

베타카로틴 함유 제제의 약효 연구 - 뷰티카로틴 제제에 대하여 -

은재순* · 서승용 · 오석흥¹ · 김요한¹ · 유진주¹ · 조형권²

우석대학교 약학대학, 1: 식품과학대학, 2: (유)한풍제약

Study on the Pharmacological Effects of Preparations Containing Beta-carotene - On Beautycarotene™ Preparations -

Jae Soon Eun*, Seung-Yong Seo, Suk Heung Oh¹, Yo Han Kim¹, Jin Ju You¹, Hyoung Kwon Cho²

College of Pharmacy, 1: College of Food Science, Woosuk University, 2: Hanpoong Pharmaceutical Company

The purpose of this research was to investigate the pharmacological effects of preparations containing beta-carotene, Beautycarotene™. Beautycarotene™ increased the collagen synthesis in CCD-986sk cells, DPPH radical scavenging activity and tyrosinase inhibitory activity *in vitro* system. In addition, it enhanced the viability of murine thymocytes and the population of splenic CD4⁺ cells. Also, it increased the phagocytic activity of murine peritoneal macrophages. These results indicate that Beautycarotene™ can have a protective effect of skin *via* the diverse action, such as the stimulatory action of collagen synthesis, antioxidative action, tyrosinase inhibitory action and immune regulatory action.

Key words : Beautycarotene™, collagen, DPPH, tyrosinase, lymphocytes, macrophages

서 론

피부는 인체 부피의 약 16%를 차지하고 있으며, 외부로부터 미생물이나 해로운 물질들이 침입하는 것을 방어하는 보호막 역할을 하고 있으며, 또한, 인체 내의 수분 손실을 막아 주고 체온을 조절하는 기능을 가지고 있다. 피부는 표피와 진피라는 서로 다른 조직층으로 구성되어 있으며, 표피는 중층편평상피(stratified squamous epithelium)로 구성되어 있고, 진피는 아교섬유, 탄력섬유를 포함하는 상피조직, 평활근조직, 신경조직 및 혈관으로 구성되어 있다¹⁾.

피부는 습도, 온도, 자외선, stress, 영양결핍 등에 의해 지속적으로 손상을 입게 되면, 피부세포 보호 및 증식 능력이 저하되고 collagen의 분해를 촉진하는 collagenase의 발현이 증가되어, 피부 탄력이 감소되고 주름살이 생성되는 피부 노화 현상이 나타난다. 즉, 피부 탄력에 중요한 역할을 하는 성분인 collagen,

mucopolysaccharide, hyaluronic acid 등이 matrix 내에서 감소되어지면, 진피는 피부의 수분을 유지하기 힘들게 되어 피부가 건조하여지고, 피부 단백질의 탄력이 감소되어 주름이 생성되는 것이다²⁾.

뷰티카로틴은 피부 주름살, 항산화 및 면역조절작용이 있다고 알려진 베타카로틴^{3,5)}, collagen 생합성에 중요한 요소인 L-proline 형성에 전구체로 작용하는 효소처리 arginine^{6,7)}, 피부 보습에 중요한 인자인 hyaluronic acid의 전구체인 N-acetylglucosamine⁸⁾, 효소처리 glutamic acid⁹⁾, 면역증강, 피부 보습성 및 탄력성을 증가시키는 lutein을 함유하고 있는 마리골드추출물^{10,11)}을 혼합한 제제이다.

따라서 본 실험에서는 뷰티카로틴의 경구용 피부보호제로의 기능을 검토하고자 collagen 합성능, 항산화작용, tyrosinase 활성 및 면역조절작용을 측정하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

* 교신저자 : 은재순, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학

· E-mail : jseun@mail.woosuk.ac.kr, · Tel : 063-290-1569

· 접수 : 2009/07/13 · 수정 : 2009/08/10 · 채택 : 2009/08/27

본 실험에 사용한 생쥐는 ICR계 수컷 6주령을 대한실험동물(주)에서 구입하여, 온도 20 ± 3℃, 습도 50 ± 5%, dark/light 12 시간의 조건하에서 1 주일 이상 실험실에 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 시약 및 기구

실험에 사용한 human skin fibroblast cell line인 CCD-986sk 세포주는 한국세포주은행에서 구입하여 사용하였으며, 마리골드 추출물 (lutein 20% 함유)은 HANSSON Co. (U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 시약은 procollagen type I peptide EIA kit는 Takara Biomedical Co., lipopolysaccharide, γ-interferon, lucigenin, zymosan, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), MTT, sulfanilamide, L-DOPA, mushroom tyrosinase (25,000unit)는 Sigma Co., Kojic acid는 Wako Co., RPMI 1640, FBS, trypsin은 Gibco Co., PE-conjugated anti-CD4, FITC-conjugated anti-CD8 antibody, PE-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-Thy1 mAbs는 Dainippon sei-yaku Co.에서 구입하여 사용하였고, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 multi-well plate (96-well, 24-well, Costar), white multi-well plate (96-well, Nunc), microplate reader (Molecular Devices, SoftMax Pro5), CO₂ incubator (Vision scientific Co.), flow cytometer (Coulter EPICS-XL), luminometer (TECAN, Infinite F200) 등을 사용하였다.

