

# Skin Improvement of the Composition Containing Nano-exosome Derived from *Aloe vera* Bark Callus as New Type of Transdermal Delivery System

Dong-Myong Kim<sup>1\*</sup>, Won-Jin Kim<sup>2</sup>, Hyung-Kon Lee<sup>1</sup>, Yong-Seong Kwon<sup>1</sup>, Yeon-Mea Choi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Research Institute, KJMBIO Ltd., Seoul, Korea

<sup>2</sup>Department of Biological Science, KAIST, Daejeon, Korea

<sup>3</sup>KimJeongMoon Aloe Ltd., Seoul, Korea

\*Corresponding author: Dong-Myong Kim, Biotechnology Research Institute, KJMBIO Ltd., KimJeongMoon Aloe Bd. 5F, 15 Saimdang-ro, Seocho-gu, Seoul 06649, Korea  
Tel.: +82 2 405 6167  
Fax: +82 2 405 6154  
Email: davidkim@aloe.co.kr or hapvirus@naver.com

Dong-Myong Kim and Won-Jin Kim contributed equally to this work.

Received January 09, 2023

Revised January 31, 2023

Accepted March 02, 2023

Published March 30, 2023



## Abstract

**Purpose:** The purpose of this study was to extract nano-exosomes from *Aloe vera* bark callus and validate their effects on collagen synthesis and skin corneous improvement. **Methods:** Human dermal fibroblast (HDF) was used to validate collagen synthesis, while HaCaT cells, a human keratin cell line, were used to verify absorption capability. The Folin-Denis technique was used to determine the polyphenol content. In addition, lotion formulations and skin application experiments were also carried out. **Results:** Nano-exosomes with size ranging 50–150 nm were successfully isolated from *Aloe vera* bark callus (alosomes). Alosomes produced 22.11% more collagen in HDF than *Aloe vera* bark extract at 1.0% concentration. In the cytotoxicity test, 80% of cells were survived at concentrations of 1% or less. After one hour, a considerable quantity was transported into the cytoplasm of HaCaT cells. The polyphenol concentration was four times that of *Aloe vera* bark extract. Skin tests using alosome-containing lotion demonstrated that skin surface, hydration, and elasticity were improved after 4 weeks. Moisture contents of the stratum corneum and dermis layer were improved, whereas moisture content of corneous was reduced after 4 weeks. **Conclusion:** The skin-improving effect of nano-exosomes derived from *Aloe vera* bark callus is shown in this study, indicating its potential as a functional cosmetic raw material.

**Keywords:** Nano-exosome, *Aloe vera*, Callus, Transdermal delivery system, Cosmeceutical

## Introduction

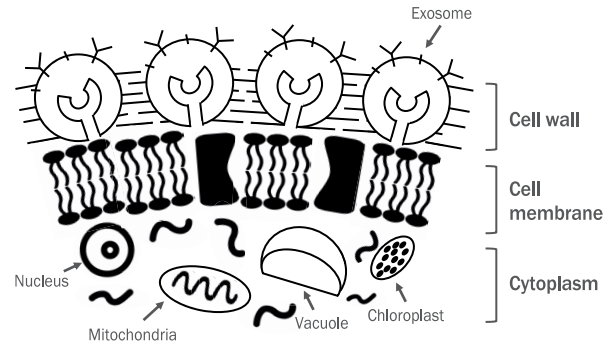
알로에(*Aloe genus*)는 백합과(*Liliaceae*)속에 속하는 식물로서 다년생 상록 다육질 초본으로 분류되며, 전 세계적으로 약 500 여종이 존재하는데(Cho *et al.*, 2014), 미국의 플로리다와 텍사스, 뉴멕시코를 중심으로 대량 재배되는 알로에 베라(*Aloe vera*), 일본 구주지방에서 자생하는 아보레 센스(*Aloe aboresences*), 미국 플로리다와 하와이에서 자생하는 사포나리아(*Aloe saponaria*) 등이 있다(Vogler & Ernst, 1999; Rhim *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2003). 한국에서는 1976년부터 김정문알로에가 처음으로 알로에 재배법을 개발하여 알

로에 베라와 아보레 센스, 사포나리아 세 종류가 제주도 등지에 보급되어 재배되고 있다. 알로에는 지방산, 유기산, 플라보노이드, 단백질, 폴리페놀류 등 200여 가지의 화합물을 함유하고 있다고 알려져 있으며, 이중에 당단백, 다당체 등의 저분자 물질인 안트라퀴논(anthraquinone)류, 안트론(anthrone)류, 크로몬(chromone)류, 피론(pyron)류, 아미노산, 비타민과 미네랄 등의 성분들이 포함되어 있다고 알려져 있다. 또한, 알로에 추출물은 강한 항산화 작용과 항균항염작용, 피부 세포재생, 상처치유, 자외선으로부터의 피부 보호, 피부 보습효과 등의 효과가 있다고 보고되었다(Rodrigues *et al.*, 2018; Sánchez *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2019). *Aloe vera*의 유효

한 성분들은 알로인(aloin)과 알로에 에모딘(aloe-emodin)으로 알려져 있으며 이러한 폴리페놀들은 항염작용에 효과적으로 알려져 있어 (Park *et al.*, 2009) 건강식품과 화장품에도 사용영역이 계속 확대되고 있다. 그 밖에 알로에 젤 추출물은 섬유모 세포의 성장을 촉진시키고 재생조직의 탄력성을 증가시키며 콜라겐 분해 및 재생을 촉진시킨다(Ro *et al.*, 2000). 최근 많은 연구를 통해 알로에의 효능이 입증되었으나, 대부분 알로에 젤 추출물에 관한 연구가 대부분이어서 알로에 껍질 추출물에 대한 생리활성 규명은 거의 전무한 상태이다.

최근에는 식물에서 유래된 엑소좀유사나노입자(exosome-like nanoparticles, ELNs) 혹은 세포외소포체(extracellular vesicles, EVs)의 한 종류인 엑소좀이 연구되고 있다(Schorey & Bhatnagar, 2008; Hessvik & Llorente, 2018). 엑소좀은 다양한 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭이며 크기는 약 30–150 nm로 주변 세포와 물질 교환을 이루기 위해 단백질, 핵산, 지질 등의 생리활성 물질을 포함한다(Colombo *et al.*, 2014; Shao *et al.*, 2018; Wortzel *et al.*, 2019). 식물에서 유래된 엑소좀의 경우 환경적 스트레스에 의한 반응으로 DNA, mRNA, miRNA, 단백질과 지질이 포함된다(Colombo *et al.*, 2014). 많은 연구들이 식물의 엑소좀이 가지고 있는 생체적합성과 약물전달의 가능성에 주목하여 치료제로서의 기능을 확인하였다(Dad *et al.*, 2021). 실례로 딸기에서 분리된 엑소좀의 경우 인간세포의 항산화효과가 있는 것으로 밝혀졌다(Perut *et al.*, 2021). 또한 포도나 생강, 당근에서 유래된 엑소좀이 항염작용에 효과가 있는 것으로 보고되었다(Mu *et al.*, 2014). 인삼과 녹차에서 추출된 엑소좀의 경우 노화, 재생, 피부장벽, 보습에 영향을 미치는 것으로 알려진 유전자수의 증가를 보여주어 이들의 엑소좀이 건강한 피부를 유지하는 것에 효과를 가짐을 확인하였다(Cho *et al.*, 2022). 포유류 유래 엑소좀과 달리 독성이 거의 없으며 동물세포로의 흡수를 이룰 수 있다(Wang *et al.*, 2013). 특히 온도와 pH와 같은 외부환경변화로부터 내부물질을 보호하여 표적세포로 전달할 수 있는 장점이 있다(Yuan *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2022b). 이러한 엑소좀의 낮은 면역원성, 낮은 세포독성, 천연 항염작용 및 높은 생체 적합성 때문에 최근에는 약물전달체 및 피부전달체(transdermal delivery system, TDS)로 활용하고자 하는 시도가 이루어지고 있다(Bunggulawa *et al.*, 2018; Shkryl *et al.*, 2022). 그러나 알로에의 경우 Figure 1과 같은 식물체의 세포 구조가 방어도구인 세포벽으로 둘러싸여 있어서 분리가 용이하지 않다. 일반적인 식물에서의 엑소좀 추출 과정은 분쇄와 초원심분리를 반복한후 여과하는 방식이 있지만 이 과정은 소포의 구조를 파괴할 수 있고 다른 무거운 분쇄물로의 응집이 이루어지는 문제점이 존재한다(Kim *et al.*, 2022a). 본 연구에서는 고가의 장비를 사용하는 것에 비해 낮은 수율을 보이는 기존의 과정을 개선한 캘러스로부터 엑소좀을 분리하는 방식을 시도하였다.

