

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001374-01

농산 부산물 유래의 당세라마이드 등  
생리활성 지질을 함유한 건강 기능식품 소재 개발

(Development of nutricosmeceuticals using bioactive lipids  
which contain plant ceramide extracted from agricultural by-products)

두산 글로넷 바이오사업부

농 립 수 산 식 품 부



# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “농산 부산물 유래의 당세라마이드 등 생리활성 지질을 함유한 건강 기능 식품 소재 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 4 월 일

주관연구기관명 : (주) 두산글로벌넷

주관연구책임자 : 정 국 훈

제1세부연구책임자 : 한 정 준

제1협동연구기관명 : 한국식품연구원

제1협동연구책임자 : 최 희 돈

제2협동연구기관명 : 경희대학교

제2협동연구책임자 : 함 대 현



# 요 약 문

**I. 제 목: 농산 부산물 유래의 당세라마이드 등 생리활성 지질을 함유한 건강 기능식품 소재 개발에 관한 연구**

## **II. 연구개발의 목적 및 필요성**

쌀과 콩의 부산물 (미강, 비지 등)로부터 회수할 수 있는 당세라마이드를 비롯한 생리활성 지질의 경구투여에 의한 피부건강 기능개선 및 항염증, 염증성 피부질환 치료 효능을 분석하고 그 작용기전을 규명하고자 함. 이를 통해 미백, 주름개선, 습진 및 아토피 치료 효능을 갖는 생리활성지질을 탐색하고 기능성 미용식품 소재로서 개발하고자 함. 또한 인체를 대상으로 한 연구에서도 동일한 결과를 낼 수 있는지 확인하고 그 소재를 농산부산물 유래로 하여 대량 생산을 통해 기능성 식품 소재를 개발하고 제품화하고자 함.

## **III. 연구개발 내용 및 범위**

**제1세부과제: 농산부산물로부터 기능성 생리활성 지질의 대량생산, 수용성 나노가용화 기술 개발 및 생리 활성 지질의 피부 주름 개선 및 피부 보습 효능 임상 시험**

- 농산 부산물 유래의 항주름 효능 및 미백 효능의 건기식 소재 개발
- 농산 부산물 유래의 아토피 등 피부 염증 및 피부 면역 개선기능 건기식 소재 개발
- 선발된 생리 활성 지질의 음료화를 위한 나노 가용화 기술 개발
- 인체를 대상으로 임상 확인 및 대량 생산을 통한 건강 기능성 식품 소재 개발 및 상품화.

**제1협동과제: 당세라마이드 등 생리활성지질류의 미백, 주름제거 등 피부기능개선 효과 분석 및 기전연구**

- 미백 효능 생리활성 지질 탐색 및 효능 검정
- 주름감소 효능 생리활성 지질 탐색 및 효능 검정
- 피부보습 효능 생리활성 지질 탐색 및 효능 검정

**제2협동과제: 생리활성지질의 항염증 및 염증성 피부질환 치료 효능 분석 및 작용기전 연구**

- RAW264.7 macrophage를 이용한 생리활성지질의 항염증 효능 in vitro assay
- 류마티스환자 유래 synovocyte를 이용한 생리활성지질의 항염증 효능 in vitro assay
- 혈관내피세포를 이용한 생리활성지질의 실혈관형성 억제 효능 in vitro assay
- 생리활성지질의 항염증 및 항관절염 효능 in vivo assay
- 생리활성지질의 항아토피성 효능 in vivo assay
- 생리활성지질의 항접촉성피부염 효능 in vivo assay

#### IV. 연구개발결과

##### 제1 세부 과제: 농산부산물로부터 기능성 생리활성 지질의 대량생산 및 수용성 나노가용화 기술 개발 및 생리 활성 지질의 피부 주름 개선 및 피부 보습 효능 임상 시험

피부 건강 증진 관련한 생리활성 지질의 타겟으로 식물세라마이드 및 대두 포스파티딜세린을 대상 소재로 선정하였다. 식물세라마이드 생산을 위한 원료로서 미강박, 쌀겨, 대두유 검 비지박 등의 원료들로부터 식물세라마이드 함량을 검토한 결과 대두유 검으로부터 생산하는 것이 비교적 가장 경제적인 것으로 판단되었다. 국내에서 공급 가능한 대두유 유래 검질을 수배하여 식물 세라마이드를 함유한 생리활성 지질을 추출할 수 있는 최적 조건을 수립하였고 대량 생산을 위한 공장 시 생산 테스트를 실시하였다. 그리고 대두 유래의 식물 세라마이드를 순수 분리 정제하여 구조 분석을 실시하였으며 최종제품 적용을 위한 제형 개발로서 분말 제품 이외에 음료용 유화 제형 개발, 그리고 간이 임상을 통해 피부 관련 효능 중 보습 효능 실험을 수행하였다.

생리 활성 지질 후보군으로서 식물 세라마이드외에 대두유 부산물인 대두 검질로부터 인지질을 농축 정제하여 포스파티딜세린을 제조하는 것을 검토하였다.

기존의 두산이 개발한 대두 포스파티딜세린 공정에는 해외에서 수입된 정제 분말 레시틴을 활용하여 제조된 중순도 PC 함량의 대두레시틴 (PC함량 55)을 사용하여 생산하여 왔다. 이에 국내에서 생산된 조레시틴을 활용하여 포스파티딜세린 공정을 대두검으로부터 대두 인지질을 추출하여 포스파티딜세린 제조를 검토하였으며 국내에서 건강 기능식품으로 인정 받은 수준의포스파티딜세린 함량 40% 이상의 포스파티딜세린을 얻을 수 있었다.

피부 관련 건강 기능 식품 소재로서 타겟 효능에 있어서는 항염증, 아토피 개선 등의 효능 효과는 국내 건강 기능식품 법규상 취득하기 불가능한 효능이므로 보습과 주름 개선이 적합하다고 판단하였다.

따라서 본 연구에서는 대두유래의 식물세라마이드와 대두검질 유래의 인지질을 이용하여 제조한 대두포스파티딜세린을 활용하여 국내 전문 임상 기관에서 임상 시험을 수행하였다. 그 결과 대두 유래 식물 세라마이드 및 포스파티딜세린은 모두 섭취전에 비하여 섭취 12주후 피부보습개선효과가 대조군에 비해 시험군이 통계적으로 유의한 수준 ( $p < 0.05$ )으로 개선 시키는 것으로 나타났다. 피부 주름 개선 효능에 있어서는

안전성 평가 결과, 이상반응을 경험한 피험자의 보고는 없었고, (활력징후)에 대해서는 군 내에서 통계적으로 유의한 수준의 차이를 보인 항목들이 있었으나 정상치 범위내에서의 변화였다. 또한, 본 시험기간동안 중대한 이상반응(SAE)뿐만 아니라 이상 약물반응(ADR) 및 이상 반응으로 인한 조기종료는 없었다.

결과적으로 대두 포스파티딜세린과 대두 당세라마이드는 눈가 주름 및 피부 보습 개선에 효과가 있는 소재라고 판단할 수 있었다.

##### 제1협동 과제: 농산 부산물 유래의 당 세라마이드 등 생리활성지질의 피부건강개선 효능 검증

농산 부산물로부터 제조한 ceramide와 phosphatidylserine(PS)의 미백, 주름 개선, 보습 등의 피부 건강 개선 효능을 검증하였다. In vitro에서의 ceramide와 PS의 미백 효능을 분

석하기 위하여 B16F10 흑색종(melanoma) 세포에서의 melanin 생성 저해효과와 tyrosinase의 활성화에 대한 ceramide와 PS의 저해 효과를 조사하였다. Ceramide는 melanin 생합성을 농도 의존적으로 감소하지는 않았지만, 양성 대조군으로 arbutin을 처리했을 때 보다 높은 저해 활성을 나타내었고, 1, 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 처리했을 때 tyrosinase 활성을 각각 17.2%, 17.6% 억제하는 것으로 나타나 동일하게 처리한 양성 대조군 kojic acid에 비해 높은 저해 활성을 나타내었다. 또한 ceramide의 melanin 생합성 저해 기전을 검증하기 위하여 B16F10 흑색종 세포에서의 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 발현량을 western blotting하여 측정된 결과 TRP-2의 발현량에는 영향을 미치지 않았으나, tyrosinase와 TRP-1의 발현량을 감소시킴을 확인할 수 있었다. 반면 PS는 ceramide에 비해 낮은 미백 효능을 나타내었다.

In vitro에서의 ceramide와 PS의 주름 개선 효능을 분석하기 위하여 인간 섬유아세포(Human dermal fibroblast)에서의 collagen 생성, MMP-1 발현, MAPKs 및 AP-1 발현 등에 ceramide와 PS가 미치는 영향을 조사하였다. PS는 대조군에 비해 collagen 생합성량을 현저히 증가시킴을 확인할 수 있었으며, UVB 조사에 의해 활성화된 MMP-1의 농도를 Western blot으로 확인한 결과, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리한 경우 MMP-1의 발현량이 크게 감소됨을 확인할 수 있었다. MMP-1 저해효능에 대한 PS의 세포내 signaling cascade를 확인하기 위하여 MAPKs(JNK, ERK, P38)의 인산화 억제효능을 Western blot으로 확인한 결과 UVB 조사시 모든 MAPKs의 인산화가 현저히 증가하였고 PS 처리에 의해 농도의존적으로 모든 MAPKs의 인산화가 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 ERK에 대한 억제 효과가 큰 것으로 나타났다. PS가 UVB에 의한 AP-1의 활성화에 억제효능을 가지는지 확인하기 위해 c-Jun과 c-fos의 발현량 변화를 Western blot으로 확인하였을 때도 MAPKs와 동일한 결과를 나타내었다. Ceramide 또한 collagen 생합성량을 현저히 증가시킴으로써 PS와 거의 유사한 주름 개선 효능을 나타냄을 확인할 수 있었다.

Hairless mouse를 이용하여 ceramide와 PS의 장기간 경구섭취가 UV 조사에 의한 주름 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 피부 수분함량의 경우 실험 10주차에 UV 대조군이 정상 대조군의  $40.0 \pm 5.0\%$  수준으로 크게 감소한 반면 PS 투여군은 정상대조군의  $56.3 \pm 7.6 \sim 72.1 \pm 4.2\%$  수준으로 UV 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 피부 두께의 경우에도 UV 조사에 의해 피부 두께가 크게 증가한 반면 PS 투여군은 UV 대조군에 비해 피부 두께가 유의적으로 크게 감소하는 것으로 나타났다. 또한 정상대조군에 비해 UV 대조군의 경우 피부 주름이 깊어지고 개수도 크게 증가하였지만 PS 투여군은 UV 대조군에 비해 주름이 얇아지고 개수도 크게 감소하는 것으로 나타났다. 주름면적의 경우에도 정상대조군의  $53.5 \pm 7.5 \text{ mm}^2$ 에서 UV 대조군의  $123.8 \pm 12.6 \text{ mm}^2$ 으로 크게 증가하였지만 PS 투여군에서는  $67.0 \pm 2.5 \sim 83.3 \pm 15.3 \text{ mm}^2$ 으로 UV 대조군에 비해 크게 감소하는 것으로 나타났다. 피부조직을 조직병리학적으로 관찰한 결과 UV 대조군에서 정상대조군에 비해 표피와 진피가 크게 두꺼워졌지만 PS 투여군에서는 PS의 투여량이 증가할수록 표피와 진피가 크게 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 PS를 장기간 경구섭취할 경우 UV에 의한 피부 조직의 구조 손상에 따른 주름 발생과 탄력저하를 완화시킬 뿐만 아니라 피부 장벽 기능 개선에도 도움을 줄 것으로 판단된다. 한편 ceramide의 in vivo 주름개선 주름개선 효능시험을 한 결과, 피부 수분함량의 경우 UV 대조군이 정상대조군의  $63.2 \pm 7.3\%$  수준으로 감소한 반면 ceramide 투여군은 정상대조군의  $60.5 \pm 8.9 \sim 78.6 \pm 7.1\%$  수준으로 UV 대조군에 비해 증가하였으며, 피부 두께의 경우에도 UV 조사에 의해 피부 두께가 크게 증가한 반면 ceramide 투여군은 UV

대조군에 비해 피부 두께가 유의적으로 크게 감소하는 것으로 나타났다. 주름면적의 경우에도 정상대조군의 18.3 mm<sup>2</sup>에서 UV 대조군의 32.7 mm<sup>2</sup>으로 크게 증가하였지만 ceramide 투여군에서는 16.2~29.6 mm<sup>2</sup>으로 UV 대조군에 비해 크게 감소하는 것으로 나타났다. 피부 조직을 조직화학적으로 관찰한 결과 UV 대조군에서 정상대조군에 비해 표피가 크게 두꺼워지고 collagen 함량이 감소하였지만 ceramide 투여군에서는 표피 두께가 크게 감소하고 collagen 함량이 크게 증가하는 것으로 나타났다.

Ceramide와 PS의 경구섭취가 hairless mouse의 피부 보습에 미치는 영향을 조사하였다. Tape stripping한 TS 대조군의 경우 정상대조군에 비해 TS후 급격히 경피수분손실량(TEWL)은 증가되고 서서히 회복되는 반면 ceramide와 PS 투여군에서는 TS 처리시 피부 장벽손상이 적게 일어나 낮은 TEWL 값을 나타내었다. 특히 저농도 세라미드 투여군에서는 피부손상도 적게 일어나고, 회복 속도도 꾸준히 증가하는 것으로 나타났다. 또한 피부 조직을 H&E 염색하여 조직병리학적으로 관찰한 결과 정상대조군에 비해 TS 대조군의 경우 표피가 매우 두꺼워진 반면 ceramide와 PS 투여에 의해 거의 정상대조군 수준으로 표피의 두께가 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 ceramide와 PS는 경구섭취를 통해 피부의 민감도 및 피부 장벽 손상에서 효과적으로 예방 및 회복력을 가짐을 확인할 수 있었다.

## 제2협동과제: 생리활성지질의 항염증 및 염증성 피부질환 치료 효능 분석 및 작용기전 연구

농산 부산물로부터 제조한 ceramide와 phosphatidylserine(PS)의 항염증 효능을 in vitro 및 in vivo 수준에서 검정하였다. RAW264.7 대식세포주에서 글루코실세라미드는 100 µg/ml 농도 이하에서는 세포 독성을 보이지 않았다. 글루코실세라미드는 100 µg/ml 이하 농도에서 LPS (1 µg/ml)에 의해 유도된 대표적인 proinflammatory cytokine인 IL-1β 및 TNF-α 발현을 농도의존적으로 강하게 저해하였다. 비록 PS 또한 IL-1β 및 TNF-α 발현을 저해하였으나, 글루코실세라미드에 비해 낮은 효능을 보였다. 류마티스 관절염 환자 유래 fibroblast-like synoviocyte에서도 글루코실세라미드는 100 µg/ml 이하 농도에서 IL-1β에 의해 유도된 IL-6, IL-8 및 PGE2와 같은 염증성 인자의 발현을 농도의존적으로 강하게 저해하였다. 또한 연골 파괴 관련 MMPs 중 하나인 MMP-1은 IL-1β에 의해 그 발현이 증가되는데, 글루코실세라미드가 이러한 MMP-1의 발현을 억제하였다. 반면 PS는 글루코실세라미드에 비해 낮은 효능을 나타내었다. 다음으로, BAEC에서 proliferation, cell migration, tube formation에 대한 글루코실세라미드 및 PS의 효능 분석을 통해 신혈관형성 기전에 대한 CB60 및 PS의 효과를 검증하였다. 글루코실세라미드 및 PS 처리는 BAEC 세포의 세포 증식, 세포 이동, 튜브 형성에 영향을 미치지 못하였다. 즉, 신혈관형성이 염증반응에 중요한 요인이나 글루코실세라미드 및 PS의 항염증 효능과는 무관한 기전으로 사료된다.