3. 검액의 조제

본 실험에 사용한 베타카로틴은 (유)한풍제약에서 구입하여 사용하였으며, 구성 성분의 함량은 Table 1과 같다. *In vivo* 실험에서는 베타카로틴을 증류수에 현탁시켜 사용하였으며, *in vitro* 실험에서는 DMSO에 용해시킨 후 PBS로 희석하여 0.45 μm membrane filter로 여과평균하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of Beautycarotene™

Samples	Weight(mg)
Dunaliella Algae extract (Beta-carotene 1%)	60.0
Calendula officinalis extract (lutein 20%)	37.5
N-acetylglucosamine	125.0
Enzyme-treated glutamic acid	17.5
Enzyme-treated arginine	250.0
Total	490

4. Collagen 합성능 측정¹²⁾

CCD-986sk 세포를 10% FBS를 첨가한 DME 배지로 5 × 10⁴ cells/ml로 조제하여, 각 well에 100 μl씩 분주한 후, 37℃의 CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 베타카로틴을 여러 농도로 희석하여 각 well에 100 μl씩 첨가하고 24시간 배양하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 PBS로 3회 세척한 후, antibody-PoD conjugate solution 100 μl를 각 well에 넣고, 37℃의 CO₂ incubator에서 3 시간 배양한 다음, PBS로 4회 세척하였다. 각 well에 발색시약 100 μl를 넣고 상온에서 15분간 배양하고, 1N-H₂SO₄ 100 μl를 첨가하여 450 nm에서 microplate reader

로 흡광도를 측정하고, 미리 작성한 표준 검량선에 의해 collagen 농도를 환산하였다.

5. 항산화작용 측정

항산화작용 실험은 DPPH법^{13,14)}에 의해 측정하였다. 베타카로틴을 DMSO로 용해 한 후 다양한 농도로 희석하여 희석한 용액 100 μl와 ethylalcohol에 용해시킨 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 용액 400 μl를 잘 혼합한 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응액을 96 well plate에 200 μl씩 넣고 517 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 환산하였다. 이때 약물대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

6. Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성 측정은 DOPA를 기질로하여 tyrosinase에 의하여 생성되는 반응산물인 붉은 색의 DOPA chrome을 비색법에 의해 측정하는 Yagi 등의 방법¹⁵⁾을 변형하여 실시하였으며, 실험 조건은 Table 2와 같다. 실험에 사용한 시약은 모두 potassium phosphate buffer (pH6.8)로 용해시켜 사용하였다. 실험군에는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH6.8) 100 μl, 10 mM L-DOPA 40 μl, mushroom tyrosinase (625unit/ml) 40 μl, DMSO로 희석한 베타카로틴 20 μl, 대조군에는 시료대신 DMSO 20 μl와 0.1 M potassium phosphate buffer 100 μl를 96 well plate에 가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에 microplate reader로 흡광도를 측정하여 tyrosinase 저해율을 아래 식에 의해 환산하였다.

$$Tyrosinase\ Inhibition(\%) = (1 - \frac{sample - sample\ blank}{control - control\ blank}) \times 100$$

Table 2. The condition of tyrosinase activity measurement

	Control (blank)	Control	Sample (blank)	Samples
Sample	-	-	20	20
DMSO	20	20	-	-
DOPA	40	40	40	40
Tyrosinase	-	40	-	40
0.1M Pot. phosphate buffer	140	100	140	100
Total (μl)	200	200	200	200