캘러스는 식물의 상처나 병원체 감염 같은 스트레스에 반응하여 생성되는 미색의 조직으로 단일분화 세포로부터 생성되어 전체 식물 세포를 재생시킬 수 있다(Ikeuchi *et al.*, 2013). 이들은 식물생장조



**Figure 1. Structure of Plant cell.**

*Aloe vera* cell wall has 4 layers. Exosome, cell wall, cell membrane and cytoplasm. The cell wall role as structural framework make hard to extract exosome.

절제(plant growth hormone)로 인공적으로 생성될 수 있고 사이클린 또는 cyclin dependent kinases (CDK)로 세포주기를 활성화하여 식물세포를 증식한다(Ikeuchi *et al.*, 2013). 알로에의 껍질 조직절편에서 유래한 캘러스는 알로에 껍질보다 세포벽이 잘 발달되어 있지 않은 부드러운 세포 및 유조직의 덩어리로 되어 있어서 세포벽 제거가 용이하므로 세포벽이 두꺼운 식물체 보다 훨씬 우수한 수율을 기대할 수 있다. 이는 식물로부터 유래된 엑소좀의 피부전달체로서 활용가능성을 높여준다. 그러나 현재 알로에의 껍질 조직절편에서 유래한 캘러스에 대한 약리효과에 대한 연구와 그로부터 분리한 엑소좀에 관한 연구는 사실상 미비한 상황이다.

본 연구에서는 알로에 베라 껍질의 조직절편으로부터 캘러스를 유도하고 이로부터 추출된 나노사이즈의 엑소좀(Aloe Nano Exosome, 이하 "Alosome (알로솜)")의 콜라겐 생성 효과와 수분량 증가와 각질 감소와 같은 피부개선효과를 확인하여 기능적 피부전달체로서의 가능성을 확인하고자 하였다.

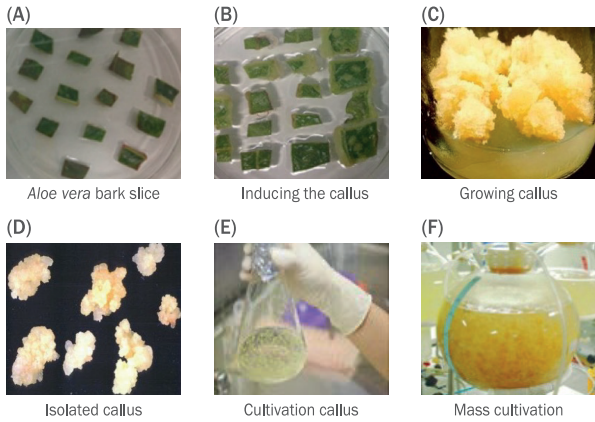
## Methods

### 1. 재료

본 연구에서 사용한 알로에 베라(*Aloe vera*)는 3–5년 생육한 생잎으로 (주)김정문알로에 제주 농공장으로부터 채취하였고 자체 KGMP 시설에서 정제수로 버블세척과 브러쉬 롤러로 3회 세척 후 커터기에 투입하여 일정 크기로 자른 뒤 사용하였다(Kim *et al.*, 2021).

### 2. *Aloe vera* 껍질에서 캘러스 유도

알로에 베라(*Aloe vera*)의 젤 성분을 분리하고 폐기 처리한 껍질을 수거하여 최대한 작은 크기로 절취하여(Figure 2A) 70% 에탄올에 30–0 s간 침지한 후 2% (w/v) NaOCl에서 조직절편의 표면을 15–20



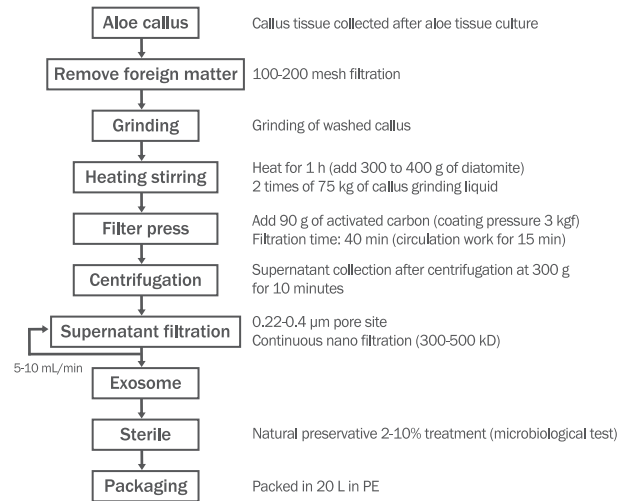
**Figure 2. Experiment procedure for inducing callus from *Aloe vera* bark.**

(A) *Aloe vera* bark slice that as small as it can be; (B) *Aloe vera* bark slice that placed on the MS solid media to induce the callus; (C) Growing callus from *Aloe vera* bark; (D) Isolated callus from sliced *Aloe vera* bark; (E) Cultivation callus on MS liquid media. (F) Mass cultivation of the callus.

min간 살균하고 멸균수로 3회 세척하였다. 무균 처리 후 Murashige and Skoog 기초배지(Murashige & Skoog 1962; Duchefa 사, 네덜란드)에 Sucrose 40.0 g/L, Hyponex 3.0 g/L, Pepton 4.0 g/L, Banana powder 35.0 g/L, Charcoal 2.0 g/L, Agar 5-10.0 g/L, 1-naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1-1 mg/L 및 benzyl adenine (BA) 0.01-0.1 mg/L를 함유한 pH 5.8 MS 고체배지에 치상하였다 (Figure 2B). 약 20-25주가 경과된 후, 배지에 치상된 절취된 알로에 껍질절편으로부터 캘러스를 유도하였다(Figure 2C). 80-90% 정도 증식한 캘러스 조직들은 크린벤치 내에서 떼어낸 후 상기의 MS 기초배지에서 agar 성분을 제거한 액체배지에 옮기고 총 3주간 배양함으로써 알로에 캘러스를 대량으로 생산하였다(Figure 2D, 2E, 2F) (Kim *et al.*, 2021).

### 3. *Aloe vera* 껍질 callus로부터 Nano-exosome 추출 및 대량 생산 공정

엑소솜을 얻기 위해 Figure 3의 제조공정에 따라 진행하였다. 대량으로 생산된 *Aloe vera* 껍질 캘러스 조직으로부터 나노엑소솜(이후 알로솜)을 추출하기 위해 캘러스 배양액을 100-200 메쉬(mesh) 이하로 여과하여 회수한 후 회수한 캘러스 조직을 습식분쇄기(NP-500TWIN; Thinky, Japan)로 30-60 min 분쇄 후 가열교반기(MS300; MISUNG S&I, Korea)에서 점성 실화를 위해 30-60 min 가열하고 150 Kg의 분쇄물을 수득하였다. 이후 분쇄물에 규조토를 300 g을 첨가하여 1 h 가열 교반 후 규조토 400 g이 코팅된 필터프레스(1000MM; 한국필터, Korea)를 통과시켜 30 min 1차 여과하였다. 여과된 여과액을 수거하여 300 g에서 10 min간 원심분리 후 잔



**Figure 3. Manufacturing pure *Aloe vera* bark callus nano-exosome.** The process of collecting *Aloe vera* bark callus and purification of nano-exosome.

여물을 제거하고 0.4  $\mu\text{m}$  여과막으로 2차 여과하여 잔여물을 제거하였다. 이후, 0.22  $\mu\text{m}$  여과막으로 3차 여과 후 세포 잔여물을 제거하였다. 최종적으로는 회수한 용액을 5-10 mL/min의 유속을 가하여 300-500 Da 분획분자량(molecular weight cut off)을 갖는 초박막 분리여과기(PAN UF; Sinotex Inc., Korea)로 콘티뉴어스 나노필터(continuous Nano filtration) 과정을 통해 단백질과 고분자 펩타이드를 제거하였다. 회수한 용액은 4-10% 부틸렌글라이콜(butylene glycol), 2-7% 1,2-헥산디올(1,2-hexanediol), 0.03-0.06% 에틸헥실글리세린(ethylhexylglycerin)을 첨가하여 콘티뉴어스 나노필터 과정을 연속 반복한 후 최종적으로 알로솜을 수득하였다. 추출된 알로솜은 투과전자현미경(JEM-2100Plus; JEOL Ltd., Japan)과 광산란분석기(Betttersizer S3 Plus; Betttersize Instruments Ltd., China)를 사용하여 크기 및 모양을 확인했다(Kim *et al.*, 2021).

### 4. *In vitro* experiments

*In vitro* 실험에서 주요한 시약은 phosphate buffer saline (PBS; Welgene Inc., Korea), propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich, USA), Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco-BRL, USA), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen, USA)를 사용하였다.

