척하고, 다시 조직 내부를 air-liquid interphase 상태로 만들어 준 뒤, 추가적으로 37℃, humidified 5% CO₂ incubator에서 42 h 동안 배양하였다. HSEM을 12-well plate에 옮기고 0.5 mg/mL MTT (Sigma-Aldrich) 용액을 0.5 mL씩 처리한 뒤, 37℃, humidified 5% CO₂ incubator에서 3 h 동안 배양시킨다. 이후 DPBS를 이용하여 3-5회 세척한 뒤, isopropanol (Sigma-Aldrich)을 이용하여 조직으로부터 MTT formazan을 추출하였으며, 96-well plate에 200 μL씩 분주하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

6. *In vitro* corrosion assay using HSEM

본 실험은 OECD 가이드라인(TG431)을 기반으로 HSEM에서 시료의 피부 자극성을 평가하였다. 분화가 유도된 HSEM의 표피 조직 표면에 시료를 농도 별로 희석하여 각각 30 μL씩 처리한다. 실온에서 3 min 동안 배양시킨 후, 즉시 DPBS를 이용하여 조직 표면을 10-15회 세척한다. HSEM을 새로운 12-well plate에 옮기고 0.5 mg/mL MTT (Sigma-Aldrich) 용액을 0.5 mL씩 처리

한 뒤, 37°C, humidified 5% CO₂ incubator에서 3 h 동안 반응시킨다. DPBS를 이용하여 3–5회 세척한 후, isopropanol을 이용하여 조직으로부터 MTT formazan을 추출하고, 96–well plate에 200 µL씩 분주하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

7. Fontana–Masson staining assay

HPEM을 이용한 시료의 멜라닌 양 조절능은 Fontana–masson 실험을 통해 분석하였다. 각각의 파라핀 조직을 xylene 1 min씩 3회, 100% ethanol, 95% ethanol, 90% ethanol, 80% ethanol, 70% ethanol, 60% ethanol 순서로 30 s씩 수세하여 조직을 탈파라핀화(de-paraffination) 하였다. Ammoniacal silver solution (Sigma–Aldrich) 200 µL을 조직에 처리한 후 60°C에서 30 min 동안 반응시키고, 조직의 색이 노란색 또는 갈색으로 변하면 증류수에 5 min씩 3회 수세하였고, 0.2% gold chloride solution (Sigma–Aldrich) 200 µL을 조직에 처리하고 실온에서 1 min 동안 반응시킨 뒤, 증류수에 5 min씩 3회 수세하였다. 이후 5% sodium thiosulfate solution (Sigma–Aldrich) 200 µL을 조직에 처리하고 실온에서 5 min 동안 반응시킨 뒤, 증류수에 5 min씩 3회 수세하였으며, 마지막으로 nuclear fast red solution (Sigma–Aldrich)을 조직에 처리하여 5 min 동안 반응시켜 대비 염색을 수행하였다. 염색된 조직은 mounting solution을 슬라이드 위에 처리하여 고정시키고, microscope (Olympus CKX 41 microscope; Olympus)을 사용하여 분석하였다. 조직 내의 멜라닌 색소화 정도는 Image J 분석 기법을 통해 멜라닌 생성량을 정량적으로 분석하여 수치화하였다.

Results and Discussion

1. HSEM내 각질층 분화마커 발현 확인을 통한 integrity 확인

표피는 각질층을 포함하여 4개의 층(각질층, 과립층, 유극층, 기저층)으로 구성되어 있다(Koster, 2009). 따라서 H&E 실험을 통해 본 연구에서 구축한 HSEM이 실제로 인체 피부 표피(epidermis)와 유사한 형태학적 특징(morphology)을 나타내는지 확인하였다(Figure 1). 또한 추가적으로 HSEM의 분화능(differentiation)을 검증하기 위하여 면역조직화학염색(immunohistochemistry) 실험을 수행하여 조직의 각 분화별 표지를 확인하였다. 실험결과, 기저층(basal layer)에는 케라틴 5 (cytokeratin 5), 유극층(spinous layer)에는 케라틴 1 (cytokeratin 1)과 케라틴 10 (cytokeratin 10), 과립층(granular layer)에는 Involucrin과 Loricrin이 적절한 위치에 발현되고 있음을 확인하였다(Figure 1). 이러한 결과를 통하여 3차원적으로 배양한 인체피부조직모델이 실질적으로 사람 피부 표피(epidermis)와 유사하게 형태학적 특성과 조직학적 특성을 나타냄을 확인하였다.