7. 흥선세포, 비장세포 및 복강대식세포의 분리

생쥐의 흥선세포 및 비장세포의 분리는 Wysocki¹⁶⁾ 및 Mizel¹⁷⁾ 등의 방법을 이용하였다. 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 베타카로틴 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여한 다음, 생쥐를 CO₂ gas로 질식시켜 흥선 및 비장을 적출하였다. 적출한 흥선 및 비장을 DPBS-A를 넣은 petri dish에서 잘게 분쇄하고 멸균된 stainless mesh로 여과하여 세포부유액을 얻은 후, DPBS-A로 2회 세척한 다음 (1,500 rpm에서 10 분간 원심분리), 흥선 및 비장세포 부유액으로 하였다. 복강대식세포의 분리는 생쥐 5 마리를 1군으로 하여 베타카로틴 500 mg/kg을 1일 1회씩 7일간 경구투여 하였으며, 3일째 생쥐 복강에 3%

thioglycollate 2 ml를 주입하고, 7일째 생쥐를 CO₂ gas로 질식시켰다. 복강에 cold PBS 10 ml를 넣어 복강세포를 수집한 후, 수집한 세포를 4℃에서 1,300 rpm으로 10 분간 원심분리하고 RPMI 배지로 2회 세척한 다음, 직경 120 mm petri dish에 분주하여 CO₂ incubator에서 배양하였다. 2 시간 후에 부착되지 않은 세포를 제거하고, 부착한 세포를 복강대식세포로 사용하였다. 세포를 배양할 때 배지는 RPMI1640 배지를 사용하였으며, 배지에 10% FBS와 penicillin- streptomycin (100 units-100 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

8. 흉선세포 및 비장세포의 증식능 측정

세포증식능 측정은 Mosmann¹⁸⁾이 개발하여 Kotnik 등¹⁹⁾이 변형시킨 MTT 방법으로 측정하였다. 분리한 흉선세포 및 비장세포를 RPMI 1640 배지로 1.2 × 10⁷ cells/ml로 조제한 후, 96-well plate의 각 well에 100 µl 씩 분주하고, 흉선세포에는 concanavalin A 5 µg/ml을 비장세포에는 lipopolysaccharide 10 µg/ml를 첨가하거나 첨가하지 않은 조건으로 37℃의 CO₂ incubator에서 48 시간 배양하였다. 배양 종료 4 시간 전에 5 mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT용액 20 µl를 각 well에 첨가하고, 0.1N-HCl에 용해시킨 10%-SDS 100 µl를 각 well에 첨가하여 차광 상태에서 18 시간 더 배양한 후 발색된 각 well의 흡광도를 microplate reader로 570 nm에서 측정하여 세포생존율을 산정하였다.

9. 흉선세포 및 비장세포의 subpopulation 측정

동일한 방법으로 세포를 분리하여, 각각 RPMI 1640 배지로 3회 세척하였다. T 및 B cell의 subpopulation은 PE-conjugated anti-B220 및 FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody로, T cell의 population은 PE-conjugated anti-CD4 및 FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody로 이중 염색하여 4℃에서 30 분간 반응시킨 후 flow cytometer [excitation; 488 nm, emission; 525 nm(FITC), 575 nm(PE)]로 subpopulation을 측정하였다²⁰⁾.

10. 복강 macrophage로부터 lucigenin chemiluminescence 측정

분리한 macrophage를 2×10⁶ cells/ml가 되도록 DME (without phenol red, 0.34 g/L NaHCO₃, 2.6 g/L HEPES, pH 7.2)에 부유시켜 실험에 사용하였다. Chemiluminescence 측정은 luminometer를 이용하여 37℃에서 측정하였다^{21,22)}. 측정용 microplate (white)의 각 well에 준비된 macrophage 부유액 50 µl, lucigenin 용액 50 µl 및 zymosan 용액 30 µl를 첨가하고 전체를 200 µl로 하여, 37℃에서 15분간 전처리한 다음, 5분 간격으로 30분 동안 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하였다.

11. 통계처리

모든 실험 결과들은 mean ± S.E.로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실 험

1. Collagen 합성에 미치는 효과

Human skin fibroblast cell line인 CCD-986sk 세포에서 생성되는 collagen양은 대조군에서 120 ± 19.5 ng/ml 이었으며, 뷰티카로틴 0.1, 1, 5 및 10 µg/ml를 각각 처리하였을 때 160 ± 20.8, 320 ± 43.7, 460 ± 56.3, 540 ± 42.9 ng/ml로 1 µg/ml 이상의 농도에서 농도의존적으로 대조군에 비해 현저히 증가하였다 (Fig. 1).

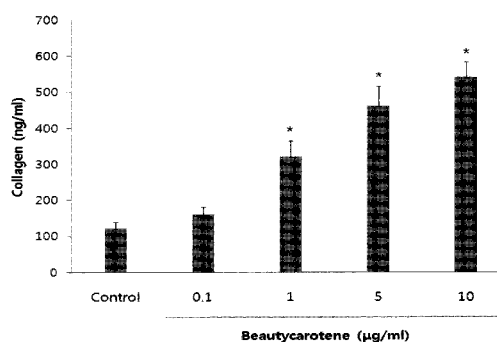


Fig. 1. Effect of Beautycarotene™ on collagen synthesis in CCD-986sk cells *in vitro* system. CCD-986sk cells (5 × 10⁴ cells/ml) were cultured with various concentration of Beautycarotene™ for 24 hrs in CO₂ incubator at 37℃. The data represents the mean ± SE of 3 experiments. *, Significantly different from control group (p<0.001).