### 5. 콜라겐 생성능실험

서울대학교 의과대학 피부과 실험실에서 보유한 cell line인 HDF (human dermal fibroblast)를  $1.0 \times 10^4$  cells/well 농도로 96-well plate에 분주하여 24시간 배양하고 시료를 희석한 무혈청 배지를 배양배지와 교환한 후 48시간 배양하였다. 배양이 끝난 세포의 배

양 상등액 50  $\mu$ L를 96-well plate에 각각 분주하고 carbonate-bicarbonate coating buffer (pH 9.6) (Sigma-Aldrich)를 100  $\mu$ L씩 첨가 후 4°C에서 overnight 방치하여 단백질을 코팅하였다. PBS-T를 이용하여 세척하고 blocking을 위해 PBS에 녹인 4% skim milk 용액(Sigma-Aldrich)을 100  $\mu$ L씩 분주하여 37°C에서 1시간 배양한 후 다시 PBS-T로 5회 세척하고 mouse-anti collagen type I antibody (Sigma-Aldrich)를 4% skim milk 용액에 희석하여 100  $\mu$ L씩 분주하고 37°C에서 1시간 배양하였다. PBS-T로 5회 세척하고 2nd antibody (Sigma-Aldrich)로 alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich)가 conjugated된 anti-mouse IgG antibody를 4% skim milk 용액에 희석하여 100  $\mu$ L씩 분주하고 37°C에서 1시간 배양한 후 PBS-T로 5회 세척하였다. 효소반응은 diethanolamine buffer (Sigma-Aldrich)에 0.1%의 *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma-Aldrich)를 녹인 기질용액을 200  $\mu$ L씩 분주하여 상온에서 30 min간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 분광광도계(V-1100D; LABINNO, Japan)을 통해 측정하였다. 상대적 콜라겐 생성량은 대조군을 100으로 한 백분율로 나타내었으며 다음과 같이 계산하였다(Kim *et al.*, 2021).

상대적 콜라겐 생성량(%)=(시료첨가군의 흡광도/시료무첨가군의 흡광도)×100 (%)

A. 세포독성실험

알로에 겔 추출물 및 알로솜의 세포독성을 측정하기 위해 HDF의 배양 상등액이 제거된 96-well plate를 200  $\mu$ L의 PBS로 각 well을 조심스럽게 세척하고, DMEM 배지에 녹인 40  $\mu$ g/mL neutral red 용액(Sigma-Aldrich)을 각 well에 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 동안 배양하였다. 1시간 경과 후 neutral red가 첨가된 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. 각 well에 200  $\mu$ L의 1%

acetic acid (Sigma-Aldrich), 50% ethanol용액(Sigma-Aldrich)을 첨가하고 plate shaker를 이용하여 200 rpm으로 15 min간 교반하여 세포 내의 neutral red를 추출한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생존 세포의 수는 대조군을 100으로 한 백분율로 나타냈으며 다음과 같이 계산하였다(Kim *et al.*, 2021).

$$\text{세포생존율(%)=(시료첨가군의 흡광도/시료무첨가군의 흡광도)} \times 100 (\%)$$

B. 각질세포의 흡수를 실험

알로솜의 인체 피부세포 흡수를 평가를 위하여 우선 알로솜을 2.5% lecithin (Sigma-Aldrich), 5.5% sodium deoxycholate (SDC; Sigma-Aldrich), 1.0% cholesterol (Sigma-Aldrich), 1.0  $\mu$ g/mL isoelectric point (PI), 10 mL PBS 용액의 비율로 15mL conical tube에 넣어 초음파분산기로 형광물질을 봉입하였다. 인체 피부각질 세포주인 HaCaT 세포는 서울대학교 의과대학 피부과 실험실에서 보유한 cell line이며, 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich)과 항생제(100  $\mu$ g/mL streptomycin (Sigma-Aldrich)과 100 U/mL penicillin (Sigma-Aldrich))가 첨가된 DMEM으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 T75 culture flask로 배양하였고 2일에서 3일에 한 번씩 분주함과 동시에 배양액을 교체해 주었다. HaCaT 세포는 12 well plate에 5 × 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 1.0 mL DMEM에서 배양하였고 24 시간이 지난 후에 DMEM 상층액 제거 및 1.0 mL PBS로 1회 세척하였다. 대조군은 PI 1.0  $\mu$ g/mL을 포함한 PBS 1.0 mL을 처리하였고, 실험군은 PI-loaded 0.1% 알로솜을 포함한 PBS 1.0 mL을 처리하였다. 그후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 동안 배양한 후 1.0 mL PBS로 3번 수세한 후 공초점 형광현미경(Leica DM-4000; Leica Microsystems Ltd, Germany)으로 세포를 관찰하였다. DAPI는 배양 1시간이 끝나기 20 min 전에 모든 well당 두 방울 떨어뜨려서 배

Table 1. Composition of lotion containing exosome

Ingredient	Amount rate (%)
<i>Aloe bark callus exosome</i>	0.50-1.00
Citric acid	0.01-0.05
Sodium percarbonate	0.03-0.07
Allantoin	0.05-0.10
Hyaluronic acid	0.50-0.80
Alanine	0.10-0.50
Glycerin	0.10-0.50
1,3-Butylene glycol	0.20-0.60
Nonylphenol ether	0.20-0.50
Polysorbate 20	0.20-0.50
Methyl p-hydroxybenzoate	0.10-0.50
Purified water	95.00-98.00
Total	100.00



양했다(Kim *et al.*, 2021).

### 6. 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu법으로(Singleton *et al.*, 1999) 측정하였으며 알로에 껍질 추출물과 알로에즙을 농도별로 희석하여 시료 희석액 0.1 mL에 Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich) 50  $\mu$ L를 첨가 후 4 min간 실온에서 반응시킨 다음 20% sodium carbonate 무수 포화용액(Sigma-Aldrich) 1.5 mL를 첨가하여 2 min간 반응시키고 micro-plate reader (VERSAmax, Molecular Device, USA)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 chlorogenic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 산출하였다. 실험결과를 3회 반복 측정하여 함량을 나타냈다(Kim *et al.*, 2021).

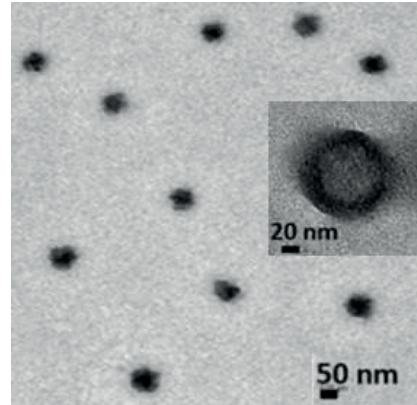
### 7. 스킨로션 조성물 제조

알로에즙을 함유한 피부 향노화, 항산화, 주름 및 탄력개선용 화장품 조성물을 아래 Table 1에서와 같이 제조하였다. 먼저, 멸균처리된 purified water에 glycerin (Biospectrum, Korea), 1,3-butylene glycol (1,3-BG; KH Neo CHEM, Japan), alanine, hyaluronic acid (GOOWORL OEM, Korea), allantoin (GOOWORL OEM, Korea), citric acid (RZBC, China), sodium percarbonate (Ewoo Bio Co., Korea)를 혼합하여 약 70°C의 온도에서 용해한 다음(수상파트), methyl p-hydroxybenzoate (Butyl paraben; Uneo Fine Chemicals Industry, Japan), Polysorbate 20 (Tween 20; CRODA, UK) 및 nonylphenyl ether (Nonoxynol-12; Jeen Internatioan, USA)를 배합하여 약 70°C의 온도에서 용해하였다(유상파트). 각각을 용해한 후 상기 수상파트를 유상파트에 첨가시켜 고압균질기(HG 15-22KW; Alphatechkorea, Korea)로 균질화하여 1차 유화한 다음에 알로에즙을 최종 첨가하였다. 그 후, 상기 혼합액에 생성된 기포를 제거한 후 실온으로 냉각시켜 스킨로션 조성물을 제조하였다(Kim *et al.*, 2021).

### 8. 인체적용시험

건강한 피부를 가진 만 18세 이상의 여성 피험자 15명을 대상으로 4주간 인체적용시험을 진행하였다(시험기관: 피엔케이피부임상연구센터㈜, 시험기간: 2021.08.17-2020.09.27, IRB No. PNK-16D12-E1R). 피험자들의 안전에 Method 7에 따른 알로에즙 함유 스킨, 로션을 1일 2회 사용하게 하고, 사용 후 2주, 4주 후 각 시점에서 피부 수분, 피부 탄력 및 피부 각질 및 피험자에 의한 설문 평가를 실시하였다. 피험자의 특징과 피부 특성은 설문에 의해 조사되었다.

피부 수분 상태는 비침습적으로 *in vivo* 상태에서 각질층의 수분 함유량을 측정하는 Corneometer CM 825 (Courage+Khazaka, Germany)와 MoistureMeter SC (Delfin Technologies Ltd., Finland)를 이용하고, 진피층의 수분 함유량을 측정하는 MoistureMeter D (Delfin Technologies Ltd., Finland)을 이용하



**Figure 4. TEM image of *Aloe vera* bark derived exosome.**

Transmission Electron Microscope image of exosome derived from *Aloe vera* bark callus. The particle are sphere and the size are about 50 nm.