Carrageenan으로 유도된 관절염 동물모델에서 글루코실세라미드 및 PS의 경구투여가 염증 및 통증에 미치는 영향을 조사하였다. 우하지 (관절염을 유발한 다리)에 대한 체중 분배비를 이용한 진통 검사에서 글루코실세라미드 투여 시 대조군에 비해 우하지의 체중 분배비가 뚜렷이 증가하여 그 수준을 유지하였다. 염증의 대표 증상인 부종 또한 글루코실세라미드의 투여에 의해 감소하였다. 이와 같은 항염 효과는 HE staining을 이용한 조직



검사에서도 확인되었는데, 글루코실세라마이드는 상피하층의 두께를 감소시켰으며, 염증세포의 침윤 및 활액막의 비대 또한 억제시켰다. PS 또한 글루코실세라마이드와 유사한 효과를 나타내었다.

14일 간 지속적인 trimellitic anhydride (TMA) 도포로 유도된 아토피성 피부염 모델을 이용하여 글루코실세라마이드 및 PS의 항아토피성 효능을 검사하였다. 생쥐의 귀에 TMA의 반복적인 도포는 귀에서 사람의 아토피 피부염과 유사한 증상인 erythema, scarring/dryness, erosion이 나타내는데, 글루코실세라마이드는 농도의존적으로 임상적 증상 및 귀 두께로 측정된 부종을 완화시켰으며, 조직 내 비만세포(mast cell) 및 염증성 세포들의 침윤을 억제하였다. 더 나아가 혈청 내 아토피의 마커인 IL-4의 농도를 감소시켰으며, 아토피성 피부 조직 및 림프절에서 Th1 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 와 Th2 사이토카인인 IL-4의 mRNA 발현은 물론 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현 역시 농도의존적인 수단으로 억제하였다. 반면 PS는 ceramide에 비해 낮은 효능을 나타내었다.

또 다른 피부염 모델인 Oxalozone으로 유도된 피부습진 동물모델에서 글루코실세라마이드는 글루코실세라마이드는 농도의존적으로 임상적 증상 및 귀 두께로 측정된 부종을 완화시켰으며, 조직 내 염증성 세포들의 침윤을 억제하였다. 특히 oxazolone의 반복적인 도포는 피부 내 수분 함량 손실과 수분통로 단백질인 aquaporin-3 (AQP-3)의 발현을 감소를 초래하였는데, 글루코실세라마이드는 경구 투여는 농도 의존적인 수단으로 피부 내 수분 함량을 상당한 수준으로 회복시켰으며, AQP-3의 발현 역시 정상군 수준으로 회복되었다.

결론적으로, 글루코실세라마이드 및 PS는 in vitro 및 in vivo에서 항염증 효과를 나타내었으며, 이는 관절염, 아토피, 접촉성 피부염과 같은 염증성 질환을 완화시키는데 도움이 될 것으로 사료된다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과

피부 건강 기능 개선 효능을 가진 생리활성지질을 선별하고 이의 대량생산 체제를 구축하여 피부기능개선 및 염증성 피부질환 치료 효능의 미용식품 소재 개발하고자 하였다. 피부 생리 활성 지질 후보군으로서 식물 세라마이드외에 대두유 부산물인 대두 검질로부터 인지질을 농축 정제하여 효소반응을 통해 제조한 포스파티딜세린을 생리활성 후보군으로 결정하였으며 이에 대한 효능 검증을 위해 세포실험, 동물 실험 그리고 임상 시험을 수행하였다.

그 결과 글루코실세라마이드 및 PS는 in vitro 및 in vivo에서 항염증 효과를 나타내었으며, 이는 관절염, 아토피, 접촉성 피부염과 같은 염증성 질환을 완화 시키는 효능을 나타냄을 확인 할 수 있었다. 동물 실험을 통해 경구섭취 시 피부의 민감도 및 피부 장벽 손상에서 효과적으로 예방 및 회복력을 갖게 하며 피부 보습능 증진 및 주름 개선 효능을 나타냄을 확인 할 수 있었다. 피부 보습능 및 주름 개선 효능에 대해 국내 전문 임상 기관에서 임상 시험을 수행하였다. 그 결과 대두 유래 식물 세라마이드 및 포스파티딜세린은 모두 섭취 전에 비하여 섭취 12주 후 피부보습개선효과가 대조군에 비해 시험군이 통계적으로 유의한 수준 ( $p < 0.05$ )으로 개선 시키는 것으로 나타났다. 피부 주름 개선 효능에 있어서는 안전성 평가 결과, 이상반응을 경험한 피험자의 보고는 없었고, 포스파티딜세린과 식물세라마이드 눈가 주름 및 피부 보습 개선에 효과가 있는 소재라고 판단할 수 있었다.

### 2. 성과 활용 계획

상기 두가지 소재에 있어서 임상에 이용했던 유효 dosage로 비교해 본 경제성 평가로 볼 때 식물 세라마이드의 가격은 10%로 400만원/kg 수준이며 PS의 경우 20%함량의 제품은 30만원/kg 수준이 된다. 임상 시 사용한 dosage는 대두 유래 당 세라마이드의 경우 하루 30mg 섭취, PS의 경우 하루 300mg 섭취가 기준이었다. 따라서 유효 dosage로 볼 때 단순히 원료비만으로 비교해보면 대두 유래 당세라마이드의 가격은 대두 포스파티딜세린에 비해 3배에 달하게 된다. 보습 및 주름 개선 효능에 있어서 비슷한 효능을 나타내고 있는 바 대두 포스파티딜세린의 피부 효능 claim을 식약청으로부터 인정 받고 사업화하는 것이 더 타당해 보인다. 특히 대두 포스파티딜세린은 이미 “노화로 인한 인지 능력 저하 개선”으로 식약청에서 뇌기능으로 인정 받은 소재이고 두산은 이미 포스파티딜세린의 대량 생산 체제를 갖추고 있고 있는 바 식약청에서 기능성을 추가로 얻을 경우 피부 관련 시장에도 진입하기 용이할 것으로 판단된다.

따라서 임상 관련 자료를 취합하여 식약청에 제출하여 피부 보습 및 주름 개선 건강 기능 식품 소재로 인증 받는 절차를 밟을 예정이다.

## SUMMARY

Plant ceramide and soy phosphatidylserine were selected as the physiologically active lipids for the improvement of skin beauty and skin health. Rice bran, soy bean gum, and soy bean curd were evaluated as raw materials for sugar-ceramide. Among them, soy bean gum was the most suitable source as a raw material in terms of yield and availability. Optimization for the production of sugar ceramide was performed from soy bean gum and the soy ceramide 40% was produced as a pilot test. We analyzed the structure of the GlcCer using FAB-Mass spectrometry. The GlcCer used in this study was comprised primarily of ceramide with 4,8-sphingadiene (d18:2) and alpha-hydroxypalmitic. Solubilization formula for nano sized emulsion of soy ceramide was studied for the application into beverage in addition to powder type product.

In addition to plant ceramide from soy, production of lecithin from soy bean gum was tried as a raw material for the synthesis of phosphatidylserine using enzyme. As a result, phosphatidylserine 40% could be produced from the lecithin.

We evaluated the effect of ceramide and phosphatidylserine (PS), made from agricultural by-products, on skin health improvement in terms of whitening, wrinkle improvement, moisturization and so on. To test the whitening effect of ceramide and PS *in vitro*, the inhibitory effect of ceramide and PS against melanin formation and tyrosinase activity in melanoma cell line, B16F10. Though there was no dose-dependent activity, ceramide showed higher inhibitory effect on melanin biosynthesis compared to positive control, arbutin. The tyrosinase activity was also inhibited by 17.2% and 17.6% at the level of 1 and 2.5  $\mu\text{g/mL}$  of ceramide, respectively, demonstrating that ceramide has higher inhibitory effect against tyrosinase compared to positive control, kojic acid at the same dose level. To dissect the mechanism of melanin biosynthesis inhibition by ceramide, we measured the protein level of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in melanoma cell line, B16F10 on Western blotting analysis, resulting that TRP-2 level was not affected but the level of tyrosinase and TRP-1 was reduced by ceramide treatment. On the other hand, PS showed relatively less whitening effect compared to ceramide.

The anti-wrinkle effect of ceramide and PS *in vitro* was evaluated by analysing collagen synthesis, and the expression level of MMP-1, MAPKs and AP-1 after treating ceramide and PS to human dermal fibroblast. PS increased the collagen biosynthesis compared to control. At the level of 10  $\mu\text{g/mL}$ , PS greatly decreased MMP-1 expression level activated by UVB irradiation on the Western Blot. To investigate the affected signaling pathway by PS resulting in MMP-1 down-regulation, the inhibitory effect of PS

on phosphorylation of MAPKs (JNK, ERK, P38) was analyzed on the Western blot. The results showed that PS could dose-dependently reduce phosphorylation on all kinds of MAPKs which was drastically increased by UVB irradiation, and the phosphorylation on ERK was the most greatly inhibited by PS. The inhibitory effect of PS on AP-1 activation by UVB was also analyzed by measuring the expression level of c-Jun and c-Fos on the Western Blot, showing similar result with MAPKs study. Ceramide also showed the similar anti-wrinkle effect compared to PS by greatly increasing the collagen biosynthesis.

The effect of long-term oral administration of ceramide and PS on wrinkle formation by UV irradiation was investigated in hairless mouse model. At week 10, the skin moisture content of PS group was significantly increased by  $56.3 \pm 7.6 \sim 72.1 \pm 4.2\%$  of normal control group, while that of UV control group was decreased by  $40.0 \pm 5.0\%$  of normal control group. The skin thickness of PS group was also significantly decreased compared to that of UV control group while UV control group showed increased skin thickness compared to normal control group. Moreover, PS group showed reduced wrinkle depth and much less wrinkle number, unlike UV control group showing deepened wrinkle depth and increased wrinkle number compared to normal control group. The wrinkle area of UV control group was  $123.8 \pm 12.6 \text{ mm}^2$ , which was significantly increased that of normal control group,  $53.5 \pm 7.5 \text{ mm}^2$ . However, the wrinkle area of PS group was  $67.0 \pm 2.5 \sim 83.3 \pm 15.3 \text{ mm}^2$ , showing great decreased compared to that of UV control group. In the histopathological analysis, the thickness of epidermis and dermis was observed to be increased in UV control group compared to that in normal control group. However, the thickness of epidermis and dermis in PS group was dramatically decreased in dose dependent manner. Therefore, the results suggest that long-term oral administration of PS may promote skin barrier function as well as bring improvement in wrinkle formation and elasticity decrease induced by structural damage of skin tissue on UV exposure. In case of ceramide, the skin moisture content of ceramide group was increased by  $60.5 \pm 8.9 \sim 78.6 \pm 7.1\%$  of normal control group, while that of UV control group was decreased by  $63.2 \pm 7.3\%$  of normal control group. The skin thickness of ceramide group was also significantly decreased compared to that of UV control group while UV control group showed increased skin thickness compared to normal control group. The wrinkle area of UV control group was  $32.7 \text{ mm}^2$ , which was significantly increased that of normal control group,  $18.3 \text{ mm}^2$ . However, the wrinkle area of ceramide group was  $16.2 \sim 29.6 \text{ mm}^2$ , showing great decreased compared to that of UV control group. In the histopathological analysis, it was observed that the epidermis thickness was increased and collagen content was decreased in UV control group compared to that in normal control group. However, the epidermis thickness was decreased

and collagen content was increased in ceramide group in dose dependent manner.

In this study, we investigated the effect of oral administration of PS and ceramide on skin moisturizing using hairless mouse. In control group, tape stripping (TS) induced acute increase of transepidermal water loss (TEWL) which was slowly recovered later. On the other hand, ceramide and PS group showed lower damage on skin barrier resulting in lower TEWL value after TS application. Especially, low-dose ceramide group showed persistent increase in recovery rate as well as lower skin damage. Moreover, histopathological study using H&E staining revealed that the epidermis thickness was recovered as thin as that of normal control group by oral administration of ceramide and PS, which was increased in TS control group compared to normal control group. Therefore, it is suggested that oral administration of ceramide and PS may effectively prevent and/or recover skin from sensitization or skin barrier damage.

We also evaluated the anti-inflammatory effect of glucosylceramide (GlcCer) and phosphatidylserine (PS), made from agricultural by-products, *in vitro* and *in vivo*. First of all, the effects of GlcCer on the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in LPS-stimulated RAW264.7. Treatment with GlcCer alone or with LPS did not cause any significant cell viability change, indicating that GlcCer was non-cytotoxic to RAW 264.7 upto 100  $\mu$ g/ml. Exposure of RAW264.7 to LPS (1  $\mu$ g/ml) increased their release of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , which was significantly inhibited by GlcCer in a dose-dependent manner. Although PS also inhibited IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , PS showed relatively less effect compared to GlcCer. GlcCer significantly inhibited MMP-1 as well as proinflammatory mediators such as IL-6, IL-8 and PGE2 in a dose-dependent manner in IL-1 $\beta$ -stimulated RA-FLS. On the other hand, PS showed relatively less effect compared to GlcCer. Next, to test the whitening effect of ceramide and PS *in vitro*, we investigated the effects of GlcCer and PS on proliferation, cell migration, and tube formation in BAEC. Both GlcCer and PS had no effects on proliferation, cell migration, and tube formation.

The analgesic and antiarthritic activities of GlcCer were investigated in rat models of carrageenan-induced arthritis by measuring weight distribution ratio and knee circumference. In WDR test, before the carrageenan injection (day 0), the mean WDR did not differ significantly among the experimental groups (the WDR was 50:50, thus controls carried 50% of the weight on each hind paw). However, significant changes in the ratio were observed on day 1 after the carrageenan injection, and the weight carried by the affected leg in the vehicle-treated arthritic group reached 20%. Distinct increase of WDR was observed in groups that received GlcCer. Reduction in knee circumference

demonstrated that oral GlcCer administration suppressed the carrageenan-induced edema. Histological staining showed that GlcCer significantly reduced the inflammatory area and the infiltration of inflammatory cells in the arthritic joints. PS also showed the similar anti-arthritic effect compared to GlcCer.

To investigate anti-atopic effects of GlcCer, we used chronic mouse model of trimellitic anhydride (TMA)-induced atopic dermatitis (AD). Chronic (repeated) TMA treatment on the dorsum of both ears caused typical morphological changes of the inflamed skin such as erythema, scarring/dryness, and erosion, which was significantly inhibited by GlcCer. Also, GlcCer inhibited the strong cutaneous cell infiltration into the inflamed ear. Furthermore, GlcCer also significantly reduced the levels of mRNA of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-4 increased in TMA-applied mouse ears and lymph node. On the other hand, PS showed relatively less effect compared to GlcCer.

In another animal model for inflammatory skin disease, mouse model of oxazolone-induced contact hypersensitivity, GlcCer significantly inhibited typical morphological changes of the inflamed skin, such as erythema, scarring/dryness, and erosion, and strong cutaneous cell infiltration into the inflamed ear. In oxazolone-induced ICD mice, GlcCer significantly inhibited irritant-related scratching behavior and dehydration of the stratum corneum, and decreased aquaporin-3 expression.

Overall, GlcCer and PS has antinflammatory effect in vitro and in vivo, suggesting that they can improve chronic and inflammatory diseases such as arthritis, atopy and contact dermatitis.

Human clinical test for the efficacy evaluation of moisturizing activity and anti-wrinkle activity of soy ceramide and phosphatidylserine was performed.

A placebo-controlled double-blind ingestion study of a soft capsule type dietary supplement containing soy-derived ceramide and soy phosphatidylserine was performed in 103 normal subjects by 12 week ingestion test, and the following results were obtained: (1) Dermatological diagnosis by physicians and by instrumental analysis showed that the supplement significantly improves anti-wrinkle activity.