2. 항산화작용에 미치는 효과

뷰티카로틴의 항산화 효과를 측정하기 위해 DPPH에 대한 유리 radical 소거 활성을 측정하였다. 뷰티카로틴 1, 10, 100 및 1,000 ppm을 처리하였을 때 농도의존적으로 전자공여능이 증가하는 경향을 나타냈으며, 약물대조군인 ascorbic acid에 비해서는 약하였지만, 마리골드추출물에 비해서는 강력한 효과를 나타내었다(Fig. 2).

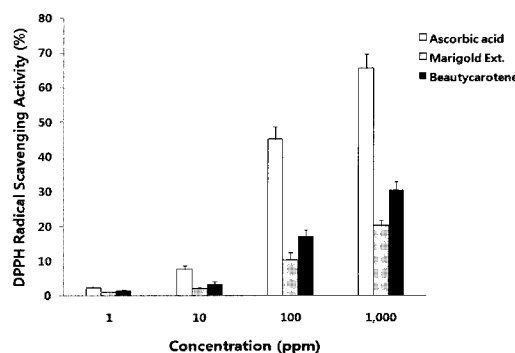


Fig. 2. Effect of Beautycarotene™ on DPPH radical scavenging activity *in vitro* system. Free radical scavenging activities were expressed as electron donating abilities (EDA) which express a decrement rate of absorbance with and without a sample. EDA (%) was calculated as follows: EDA(%) = (1-(S/B))×100, where S, absorbance at 517 nm in the presence of a sample; B, absorbance at 517 nm in the absence of sample. The data represents the mean ± SE of 3 experiments.

3. Tyrosinase 활성에 미치는 효과

뷰티카로틴 1, 10, 100 및 1,000 ppm을 처리하고 tyrosinase 저해 활성을 측정된 결과 농도의존적으로 tyrosinase 활성을 억제하였으며, 약물대조군인 kojic acid에 비해서는 약하였지만, 마리골드추출물에 비해서는 tyrosinase 활성을 비슷한 정도로 억제하였다(Fig. 3).

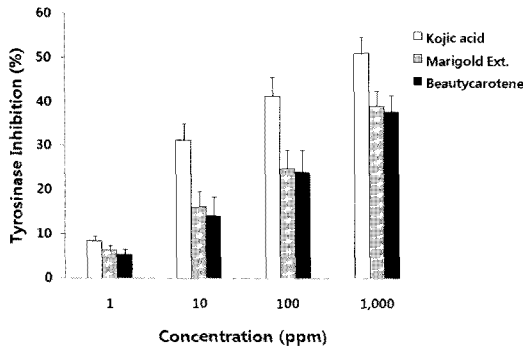


Fig. 3. Effect of Beautycarotene™ on tyrosinase inhibitory activity *in vitro* system. Tyrosinase inhibitory activity was tested as described in Materials and Methods. The data represents the mean ± SE of 3 experiments.

4. 흥선세포 및 비장세포의 증식에 미치는 효과

약물을 투여하고 분리한 흥선세포에 T-lymphocyte mitogen 인 Con A를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, Con A를 처리하였을 때 세포생존율은 128.5 ± 3.6%로 증가하였으며, 뷰티카로틴을 투여하고 분리한 흥선세포에 Con A를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 158.4 ± 3.7%로, Con A를 처리하였을 때의 세포생존율은 177.5 ± 5.5%로 대조군에 비해 현저히 증가하였다(Fig. 4).

약물을 투여하고 분리한 비장세포에 B-lymphocyte mitogen 인 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율을 100%로 하였을 때, LPS를 처리하였을 때 세포생존율은 127.4 ± 3.5%로 증가하였으며, 뷰티카로틴을 투여하고 분리한 비장세포에 LPS를 처리하지 않았을 때의 세포생존율은 108.8 ± 3.8%로, LPS를 처리하였을 때의 세포생존율은 135.2 ± 4.7%로 대조군과 별 차이가 없었다(Fig. 5).