여 각각 좌측 뺨 정면을 3회 측정하여 평균값을 취하였다. 피부 탄력은 Cutometer MPA 580 (Courage+Khazaka, Germany)를 이용하여 우측 뺨 정면을 측정하였다. 피부 각질량은 좌측 뺨 정면에 적용한 Black D-squame<sup>®</sup> Tape (Cuderm, USA)에 부착된 각질을 Charmview scope 700X (MORITEX, Japan)로 각질 이미지를 촬영하였다. 촬영한 이미지는 BMI image analysis software (WINaTech, USA)를 이용하여 각질의 면적(pixel number)을 분석하였다(Kim *et al.*, 2021).

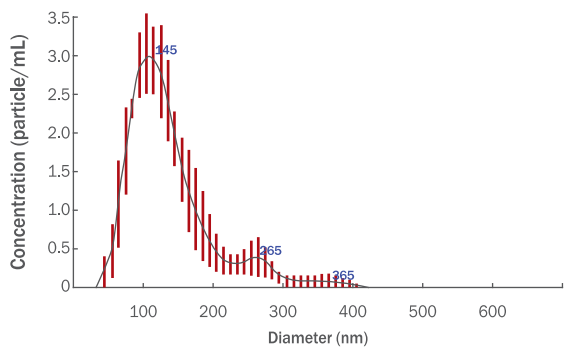
### 9. 통계처리

본 실험에서 진행된 각 실험군 간의 비교분석은 SPSS 21.0 프로그램(SPSS Inc., USA)을 이용하여 Student's *t*-test (*p* value<0.05\*, 0.01\*\*, 0.001\*\*\*)로 통계처리하였다.

## Results and Discussion

### 1. *Aloe vera* 껍질 캘러스로부터 nano exosome 추출

추출한 알로에즙을 투과전자현미경(JEM-2100Plus; JEOL Ltd., Japan)과 광산란분석기(Bettersizer S3 Plus, Bettersize Instruments Ltd, China)를 사용하여 크기 및 모양을 확인하였고, 캘러스 분쇄 후 여과액 750-800 mL로부터 추출된 알로에즙을 나노입자추적분석기(Epsilon-1; Malvern Panalytical Ltd, UK)를 통해 순도 및 수율을 확인하였다. 추출된 엑소좀은 구형의 나노입자 모양이며(Figure 4), 크기는 입도분포는 50-150 nm이었으며 평균입도는 83.17 nm로 확인되었다(Figure 5). 또한, 콘티뉴어스 나노 필터시스템을 통해 추출된 알로에즙의 농도는 3-5×10<sup>10</sup> particles/mL이며, 순도는 1.56-2.35×10<sup>7</sup> particles/ $\mu$ g이었다. 따라서 나노크기의 엑



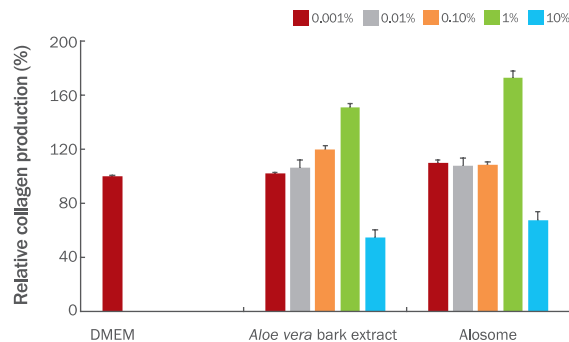
**Figure 5. Laser diffraction particle size result of *Aloe vera* bark callus derived exosome.**

The exosome size is diversity in 50-150 nm. The average size is 83.17 nm.

소음을 *Aloe vera* bark callus로부터 본 연구에서 진행한 대량공정을 통해 추출할 수 있었다(Kim *et al.*, 2021). 일반적으로 포유류의 엑소좀이 40–150 nm인 것을 고려하면(Villa *et al.*, 2019; Sinha *et al.*, 2021) 균질한 엑소좀을 추출하였음을 확인했다. *Aloe vera* 겹과 껍질에서 추출한 50–500 nm 크기의 nanoparticle의 농도가  $1 \times 10^8$  particle/mL인 것을(Jeng *et al.*, 2021) 고려하면 본 연구에서 사용한 캘러스로부터 엑소좀을 추출하는 과정은 더 높은 수득률을 가지는 것으로 사료된다. 이는 알로솜이 식물세포와는 달리 세포벽을 가지고 있지 않기 때문에 엑소좀을 추출하는 과정에서 응집이나 파괴의 가능성을 줄인 것으로 사료된다.

**2. In vitro 콜라겐 생성능**

*Aloe vera* bark callus exosome (알로솜)이 인간피부세포에 대해서 콜라겐 생성을 유도할 수 있는지에 대해 실험하기 위해서 HDF



**Figure 6. Collagen production of HDF cells for DMEM, *Aloe vera* bark extract and *Aloe vera* bark callus exosome.**

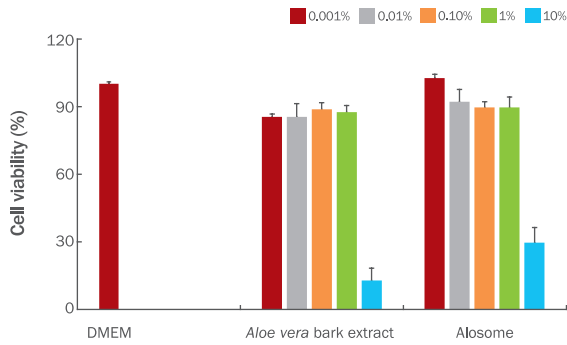
The concentration of *Aloe vera* bark extract and *Aloe vera* bark callus exosome were treated with varying concentrations (0.001%, 0.01%, 0.1%, 1%, and 10%) on human dermal fibroblast. Values are shown relative to DMEM as 100%. With *Aloe vera* bark extract as concentration increased, collagen production also increased than DMEM with out in 10% concentration. With Alosome, the collagen productions are increased than DMEM except 10% concentration. Both 10% of *Aloe vera* bark extract and *Aloe vera* bark callus exosome show decreased collagen production than DMEM. Data are means±S.D. of 3 separate experiments.

(human dermal fibroblast)에 48시간 배양하였다. 그 결과 *Aloe vera* 껍질 추출물과 알로솜의 경우 0.1–1.0% 농도 범위에서 콜라겐의 생성량이 증가하는 모습이 나타났다(Figure 6와 Table 2). *Aloe vera* 껍질 추출물에서는 1% 이하의 농도에서는 농도가 증가할수록 콜라겐 생성량이 증가하는 경향을 보인다(Figure 6), 특히 1.0% 농도에서 함께 실험한 *Aloe vera* 껍질 추출물이 대조군(DMEM배지)에 비해 51.26% 증가한데 비하여 알로솜의 경우는 73.37%만큼 콜라겐 생성량이 증가하여 알로솜이 콜라겐 생성에 유효한 효과를 보이는 것이 확인되었다. 따라서 알로솜은 *Aloe vera* 껍질 추출물에 비하여 HDF

**Table 2. Collagen production of HDF (human dermal fibroblast)**

Sample	Concentration (%)	Relative collagen production (%)
DMEM	-	100.00
	0.001	102.01±1.03
Aloe bark extract	0.01	106.53±0.82
	0.1	119.60±1.57
	1	151.26±1.81
	10	54.77±0.89
	0.001	110.06±1.30
<i>Aloe bark</i> callus exosome	0.01	108.04±0.98
	0.1	108.54±1.27
	1	173.37±2.04
	10	67.34±1.08

Data are means ±SD of 3 separate experiments.



**Figure 7. Cell viability of HDF cells for DMEM, *Aloe vera* bark extract and *Aloe vera* bark callus exosome.**

The concentration of *Aloe vera* bark extract and *Aloe vera* bark callus exosome were treated with varying concentrations (0.001%, 0.01%, 0.1%, 1%, and 10%). Values are shown relative to DMEM as 100%. Survived cells decreased by 80-90% except treatment of 10% concentration in both *Aloe vera* bark extract and *Aloe vera* bark callus exosome treatment. With 10% concentration treatment both showed dramatic drop of cell viability than DMEM and other concentration treatments. Data are means±S.D. of 3 separate experiments.

에서 콜라겐 생성량 유도에 높은 효과를 갖는 것이 확인되었다(Kim *et al.*, 2021). 기존의 *Aloe vera* 추출물은 피부세포에서 콜라겐 생성을 증가시켜 주름과 탄력에 효과가 있고(Choi, 2022; Cho *et al.*, 2009) 상처치유에 효과를 보였는데(Chithra *et al.*, 1998), 알로솜이

*Aloe vera* 껍질추출물과 같이 콜라겐 생성량의 증가를 유도할 수 있는 것은 지질막으로 둘러 쌓여있는 알로솜의 구조(Cho *et al.*, 2022)가 피부세포로의 흡수를 용이하게 하기 때문이라고 사료된다. 따라서 알로솜은 피부세포에서 효과적으로 콜라겐생성을 유도할 수 있는 것은 피부개선 기능성 시험시료이다.