(2) On measurement of water content in the skin, the supplement was shown to significantly increase the water content in the skin. The above findings showed that 3 months ingestion of a supplement soy-derived ceramide and phosphatidylserine are effective in moisture-retention and anti-wrinkle activity, and thus, is an effective skin-beautifying food.

# CONTENTS

Summary .....	2
1. Research Outline .....	16
2. Current State of Domestic and Foreign Technologies .....	16
3. Experiments and Results	
<The 1 <sup>st</sup> subject>	
I. Plant ceramide .....	19
1. Screening of ceramide source from agricultural by-products .....	19
2. Establishment of HPLC analysis method for the quantification of plant ceramide .....	21
3. Establishment of extraction and purification method for plant ceramide production .....	25
4. Optimization for the mass production of plant ceramide .....	27
5. Eluciation of structure of soy ceramide .....	28
6. Development of nano-emulsion formula of soy ceramide .....	31
7. Stability test for nano-emulsion of soy ceramide .....	36
II. Production of lecithin from soy bean gum was tried as a raw material for the synthesis of phosphatidylserine using enzyme .....	42
III. Human clinical test for the efficacy evaluation of moisturizing activity and anti-wrinkle activity of soy ceramide and phosphatidylserine .....	46
1. Preparation of materials for human clinical test and test methods for moisturizing effect and anti-wrinkle activity .....	46
2. Human clinical test result for anti-wrinkle activity .....	51
3. Human clinical test result for moisturizing activity .....	55
4. Conclusions for human clinical tests .....	57
<The 1 <sup>st</sup> cooperation subject>	
1. Methods of <i>in vitro</i> whitening efficacy of bioactive lipids .....	59
2. Methods of <i>in vitro</i> anti-wrinkle efficacy of bioactive lipids .....	60
3. Methods of <i>in vivo</i> anti-wrinkle efficacy of bioactive lipids .....	65

4. Methods of <i>in vivo</i> moisturizing efficacy of bioactive lipids .....	67
5. Results of <i>in vitro</i> whitening efficacy of bioactive lipids .....	70
6. Results of <i>in vitro</i> anti-wrinkle efficacy of bioactive lipids .....	74
7. Results of anti-wrinkle efficacy of bioactive lipids .....	88
8. Results of <i>in vivo</i> moisturizing efficacy of bioactive lipids .....	100

<The 2<sup>nd</sup> cooperation subject>

I. Anti-inflammation effect of plant ceramide using <i>in vitro</i> system .....	105
1. Evaluation of anti-inflammation effect of plant ceramide using RAW264.7 .....	105
2. Evaluation of anti-inflammation effect of soy ceramide using fibroblast-like synoviocyte (FLS) .....	107
3. Evaluation of anti-angiogenic effects of soy ceramide using Bovine Aortic Endothelial Cell (BAEC) .....	108
II. Anti-inflammation effect of plant ceramide using <i>in vivo</i> system .....	110
1. Evaluation of anti-inflammatory and anti-arthritic effects of soy ceramide using <i>in vivo</i> model .....	110
2. Evaluation of anti-atopic effects of soy ceramide <i>in vivo</i> model .....	111
3. Evaluation of beneficial effects in mouse oxazolone-induced contact hypersensitivity. ....	114
4. Evaluation of anti-inflammatory and anti-arthritic effects of soy phosphatidylserine .....	116
5. Evaluation of anti-atopic effects of soy phosphatidylserine by <i>in vivo</i> model .....	117
<b>4. Accomplishment of objects and contribution for the related fields .....</b>	<b>119</b>
<b>5. Outcomes and applications of the results .....</b>	<b>122</b>



# 목 차

요 약 문 .....	2
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	16
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	16
1. 국내 피부 관련 제품 시장 상황 .....	16
2. 국외 제품생산 및 시장 현황 .....	17
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	19
< 제1세부과제 >	
I. 식물 세라마이드 .....	19
1. 농산 부산물로부터 생리활성 지질류의 탐색 .....	19
2. HPLC에 의한 식물 세라마이드의 정량법 확립 .....	21
3. 농산 부산물로부터 식물세라마이드 생산을 위한 분리 정제 공정의 수립 .....	25
4. 식물 세라마이드의 대량생산 .....	27
5. 식물세라마이드의 구조 분석 .....	28
6. 식물 세라마이드 함유 지질류의 유화액 개발 .....	31
7. 유화액 저장안정성 테스트 .....	36
8. 음료적용 저장안정성 테스트 .....	38
9. 식물세라마이드의 보습 효능 간이 임상실험 .....	39
II. 대두검질로부터 인지질의 제조 및 이를 활용한 포스파티딜세린의 생산 .....	42
III. 당세라마이드 함유 대두 추출물 및 대두 포스파티딜세린의 피부 보습 및 주름 개선 효능 인체 적용 시험 .....	46
1. 인체적용 시험용 건강기능식품의 제조 및 인체적용 검사 항목 및 관찰 검사 방법 .....	46
2. 주름 개선능 인체적용 유효성 평가결과 .....	51
3. 보습 개선능 인체적용 유효성 평가결과 .....	55
4. 유효성에 대한 최종결론 .....	57
<제1협동과제 >	
1. 생리활성지질의 미백 효능 in vitro assay 방법 .....	59
2. 생리활성지질의 주름개선 효능 in vitro assay 방법 .....	60
3. 생리활성지질의 주름개선 효능 in vivo assay 방법 .....	65
4. 생리활성지질의 보습 효능 in vivo assay 방법 .....	67

5.. 생리활성지질의 미백 효능 in vitro assay 결과 .....	70
6. 생리활성지질의 주름개선 효능 in vitro assay 결과 .....	74
7. 생리활성지질의 주름개선 효능 in vivo assay 결과 .....	88
8. 생리활성지질의 보습 효능 in vivo assay 결과 .....	100

<제2협동과제>

I. In vitro system을 이용한 항염증 효과 분석 .....	105
1. RAW264.7 대식세포주에서 당세라마이드의 항염증 효과 .....	105
2. 류마티스 환자 유래 fibroblast-like synoviocyte (FLS)에서 당세라마이드의 항염증 효과 .....	107
3. Bovine Aortic Endothelial Cell (BAEC)에서 angiogenesis에 대한 당세라마이드의 효과 .....	108
II. In vivo 동물모델을 이용한 항염증 효과 분석 .....	110
1. 관절염 동물 모델에서 당세라마이드의 항관절염 및 항진통 효과 .....	110
2. 아토피성 피부염 동물 모델에서 당세라마이드의 항아토피성 효과 .....	111
3. 습진성 피부염 동물 모델에서 당세라마이드의 효능 분석 .....	114
4. 관절염 동물 모델에서 대두 유래 phosphatidylserine (PS)의 항관절염 및 항진통 효과 .....	116
5. 아토피성 피부염 동물 모델에서 PS의 항아토피 효과 .....	117
제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	119
제 5 장    연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	122

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

쌀과 콩 등의 부산물 (미강, 비지 등)로부터 회수할 수 있는 인지리 함유 검류 및 당세라 마이드를 비롯한 생리활성 지질의 경구투여에 의한 피부건강 기능개선 및 항염증, 염증성 피부질환 치료 효능을 분석하고 그 작용기전을 규명하고자 함. 이를 통해 미백, 주름개선, 습진 및 아토피 치료 효능을 갖는 생리활성지질을 탐색하고 기능성 미용식품 소재로서 개발하고자 함. 또한 인체를 대상으로 한 연구에서도 동일한 결과를 낼 수 있는지 확인하고 그 소재를 농산부산물 유래로 하여 대량 생산을 통해 기능성 식품 소재를 개발하고자 하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 국내 피부 관련 제품 시장 상황

국내는 2006년부터 먹는 화장품이란 개념이 활성화되기 시작했으며 콜라겐, 포도씨추출물, 석류추출물, 베타카로틴 등의 천연성분과 항산화제 등이 포함된 제품이 주류를 이룸. 2007년도엔 국내 최초 식약청인증 개별인정형 미용건강기능식품(복합물)인 “L-스킨케어”가 LG생활건강에 의해 개발되어 시판 중에 있음.

이외에 건강기능식품으로서 피부관련 health claim을 가진 제품으로는 화분제품, 스쿠알렌 함유제품, 엽록소함유제품, 알로에제품, 베타카로틴함유제품 등이 있음. 이들은 단순히 피부건강에 도움이 된다는 정도로 소구하고 있으나 다른 기능도 동시에 소구하므로 꼭 피부미용을 위한 제품으로 분류하기는 어렵다고 판단됨. 2004년도 수입현황으로 보면 이들이 차지하는 비율은 대략 13% 정도를 차지하고 있음.

최근 화장품 업체를 중심으로 뷰티푸드에 대한 시장개척이 활발히 진행되고 있으며 시중에 나와있는 제품으로는 V=B, 뷰트리, 멜라케어, 페어웰 링클라인 등이 있음. 또한 식품 업체들도 비타민, 콜라겐, 히아루론산, 그리고 글루코사민 등을 함유한 제품으로 뷰티푸드 전략을 구사하고 있음. 그러나 이들 미용식품은 현재 표시광고의 한계로 인하여 시장 확장에는 많은 난관이 있어 보임.

피부 관련하여서 health claim이 가능한 개별인정형 소재로서 히알루론산, N-아세틸글루코사민 및 곤약추출물이 피부 보습에 도움을 주는 효능이 현재 국내에서 인정되어 있음. 피부 미용 용도로 판매되고 있는 소재는 거의 없는 상태임. [식품과학과 산업 vol 40(4) 31-39]

이는 아직 시장이 성숙되지 않았다는 증거이며 한 예로 대기업이 출시한 콜라겐 함유 미용식품의 경우, 맛의 문제와 기능성 표시의 불가 등으로 인해 시장에서의 안착에 성공하지 못하였음. 현재 식약청에서 인정되고 있는 피부 관련 기능성도 피부 보습 정도에 국한되고 있음.

## 2. 국외 제품생산 및 시장 현황

### 세계시장

2008년 기준, 약 10억 달러규모의 세계시장이 형성되어 있으며 향후 5년 이내 두배 이상 증가할 것으로 전망됨 [2008년 연례보고서, Kline & Company]

### 북미, 유럽시장

경구섭취를 하는 기능성 미용 식품 시장은 유럽의 경우 주요. 국가별로 살펴보면 스웨덴의 경우 1,300만불 (9% 성장)이고 프랑스는 2억 2,300만불 (7% 성장)로 다양하게 구성되어 있다. 미국시장은 7억4,000만 불로 약 10%의 성장률이 예상되고 있다. 2000년 이후 매년 두자리수 이상의 시장 성장. 음료형태의 제품이 주종을 이루며 캔디, 초콜릿, 알약 형태의 제품들이 있음. 주름방지, 자외선차단, 미백, 항 콜레스테롤, 항비만 등의 기능성에 초점을 맞춤.

### 일본시장

일본 시장을 구체적으로 보면 피부 미용 시장의 소재가 약 100억엔 (한화 1500억원) 정도 시장이 있는 것으로 파악되고 있으며 2005년 현재 완제 시장으로 1220억엔 정도의 피부 미용 시장이 형성되고 있다. [후지경제 2004년 보고서] 이 중 콜라겐이 차지하는 비율이 가장 크다. 일본의 경우 국내와는 달리 상대적으로 기능성 주장 및 광고 등에 있어서 비교적 자유롭기 때문에 피부 미용에 관한 기능성식품이 많이 보편화되어 있다.

식물계 미용소재로서 세라마이드가 함유된 소맥추출물, 쌀 추출물, 구약나물 추출물이 개발되어 미용식품으로의 이용 전개가 시작되고 있다. 일본유지(日本油脂)의 글루코실세라마이드 4% 함유제품 「닛산N-세라마이드」는 식용으로 개발된 소맥 세라마이드 소재로 피부미용 효과를 강조하는 다양한 제품에 이용되고 있다. 주로 외용(도포) 용도로 사용되고 있으며 식품에서도 높은 활용도를 자랑한다.

오리자유화가 판매하는 쌀 유래의 세라마이드에 대한 이용도 활발해지고 있다. 이 회사에서는 4년 전 세라마이드 함량 3%, 6%의 엑스 분말을 개발, 판매를 시작했으며 최근 미용식품 붐의 영향으로 서플리먼트와 음료 소재로의 이용이 급증하고 있다. 주로 콜라겐, 비타민 C와의 조합과 히알루론산, 글루코사민과의 조합으로 이용되고 있다.

일본제분(日本製粉)에서는 쌀 배아·쌀겨 유래의 「닛폰 세라마이드 RPS」를 판매하고 있다. RPS는 백색 무색의 분말로 글루코실세라마이드를 6% 이상 함유하고 있다. 유니티카(UNITIKA) 생활건강 사업부가 판매하는 세라마이드 소재는 글루코만난 유래 제품이다. 글루코실세라마이드 함량 3%의 분말타입과 0.3% 유화액을 구비하고 있다.

식물 세라마이드의 경우 그 효능을 나타내는 유효 농도로 하루 1.2mg 섭취로 피부 보습 등의

효능을 갖는다고 설명하고 있으며 이러한 미량의 농도로 어떻게 피부 보습을 촉진할 수 있는지에 대해서는 아직도 의문점으로 남아 있으며 규명되지 않아 있다. 그리고 보습 효능 등의 효능 data의 원료로서 당 세라마이드 순도가 매우 낮은 1, 2, 5 % 수준의 함량의 제품을 이용한 기업 내부 data 들이 대부분이며 보습 이외의 피부 관련 작용은 SCI 급의 공신력이 있는 문헌으로 거의 보고 되고 있지 못한 것이 현실이다.

일본에서의 식물 세라마이드의 시장 가격은 대체로 1% 제품의 kg당 45,000~50,000 YEN을 형성하고 있다. 원료로서 매우 높은 가격이나 2002년 본격화되어 2006년 현재 소재로만 15억엔(한화 225억원)의 매출을 형성하고 있다 [후지경제 생물유래 유용성분 소재 시장 철저조사 2006]

### 국내외 관련분야 환경변화

국내는 2006년부터 먹는 화장품이란 개념이 활성화되기 시작했으며 콜라겐, 포도씨추출물, 식류추출물, 베타카로틴 등의 천연성분과 항산화제 등이 포함된 제품이 주류를 이룸. 2007년도엔 국내 최초 식약청인증 개별인정형 미용건강기능식품(복합물)인 “L-스킨케어”가 LG생활건강에 의해 개발되어 시판 중에 있음.

최근 화장품 업체를 중심으로 뷰티푸드에 대한 시장개척이 활발히 진행되고 있으며 시중에 나와 있는 제품으로는 V=B, 뷰트리, 멜라케어, 페어웰 링클라인 등이 있음. 또한 식품업체들도 비타민, 콜라겐, 히알루론산, 그리고 글루코사민 등을 함유한 제품으로 뷰티푸드 전략을 구사하고 있음.

피부 관련하여서 health claim이 가능한 개별인정형 소재로서 히알루론산, N-아세틸글루코사민 및 곤약추출물이 피부 보습에 도움을 주는 효능이 현재 국내에서 인정되어 있음.

또한 2010년부터 CJ사의 히알루론산 함유 제품인 “이너비” 라는 보습 관련 건강 기능식품의 시장이 확대되는 현상이 나타 났으며 점차로 시장의 확대가 되고 있음.

보습 관련 이외에 주름 개선에 관련된 시장은 매우 큰 잠재력을 가지고 있으며 피부 미용 관련하여 보습보다 훨씬 더 큰 시장을 형성할 수 있다고 할 수 있다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### <제1세부과제>

제 1 세부 과제에서는 1차 년도에서 당세라마이드 당지질 및 PS, PA, LPA 등을 함유하는 농산물 및 농산부산물을 확보하고 타겟 소재의 함량 조사하고 이들의 고순도 분리·정제 방법의 확립하고 효능이 확인된 후보 물질의 대량 생산법 개발 및 이의 대량 생산의 경제성을 검토하는 것을 목표로 하였다.