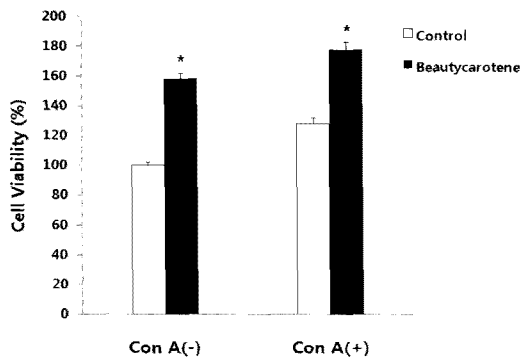


Fig. 4. Effect of the administration of Beautycarotene™ on the cell viability of thymocytes. Beautycarotene (500 mg/kg) were administered orally once a day for 7 days, and then the separated thymocytes (1.2×10^7 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen, concanavalin A. The data represents the mean ± SE of 5 mice. *: Significantly different from control group ($p < 0.001$).

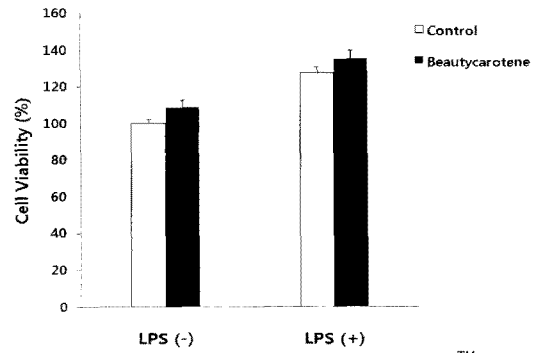


Fig. 5. Effect of the administration of Beautycarotene™ on the cell viability of splenocytes. Beautycarotene (500 mg/kg) were administered orally once a day for 7 days, and then the separated splenocytes (1.2×10^7 cells/ml) were cultured for 48 h in RPMI1640 media mixed with an activating mitogen, lipopolysaccharide. The data represents the mean ± SE of 5 mice.

5. 흥선세포 및 비장세포의 아군집에 미치는 효과

흥선세포 중 대조군의 CD4⁺ 세포는 11.0 ± 0.2% 이었으며, CD8⁺ 세포는 2.5 ± 0.2% 이었다. 뷰티카로틴을 투여하고 분리한 thymic T-lymphocytes 중 CD4⁺ 세포는 11.2 ± 0.6%로, CD8⁺ 세포는 2.1 ± 0.4%로 대조군과 별 차이가 없었다. 비장세포 중 대조군의 B220⁺ 세포는 37.6 ± 3.2% 이었으며, Thy1⁺는 14.4 ± 2.6% 이었다. 뷰티카로틴을 투여하고 분리한 비장세포 중 B220⁺ 세포는 35.4 ± 1.3%로, Thy1⁺ 세포는 16.1 ± 1.2%로 대조군과 별 차이가 없었으며, splenic T-lymphocytes 중 대조군의 CD4⁺ 세포는 14.2 ± 0.5% 이었고, CD8⁺ 세포는 5.6 ± 0.3% 이었으며, 뷰티카로틴을 투여하고 분리한 splenic T-lymphocytes 중 CD4⁺ 세포는 16.2 ± 0.4%로, CD8⁺ 세포는 5.2 ± 0.3%로 CD4⁺ 세포가 대조군에 비해 증가하였다(Fig. 6).

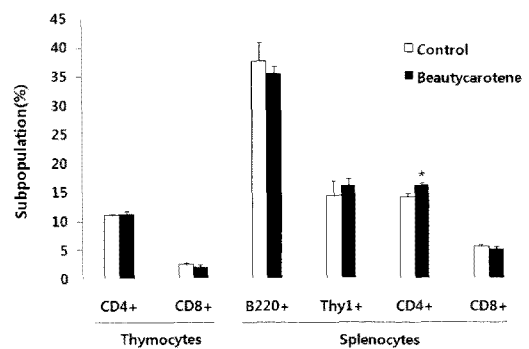


Fig. 6. Effect of the administration of Beautycarotene™ on the subpopulation of thymocytes and splenocytes. Beautycarotene (500 mg/kg) were administered orally once a day for 7 days, and the separated thymocytes were stained with PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4°C and the separated splenocytes were stained with PE-conjugated anti-B220 and FITC-conjugated anti-Thy1 monoclonal antibody or PE-conjugated anti-CD4 and FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibody for 30 minutes at 4°C. The subpopulation was determined with a flow cytometer. The data represents the mean ± SE of 5 mice. *: Significantly different from control group ($p < 0.05$).

6. 복강 대식세포의 탐식능에 미치는 효과

뷰티카로틴을 투여하고 분리한 복강대식세포에서 생성되는 lucigenin chemiluminescence 양을 측정된 결과 대조군에 비해 15분 이후부터 유의성 있게 증가하였다(Fig. 7).