반면 10%의 처리농도에서는 콜라겐의 생성량이 감소하는 것으로 나타났는데(Figure 6), 이는 시료의 세포독성에 의한 세포 수의 감소에 따른 것인지 이후 세포독성실험을 통해 확인하고자 하였다.

**3. 세포독성**

알로솜이 인체피부세포에 대해 독성이 있는지 확인하기 위해서 세포독성실험을 진행하였다. 한 시간이상 시료와 HDF를 배양한 결과, *Aloe vera* bark extract의 경우 1% 이하의 농도에서는 85-87%의 생존율을 보였다(Figure 7 및 Table 3). 알로솜의 경우 1% 이하의 농도에서 102-89%의 생존율을 보였으므로(Figure 7 및 Table 3) 1% 이하의 농도에서는 *Aloe vera* bark extract보다 알로솜의 경우가 세포독성이 낮은 것을 확인할 수 있다(Kim *et al.*, 2021). 알로솜을 처리한 세포의 비교적 높은 생존율은 알로솜의 막이 나노사이즈의 인지질 이중막인 것이 고려했을 때(Garaeiva *et al.*, 2021) 추출물보다 세포막에 대해 친화적이기 때문이라고 추론할 수 있다. 콜라겐 생성을 효과적으로 관찰할 수 있었던 1% 이하의 농도에서(Figure 6 및 Table 2) 세포생존율은 증가하지 않는 것으로 보아(Figure 7 및 Table 3) 콜라겐 생성은 세포 수 증가로 인한 것이 아니라 *Aloe vera* bark extract 과 알로솜에 의한 콜라겐생성 촉진효능인 것으로 확인되었다.

**Table 3. Cytotoxicity of *Aloe bark* callus exosome**

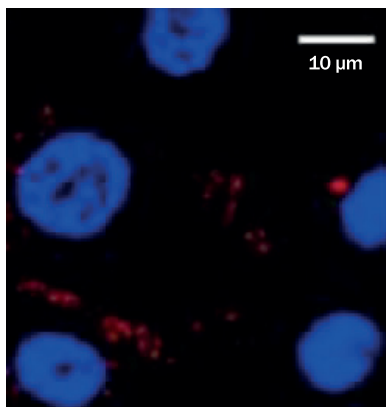
Sample	Concentration (%)	Relative cell survival (%)
DMEM	-	100.00
<i>Aloe bark</i> extract	0.001	85.58±2.74
	0.01	85.58±3.45
	0.1	88.65±3.83
	1	87.73±2.57
	10	12.88±5.91
<i>Aloe bark</i> callus exosome	0.001	102.45±3.96
	0.01	92.02±4.24
	0.1	89.57±3.93
	1	89.57±5.28
	10	29.75±5.80

Data are means±SD of 3 separate experiments.

**Table 4. Polyphenol content**

Sample	Total polyphenol content (mg/g)
<i>Aloe bark</i> extract	10.17±2.72
<i>Aloe bark</i> callus exosome	43.78±1.03

Data are means±SD of 3 separate experiments.

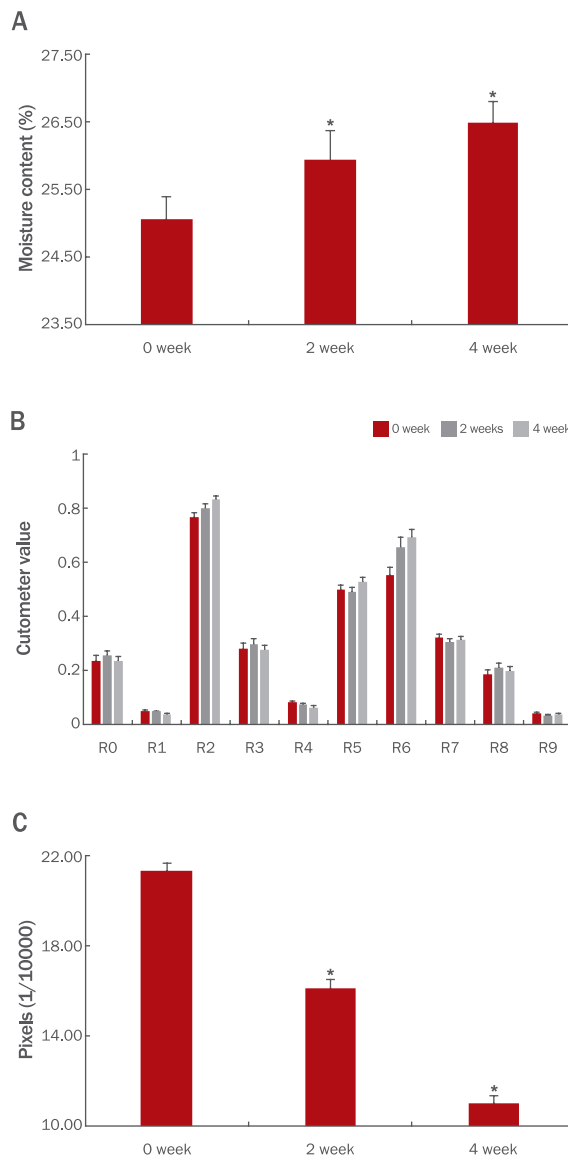


**Figure 8. Confocal fluorescence microscope image of HaCaT cells.** HaCaT cells were cultured in the DMEM for 24 h and then the cells were treated with Alosome for 1 h. Treated cell lines were stained with DAPI and PI and visualized by fluorescence microscope. Intact cell nucleus was visualized in blue round shape by DAPI. Alosome were visualized with red dots inside the cells using PI. PI, propidium iodide; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

*Aloe vera* bark extract와 알로솨은 10% 농도에서 세포생존율이 10~20%으로 감소하여 다소 높은 독성을 가진 것으로 확인되었다(Figure 7 및 Table 2). 콜라겐 생성능 분석에서 마찬가지로 10%의 농도는 50~60%의 다른 농도와 비교적 낮은 생성능을 보였는데(Figure 6 및 Table 1), 이는 세포독성으로 인한 세포 수 감소에 의한 것으로 확인되었다.

**4. In vitro 인체각질세포의 Alosome 흡수율 평가**

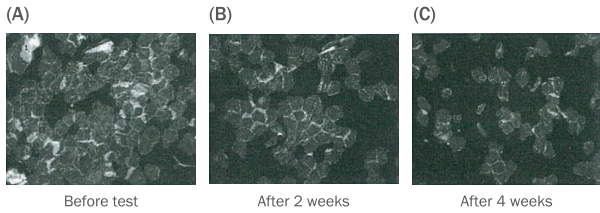
분리된 *Aloe vera* bark callus exosome을 인체 피부각질세포주인 HaCaT에 처리하여 1시간 배양하여 세포 흡수여부를 확인하고자 하였다. 형광현미경으로 확인한 결과 세포내부에서 붉은 형광의 PI와 핵(DAPI)을 푸른색으로 확인할 수 있다(Figure 8). PI가 살아있는 세포막을 투과할 수 없음을 고려하면 알로솨 처리 후 1시간 이내로 유의미한 양의 알로솨이 HaCaT 세포의 세포질 내부로 전달된 것으로 결론지을 수 있다. 이는 알로솨이 세포막에 친화적인 인지질 이중막으로 구성되어 있어 인간각질세포의 내부로 흡수될 수 있는 것으로 사료되며(Garaeva et al., 2021) 알로솨 내부에 표적물질을 초음파분산기로 봉입하여 세포내부로 전달할 수 있음을 보여준다. 이러한 봉입과정은 active loading 과정으로 초음파나 온도변화 같은 충격을 막에 주어 표적물질을 처리한 후 엑소솨의 막이 다시 회복되는 것을 기다리는 방식이다(Fuhrmann et al., 2015). 따라서 본 연구에서는 알로솨을 표적물질을 피부세포로 전달할 수 있는 피부전달체(transdermal delivery system, TDS)로써 이용할 수 있는 가능성을 확인한 의의가 있다.