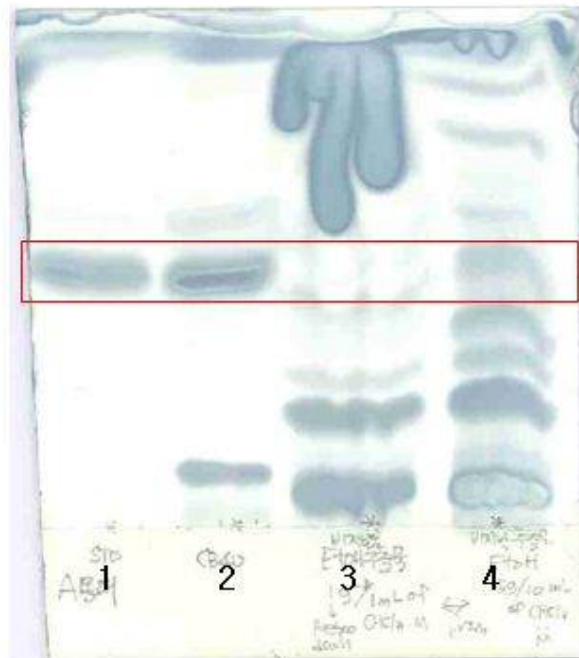
농산 부산물로서 비지박과 대두유 부산물인 대두검(gum), 미강박 등을 검토하였다.

### I. 식물 세라마이드

#### 1. 농산 부산물로부터 생리활성 지질류의 탐색.

가. TLC에 의한 부산물로부터 지질의 추출 및 식물 세라마이드 함유 확인

비지박, 대두유검 (조레시틴), 미강박 등 각 농산 부산물들을 클로로포름/메탄올 혼합 용액을 이용하여 원료의 10배가 되도록 용매를 가하여 40도에서 2회 추출하고 감압 농축한 후에 아세톤 처리를 통해 대부분의 중성 지질을 제거한 후 침전물을 TLC법으로 식물

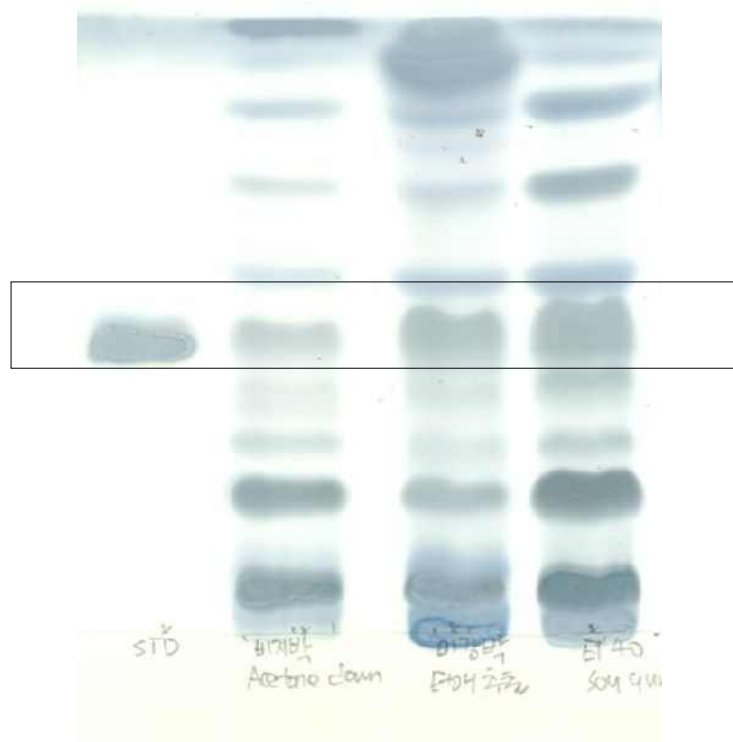


1. CB standard
2. CB 40%
3. 비지박 추출물(CHCl<sub>3</sub>:MeOH)
4. 비지박 추출물(EtOH)-1g acetone down

세라마이드 함량을 확인하였다. TLC (chloroform:acetone: MeOH:Acetic acid: water = 50:20:10:10:2)로 확인하였다.

나. 비지박 주정 추출물 및 아세톤 처리 침전물

비지박을 95% 주정으로 추출한 후 추출액을 농축하고 아세톤으로 중성 지질을 제거한 후의 침전물을 TLC 분석하였으며 글루코실 세라마이드의 존재를 확인 할 수 있었다.



다. 대두gum (조레스틴) 및 미강유박으로부터 식물세라마이드 확인

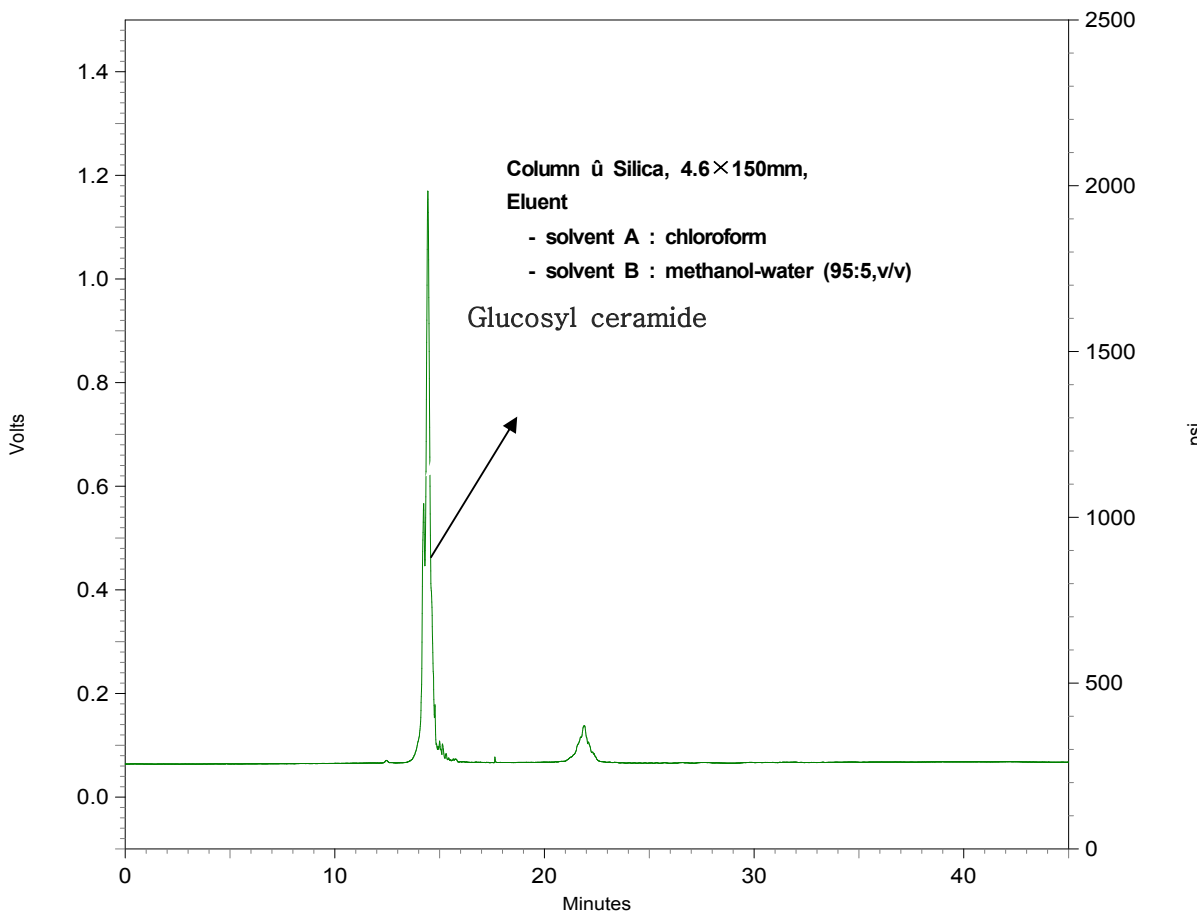
대두검 및 비지박을 각각 아세톤 처리하여 중성 지질을 없앤 후, 그리고 미강박의 경우는 주정 추출물을 TLC를 통해 식물 세라마이드 함유 여부를 확인 하였다. 각 부산물은 모두 식물 세라마이드를 함유 하고 있음을 정성적으로 파악하였으며 이들로부터 식물 세라마이드가 어느 정도 함유 되어 있는지를 조사하기 위해 HPLC 분석을 시도하였다.

## 2. HPLC에 의한 식물 세라마이드의 정량법 확립

식물 세라마이드의 주성분인 글루코실세라마이드의 정량을 위해 HPLC 분석법을 수립하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다.

- 1) column - Inertsil Sil 100-5, 4.6×150mm, GL
- 2) 분리용매  
solvent A : chloroform  
solvent B : methanol-water (95:5,v/v)
- 3) time program

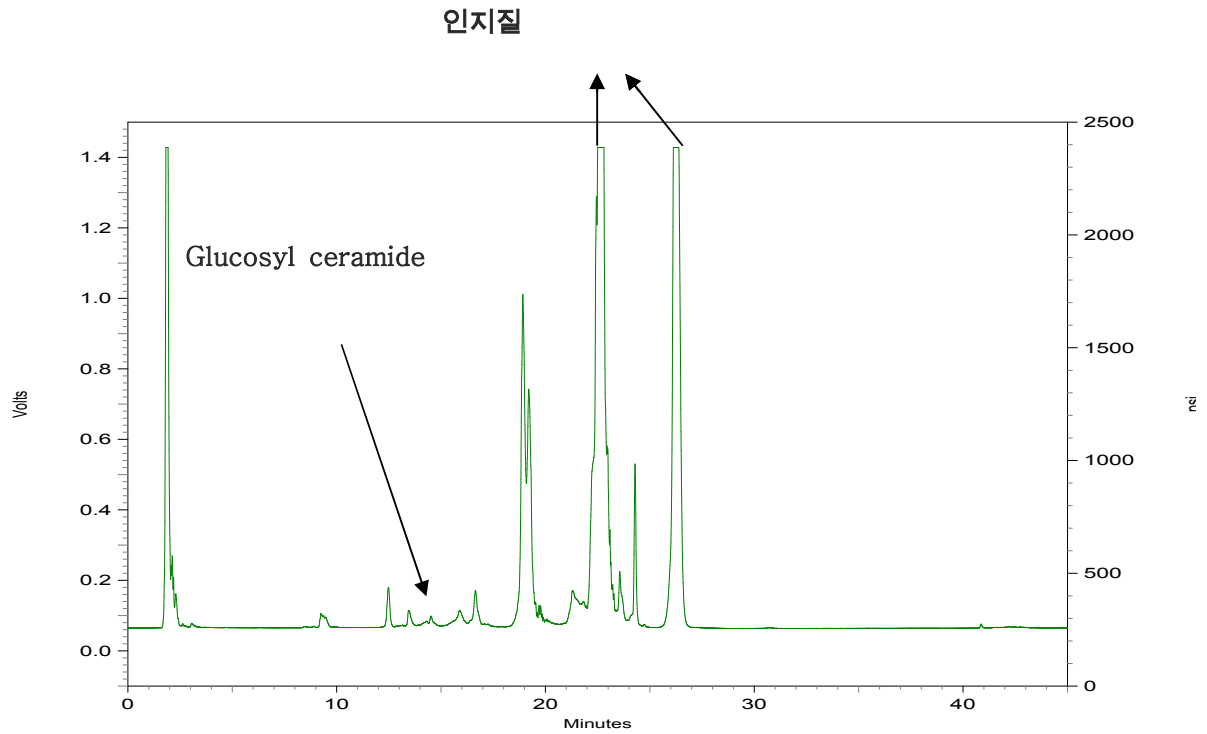
Time(min)	A(%)	B(%)
0	99	1
15	75	25
20	10	90
25	99	1