2. HSEM의 *in vitro* 피부 자극성 및 부식성 평가모델 검증

피부는 가장 기본적인 인체의 면역기관으로 외부 물질에 대하여 물리적으로 방어할 수 있는 장벽기능(barrier function)을 가진다(Abdallah *et al.*, 2017). 일반적으로 피부는 외부 물질에 의해 자극을 받으면 피부의 각질층을 투과하여 각질피부형성세포와 다른 피부세포의 기반이 되는 미세 환경(microenvironment)을 손상시킬 수 있다(Wickett & Vissler, 2006). 따라서 실제 사람 피부 표피(epidermis)와 유사하게 제작하여 만든 HSEM 기반

Table 1. Viability of the HSEM determined by MTT assay after treatment with 5% SDS (*in vitro* skin irritation test)

Name of chemical	<i>In vivo</i> class	Results of <i>in vitro</i> skin irritation test using a HSEM		
		Mean of cell viability (%)	S.D. (%)	<i>In vitro</i> prediction
PBS	NI ¹⁾	100	6.51	NI
5% SDS	I ²⁾	13.7	4.13	I

Data are mean±S.D. of three independent experiments. ¹⁾NI, non-irritant; ²⁾I, irritant; HSEM, human skin equivalent model; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS, phosphate-buffered saline; SDS, sodium dodecyl sulfate; S.D., standard deviation.

Table 2. Viability of the HSEM determined by MTT assay after treatment with 8N potassium hydroxide (*in vitro* skin corrosion test)

Name of chemical	<i>In vivo</i> class	Results of <i>in vitro</i> skin irritation test using a HSEM		
		Mean of cell viability (%)	S.D. (%)	<i>In vitro</i> prediction
PBS	NC ¹⁾	100	2.57	NC
8N potassium hydroxide	C ²⁾	8.18	2.17	C

Data are mean±S.D. of three independent experiments. ¹⁾NC, non-corrosive; ²⁾C, corrosive; HSEM, human skin equivalent model; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS, phosphate-buffered saline; S.D., standard deviation.

의 실험은 피부의 자극 및 부식과정의 초기 단계를 세포 생존율로 분석할 수 있다는 장점이 있다(Ponec, 2002; Groeber *et al.*, 2011; Jannasch *et al.*, 2015). 뿐만 아니라, 유럽의 화장품 법령에 따르면, 유럽은 독성(acute toxicity)을 포함한 인체 효과(human health effects)에 대하여 동물에 실험한 모든 화장품 및 화장품 원료에 대해서는 판매가 금지된다(Vinardell & Mitjans, 2017). 즉, 화장품에 사용되는 원료의 안정성을 검증하는데 있어서 대체적인 접근방식이 필요하다는 것을 의미한다. 따라서 본 연구는 동물대체시험법 중 하나인 인간피부유사모델을 사용하여 *in vitro* skin irritation 및 corrosion tests를 실시하고자 하였다. 먼저, OECD 가이드라인을 기반으로 본 연구에서 제작한 HSEM의 *in vitro* 피부 자극성(irritation) 및 부식성(corrosion) 평가 모델 적합 유무를 평가하였다. 피부 자극성 실험에서 양성대조군(5% sodium dodecyl sulfate, SDS)을 15 min 동안 처리하고 세척한 뒤, 42 h 배양하여 세포 생존율을 분석하였다. 50% 이하의 세포생존율은 피부 자극원(irritant)으로 판단된다. 실험 결과, 5%의 SDS가 처리된 HSEM은 $13.7 \pm 4.13\%$ 의 세포생존율을 나타내어, 본 연구에서 구축한 HSEM 모델은 *in vitro* 피부 자극성 실험에 적합함을 검증하였다(Table 1). 피부 부식성 실험은 양성대조군(8N potassium hydroxide)을 사용하였으며, 해당 물질을 HSEM에 3 min 처리하고 세척한 뒤, 즉시 세포 생존율을 분석한

결과, $8.18 \pm 2.17\%$ 의 세포생존율을 나타내어, 본 연구에서 구축한 HSEM 모델은 *in vitro* 피부 부식성 실험에 적합함을 검증하였다(Table 2).