**Figure 9. Measurement of skin moisture, skin elasticity, and skin corneous pixels.**

Each result is measured before test and after 2, 4 weeks applying Alosome containing lotion twice a day. Data are means±S.D. of 3 separate experiments. \**p*<0.05. (A) Average left cheek skin moisture value of three measurements: stratum corneum moisture measurement by Corneometer CM 825 and MoistureMeter SC, and dermis layer moisture measurement by MoistureMeter D. Data are means±S.D. of 3 measurements. Before test and after 2, 4 weeks, the skin moisture was increased to 25.06±0.33 AU, 25.94±0.42 AU, and 26.48±0.32 AU for each. (B) Right cheek skin elasticity measurement before test and after 2, 4 weeks by Cutometer MPA 580. Each R0-R9 parameter represent right cheek of 0-9 subjects. The results of other 5 subjects are omitted as they didn't show significant change during the experiment. The parameter R2, R6 showed clear improvement of skin elasticity at 2 and 4 weeks. The parameter R5 and R8 showed improvement of skin elasticity at 4 weeks. (C) Pixel counting of left cheek skin corneous before test and after 2, 4 weeks. The counting before test was 21.292±0.63 and it clearly decreased to 11.033±0.60 at 4 weeks which is nearly half.





**Figure 10. Changes in skin corneous.**

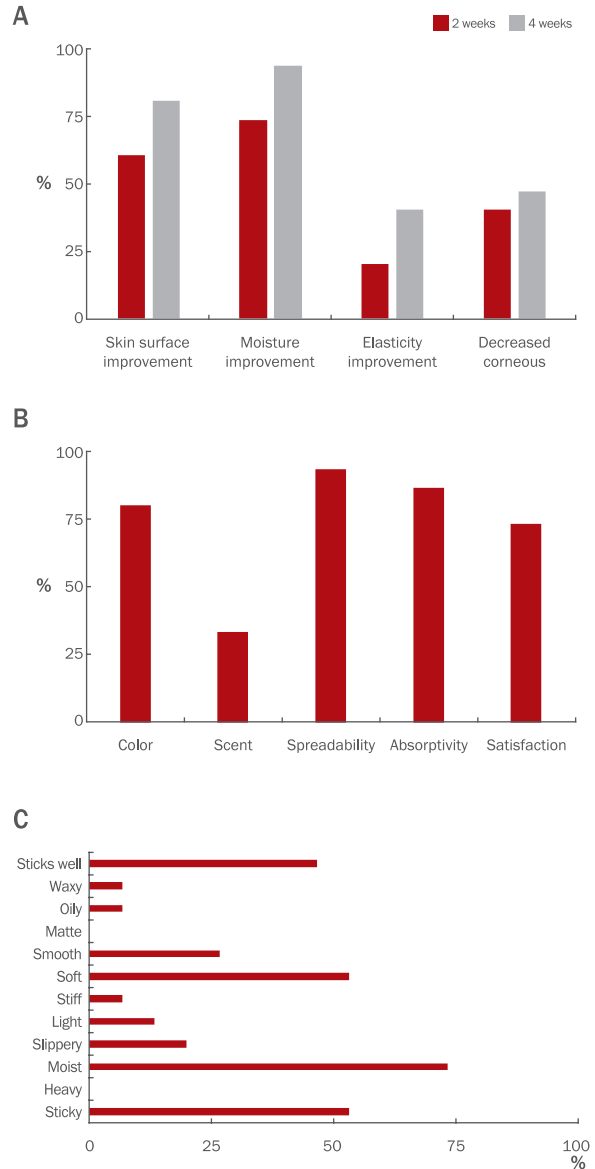
Image of left cheek skin corneous before test and after 2, 4 weeks applying lotion containing Aloe vera bark callus exosome twice a day. Pictured by Charmview scope 700X. (A) Before test. (B) After 2 weeks. (C) After 4 weeks. The images show decrease of skin corneous which is white and gray.

**5. 폴리페놀 함량**

총 폴리페놀 함량을 Folin-Ciocalteu법으로 측정된 결과 함량은 알로에 껍질 추출물이 10.17 mg/g으로 나타났고 알로좀은 43.78 mg/g로 나타나(Table 4) 알로에 껍질 추출물보다 알로좀이 4배 이상의 높은 총 폴리페놀 함량을 갖는 것으로 나타났다. 알로에 추출물의 항산화활성은 폴리페놀류나 플라보노이드 물질에서 기인하여 나타나는 것으로 볼 때(Hes *et al.*, 2019; Gebicki & Nauser, 2021) 알로좀의 높은 폴리페놀성분 또한 활성산소나 히드록시 라디칼(hydroxyl radical)에 대한 강력한 소거작용을 기대할 수 있을 것이다(Kim *et al.*, 2021). 항산화작용은 피부노화를 방지하는 요소임을 고려하면 (Masaki, 2010) 알로좀의 높은 폴리페놀 함량으로 항산화 작용에 효과적인 기능성원료로의 가능성을 재확인하였다.

**6. 인체적용시험을 통한 피부 수분, 탄력, 각질 개선효과**

알로좀이 포함된 로션제형을 조성하여(Table 1) 피부에 하루 2번 도포하며 사용 2주 후 및 4주 후, 각 시점마다 피험자는 설문에 의한 피험자의 주관적 평가 방법을 실시하였다. 제품의 피부 개선 상태를 평가하였고, 질의응답을 통해 주관적 피부 자극감과 객관적 피부 자극을 평가하였다. 제품 적용 전후의 피부 수분, 탄력 및 각질량의 변화를 분석한 결과는 Figure 9 및 Figure 10과 같다. 피부 수분 측정 결과 제품 사용 전에 비해 사용 2주 및 4주 후 시점에서 피부 수분량이 유의미하게 개선되었다. 피부 탄력 측정 결과 R2, R6 파라미터의 경우 2주와 4주 후 각 시점에서, R5, R8 파라미터의 경우 4주 후 시점에서 유의한 개선 효과가 있었다(Figure 9). 피부 각질 분석 결과, 제품 사용 전과 비교하여 제품 사용 2주 후부터 사용 4주 후까지 피부 각질량이 유의미하게 감소하였다(Figure 10). 픽셀 수를 통한 정량적 분석에 따르면 사용전의  $21,292 \times 10^4$  개에서 사용 후  $11,033 \times 10^4$  개로 절반 가까이 줄어들었다. 따라서 알로좀은 피부각질 감소의 효과를 가진다는 것을 보여주었다(Kim *et al.*, 2021). 알로좀 로션의 피부탄력증가는 피부세포의 콜라겐합성 유도로 인한 것으로 추측할 수 있다. 알로에 추출물이 피부보습에 도움을 주는 것을 고려하



**Figure 11. Survey after using Alosome containing lotion for 4 weeks.**

(A) Responses for changes in skin surface, moisture, elasticity, and corneous after 2 and 4 weeks. The responses said skin surface, moisture, elasticity and corneous were improved. (B) Responses for opinion about Aloe vera bark callus derived exosome containing lotion’s color, smell, spread ability, absorption, and satisfaction. Except smell of lotion, the others were over 70%. (C) Responses for formulation of the lotion. The responses allow multiple choices. Many responded that it was moist, but there was no response that it was heavy or matte.

면(Dal’Belo *et al.*, 2006) 알로좀의 피부수분 량 증가의 효과는 같은 매커니즘을 가질것으로 사료된다. 피부의 보습은 피부 각질층의 재생과 각질감소의 효과가 있으므로(Nolan *et al.*, 2012) 상기의 알로좀의 피부각질감소의 효과 또한 알로에 추출물과 같은 결과를 확인

할 수 있다.

피험자 설문에 의한 제품 평가 결과는 Figure 11에 나타나 있다. '피부 표면의 변화', '피부 수분 증가' 항목에 관하여 80% 이상, '피부 탄력 증가', '피부 각질 감소' 항목에 관하여 40% 이상이 사용 4주 이후 "좋아졌다"고 답하였다. 제품 사용성 종합 평가 결과, '제품의 향'을 제외한 나머지 항목에 관하여 70% 이상 긍정적인 평가를 하였고, 제품의 사용감으로는 "촉촉하다", "부드럽다", "끈적이다"라고 응답한 비율이 높았다. 피부 안전성 평가 결과, 총 15명의 피험자 중 주관적 자극 및 객관적 자극면에서 피부 부작용을 호소한 피험자는 관찰되지 않았다.

따라서 알로솨은 로션제형에서 피부 수분과 탄력, 각질에 개선을 줄 수 있는 유효한 효능이 있음을 확인했으며 신체에 적용했을 때 불편감을 확인할 수 없었으므로 로션제형으로 사용하기에 적합했다. 본 연구에 사용된 제형은 스킨로션형이지만 해당 제형에 한정하지 않고 유연 화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 바디로션, 바디오일, 바디에센스, 비누 및 샴푸로 적용되어 사용될 가능성을 시사한다.