Glucosyl ceramide peak in HPLC chromatogram



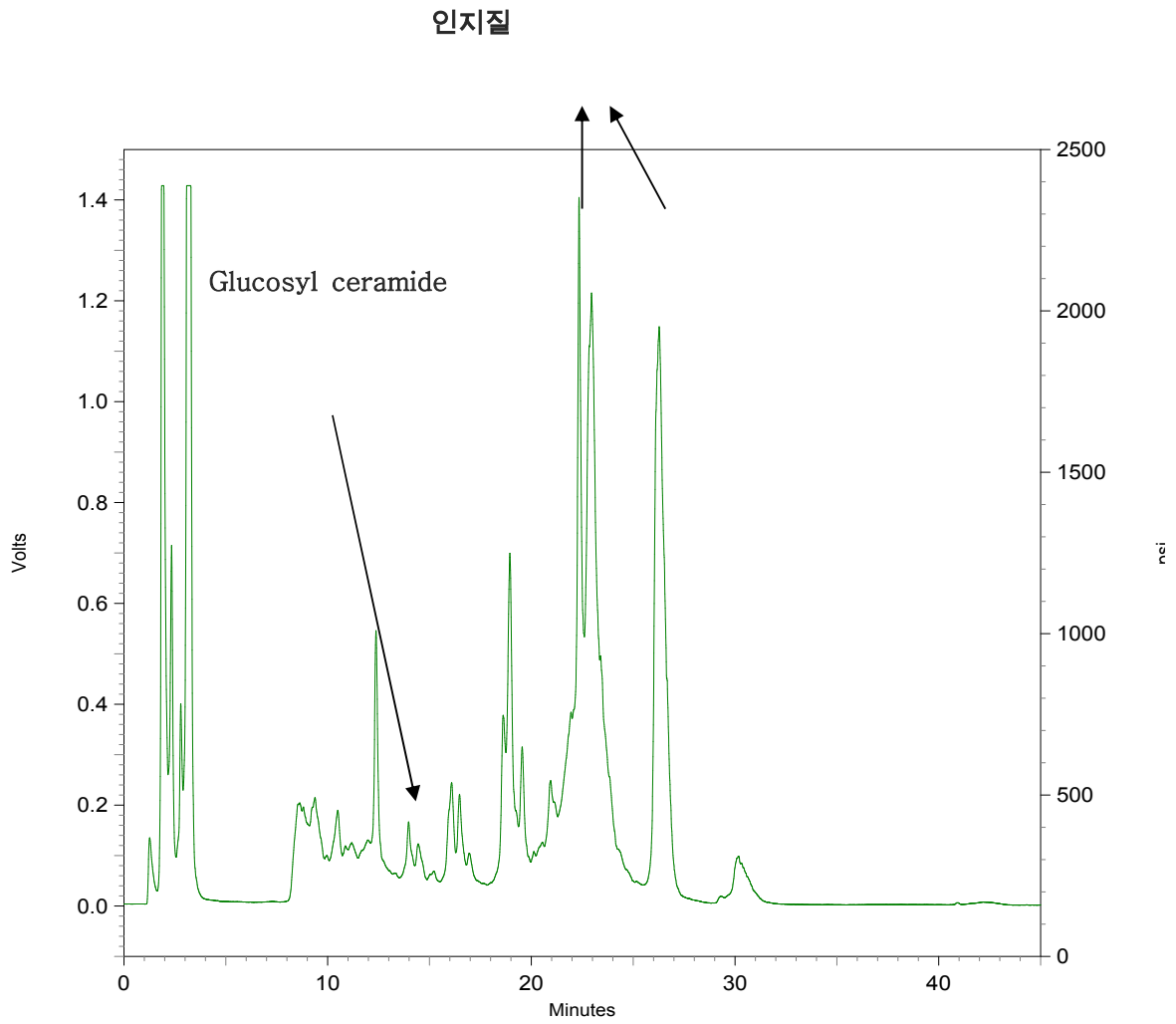
가. 비지박 아세톤 처리 침전물의 HPLC 분석



**비지박 추출물  
(수율 15%)**

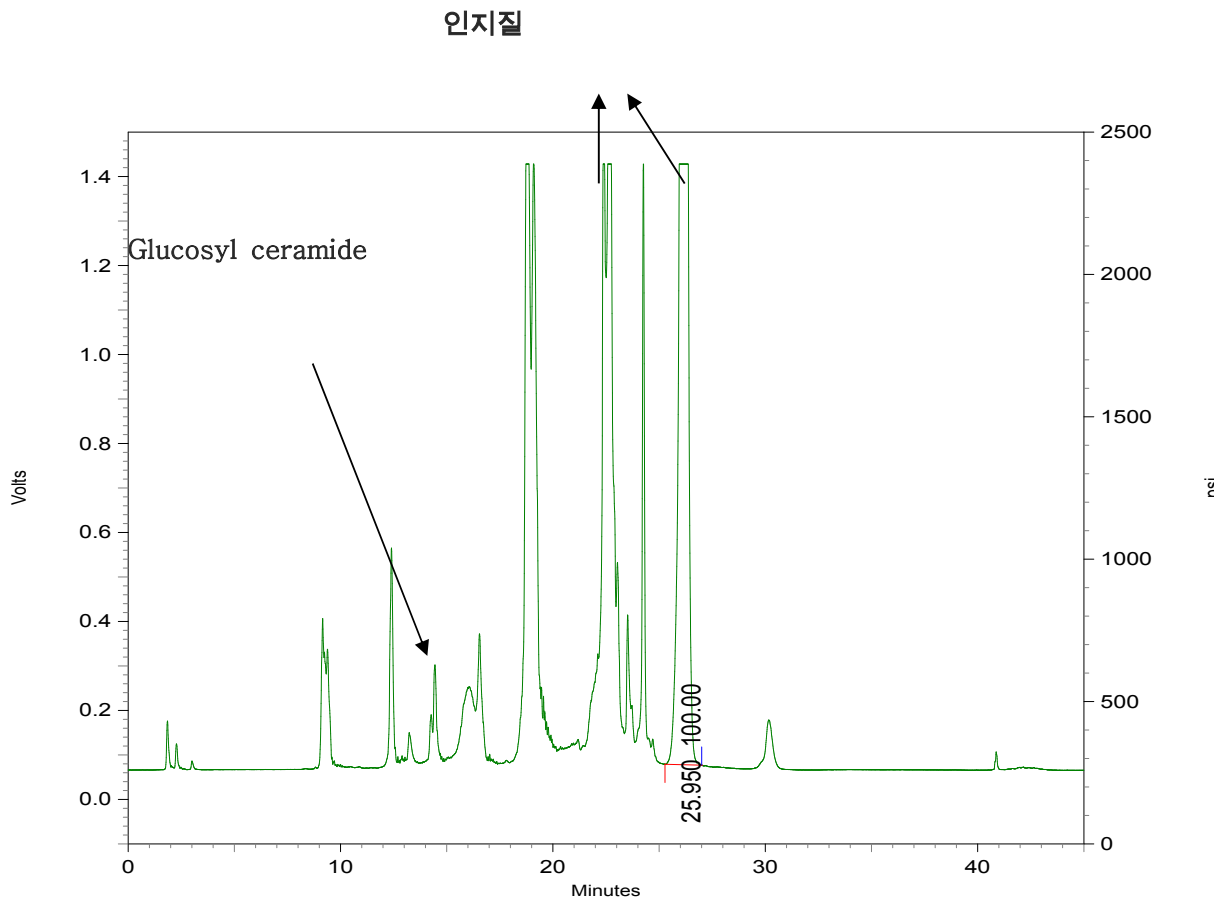
비지박의 경우 대부분 중성지질로 이루어져있고 이 중성 지질을 제거한 후의 아세톤 침전물을 HPLC를 통하여 분석한 결과 대부분이 인지질로 이루어져있는 것이 확인되었다. HPLC 분석 결과 중성지질을 제거한 후의 글루코실 세라마이드 함량은 0.1% 미만으로 극히 작은 양을 함유하고 있어 식물 세라마이드 원료로서는 부적합하였다.

나. 미강박 추출물의 HPLC 분석



미강박에서 주정으로 추출한 경우 수율은 10.5% 수준에서 식물 세라마이드의 함량을 측정하여 본 결과 0.5% 수준으로 함유하고 있는 것으로 판단되었다.

다. 대두유 gum 아세톤 처리 분말의 HPLC 분석



대두유검의 아세톤 분말의 경우는 0.5~1% 수준의 글루코실 세라마이드를 함유하고 있음을 확인 할 수 있었다. 세가지 부산물중에서 가장 얻기 쉬운 대두유검으로부터 식물 세라마이드를 제조 공정을 수립하는 것이 가장 적합 한 것으로 판단하였다.

### 3. 농산 부산물로부터 식물세라마이드 생산을 위한 분리 정제 공정의 수립

비지박, 미강박, 대두유검 원료들로부터 식물세라마이드 함량을 검토한 결과 우선적으로 대두유 검으로부터 생산하는 것이 비교적 가장 경제적인 것으로 판단하여 대두유 검으로부터 우선 식품 또는 식품 첨가물로 사용 가능한 유기용매를 사용하여 생리활성 지질을 추출할 수 있는 조건을 수립하고자 하였다.

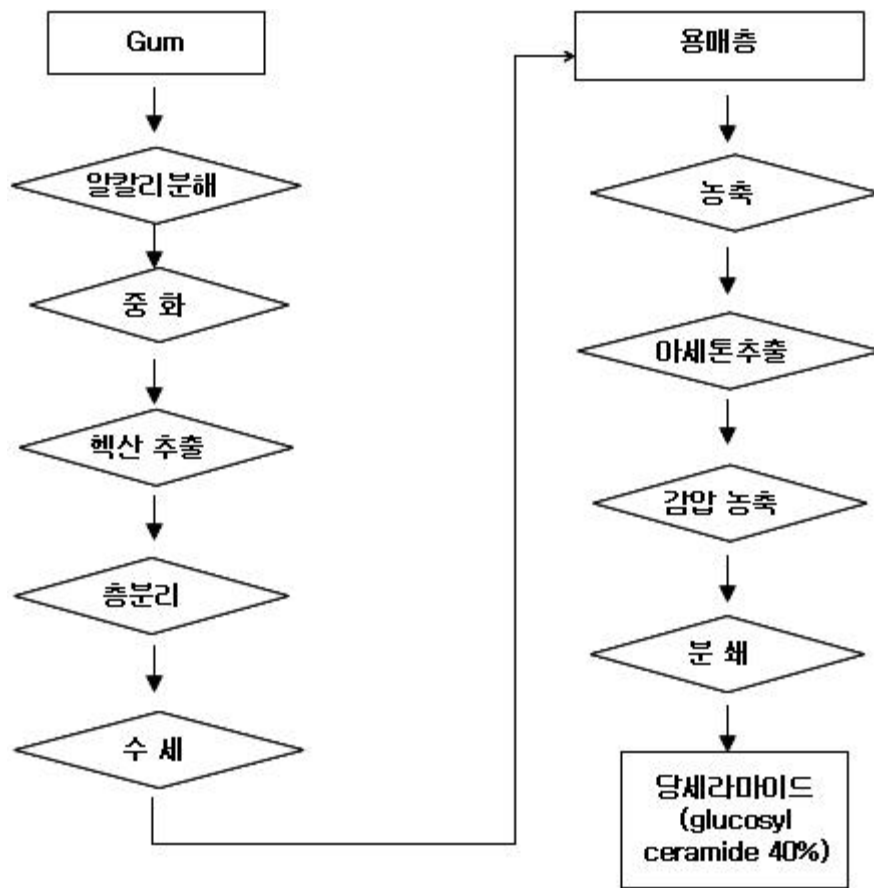


Fig 식물 세라마이드 생산 공정도

우선 원료의 10배의 90% 주정으로 완전히 비누화가 될 수 있도록 충분히 NaOH를 넣고 60도에서 8시간 반응을 한다. 이렇게 하여 완전히 비누화 반응이 되어 중성지질 및 인지질이 모두 알칼리가수분해된 것을 TLC로 확인 한 후 HCl로 중화 한 후 농축하고 헥산과 물을 넣고 추출한다. 이후 정지를 하여 상분리가 되도록 한 후 하층부를 제거하여 물에 용해되는 극성 물질들을 모두 제거한 후 헥산층을 농축하고 이 농축물에 아세톤을 가하여 지방산을 제거한 후 여과하여 잔사를 취한다.

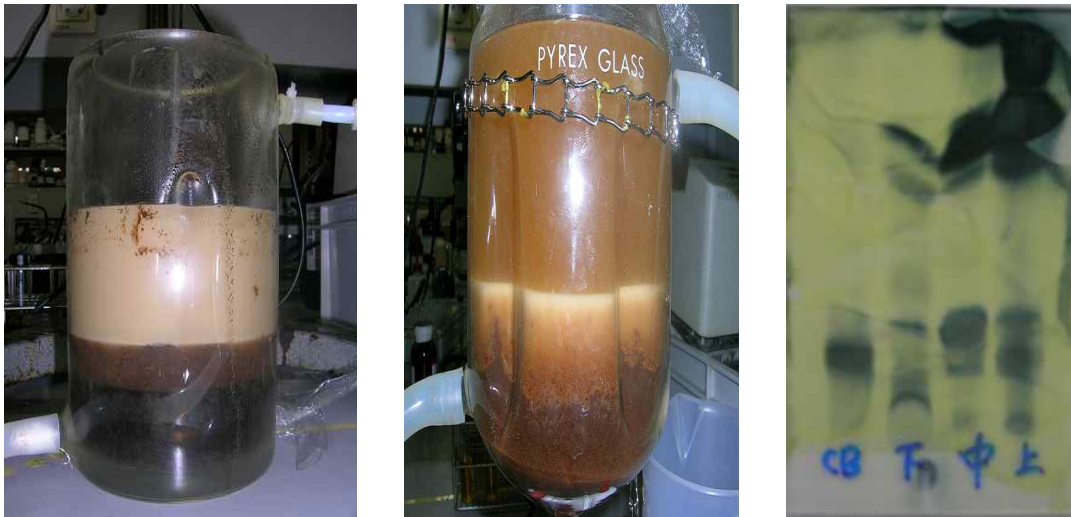
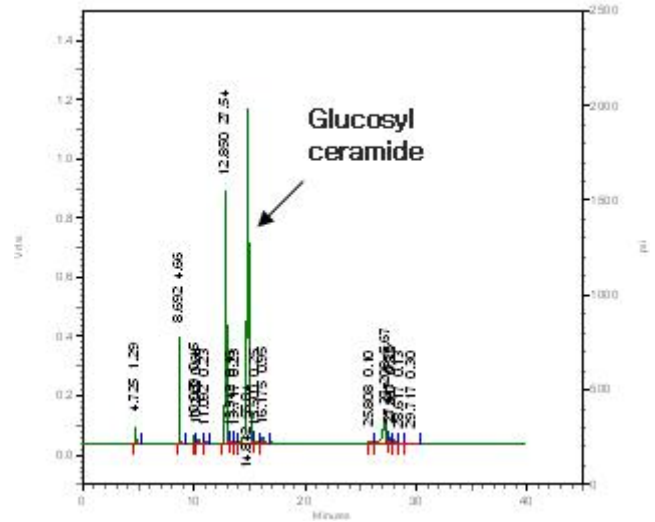


Fig. 대두 겉으로부터 식물 세라마이드 추출 정제 상분리

이렇게 해서 얻어진 대두gum유래 식물 세라마이드의 함량을 HPLC로 분석하였으며 그 결과 글루코실 세라마이드 함량이 40% 수준의 분말을 얻을 수 있었다. 수율은 3~4% 수준이었다.

일본에서 시판되는 식물세라마이드는 분말 기준으로 글루코실 세라마이드 함량 1~3% 수준이 제일 많으며 음료용 유화액은 1% 제품이 주를 이루고 있다. 따라서 1% 함량 제품을 만들기 위해서는 얻어진 식물 세라마이드를 40배 정도 부형제를 이용하여 희석하여 제조가 가능하였다.



#### 4. 식물 세라마이드 대량 생산

##### 1.5.1. 알칼리 비누화 반응 시간 결정

우선 원료의 10배의 90% 주정으로 완전히 비누화가 될 수 있도록 충분히 NaOH를 넣고 60도에서 응을 하면서 비누화 반응을 하면서 중성지질 및 인지질이 모두 알칼리 가수분해된 것을 TLC로 확인하였다. 그 결과 6시간 정도 반응을하면 충분히 가수분해 되었음을 확인 할 수 있었다.

##### 1.5.2. 헥산 추출 조건 최적화

비누화 반응을 종결한 후 중화를 하고 감압 농축을 하여 에탄올을 제거 한 후 헥산 및 물을 이용하여 식물 세라마이드의 손실을 줄이는 추출을 하기 위한 조건을 탐색하였다. 헥산은 원료 대비 약 5, 7.5, 10배 정도를 투입하고 물은 원료 대비 약 3, 5배 정도를 각각 혼합하여 수용성물질을 추출 수세해내는 조건이 탐색하였으며 최종적으로 헥산은 10배 물을 5배가 적합하였다. 이 과정은 TLC를 통해 모니터링을 하였다.

이 후 비누화된 지방산을 아세톤을 이용하여 추출 제거한 후 감압 건조하여 분쇄하여 분말 타입으로 만드는 공정을 수립하였다. 이렇게 확정된 조건으로 1Kg 원료 투입을 반복적으로 투입하여 상기 공정을 통해 생산 수율과 글루코실 세라마이드 함량을 측정하였다. 100g 수준의 실험에서와 마찬가지로 유사한 3~4% 정도의 수율과 40% 수준의 글루코실 세라마이드의 제조가 가능하였다.

공장 스케일에서 생산성과 대량 생산 공정에서의 문제점들을 파악하기 위하여 공장 스케일에서 테스트를 실시하였다. 100KG의 대두유 검을 원료로 하여 투입하여 2회 실시하였다. 그 결과로 수율은 3~4% 수준으로 40% 수준의 분말이 얻어졌다.

## 5. 식물세라마이드의 구조 분석

### 가. 글루코실 세라마이드의 순수 분리 정제

추출된 식물 세라마이드가 어떠한 구조를 가지고 있는지 구조를 분석하기 위하여 순품을 얻고자 다음과 같은 조건으로 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.

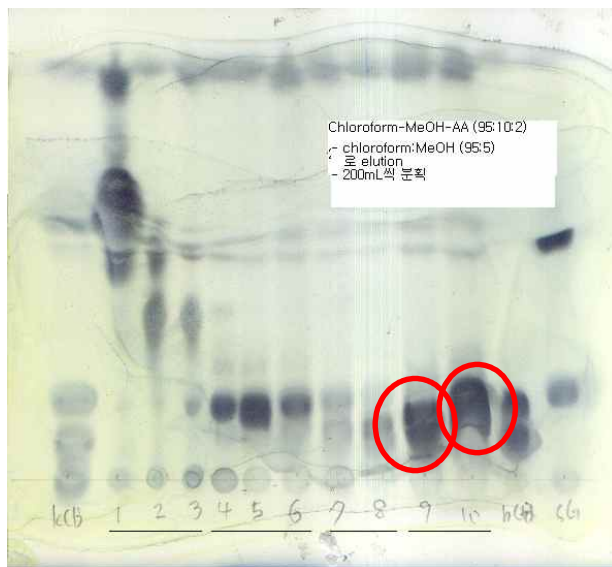
- Column : 30×3.5cm, 150ml volumn
- Packing : silica gel 50g을 chloroform-MeOH (95:5)에 분산후 packing함.
- Loading : 식물 세라마이드 sample 1g을 chloroform에 녹인후 loading함.
- Elution : chloroform-MeOH (95:5)로 elution하여 200ml씩 분획함.
- Loading : 식물세라마이드 추출물 1g을 chloroform 4 ml에 녹인후 loading함.