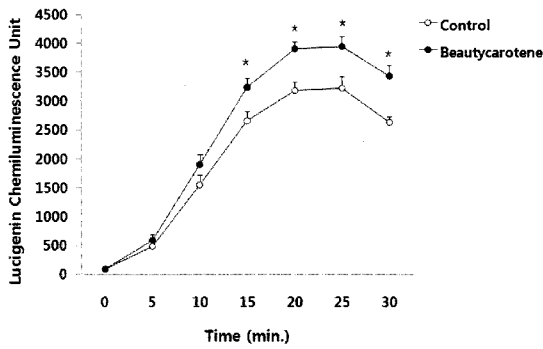


Fig. 7. Effect of the administration of Beautycarotene™ on lucigenin chemiluminescence unit of peritoneal macrophages. Beautycarotene™ (500 mg/kg) was administered orally once a day for 7 days and the separated peritoneal macrophages (2×10^6 cells/ml) were cultured in DME media (without phenol red) mixed with opsonized zymosan. The level of lucigenin chemiluminescence was measured for 30 min with a luminometer. Each bar represents the mean \pm SE of 5 mice. *; Significantly different from control group ($p < 0.001$).

고찰

Collagen은 인체 단백질의 70 ~ 80%를 차지하며, 대부분이 type I ~ IV형에 속하고, 섬유아세포에 의해 procollagen으로부터 효소에 의해 절단되어 합성되어진다. CCD-986sk 세포주는 사람 피부 섬유아세포로서, KFDA 기능성화장품의 유효성 평가를 위한 가이드라인에서, 세포로부터 합성되는 collagen 양을 측정하여 주름 개선의 효능을 평가하고 있다²³⁾.

뷰티카로틴 0.1, 1, 5 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 CCD-986sk 세포에 각각 처리하였을 때 1 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 농도의존적으로 collagen 합성이 증가되었다. 이 결과는 뷰티카로틴이 주름을 개선시킬 수 있는 효능이 있음을 의미하는 것이다.

뷰티카로틴에 함유된 베타카로틴 및 마리골드 추출물은 항산화작용^{5,24)}이 있기 때문에 이들을 혼합한 뷰티카로틴에 대한 항산화작용을 DPPH법에 의해 측정하여 보았다. DPPH는 ascorbic acid, BHA 등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연 소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다²⁵⁾. DPPH는 비교적 안정한 유리 radical이며, 비공유전자로 인해 517 nm 부근에서 강한 자색을 나타내나, 분자 내 질소가 쉽게 전자를 받아들임으로써 본래의 짙은 자색을 잃어버려 517 nm 부근에서 흡광도와 감소된다. 이들 항산화 물질의 전자 공여 작용은 지질과산화의 연쇄반응에 관여하는 산화성 활성 유리 radical에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도가 되고 있다²⁶⁾. 활성 free radical은 인체 내에서 각종 질병과 oxidative stress, 노화 등을 일으키는 역할을 하기 때문에 이들과 반응하여 그 활성을 소거시키는 능력을 지닌 항산화제는 중요한 의미를 가지게 된다²⁷⁾. 뷰티카로틴을 처리하였을 때 농도의존적으로 DPPH radical 소거능이 증가하는 경향을 나타냈으며, 약물대조군인 ascorbic acid에 비해서는 약하였지만, 마리골드추출물에 비해서는 강력한 효과를 나타내었다. 이는 뷰티카로틴이 항산화작용을 가지고 있음을 시사하는 것이다.

Melanin 색소의 생성은 tyrosine을 기질로 tyrosinase에 의

해 dopaquinone 등의 유도체를 경유하여 생성되기 때문에²⁸⁾, melanin 합성의 주효소인 tyrosinase의 활성을 저해하면, tyrosine 산화를 억제하여 melanin 생성이 억제된다. Tyrosinase 활성을 억제하는 물질로는 ascorbic acid, kojic acid 등이 잘 알려져 있으며, 이 외에도 다양한 천연물들이 보고되었다²⁹⁻³¹⁾.

뷰티카로틴을 처리하면 tyrosinase 활성이 농도의존적으로 억제되었으며, 약물대조군인 kojic acid에 비해서는 약하나, 마리골드추출물과는 비슷한 정도로 tyrosinase 활성을 억제하였다. 이 결과는 뷰티카로틴이 미백효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다. 뷰티카로틴에 함유된 베타카로틴⁴⁾ 및 마리골드추출물¹¹⁾이 면역조절작용이 있다고 알려져 있기 때문에 뷰티카로틴이 생체의 면역능에 미치는 영향을 관찰하여 보았다. 뷰티카로틴을 투여하였을 때 흉선세포의 생존율은 Con A를 처리하지 않았을 때나 처리하였을 때 모두 증가하였으나, 비장세포의 생존율은 대조군과 별 차이가 없었다. 이 결과는 뷰티카로틴이 흉선세포의 생존율을 증가시켜 면역능을 조절할 수 있음을 의미하는 것이다.