3. HSEM을 이용한 PF3758309의 *in vitro* 피부 자극성(irritation) 평가

OECD에 명시된 *in vitro* 피부 자극성 평가법 기반(TG439)으로, PF3758309를 0.2, 0.5, 1 mg 농도로 HSEM 내 각질 표면에 15 min 동안 처리하였다. 양성대조군은 5% SDS를 사용하였다. 실험 결과값의 통계학적 유의성을 판단하고자, 본 실험은 3번 독립적으로 반복하였다. PF3758309 (0.2 mg)가 처리된 HSEM의 평균적인 세포생존율은 $83.6 \pm 3.37\%$ 로 나타났으며, 이는 OECD에 명시된 *in vitro* 피부 자극성 평가법에 따라 50% 이상의 세포생존율을 나타내어 PF3758309의 피부 비자극(non-irritant) 효과를 제시한다(Table 3). 양성대조군(5% SDS)이 처리된 HSEM의 평균적인 세포생존율은 $2.8 \pm 6.12\%$ 로 나타났으며, 이는 SDS의 피부 자극성을 증명한다(Table 3). 이와 유사하게, 0.5 및 1 mg의 PF3758309가 처리된 HSEM의 세포생존율은 각각 $78.8 \pm 5.94\%$ 및 $77.8 \pm 4.76\%$ 로 나타났다(Table 3). 따라서, PF3758309는 *in vitro* 피부 자극성 평가법에 의해 비자극성(non-irritant)으로 판단될 수 있다.

Table 3. Viability of the HSEM determined by MTT assay after treatment with PF3758309, 5% SDS as a positive control and PBS as a negative control (*in vitro* skin irritation test)

Name of chemical	Results of <i>in vitro</i> skin irritation test using a HSEM		
	Mean of cell viability (%)	S.D. (%)	<i>In vitro</i> prediction
PBS	100.0	1.43	NI ¹⁾
5% SDS	2.8	6.12	I ²⁾
0.2 mg PF3758309	83.6	3.37	NI
0.5 mg PF3758309	78.8	5.94	NI
1 mg PF3758309	77.8	4.76	NI

Data are mean±S.D. of three independent experiments. ¹⁾NI, non-irritant; ²⁾I, irritant; HSEM, human skin equivalent model; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS, phosphate-buffered saline; SDS, sodium dodecyl sulfate; S.D., standard deviation.

Table 4. Viability of the HSEM determined by MTT assay after treatment with PF3758309, 8N potassium hydroxide as a positive control and PBS as a negative control (*in vitro* skin corrosion test)

Name of chemical	Results of <i>in vitro</i> skin irritation test using a HSEM		
	Mean of cell viability (%)	S.D. (%)	<i>In vitro</i> prediction
PBS	100.0	3.45	NC ¹⁾
8N potassium hydroxide	16.5	2.11	C ²⁾
0.2 mg PF3758309	95.3	7.46	NC
0.5 mg PF3758309	95.0	3.03	NC
1 mg PF3758309	94.2	2.93	NC

Data are mean±S.D. of three independent experiments. ¹⁾NC, non-corrosive; ²⁾C, corrosive; HSEM, human skin equivalent model; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS, phosphate-buffered saline; S.D., standard deviation.

4. HSEM을 이용한 PF3758309의 *in vitro* 피부 부식성(corrosion) 평가

OECD에 명시된 *in vitro* 피부 부식성 평가법(TG431) 기반으로, PF3758309를 0.2, 0.5, 1 mg 농도로 HSEM 내 각질 표면 에 3 min 동안 처리 후, 세포생존율을 측정하였다. 양성대조군은 8N potassium hydroxide를 사용하였다. 실험결과 값의 통계학적 유의성을 판단하고자, 본 실험은 3번 독립적으로 반복하였다. PF3758309 (0.2 mg)가 처리된 HSEM의 평균적인 세포생존율은 $95.3 \pm 7.46\%$ 로 나타났으며(Table 4), 이는 OECD에 명시된 *in vitro* 피부 자극성 평가법에 따라 50% 이하의 세포생존율을 나타내어 PF3758309의 피부 비부식성(non-corrosion) 효과를 제시한다. 양성대조군(8N potassium hydroxide)이 처리된 HSEM의 평균적인 세포생존율은 $16.5 \pm 2.11\%$ 로 나타났으며(Table 4), 이는 potassium hydroxide의 피부 부식성을 증명한다. 이와 유사하게, 0.5 및 1 mg의 PF3758309가 처리된 HSEM의 세포생존율은 각각 $95.0 \pm 3.03\%$ 및 $94.2 \pm 2.93\%$ 로 나타났다(Table 4). 따라서, PF3758309는 *in vitro* 피부 부식성 평가법에 의해 비부식성(non-corrosion)으로 판단될 수 있다.