TLC chromatogram

SG : phytosterol glycoside, CB : Glucosylceramide

OL : over loading, A : acetone (1-19), M : methanol (1-12)

TLC 조건(Chloroform:Acetone:Acetic acid:MeOH:Water = 50:20:10:10:5)



4~6 : Glucosyl-ceramide 포함된 혼합물이 elution 됨

7~8 : Glucosyl-ceramide + SG가 혼합

9~10 : Glucosyl-ceramide가 주를 이룸.

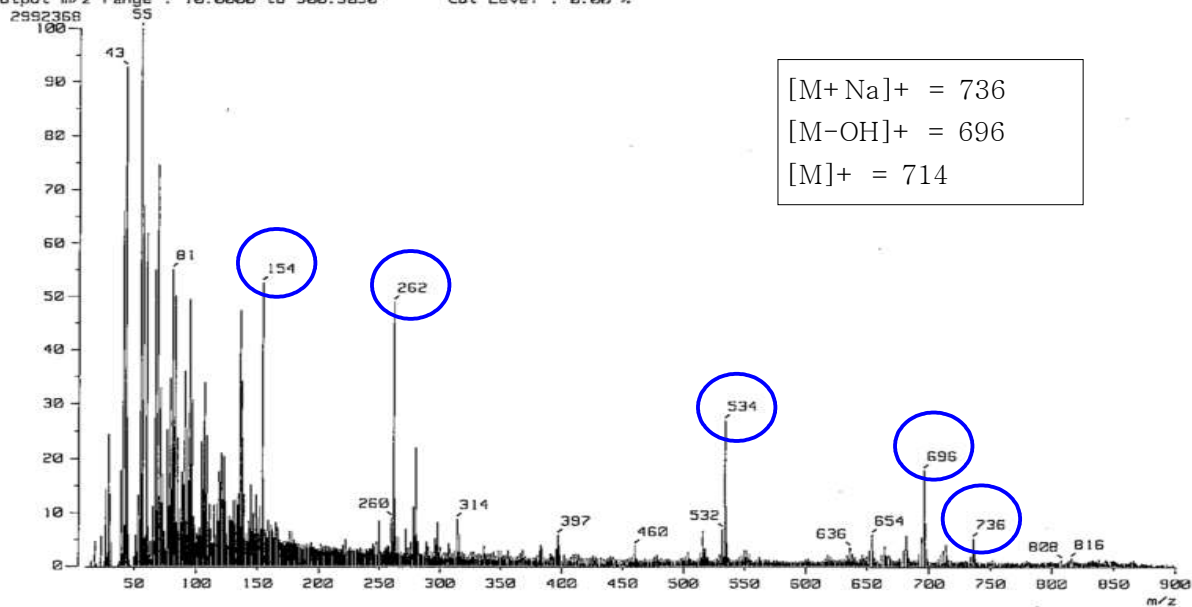
30×3.5cm 크기의 150ml의 부피를 갖는 컬럼에 silica gel 50g을 chloroform-MeOH (95:5)에 분산후 packing하고 식물 세라마이드 sample 2g 을 chloroform에 녹인후 loading하였다. 이어 chloroform-MeOH (95:5)로 elution하여 200ml씩 분획하여 각 fraction을 TLC 분석하였고 글루코실 세라마이드로 주로 이루어진 fraction을 농축하고 이후 PREP TLC를 이용하여 다음 조건 Chloroform:Acetone:Acetic acid:MeOH:Water = 50:20:10:10:5을 통해 순수 분리하여 FAB-MASS를 이용 분석하였다.

#### 나. FAB-Mass spectrometry에 의한 대두유래 식물 세라마이드의 구조 해석

구조분석에 사용된 mass spectrometer는 JMS-AX505WA (JEOL Ltd., Tokyo, Japan)이며 사용된 FAB(fast atom bombardment) 매트릭스는 3-nitrobenzyl alcohol (M.W.: 153.14)였다. 미량의 시료액체가 FAB 프로브위에 매트릭스와 함께 혼합되고 6keV Xe 원자로 1차 충돌 후 10keV까지 가속되어 생성되는 이온을 관찰하였다. 이번 실험에서 측정된 m/z는 10.0000에서 900.9050까지였다. 측정된 결과는 주 분자이온 [M+Na]<sup>+</sup> 은 m/z = 736이고, [M-OH]<sup>+</sup> 은 m/z = 696을 나타내었고 이는 4,8-sphingadienine d18:2, C40H75NO9 에 해당한다. 당세라마이드의 이온 특성에 해당하는 세라마이드 피크, 지방산 피크, 지방산 절편 피크가 각각 m/z = 534, 262, 154에서 관찰되었다. 선행 연구에서의 mass spectrum도 포유류의 스펅고지질과 식물유래의 스펅고지질의 차이는 8-sphingenine(d18:1), 4,8-sphingadienine (d18:2) and 4-hydroxy-8-sphingenine (t18:1)등의 6탄당을 함유하고 있음을 보고하여 금번의 연구와 일치한다 (Sugawara T, Miyazawa T., 1999, Separation and determination of glycolipids from edible plant sources by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection. *Lipids*. 34: 1231-1237).



[ Mass Spectrum ]  
Data : FAB-MS-0376 Date : 10-Sep-105 17:48  
Sample: ES-F  
Note: m-NBA  
Inlet : Direct Ion Mode : FAB+  
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]  
RT : 0.20 min Scan# : (2,3)  
BP : m/z 55.0000 Int. : 285.32  
Output m/z range : 10.0000 to 900.9050 Cut Level : 0.00 %



## 6. 식물 세라미드 함유 지질류의 유화액 개발

우선 대두 검질유 유래 당세라미드 함유 유화액을 개발하기 위해 경쟁사 제품들을 조사하였다.

경쟁사 식물세라미드 가용화 제품 현황: 현재 Tsuji(Corn), Oriza(쌀), 일본유지(소맥), NIPPON(일본제분, wheat), Ichimaru pharmacos(쌀)의 5개사에서 식물성 세라미드 가용화 제품이 출시되고 있으며, 콩 유래의 식물세라미드는 가용화 제품이 없는 상황이다. 또한, 가용화 제품의 경우 글루코실세라미드 함량이 1% 수준이다

	Tsuji	Oriza		일본유지
원료	Corn	쌀		소맥
Name	ME-1	Oriza-ceramide-L	Oriza-ceramide-P	Neoliquid-ceramideN
성상	갈색 점성액체	갈색액체 특이취	담황색~황색 분말 특이취	갈색액체
식물세라미드함량	> 1% (densitometer)	> 0.3% (densitometer)	> 3.0% (densitometer)	니산 N-ceramide 10% 함유
일반생균수	< 1000/g	< 3000/g	< 3000/g	
진균수	< 100/g	< 1000/g	< 1000/g	
대장균수	음성	음성	음성	
비소	< 1ppm	< 1ppm	< 1ppm	
중금속	< 10 ppm	< 10 ppm	< 10 ppm	
성분	Glycerin, 유화제, corn추출물			
보관방법	냉장보관	고온다습을 피하고, 암소		냉장(10℃ 이하)
				내산(pH 3.0), 내열(85℃, 30분)성
		in vitro 보수성능 시험		점도가 높아 유동성이 나쁘면 가볍게 데워서 사용
표기		쌀추출물(세라미드 함유), 쌀추출물		
		쌀액기스(세라미드 함유), 쌀액기스		

	일본유지	NIPPN (일본제분)			ICHIMARU PHARCOS
원료		Wheat		쌀	쌀
Name	니 산 N-ceramide	W h e a t g e r m oil-S	W h e a t g e r m oil-S 분 말 70%	NIPPN ceramide RP	Phytocera mide
성상	담황색 분말 특이취	갈색 점성 액체, 특이 취	갈색분말 특이취	백색분말	white to l i g h t y e l l o w powder
식물세 라마이 드함량	> 3.0% 당지질 50% 이 상	> 6% glycolipid (ceramide 포함)	> 4% glycolipid (ceramide 포함)	> 6.0% (HPLC광 산란 검 출법)	1, 10%
일반생 균수	< 3000/g				< 1000/g
진균수	< 3000/g				< 100/g
대장균 수	음성				음성
비소	< 2ppm(As2O3)				< 2ppm
중금속	< 20ppn(Pb)				< 20ppm
성분					물에 유백 색 dissolve 고온다습을 피하고, 압 소
보관방 법	냉암소 보관(상 온)	직광 피함	15℃ 이하 6개월	냉암소(상 온)	
	제조일로부터 1 년			제조일로 부터 2년	
표기	소맥엑기스, 소 맥추출물				

식물세라마이드 유화액을 개발하기 위하여 다양한 유화제를 선정하여 각 최적의 조성비를 탐색하고자 하였다. 유화제로서 대두레시틴, 글리세린, 글리세린지방산에스터, 폴리글리세린 지방산에스터의 조합을 검토하였다.

식물세라마이드 용해 : 글루코실세라마이드 함량 40%의 식물세라마이드 및 대두 레시틴을 1:1로 혼합하여 에탄올에 용해시킨 후 5배의 글리세린을 넣어 잘 섞어준 후에 용매를 제거하여 유상을 준비한다.

에멀전 제조 : 최적의 식물세라마이드 유화 조건을 개발하기 위하여 표 2.1에 나타난 바와 같은 조건에서 상기 유상과 유화제가 혼합된 수상을 섞은 후 80도로 가온하여 잘 혼합하여 두 상을 잘 섞어 준 다음 Homogenizer (APV LAB2000)에 넣고 300bar에서 1pass, 1000bar에서 2 pass를 통과시켜 에멀전을 제조하였다. 이렇게 제조된 에멀전 용액은 extruder를 사용하여 10~20bar 정도의 압력에서 polycarbonate membrane을 통과시켰다. Polycarbonate membrane은 pore size 는 1.2um를 사용하였다. 다양한 유화제를 사용하여 적정 제형을 테스트 하였으며 각각의 조건에서 얻어진 유화액의 particle size를 측정하였다

표. 투명제형에 사용한 유화제에 따른 입경

식물세라 마이드	대두 Lecithin	글리세린 지방산에스 터/LPL	폴리글 리세린 지방산 에스터	glycerine	water	size(n m)	폴리글리세린지 방산에스터명
0.25	0.75	DG 0.6	0.4	5	3	176.2	A-75
0.25	0.75	DG 0.6	0.4	5	3	162.5	B-50
0.25	0.75	DG 0.6	0.4	5	3		C-75
0.25	0.75	DG 0.6	0.4	5	3	171.7	D-75
0.25	0.75	DG 0.6	0.4	5	3		E-75
0.25	0.75	DG 0.6			8.4	190.6	
0.25	0.75		0.4		8.6	167.1	F-75
0.25	0.75		0.4		8.6	142.4	B-50
0.25	0.75		0.4		8.6	123.1	C-75
0.25	0.75		0.4		8.6	125.9	D-75
0.25	0.75				9	195.1	
0.25	0.75		0.4	5	3.6	347	C-75
0.25	0.75	LPL 0.6	0.4	5	3.6	90	
0.25	0.75	LPL 0.6	0.4	5	3.6	92	
0.25	0.75		0.4	5	3.6	315.4	B-50
0.25	0.75	DG 0.2	0.4	5	3.4	351.3	B-50
0.25	0.75	DG 0.4		5	3.6	367.6	E-75
0.25	0.75	LPL 0.6	0.4	5	3	135.6	
0.25	0.75	DG 0.2	0.4	5	3.4	386	C-75
0.25	0.75	DG 0.2	0.4	5	1.4	389.6	A-75
0.25	0.75	DG 0.2	0.4	5	1.7	377.8	D-75
0.25	0.75	DG 0.6	0.4	5	1.5	171.5	B-50

LPL: lysophospholipid

저장성 실험 : 1% 식물세라마이드 함유 에멀전 원액, 음료샘플을 상온암소, 상온, 4도, 45℃에 보관하면서, 시간이 경과함에 따른 침전물 확인 및 입경변화를 측정하여 24주간 안정성을 확인하였다.

음료제형 : 음료제형은 기존에 판매되고 있는 비타민, 아미노산, 이온음료, 콜라겐음료에 에멀전용액 1%를 첨가하여 만든 후 80도에서 30분간 가열처리 하였다.

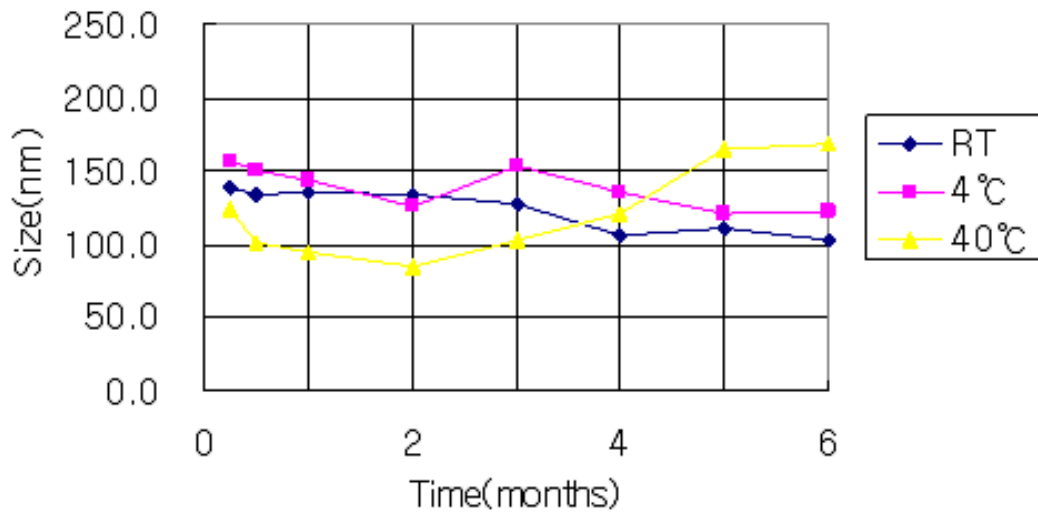
유화조성 확정: 다양한 종류의 유화제를 사용하여 제형의 투명도 및 안정성을 가실험한 결과, 실험 제형 중 가장 적합한 제형은 사용유화제로 대두레시틴 7.5%, 디글리세리드 6%, 폴리글리세린지방산에스터 4% (기업 보안상 정확한 명칭을 표기하지 않았습니다. 양해 부탁드립니다.) 을 사용한 경우로 다른 유화제의 경우 젤을 형성하던지 침전이 발생한 반면 상기의 유화제는 침전없이 투명한 제형의 안정성을 유지하였다.



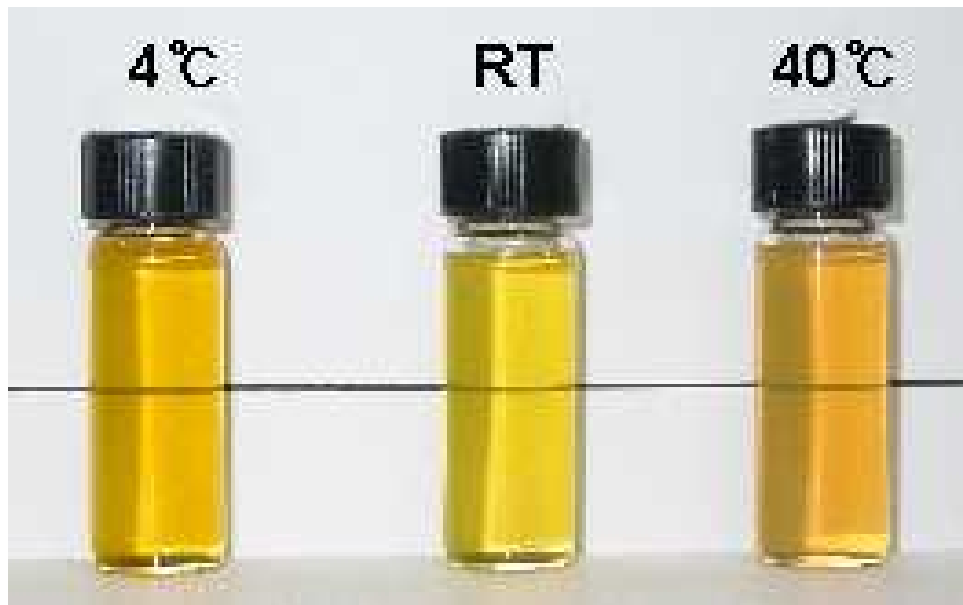
식물 세라마이드 1% 유화액

## 7. 유화액 저장안정성 테스트

1% 식물세라미드함유 유화액 저장안정성을 테스트 하였다. 제조한 유화액을 상온, 상온 암실, 4도, 40도에 보관하면서 주차별로 입경크기의 변화를 관찰하였다. 아래 그래프에서 보듯이 6개월간 입경의 변화의 차이가 크지 않아 유화액이 안정하다는 것을 알 수 있다. 저장 실험기간 동안 침전물도 발생하지 않았으며, 40도에서의 입경변화에도 큰 차이가 없으므로 통상의 판단 기준으로 제형의 상온 1년의 제품 안정성은 확보되었다고 할 수 있다. 지속적으로 상온에서의 실제 저장 안정성 테스트는 지속할 예정이다.