흉선세포는 흉선의 피질 및 수질에서 분화과정을 거쳐 helper T lymphocyte (CD4^+) 및 cytotoxic T lymphocyte (CD8^+)로 분화되며, 분화된 helper T (Th) 세포 중 Th1 세포에서는 γ -IFN 및 IL-2, Th2 세포에서는 IL-4, IL-6 및 IL-10 등의 cytokine이 분비되어, 다른 lymphocytes 및 macrophages의 증식과 분화를 촉진하고, cytotoxic T cell은 tumor cell의 lysis를 일으키며 macrophage를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 또한, B 임파구는 항체의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다³²⁾.

뷰티카로틴을 투여하였을 때 흉선세포의 thymic CD4^+ 세포 및 thymic CD8^+ 세포 아군집의 비율은 대조군과 별 차이가 없었으며, 비장세포의 B220⁺ 세포 및 Thy1⁺ 세포의 아군집 비율도 대조군과 별 차이가 없었으나, splenic CD4^+ 세포의 아군집 비율이 대조군에 비해 증가하였다. 이는 뷰티카로틴이 비장세포의 helper T 세포의 비율을 증가시켜 면역능을 조절할 수 있음을 의미하는 것이다.

외부로부터 이물질이 침입하게 되면 생체는 자기방어를 위해 임파구에서 cytokines들을 분비하여 대식세포의 탐식능 등을 증가시키는 것으로 알려져 있어, 복강 대식세포의 탐식능을 측정하여 보았다. 본 실험에서 대식세포의 탐식능을 측정하는데 lucigenin chemiluminescence 양을 측정하는 방법을 이용하였다. 이 방법의 원리는 대식세포가 particle를 탐식하는 동안 oxygen radical을 생성하는데, 이때 생성된 oxygen radical과 lucigenin이 반응하여 lucigenin chemiluminescence를 발생하는 것을 측정함으로써 탐식능이 진행되는 것을 경시적으로 확인하는 방법이다³³⁾. 대식세포로부터 생성되는 lucigenin chemiluminescence 양을 측정할 결과, 뷰티카로틴을 투여하였을 때는 대조군에 비해 증가하였다. 이 결과는 뷰티카로틴이 생체에서 대식세포의 탐식능을 증가시켜 면역능을 조절할 수 있음을 시사하는 것이다.

결론

베타카로틴 함유제제인 뷰티카로틴은 경구투여시 collagen

합성 촉진작용, 항산화작용, tyrosinase 저해작용 및 면역조절작용 등 다양한 효능에 의해 피부를 보호할 수 있는 제제라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009년 교육과학기술부의 지원 (지역거점연구단 육성사업/헬스케어기술개발사업단) 및 2009학년도 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