## Conclusion

본 연구에서 사용한 알로에 껍질 캘러스 유래 나노 엑소솨의 제조 방법은 조직배양 기술을 이용하여 캘러스로의 분화 유도 효과가 우수했다. 또한 알로솨를 알로에 식물체가 아닌 알로에 껍질 유래의 캘러스로부터 용이하게 분리할 수 있는 신규한 공정으로 알로솨의 대량공정방식을 제시하였다. 개발한 공정을 통하여 알로에 껍질 캘러스로부터 성공적으로 나노 엑소솨를 분리할 수 있었으며 분리된 알로에 껍질 캘러스 나노 엑소솨(이하 알로솨)의 효능을 확인할 수 있었다. Human dermal fibroblast에 알로솨를 처리한 실험에서 1.0% 농도에서 함께 실험한 알로에 껍질 추출물의 콜라겐 생성이 51.26% 증가한데 비하여 알로솨의 경우는 73.37% 만큼 콜라겐 생성량이 증가하여 더 높은 콜라겐 생성능을 보여주었다. 세포독성 실험에서 1% 이하의 농도에서는 80% 이상의 세포 생존율로 거의 독성을 나타내지 않았다. 인체 피부각질 세포주인 HaCaT 세포를 이용한 실험에서는 해당 세포질 내부로 한 시간 이내의 유의미한 양이 전달되는 것을 확인하여 새로운 종류의 TDS로의 활용가능성을 제시하였다. 알로솨의 폴리페놀 함량을 측정된 결과 알로에 껍질 추출물보다 알로솨가 4배 이상의 높은 함량을 보여주었으므로 활성산소나 히드록시 라디칼(hydroxyl radical)에 대한 강력한 소거작용의 가능성을 확인했다. 알로솨를 첨가하여 만들어진 스킨로션제형을 사용한 설문을 통한 인체 적용검사에서 수분과 탄력에 대해 효과적이라는 답변을 얻었으며 기기를 통해 피부의 수분과 탄력이 증가했고 피부각질이 감소했음을 확인하였다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때, 알로에 캘러스에서 분리한 나노 엑소솨는 피부콜라겐 형성과 각질개선에 효과적인 화장품의 조성물로

역할을 수행할 수 있음을 알 수 있다. 특히 인체적용검사에서 확인한 바와 같이 로션제형의 기능성 원료로 사용될 수 있는 적합성을 증명하였다. 더하여, 분리된 알로솨이 기존 콜라겐 형성에 관련하는 물질들에 비해 체내 안전성이 뛰어나므로 콜라겐 형성과 관련된 인자들을 효과적으로 피부 세포 내로 전달할 가능성이 높다(Kim *et al.*, 2021). 따라서 알로솨를 유효성분으로 함유하는 피부 콜라겐 형성 촉진 및 주름개선용 조성물로서 피부 적용에 안전하고, 피부 노화 방지, 피부 재생 및 피부상태 개선에 효과적인 화장품 및 약학적 조성물의 가능성을 제시했을 뿐만 아니라 새로운 형태의 TDS, 피부전달체로 적용 가능성을 기대한다.

## Acknowledgements

본 논문은 2021, 2022년도 중소벤처기업부의 재원으로 창업성장기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임(과제번호: S2953529, S3049433).

## Author's contribution

D.M.K. designed and performed this experiment, W.J.K. wrote the manuscript, H.K.L. and Y.S.K. analyzed the data and performed this experiment, Y.M.C. designed this experiment.

## Author details

Dong-Myong Kim (Chief Technical Officer), Biotechnology Research Institute, KJM Bio Ltd, 17 Saimdang-ro, Seocho-gu, Seoul 06649, Korea; Won-Jin Kim (Researcher), KAIST(Korea Advanced Institute of Science and Technology), Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34141, Korea; Hyung-Kon Lee (Senior Researcher), Biotechnology Research Institute, KIM Bio Ltd., 17, Saimdang-ro, Seocho-gu, Seoul 06649, Korea; Yong-Seong Kwon (CEO), Biotechnology Research Institute, KIM Bio Ltd., 17, Saimdang-ro, Seocho-gu, Seoul 06649, Korea; Yeon-Mea Choi (Chairman), KimJungMoon Aloe Ltd, 15 Saimdang-ro, Seocho-gu, Seoul 06649, Korea.

## References

- Bunggulawa EJ, Wang W, Yin T, Wang N, Durkan C, Wang Y, Wang G. Recent advancements in the use of exosomes as drug delivery systems. *Journal of Nanobiotechnology*, 16: 1-13, 2018.
- Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. Influence of *Aloe vera*

- on the healing of dermal wounds in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 59: 195-201, 1998.
- Cho E, Kim S, Bang S, Kim DC, In MJ, Chae HJ. Biological activity of *Aloe vera* gel and skin extracts. *KSBB Journal*, 29: 437-442, 2014.
- Cho JH, Hong YD, Kim D, Park SJ, Kim JS, Kim HM, Yoon EJ, Cho JS. Confirmation of plant-derived exosomes as bioactive substances for skin application through comparative analysis of keratinocyte transcriptome. *Applied Biological Chemistry*, 65: 8, 2022.
- Cho S, Lee S, Lee MJ, Lee DH, Won CH, Kim SM, Chung JH. Dietary aloe vera supplementation improves facial wrinkles and elasticity and it increases the type I procollagen gene expression in human skin *in vivo*. *Annals of Dermatology*, 21: 6-11, 2009.
- Choi JJ. Anti-wrinkle and moisturizing activity of *Echinacea angustifolia* extract as a cosmetic ingredient. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 20: 531-540, 2022.
- Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30: 255-289, 2014.
- Dad HA, Gu TW, Zhu AQ, Huang LQ, Peng LH. Plant exosome-like nanovesicles: emerging therapeutics and drug delivery nanoplatfroms. *Molecular Therapy*, 29: 13-31, 2021.
- Dal'Belo SE, Gaspar LR, Maia Campos PM. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing *Aloe vera* extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. *Skin Research and Technology*, 12: 241-246, 2006.
- Fuhrmann G, Serio A, Mazo M, Nair R, Stevens MM. Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *Journal of Controlled Release*, 205: 35-44, 2015.
- Garaeva L, Kamyshinsky R, Kil Y, Varfolomeeva E, Verlov N, Komarova E, Garmay Y, Landa S, Burdakov V, Myansnikov A, et al. Delivery of functional exogenous proteins by plant-derived vesicles to human cells *in vitro*. *Scientific Reports*, 11: 1-12, 2021.
- Gebicki JM & Nauser T. Fast antioxidant reaction of polyphenols and their metabolites. *Antioxidants*, 10: 1297, 2021.
- Hęś M, Dziedzic K, Górecka D, Jędrusek-Golińska A, Gujska E. *Aloe vera* (L.) Webb.: natural sources of antioxidants-a review. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 74: 255-265, 2019.
- Hessvik NP & Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75: 193-208, 2017.
- Hu Y, Xu J, Hu Q. Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* miller) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7788-7791, 2003.
- Ikeuchi M, Sugimoto K, Iwase A. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, 25: 3159-3173, 2013.
- Kim DM, Jung JY, Lee HK, Kwon YS, Lee KH, Jang JH, Han IS. Induction and proliferation of callus in the flower stalk of calanthe discolor lindl. and its antioxidant properties. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 19: 423-433, 2021.
- Kim DM, Lee HK, Kwon YS, Choi YM. Method for producing nano exosome derived from *Aloe bark* callus and composition for skin improvement comprising nano exosomes derived from *Aloe bark* callus prepared accordingly. Korea Patent 1-2020-006998-5, 2021.
- Kim J, Li S, Zhang S, Wang J. Plant-derived exosome-like nanoparticles and their therapeutic activities. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17: 53-69, 2022a.
- Kim K, Park J, Sohn Y, Oh CE, Park JH, Yuk JM, Yeon JH. Stability of plant leaf-derived extracellular vesicles according to preservative and storage temperature. *Pharmaceutics*, 14: 457, 2022b.
- Masaki H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *Journal of Dermatological Science*, 58: 85-90, 2010.
- Mu J, Zhuang X, Wang Q, Jiang H, Deng Z, Wang B, Zhang L, Kakar S, Jun Y, Millar D, Zhang H. Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58: 1561-1573, 2014.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum*, 15: 473-497, 1962.
- Nolan K, Marmur E. Moisturizers: reality and the skin benefits. *Dermatologic Therapy*, 25: 229-233, 2012.
- Park MY, Kwon HJ, Sung MK. Evaluation of aloin and aloemodin as anti-inflammatory agents in aloe by using murine macrophages. *Bioscience, Biotechnology, and*