식물세라미드 1% 유화액의 저장 안정성 테스트



식물세라마이드 1% 유화액의 6개월 경과 후 상태



## 8. 음료적용 저장안정성 테스트

식물세라마이드 유화액의 산, 염, 열 안정성을 확인하기 위하여 pH 3 구연산 용액과 NaCl 3% 용액에 식물세라마이드 유화액을 1% 첨가하여 85도에서 30분간 열처리 한 후 40도에서 보관하며 침전여부 및 투명정도를 확인한 결과, 구연산 용액에서는 투명도 및 침전에서 문제가 없었으나, 3% 염용액에서는 혼합 후 열처리시 투명도가 나빠지고 저장시 침전이 발생하였다. 본 제형은 산 안정성은 강하나 염 안정성은 보강해야 될 것으로 보인다.

개발된 유화액의 실제 음료로의 적용을 검토하여 보기 위해 현재 시판 중인 비타민 음료, 천연침출차, 유음료 등에 글루코실 세라마이드 함량 20mg (1% 유화액 2g/100ml) 기준으로 첨가하여 적용성 test를 하였다. 그 결과 모두 안정한 투명 제형임을 확인 할 수 있었다.



## 9. 식물세라마이드의 보습 효능 간이 임상실험

보습 관련 임상 테스트를 실시 하기 전 사내에서 이중 맹검에 의한 간이 임상을 실시하여 보았다.

### 가. 임상 실험 설계

위약대비 이중맹검법으로 설계하여 대두유래 당세라마이드를 하루 2.4mg씩 섭취하여 4주간 진행하였다. 21세 ~ 43세의 남녀 24명이 실험에 참여하였으며 참가자들을 사전 면접 후 동의서에 서명한 후에 팔과 목의 피부 수분을 측정하는 실험이 진행되었다. 다음 사항에 해당하는 참가자들은 실험에서 배제되었다. 임신부 혹은 임신이 기대되는 자, 모유 수유자, 식품알레르기를 가진자, 질병을 앓고 있는자, 피부 수분에 영향을 미칠만한 피부과 치료를 받은자 등이다. 실험참여자들의 인구통계학적 특징은 그림과 같다. 실험참여자들은 난수표에 따라 위약군과 처치군에 암호화된 용기에 담긴 시료를 받아 섭취하였다. 조사자들도 실험이 종료될 때까지 위약군과 처치군을 모르게 하여 실험진행 중의 편견을 예방하였다. 실험기간은 총 4주간 진행하였다. 각 실험참여자들은 대두유래 당세라마이드를 2.4mg 함유하고 있는 캡슐이나 텍스트린만을 함유한 캡슐을 하루 한 알씩 4주 동안 섭취하였다.

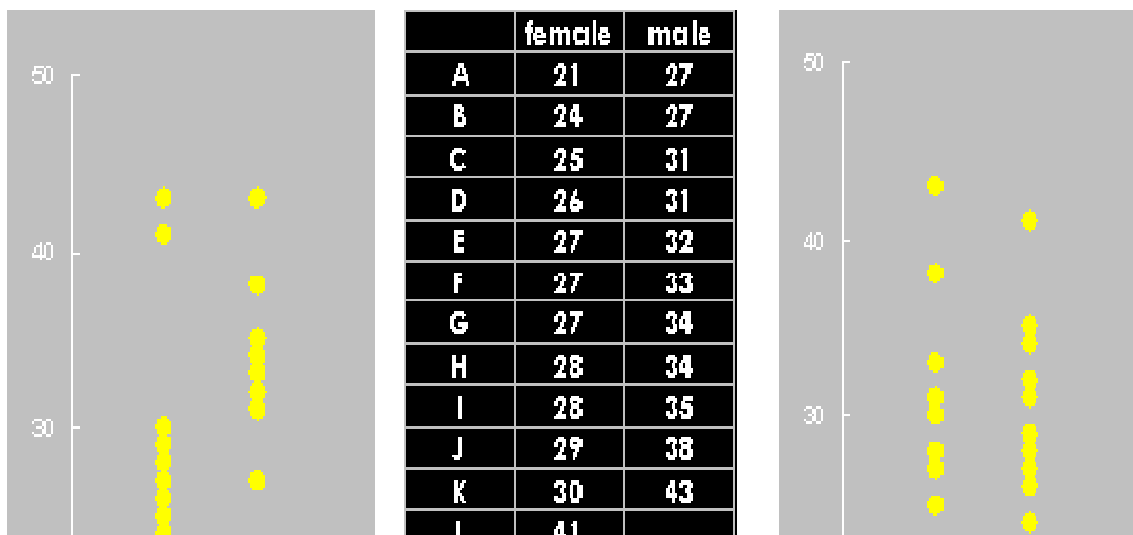


Fig. Characteristics of participating in the study

## 나. 피부보습, 산도 및 TEWL 측정방법

피부 보습은 CM825 corneometer (Courage+ Khazaka Electronic GmbH Co., Koln, Germany)를 사용하여 팔과 목 부위를 측정하였다. 이 기구는 stratum corneum의 전기전도도를 측정하여 상피세포의 수분함량을 측정한다. 측정치는 임의단위인 A.U.로 표기한다. 산도는 PH900 Skin-pH-meter (Courage+ Khazaka Electronic GmbH Co., Koln, Germany)를 이용하여 팔과 목 부위를 측정하였다. 이 기구는 유리막 옆의 이온투과성 막이 피부와 접촉하여 전기화학적으로 산도를 측정하는 비파괴적방법이다. TEWL (Trans Epidermal Water Loss)는 TM210 Tewameter (Courage+ Khazaka Electronic GmbH Co., Koln, Germany)를 이용하여 측정하였다. 측정치는  $g/hm^2$  단위로 표기한다. 동일한 실험 환경을 조성하기 위해 각 측정을 온도가 20~24°C가 유지되고 습도가 45~45%가 유지되는 항온항습 회의실에서 행하였다. 각 실험참여자는 측정 전에 티셔츠를 입은 상태에서 팔과 목이 공기에 노출된 상태에서 30분 이상 회의실에서 대기하고 3가지 측정을 거의 동시에 행하였다.

모든 측정치는 평균±표준편차로 나타내었다. 위약군과 처치군의 피부보습과 TEWL (Trans Epidermal Water Loss) 유의적인 차이는 Student's t-test를 사용하여 판별하였다. 통계적 차이가  $p<0.1$ 과  $p<0.05$ 일 때를 통계적으로 유의적인 차이를 보인다고 간주하였다.

## 다. 간이 임상실험 결과

21세~43세의 24명의 실험참여자들을 13명의 처치군과 11명의 위약군으로 나누었다. 두 집단간에 평균나이는 처치군이  $30.76 \pm 6.77$  (21세~43세)이고, 위약군이  $31.00 \pm 4.88$  (24세~41세)였다. 팔과 목의 피부보습에서도 유의적인 차이가 없었다. 그림은 4주 동안 각 집단에서의 목과 팔에서의 피부보습과 TEWL (Trans Epidermal Water Loss)의 변화를 나타낸 것이다. 4주 후에 처치군과 위약군의 목부위 피부보습에서 통계적으로 유의적인 차이( $p<0.05$ )를 나타내었고, 모든 주차에서 위약군은 피부보습의 점진적인 감소를 보이나 처치군에서는 꾸준한 피부보습 유지능을 보여 주었다. 각 집단에서의 목 부위의 피부 보습 차이는 여성보다는 남성에서 차이가 컸다. 팔에서의 TEWL 측정 결과를 그림에 나타내었다. 남성의 팔 부위 피부수분손실 차이도 처치군과 위약군에서 통계적으로 유의적인 차이( $p<0.05$ )를 나타내었다. 반면에 여성 집단에서는 유의적 차이를 보이지 않았다. pH로 측정하는 피부 산도의 변화는 유의성이 없었다. 이러한 결과는 위약군과 비교하여 4주 동안 대두유래 당세라마이드를 섭취하는 것이 팔과 목의 피부보습을 유의적으로 증가시키거나 유지시킬 수 있음을 보여준다. 이번 연구에 사용한 대두유래 당세라마이드는 하루 2.4mg으로써 매우 낮은 농도이다. 다른 성분에 비해서 이렇게 낮은 농도에서도 피부 보습을 유지하거나 향상시킴을 보일 수 있는 것은 소비자 측면에서 캡슐의 크기를 줄일 수 있거나 섭취 횟수를 줄일 수 있으므로 큰 장점을 가진다. 이는 식

품 제조업자에게도 식품의 물성에 영향을 최소화하면서 기능성분을 첨가할 수 있다는 장점을 부여한다.

Fig. Effect of soy-derived glucosylceramide on skin hydration

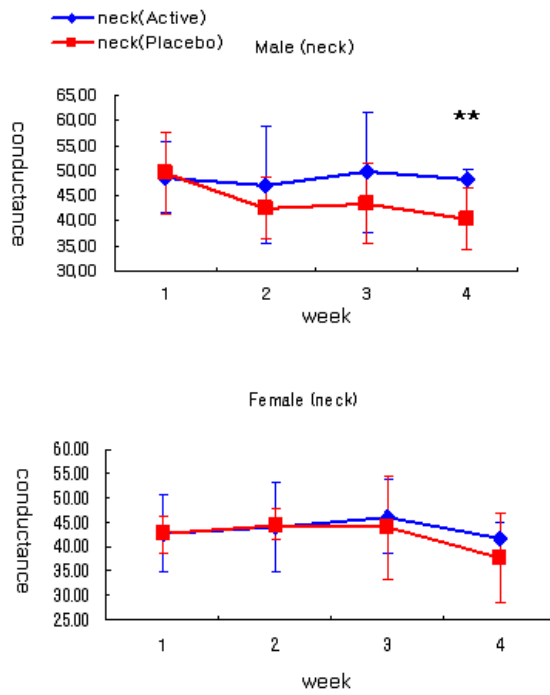
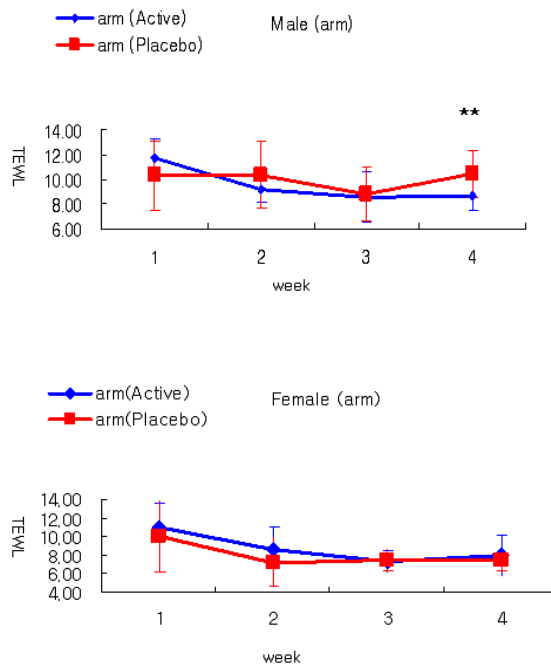


Fig. Effect of soy-derived glucosylceramide on transepidermal water loss (TEWL)



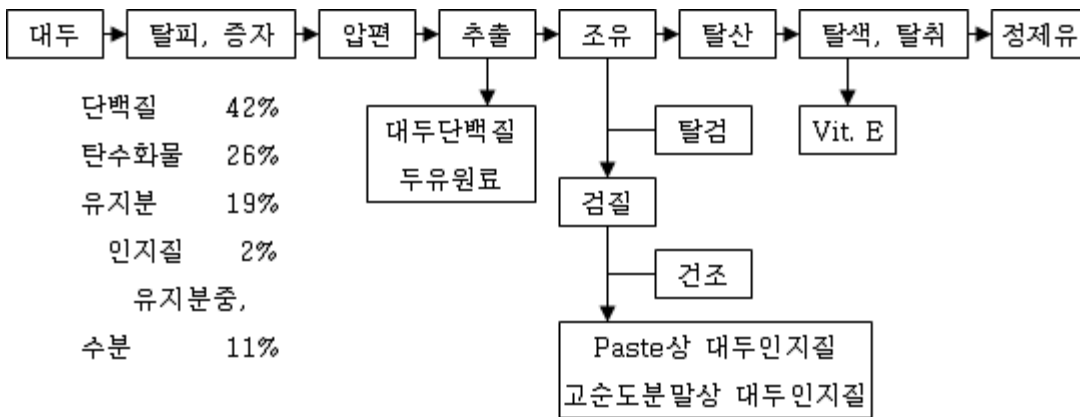
## II. 대두검질로부터 인지질의 제조 및 이를 활용한 포스파티딜세린의 생산

농산물 유래 피부 건강 기능 식품 소재 개발을 위한 생리 활성 지질 후보군으로서 식물 세라미드외에 대두유 부산물인 대두 검질로부터 인지질을 농축 정제하여 포스파티딜세린을 제조하는 것을 검토하였다. 1차년도 협동 연구과제 효능 관련 연구 결과로부터 식물세라미드와 대두 검질 유래 포스파티딜세린이 공히 피부의 항염증, 항아토피, 피부 보습 및 항주름 개선 효능이 관찰된 바 식물세라미드의 생산 조건 검토 이외에 대두 검질 유래로부터 정제 대두 레시틴 생산을 검토 하였다.

기존의 두산이 개발한 대두 포스파티딜세린 공정에는 해외에서 수입된 정제 분말 레시틴을 활용하여 제조된 중순도 PC 함량의 대두레시틴 (PC함량 55)을 사용하여 생산하여 왔다. 이에 국내에서 생산된 조레시틴을 활용하여 포스파티딜세린 공정을 대두검으로부터 대두 인지질을 추출하여 포스파티디세린 제조를 검토하였다.

### 1. 대두검으로부터 인지질의 생산

대두유래 검질을 주정을 활용하여 추출하여 인지질을 추출하고 아세톤을 처리하여 분말 인지질을 제조 하는 공정을 검토하였다. 대두유 유래 검질은 그림에 나타난 바와 같이 대두를 압편 추출에서 얻어지는 조유로부터 유지의 품질을 위해 제거되는 탈검 과정에서 유래된다. 이러한 조유에서 얻어지는 검질류는 현재 대부분 사료로 이용되고 있는 실정이다.



대두인지질의 제조

1) 중성 지질 제거: 이러한 검질류를 이용하여 인지질을 제조하기 위해 검질 1kg의 10배 (10L)의 아세톤을 투입하여 교반을 하고 여과를 하였다. 이 후 잔사를 다시 한번 5L의 아세톤을 이용하여 교반 수세하여 중성지질을 중성 지질을 제거한다.