- 이원택 외 역. Hole's human anatomy & physiology 9판. 정답, p 168, 2004.
- Bauza, E., Oberto, G., Berghi, A., Dal, C.F., Domloge, N. Collagen-like peptide exhibits a remarkable antiwrinkle effect on the skin when topically applied: in vivo study. *Int J Tissue React.*, 26(3-4):105-111, 2004.
- O'Connor, I. and O'Brien, N. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 16: 226-230, 1998.
- Chew, B.P., Park, J.S. Carotenoid action on the immune response. *J. Nutr.*, 134(1):257S-261S, 2004.
- Grassmann, J. Terpenoids as plant antioxidants. *Vitam. Horm.*, 72: 505-535, 2005.
- Mühling, J., Fuchs, M., Campos, M., Gonter, J., Sablotzki, A., Engel, J., Welters, I.D., Wolff, M., Matejec, R., Dehne, M.G., Menges, T., Krüll, M., Hempelmann, G. Effects of ornithine on neutrophil (PMN) free amino acid and alpha-keto acid profiles and immune functions in vitro. *Amino Acids.*, 27(3-4):313-319, 2004.
- Marin, V.B., Rodriguez-Osiac, L., Schlessinger, L., Villegas, J., Lopez, M., Castillo-Duran, C. Controlled study of enteral arginine supplementation in burned children: impact on immunologic and metabolic status. *Nutrition.* 22(7-8):705-712, 2006.
- Garner, S.T.Jr., Israel, B.J., Achmed, H., Capomacchia, A.C., Abney, T., Azadi, P. Transdermal permeability of N-acetyl-D-glucosamine. *Pharm. Dev. Technol.*, 12(2):169-174, 2007.
- Han, D., Kim, H.Y., Lee, H.J., Shim, I., Hahm, D.H. Wound healing activity of gamma-aminobutyric Acid (GABA) in rats. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17(10):1661-1669, 2007.
- Lee, E.H., Faulhaber, D., Hanson, K.M., Ding, W., Peters, S., Kodali, S. and Granstein, R.D. Dietary lutein reduces ultraviolet radiation-induced inflammation and immunosuppression. *J. Invest. Dermatol.*, 122: 510-517, 2004.
- Philips, N., Keller, T., Hendrix, C., Hamilton, S., Arena, R., Tuason, M., Gonzalez, S. Regulation of the extracellular matrix remodeling by lutein in dermal fibroblasts, melanoma cells, and ultraviolet radiation exposed fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.*, 299(8):373-379, 2007.
- Oikarinen, A., Autio, P., Kiistala, U., Risteli, L., Risteli, J. A new method to measure type I and III collagen synthesis in human skin in vivo: demonstration of decreased collagen synthesis after topical glucocorticoid treatment. *J. Invest. Dermatol.*, 98: 220-225, 1992.
- Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radicals. *J. Agric. Food. Chem.*, 25: 103-107, 1977.
- Wattasinghe, M., Shahidi, F. Scavenging of reactive oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food chem.*, 70: 17-26, 2000.
- Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. The effect of tyrosinase inhibition for Aloe. *Planta Med.* 3981: 517-519, 1986.
- Wysocki, L.J. and Sato, V.L. Planning for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 2844, 1978.
- Mizel, S.B., Openheim, J.J. and Rosensteich, D.L. Characterization of lymphocyte-activating factor(LAF) produced by the macrophage cell line P388D1. *J. Immunol.* 120: 1497, 1979.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. methods.*, 65: 55, 1983.
- Kotnic, V. and Fleischmann, W.R.Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J. Immunol. methods.*, 129: 23, 1990.
- Suda, T. and Nagata, S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.* 179: 873-879, 1994.
- Boudard, F., Vallot, N., Cabaner, C. and Bastide, M. Chemiluminescence and nitrite determinations by the MALU macrophage cell line. *J. Immunol. Methods*, 174: 259, 1994.
- Blair, A.L., Cree, I.A., Beck, J.S. and Hating, M.J.G. Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtiter plate format. *J. Immunol. Methods*, 112: 163, 1988.
- Korea Food & Drug Administration (KFDA), Guideline for efficacy evaluation of functional cosmetics (II). 11-1470000-000863-01, 2005.
- Braga, P.C., Dal Sasso, M., Culici, M., Spallino, A., Falchi, M., Bertelli, A., Morelli, R., Lo Scalzo, R. Antioxidant activity of Calendula officinalis extract: inhibitory effects on chemiluminescence of human neutrophil bursts and

- electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Pharmacology*. 83(6):348-355, 2009.
25. Yu, M.H., Im, H.G., Lee, H.J., Ji, Y.J., Lee, I.S. Components and their Antioxidant Activities of Methanol Extracts from Sarcocarp and Seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. *Food Sci. Technol.*, 38: 128-134, 2006.
 26. Lee, S.J., Park, D.W., Jang, H.G., Kim, C.Y., Park, Y.S., Kim, T.C., Heo, B.G. Total Phenol Content, Electron Donating Ability, and Tyrosinase Inhibition Activity of Pear Cut Branch Extract. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 24(3):338-341, 2006.
 27. Hwang, J.H., Lee, B.M. Inhibitory Effects of Plant Extracts on Tyrosinase, l-DOPA Oxidation, and Melanin Synthesis. *J. Toxicol. Environ. Health. A*. 70(5):393-407, 2007.
 28. Körner, A., Pawelek J. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science*, 217: 1163-1165, 1982.
 29. An, B.J., Cho, Y.J., Son, J.H., Pack, J.M. Lee, J.Y., Pack, T.S. Antioxidant effects and Tyrosinase Inhibition Activity of Extract of *Prunus sargentii* Rehder. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.*, 49(2):145-148, 2006.
 30. Jeong, J.H., Wee, J.J., Shin, J.Y., Cho, J.H., Jung, D.H. Antioxidative effect of crude saponin fraction prepared from culture product of basidiomycota cultured with fresh ginseng as substrate, *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 67-72, 2005.
 31. Kim, S.H., Kim, I.C. Antioxidative properties and whitening Effects of the *Eucommia* cortex, *Salvia miltiorrhiza* radix, *Aurantii nobilis* pericarpium and *Cnidii rhizoma*, *J. East. Asian. Soc. Dietary Life*, 18(4):618-623, 2008.
 32. Miceli, M.C., Parnes, J.R. The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Advances in Immunology*, 53: 59-63, 1993.
 33. Breiheim, G., Stendahl, O. and Dahlgren, C. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 45: 1, 1984.