5. HPEM을 이용한 PF3758309의 anti-melanogenesis 효과 검증

사람의 피부색은 멜라닌형성세포에 의하여 결정된다. 멜라닌형성세포는 표피의 기저층에 존재하며 멜라닌 색소를 합성하여 주변의 각질피부형성세포로 전달함으로써 자외선에 의한 피부손상을 막고, 활성산소를 제거하여 피부를 보호하는 중요한 역할을 한다(Lin & Fisher, 2007). 피부가 자외선에 의한 외부 자극에 노출될 경우 표피층의 각질형성세포에서 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)의 생성과 분비가 촉진되며, 주변으로 분비된 α -MSH는 멜라닌형성세포의 표면에 위치한 melanocortin 1 receptor (MC1R) 수용체에 결합하여 세포 내 cAMP의 양을 증가시킴으로써 protein kinase A (PKA)를 활성화시킨다(Lin & Fisher, 2007). 뿐만 아니라, PAK4는 CREB의 인산화 과정을 멜라닌 합성 과정을 조절하는 대표적인 전사조절인자(transcription factor)인 MITF의 발현을 증가시켜 멜라닌의 합성이 증가된다고 잘 알려져 있다(Yun *et al.*, 2015). PF3758309는 PAK4 저해를 통해 CREB 및 Wnt/ β -catenin signaling pathway의 억제를 바탕으로 MITF의 발현을 저해하여 멜라닌 합성을 억제하는 것으로 알려져 있다(Yun *et al.*, 2015). 따라서 본 실험에서는 HPEM을 사용하여 PF3758309의 멜라닌 합성 저해 효능을 검증하고자 하였다. 이를 위해, 각질피부형성세포와 멜라닌형성세포를 동시에 배양하여 멜라닌형성능력을 가지는 HPEM을 제작하였다. HPEM에 100 nM α -MSH를 처리한 후, Fontana-Masson으로 조직 내 멜라닌을 염색한 결과, PBS를 처리한 음성대조군 대비 78.65

$\pm 5.41\%$ 멜라닌 양이 증가함을 확인하였다(Figure 2). 하지만, 100 nM α -MSH와 500 nM PF3758309가 처리된 HPEM에서는 음성대조군 대비 $34.64 \pm 3.28\%$ 만 증가해, α -MSH에 의한 멜라닌 합성이 저해됨을 확인하였다(Figure 2). 따라서, PF3758309의 멜라닌 합성 저해능은 HPEM에서도 확인되었다.

Conclusion

본 논문에서는 화장품 원료의 안전성 시험에 있어, 동물대체시험법 중 하나인 3차원 인간피부유사모델인 HSEM을 구축하고, OECD 가이드라인에 맞춰 본 연구에서 구축한 HSEM의 평가 검증을 시도하였다. 인간 표피와 유사하게 HSEM이 구축됨을 확인하였으며, 화장품 원료의 피부 부식성 및 자극성 검사 기준에도 부합함을 확인하였다. 기존 미백효능이 있는 것으로 알려진 PF3758309 물질의 피부 자극성 및 부식성을 HSEM모형을 이용하여 평가한 결과, 매우 낮은 자극성 및 부식성을 나타내었다. 뿐만 아니라, 멜라닌형성세포를 이용하여 HPEM 모델을 구축하였으며, 해당 모델을 이용하여 PF3758309 물질의 멜라닌 합성 저해 효능을 검증하였다. 이를 통해, PF3758309는 낮은 피부 자극성을 나타내는 물질이며, 차후 새로운 미백 기능성화장성분으로서 가능성을 제시해주고 있다.

Acknowledgements

본 연구는 중소기업벤처부의 창업성장기술개발사업[S201710S00069]의 일환으로 수행하였음.