- Biochemistry*, 73: 828-832, 2009.
- Perut F, Roncuzzi L, Avnet S, Massa A, Zini N, Sabbadini S, Giampieri F, Zini N, Sabbadini S, Giampieri F, Mezzetti B, Baldini N. Strawberry-derived exosome-like nanoparticles prevent oxidative stress in human mesenchymal stromal cells. *Biomolecules*, 11: 87, 2021.
- Rhim JY, Moon YS, Jung SH, Lee KY, Lyu SY, Shim CS, Park WB. Antimicrobial activities of combined extract of *Aloe vera* with propolis against oral pathogens. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 31: 899-904, 2002.
- Rodrigues LL, De Oliveira ACL, Tabrez S, Shakil S, Khan MI, Asghar MN, Matias BD, Batista JMADS, Rosal MM, de Lima MMDF, et al. Mutagenic, antioxidant and wound healing properties of *Aloe vera*. *Journal of Ethnopharmacology*, 227: 191-197, 2018.
- Ro JY, Lee BC, Kim JY, Chung YJ, Chung MH, Lee SK, Jo TH, Kim KH, Park YI. Inhibitory mechanism of aloe single component (alprogen) on mediator release in guinea pig lung mast cells activated with specific antigen-antibody reactions. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 292: 114-121, 2000.
- Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*, 9: 871-881, 2008.
- Shao H, Im H, Castro CM, Breakefield X, Weissleder R, Lee H. New technologies for analysis of extracellular vesicles. *Chemical Reviews*, 118: 1917-1950, 2018.
- Shkryl Y, Tsydeneshieva Z, Degtyarenko A, Yugay Y, Balabanova L, Rusapetova T, Bulgakov V. Plant exosomal vesicles: perspective information nanocarriers in biomedicine. *Applied Sciences*, 12: 8262, 2022.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178, 1999.
- Sinha D, Roy S, Saha P, Chatterjee N, Bishayee A. Trends in research on exosomes in cancer progression and anticancer therapy. *Cancers*, 13: 326, 2021.
- Sánchez M, González-Burgos E, Iglesias I, Gómez-Serranillos MP. Pharmacological update properties of *Aloe vera* and its major active constituents. *Molecules*, 25: 1324, 2020.
- Villa F, Quarto R, Tasso R. Extracellular vesicles as natural, safe and efficient drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 11: 557, 2019.
- Vogler B, & Ernst E. *Aloe vera*: a systematic review of its clinical effectiveness. *The British Journal of General Practice: the Journal of the Royal College of General Practitioners*, 49: 823-828, 1999.
- Wang Q, Zhuang X, Mu J, Deng ZB, Jiang H, Zhang L, Xiang X, Wang B, Yan J, Miiller D, et al. Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids. *Nature Communications*, 4: 1867, 2013.
- Wortzel I, Dror S, Kenific CM, Lyden D. Exosome-mediated metastasis: communication from a distance. *Developmental Cell*, 49: 347-360, 2019.
- Yuan F, Li YM, Wang Z. Preserving extracellular vesicles for biomedical applications: consideration of storage stability before and after isolation. *Drug Delivery*, 28: 1501-1509, 2021.
- Yuan L, Duan X, Zhang R, Zhang Y, Qu M. Aloe polysaccharide protects skin cells from UVB irradiation through KEAP1/Nrf2/Are signal pathway. *Journal of Dermatological Treatment*, 31: 300-308, 2019.



## 국문초록

# Aloe vera 껍질 껀러스에서 유래된 나노 엑소솜에 대한 신규 피부전달체로서의 피부 개선효과 연구

김동명<sup>1\*</sup>, 김원진<sup>2</sup>, 이형곤<sup>1</sup>, 권용성<sup>1</sup>, 최연매<sup>3</sup>

<sup>1</sup>(주)케이제이엠바이오 바이오연구소, 서울, 한국

<sup>2</sup>KAIST 생명과학과, 대전, 한국

<sup>3</sup>(주)김정문알로에, 서울, 한국

**목적:** 본 연구에서는 알로에 베라의 껍질 껀러스에서 나노 엑소솜을 추출하고 이를 유효성분으로 함유하는 조성물로 콜라겐 형성 및 피부 개선 효과를 확인하여 피부전달체로서의 가능성을 검토하고자 하였다. **방법:** Human dermal fibroblast (HDF)에 처리하여 콜라겐 생성능을 확인하고, 인체 피부각질 세포주인 HaCaT 세포로의 흡수율을 확인하였다. 폴리페놀 함량을 측정했으며 함유된 스킨로션 제형을 만들어 인체적용검사를 실시하였다. **결과:** 알로에베라 껍질 껀러스로부터 성공적으로 엑소솜을 분리하여(이하 알로솜) TEM으로 관찰한 결과 크기 50-150 nm의 나노엑소솜을 수득할 수 있었다. HDF에 처리한 결과, 1.0% 농도에서 알로에 껍질 보다 알로솜의 경우가 콜라겐 생성량이 22.11% 증가하여 더 높은 콜라겐 생성능을 보였다. 세포독성 실험에서 1% 이하의 농도에서는 80% 이상의 세포가 생존하여 거의 독성을 나타내지 않았다. 인체피부각질 세포주인 HaCaT세포의 세포질 내부로 한 시간 이내의 유의미한 양이 전달되는 것을 형광현미경을 통해 확인하였다. 폴리페놀 함량을 Folin-Ciocalteu법으로 측정한 결과 알로에 껍질 추출물보다 4배 이상 높았다. 알로솜을 첨가하여 만들어진 스킨로션제가 인체적용검사에서 4주내에 피부 표면개선과 수분, 탄력 그리고 각질감소의 효과가 있었다는 답변을 얻었다. 기기측정을 통한 정량적 평가에서 각질층과 진피층의 수분함량이 4주 내로 향상되었음을 확인하고 피부 각질 감소에 4주내로 효과를 확인할 수 있었다. **결론:** 알로에 껍질 껀러스에서 얻은 나노 엑소솜은 콜라겐 생성에 도움을 주며 피부 수분 및 탄력 증가와 각질감소에 효과가 있으므로 피부전달체로서의 가능성을 제시한다.

**핵심어:** 나노 엑소솜, 알로에 베라, 껀러스, 피부전달체, 코스메슈티컬

본 논문은 2021, 2022년도 중소벤처기업부의 재원으로 창업성장기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임(과제번호: S2953529, S3049433)

## 참고문헌

- 김동명, 이형곤, 권용성. 알로에 껍질 껀러스 유래 나노 엑소솜의 제조방법 및 이에 따라 제조된 알로에 껍질 껀러스 유래 나노 엑소솜을 포함하는 피부개선용 조성물. 특허번호 1-2020-006998-5, 2021.
- 김동명, 정주영, 이형곤, 권용성, 이관호, 장진훈, 한인석. 새우난초 줄기에서부터 껀러스 유도 및 이의 항산화 활성. *아시아뷰티화장품학술지*, 19: 423-433, 2021.
- 임지영, 문유선, 정승희, 이규임, 유수연, 심창섭, 박원봉. 알로에 베라 및 프로폴리스 혼합 추출물의 구강내 병원균에 대한 항균활성. *한국식품영양과학회지*, 31: 899-904, 2002.
- 조은혜, 김소영, 방순일, 김동청, 인만진, 채희정. 알로에 베라 젤 및 껍질 추출물의 생리활성 평가. *KSBB Journal*, 29: 437-442, 2014.
- 최인정. *Echinacea angustifolia* 추출물의 화장품 원료로서의 향주름 및 보습효과. *아시아뷰티화장품학술지*, 20: 531-540, 2022.

## 中文摘要

### 芦荟皮愈伤组织纳米外泌体作为新型皮肤递送载体的皮肤改善作用研究

金東明<sup>1</sup>, 金垣真<sup>2</sup>, 李滢坤<sup>1</sup>, 權容聖<sup>1</sup>, 崔蓮梅<sup>3</sup>

<sup>1</sup>KJM生物有限公司生物工程研究所, 首尔, 韩国

<sup>2</sup>KAIST 生命科学科, 大田, 韩国

<sup>3</sup>Kim Jung Moon芦荟有限公司, 首尔, 韩国

**目的:** 本研究的目的是从芦荟皮愈伤组织中提取纳米外泌体, 并验证其对胶原蛋白合成和皮肤角质改善的作用。

**方法:** 人真皮成纤维细胞(HDF)用于验证胶原蛋白合成, 而HaCaT细胞(一种人角蛋白细胞系)用于验证吸收能力。Folin-Denis技术用于测定多酚含量。此外, 还进行了乳液配方和人体临床试验。**结果:** 从芦荟皮愈伤组织(alosomes)中成功地分离出大小范围为 50-150 nm的纳米外泌体。Alosomes在HDF中产生的胶原蛋白比浓度为 1.0%的芦荟树皮提取物多22.11%。在细胞毒性试验中, 80%的细胞在1%或更低的浓度下存活。通过荧光显微镜证实, 在一小时内, 大量的细胞被转移到HaCaT细胞(一种人角蛋白细胞系)的细胞质中。Alosome的多酚浓度是芦荟皮提取物的四倍。使用含alosome乳液的人体临床试验表明, 皮肤表面、水合作用和弹性在4周后得到改善。在通过仪器测量的定量评估中, 确认角质层和真皮层的水分含量在4周内得到改善, 并在4周内确认减少死皮细胞的效果。**结论:** 本研究显示了源自芦荟皮愈伤组织的纳米外泌体的皮肤改善作用, 表明其作为功能性化妆品原料的潜力。

**关键词:** 纳米外泌体, 芦荟, 愈伤组织, 皮肤输送系统, 化妆品