References

- Abdallah F, Mijouin L, Pichon C. Skin immune landscape: inside and outside the organism. *Mediators of Inflammation*, 2017: ID 5095293, 2017.
- Bellei B, Pitisci A, Catricalà C, Larue L, Picardo M. Wnt/ β -catenin signaling is stimulated by α -melanocyte-stimulating hormone in melanoma and melanocyte cells: implication in cell differentiation. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 24: 309-325, 2011.
- Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K. Skin tissue engineering: *in vivo* and *in vitro* applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63: 352-366, 2011.
- Hino S, Tanji C, Nakayama KI, Kikuchi A. Phosphorylation

- of β -catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes β -catenin through inhibition of its ubiquitination. *Molecular and Cellular Biology*, 25: 9063-9072, 2005.
- Jannasch M, Groeber F, Brattig NW, Unger C, Walles H, Hansmann J. Development and application of three-dimensional skin equivalents for the investigation of percutaneous worm invasion. *Experimental Parasitology*, 150: 22-30, 2015.
- Kerdudo A, Burger P, Merck F, Dingas A, Rolland Y, Michel T, Fernandez X. Development of a natural ingredient-natural preservative: a case study. *Comptes Rendus Chimie*, 19: 1077-1089, 2016.
- Kim BH. The introduction of alternative method of reconstructed human skin equivalents for the assessment of skin irritation. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 9: 139-147, 2011.
- Koster MI. Making an epidermis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170: 7-10, 2009.
- Lee JH. Wnt signaling in hair follicle development. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 15: 242-246, 2017.
- Li Y, Shao Y, Tong Y, Shen T, Zhang J, Li Y, Gu H, Li F. Nucleocytoplasmic shuttling of PAK4 modulates β -catenin intracellular translocation and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823: 465-475, 2012.
- Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, 445: 843-850, 2007.
- Murray BW, Guo C, Piraino J, Westwick JK, Zhang C, Lamerdin J, Dagostino E, Knighton D, Loi CM, Zager M, et al. Small-molecule p21-activated kinase inhibitor PF-3758309 is a potent inhibitor of oncogenic signaling and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 9446-9451, 2011.
- Ponec M. Skin constructs for replacement of skin tissues for *in vitro* testing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54: S19-S30, 2002.
- Schepsky A, Bruser K, Gunnarsson GJ, Goodall J, Hallsson JH, Goding CR, Steingrimsdottir E, Hecht A. The microphthalmia-associated transcription factor Mitf interacts with β -catenin to determine target gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 26: 8914-8927, 2006.
- Vinardell MP. The use of non-animal alternatives in the safety evaluations of cosmetics ingredients by the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71: 198-204, 2015.
- Vinardell MP, Mitjans M. Alternative methods to animal testing for the safety evaluation of cosmetic ingredients: an overview. *Cosmetics*, 4: 30, 2017.
- Wickett RR, Visscher MO. Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control*, 34: S98-S110, 2006.
- Yun CY, You ST, Kim JH, Chung JH, Han SB, Shin EY, Kim EG. p21-activated kinase 4 critically regulates melanogenesis via activation of the CREB/MITF and β -catenin/MITF pathways. *The Journal of Investigative Dermatology*, 135: 1385-1394, 2015.

국문초록

인체피부모델을 이용한 미백 효능물질 PF3758309의 *in vitro* 피부 자극성 평가

이아영^{1,2}, 이유림¹, 김지예^{1,2}, 정진혁², 박영금³, 김유정⁴, 이성내⁵, 안성관¹, 배승희^{1*}

¹건국대학교 화장품공학과, 질병분자표적신약연구소, 서울, 한국

²한국피부과학연구원, 서울, 한국

³(주)그라쎄, 충청북도 청주시, 한국

⁴여주대학교, 뷰티약손미용과, 경기도 여주시, 한국

⁵경인여자대학교 피부미용과, 인천, 한국

목적: 본 연구는 인간피부유사모델(human skin equivalent model, HSEM)을 사용하여 멜라닌 합성저해제로 알려진 PF3758309의 피부 자극성을 동물대체시험법의 일환으로 평가하고자 하였다. **방법:** 인체피부유사체는 콜라겐으로 코팅된 matrix insert 위에 인간에서 분리한 각질세포(human epidermal keratinocyte, HEK)를 성장 배지와 함께 배양시켜 제작하였다. 제작된 인간피부유사모델을 사용하여 PF3758309의 피부 자극성(irritation)에 대해서 평가하고자, 해당 물질을 HSEM의 각질 표면 위에 처리한 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 통하여 세포생존율을 측정하였다. 세포생존율이 50% 이하일 경우 자극성이 존재하며, 50% 이상일 경우 비자극성으로 판단할 수 있다. 또한, HSEM을 이용하여 PF3758309의 피부 부식성(corrosion) 및 멜라닌 합성 저해능을 검증하였다. **결과:** 제작된 HSEM의 integrity는 epidermal differentiation markers인 Keratin 5, Keratin 1, Involucrin의 발현을 면역조직화학염색법으로 검증하였다. HSEM에 PF3758309를 15 min 동안 처리 후, *in vitro* irritation assay를 진행한 결과, PF3758309의 처리 농도가 0.2, 0.5, 1.0 mg 일 때, 세포생존율은 각각 83.6%, 78.8%, 77.8%로 나타났으며, 양성대조군인 5% sodium dodecyl sulfate을 처리시 세포생존율 2.8%를 나타내었다. 또한, *in vitro* corrosion assay를 진행한 결과, PF3758309의 처리 농도가 0.2, 0.5, 1.0 mg 일 때, 세포생존율은 각각 95.3%, 95.0%, 94.2%로 나타났다. 뿐만 아니라, Fontana-Masson 염색법을 활용하여 PF3758309가 처리된 HSEM의 멜라닌 수준은 대조군 대비 현저하게 감소됨을 보였다. **결론:** 멜라닌 합성 저해제로 알려진 PF3758309는 피부자극성이 없음을 본 실험을 통해 나타내었다.

핵심어: 인간피부유사모델, PF3758309, 자극, 피부, 멜라닌 합성 저해

본 연구는 중소기업벤처부의 창업성장기술개발사업[S201710S00069]의 일환으로 수행하였음.

참고문헌

- 이재호. 모낭 발달에 있어서의 Wnt 신호전달의 역할. *아시안뷰티화장품학술지*, 15: 242-246, 2017.
김배환. 인공피부를 이용한 피부자극 대체시험법 소개. *아시안뷰티화장품학술지*, 9: 139-147, 2011.

中文摘要

利用人表皮模型体外评估抗黑色素剂PF3758309的皮肤刺激可能性

李雅榮^{1,2}, 李柳林¹, 金智勲^{1,2}, 鄭鎮赫², 朴映錦³, 金柔廷⁴, 李星乃⁵, 安成官¹, 裴承熙^{1*}

¹建国大学化妆品工学科疾病分子靶标新药研究所, 首尔, 韩国

²韩国皮肤科学研究院, 首尔, 韩国

³Gragem, 忠清北道清州市, 韩国

⁴骊州大学美容药手美容科, 京畿道骊州市, 韩国

⁵敬仁女子大学皮肤美容科, 仁川, 韩国

目的: PF375830是一种被称为黑色素合成抑制剂。本研究利用人体皮肤等效模型 (human skin equivalent model, HSEM) 评估PF3758309的皮肤刺激作为替代动物试验方法。**方法:** 通过将正常人源性表皮角质形成细胞 (human epidermal keratinocyte, HEK) 与增殖培养基一起孵育在胶原基质插入物上来构建人体皮肤等效物。使用构建的人体皮肤等效物, 研究PF3758309的刺激可能性, 将该试剂施用于表皮表面后, 通过3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)试验测定细胞存活率。若细胞存活率低于50%, 则有刺激性; 若细胞存活率高于50%, 则可判断为无刺激性。此外, HSEM用于验证皮肤腐蚀和抑制PF3758309的黑色素合成。**结果:** 利用免疫组织化学染色法, 通过表皮分化标志物角蛋白5, 角蛋白1和Involucrin的表达验证了制作的HSEM的完整性。在HSEM中, 用PF3758309处理15 min之后, 测定体外刺激试验结果显示: 当PF3758309分别以0.2, 0.5和1.0 mg浓度处理时, 细胞存活率分别为83.6%, 78.8%和77.8%, 而阳性对照组 (5%十二烷基硫酸钠) 的细胞存活率为2.8%。体外腐蚀实验表明, 当PF3758309的处理浓度分别为0.2, 0.5和1.0 mg时, 细胞存活率分别为95.3%, 95.0%和94.2%。此外, 与对照相比, 使用Fontana-Masson染色方法观察到用PF3758309处理的HSEM的黑色素水平显着降低。**结论:** 通过以上研究, 抗黑色素生成剂PF3758309不具有皮肤刺激性。

关键词: 人体皮肤等效模型, PF3758309, 刺激, 皮肤, 抗黑色素生成剂