2) 에탄올 추출 조건 최적화

아세톤 추출 잔사를 30도, 40도, 50도에서 에탄올을 5L투입하여 30분간 추출하였다. 추출액을 덜어낸 후 다시 에탄올 5L를 투입하여 30분간 추출하고 여과하여 여액을 취하여 1차 추출물과 합하였다.

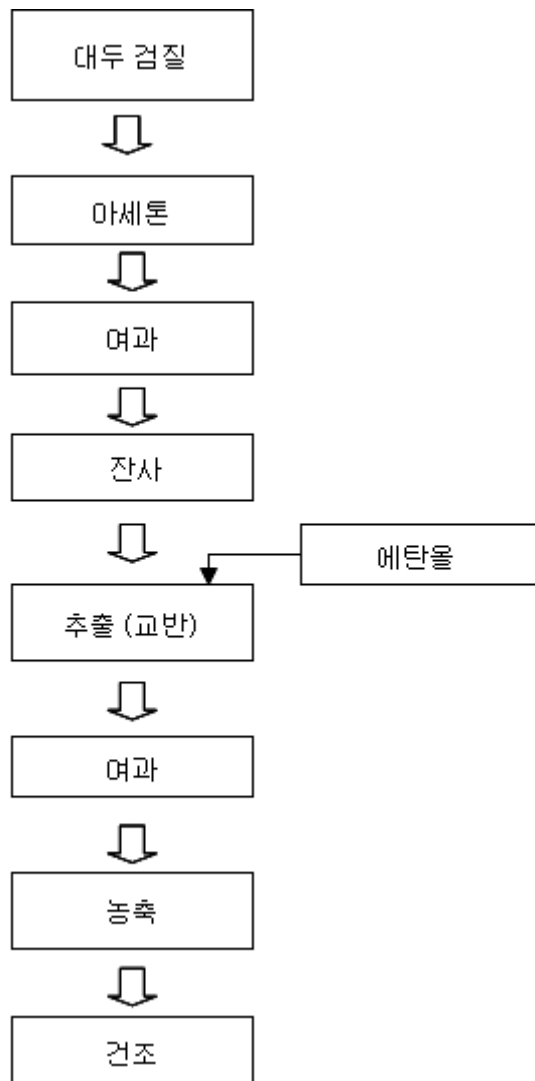


Table 각 추출 조건에서의 수율 및 인지질 함량

온도	수율	PC함량
30도	20.8%	52.4%
40도	25.2	50.5%
50도	22.2	48.2%

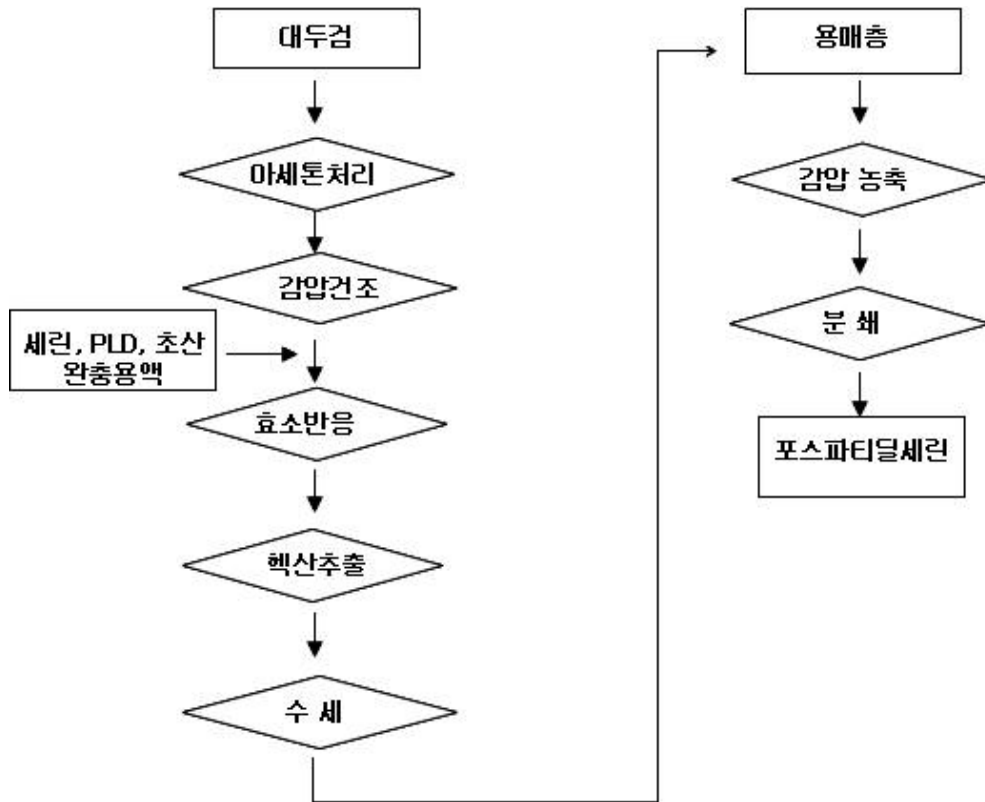
특히 50도에서는 추출과정에서 잔사들이 응집이 일어나는 현상이 발견되었다. 이에 50도 이상에서는 추출이 효율적으로 이루어지기 어려움을 알 수 있었고 40도에서 추출하는 것이 최적임을 확인 할 수 있었다.

추출액을 덜어낸 후 다시 에탄올을 5L 투입하여 30분간 추출하였다. 이 후 추출액을 1차 추출액과 함께 혼합하여 농축 건조하여 인지질을 얻었다. 이를 HPLC를 활용하여 분석한 결과 PC 함량 50.2% 수준의 인지질을 얻을 수 있었다. 이러한 인지질을 이용하여 포스파티딜세린을 제조하는데 이용하였다.

이 후의 포스파티딜세린의 제조 공정은 이미 두산이 개발하여 현재 생산 중인 공정으로 뇌기능 건강 기능식품으로서도 식약청의 인정을 받은 제조 공정으로서 여기서는 자세한 공정을 신지 않고 간단히 기술한다.

초산완충용액에 세린 및 대두검질로부터 추출된 인지질을 투입하고 포스포리파제 D를 투입하여 반응을 시작한 후에 20시간이 지난 후 헥산으로 추출하고 헥산 추출액을 물로 3회 수세한 후 헥산 추출물을 가압 농축하여 포스파티딜세린을 얻었다. 이렇게 얻어진 포스파티딜세린의 함량은 40.4% 였다. 이를 활용하여 동물 실험에 피부 관련 효능의 동물 실험에 활용하였다.

본 연구 결과로서 대두 검질 유래의 인지질을 이용함으로써 기존에 해외에서 수입하여 이용 중인 레시틴을 대체하는 연구를 수행함으로써 원가 절감이 가능할 수 있음을 확인 하였다.





### III. 당세라마이드 함유 대두 추출물 및 대두 포스파티딜세린의 피부 보습 및 주름 개선 효능 인체 적용 시험

피부 관련 건강 기능 식품 소재로서 타겟 효능에 있어서는 항염증, 아토피 개선 등의 효능 효과는 국내 건강 기능식품 법규상 취득하기 불가능한 효능이므로 보습과 주름 개선이 적합하다고 판단하였다.

따라서 본 연구에서는 대두유래의 식물세라마이드와 대두검질 유래의 인지질을 이용하여 제조한 대두포스파티딜세린을 활용하여 국내 전문 임상 기관에서 임상 시험을 수행하였다.

임상 시험은 국내 전문 기관인 (주)엘리드에서 행하였다. 대두 포스파티딜세린과 식물 세라마이드의 눈가 주름 및 피부 보습 개선효과에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주 이중맹검, 위약대조, 무작위 배정 인체적용시험을 (주)엘리드 표준 운용 절차 (EL-P-7400)에 따라 연구를 수행하였다.

#### 1. 인체적용 시험용 건강기능식품의 제조 및 인체적용 검사 항목 및 관찰 검사 방법

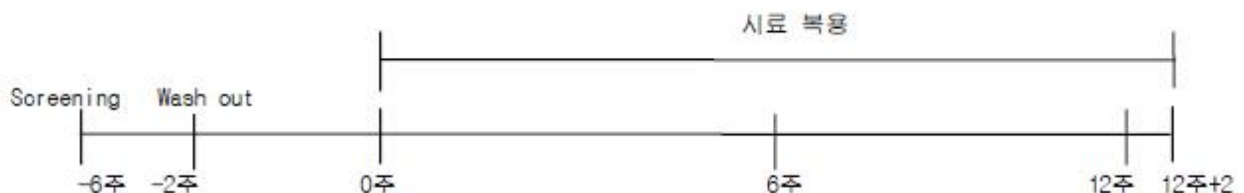
##### 가. 시험식품과 대조식품

임상 시험을 위해 시험군과 대조군의 건강 기능식품 형태의 제품을 만들기 위하여 두산 글로벳 익산 공장에서 생산한 대두 유래 당세라마이드와 포스파티딜세린을 이용하여 다음과 같은 배합비로 (주)서흥캡셀에서 연질 캡셀을 제조하였다.

시험군 A는 대두 포스파티딜세린은 750mg 캡셀 1개당 포스파티딜세린150mg함유  
시험군 B는 당세라마이드함유 대두추출물 750mg 캡셀 1개당 당세라마이드 15mg 함유,  
시험군 C는 대조군으로서 각 샘플을 용해하기 위해 사용한 중쇄지방을 사용 캡셀을 제조하였다.

##### 나. 1일 섭취량 및 섭취방법

- 시험군: 1일2캡셀(750mg x 2ea) 섭취
- 대조군: 시험군과 동일
- 섭취방법: 물과 함께 섭취
- 섭취기간: 시험식품 또는 대조 식품을 12주간 섭취
- 유의사항: 식사광선을 피하여 실온, 암소에서 보관한다



다. 각군별 인구학적정보 및 기타 섭취전 특성

표 5. 피험자의 인구학적 정보 및 섭취 전 특성 (ITT)

		시험군 A n=34	시험군 B n=34	대조군 n=35	군간비교 시험군A / 시험군 B / 대조군
연령(세)	Mean ± S.D	46.68±4.73	48.71±3.34	47.94±4.49	0.142
	Min, Max	41, 55	42, 55	41, 58	
체중(Kg)	Mean ± S.D	56.83±7.75	57.35±5.36	58.73±6.62	0.474
	Min, Max	41.90, 79.50	48.20, 68.90	50.20, 78.30	
맥박(회)	Mean ± S.D	74.65±10.95	71.41±7.19	75.20±8.68	0.180
	Min, Max	52, 104	60, 88	61, 100	
수축혈압(mmHg)	Mean ± S.D	111.94±11.64	114.29±11.61	116.06±12.02	0.350
	Min, Max	90, 132	83, 139	90, 139	
확장혈압(mmHg)	Mean ± S.D	67.47±9.93	70.56±9.75	68.57±7.35	0.367
	Min, Max	49, 84	49, 92	49, 82	
눈가 주름 육안평가	Mean ± S.D	3.29±1.00	3.44±1.08	3.40±1.01	0.884
	Min, Max	2, 6	2, 6	2, 6	

모든 항목에 대해 시험군, 대조군을 각각 비교한 결과, 시험군과 대조군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

본 시험에 참가한 피험자는 103명의 여성으로 평균연령은 시험군 A 46.68±4.73세, 시험군 B 48.71±3.34 대조군 47.94±4.49세 이었으며, 평균체중은 시험군 A 56.83±7.75kg, 시험군 B 57.35±5.36 kg 대조군 58.73±6.62kg 이었다.

맥박은 시험군 A 74.65±10.95회, 시험군 B 71.41±7.19회, 대조군 75.20±8.68회 이었다. 평균 수축 혈압은 시험군 A 111.94±11.64mmHg, 시험군 B 114.29±11.61mmHg 대조군 116.06±12.02mmHg 이었으며, 평균 확장 혈압은 시험군 A 67.47±9.93, 시험군 B 70.56±9.75mmHg 대조군 68.57±7.35mmHg, 이었다.

피험자들의 시험 식품 섭취 전 유효성 관련 특성의 분석 결과 군간의 유의한 차이는 나타나지 않았다. 눈가 주름 육안평가는 시험군 A 3.29±1.00, 시험군 B 3.44±1.08 대조군 3.40±1.01이었다.

라. 관찰항목, 인체적용 검사 항목 및 관찰 검사 방법

표 3. 인체적용시험의 연구 흐름도

Visit Number	피험자 선별 (Screening)	준비 (Wash out)	섭취 (Treatment)			
			3	4	5	6
Visit Name	등록	-2주	0주	6주	12주	12주 +2일
피험자 동의 및 선별	○					
인구학적 조사	○					
병력 조사	○					
선정기준/제외기준	○					
신체검사	○					
주름 육안평가	○		○	○	○	
주름 기기측정			○	○	○	
화상사진 촬영			○	○	○	
보습 기기측정			○	○	○	
이상반응 <sup>1)</sup>				○	○	
혈액/뇨 검사 <sup>2)</sup>	○					○
식이 조사			○	○	○	
피험자 교육 <sup>3)</sup>		○	○	○	○	
식품 지급/반납 <sup>4)</sup>			○	○	○	
순응도 확인 <sup>5)</sup>				○	○	
설문평가 <sup>6)</sup>				○	○	

1) 이상반응 확인을 위해 3 주, 9 주 총 2 회에 걸쳐 전화로 설문평가를 실시하였고, 6 주, 12 주 방문시 에도 설문평가를 실시하였다.

2) 혈액/뇨 검사는 1 차 방문과 6 차 방문에 이루어 지며 검사 전날 8 시간 이상 공복 상태를 유지한 후 연구소에 방문한다. 혈액검사 결과는 48 시간 이내에 처리하였다.

3) 피험자 교육은 피험자 제한사항, 식품 섭취법과 식이관리 교육으로 이루어졌다.

4) 식품 지급은 0 주차에 6 주 분량을 지급하고 6 주차에 12 주까지의 분량을 지급한다. 매 방문 시 피험자는 식품 잔량을 확인하기 위해 식품을 지참하고 연구소에 방문하였다.

5) 순응도 확인을 위해 3 주, 9 주 총 2 회에 걸쳐 전화 설문이 이루어지며, 6 주, 12 주 방문에는 식품 섭취 확인서와 식품 잔량의 확인이 이루어졌다.

6) 설문평가는 식품 섭취 후 효능에 대한 피험자의 주관적 설문평가로 6 주차, 12 주차 방문에 이루어졌다. 또한, 추가적으로 3 주, 9 주 총 2 회에 걸쳐 전화로 설문평가를 실시하였다

### 1) 눈가주름 육안평가

피험자의 눈가 주름 정도는 두 명의 피부과 전문의가 평가하였다. 피험자 방문 시 연구소에 방문한 피험자들을 대상으로 눈가의 주름 정도를 Global Photodamage Score (0: none, 1: none/mild, 2: mild, 3: mild/moderate, 4: moderate, 5: moderate/severe, 6: severe, 7: very severe)에 근거하여 평가하였다. 두 피부과 전문의의 평가에 차이가 있을 경우 주름 개선 정도가 낮은 단계를 선택하였다.

### 2) 화상사진촬영

피부과 전문의에 의한 육안판정과 더불어 화상사진을 통하여 육안 판정결과의 보조적인 방법으로 화상 사진을 촬영 하였다. 주름촬영 용안면 고정장비세트 및 조명세트와 고해상도 디지털카메라를 이용하여 실내조명의 밝기가 동일한 조건에서 화상사진을 촬영하였다. 표준화를 위하여 사진 촬영은 동일 연구자가 시행하였으며 특수 제작된 장비를 통하여 촬영조건 (측정방향 및 위치)을 고정하여 측정하였다.

### 3) 눈가주름기기측정평가(Skin Visiometer SV 600)

눈가 주름 모사판은 실리콘 용액 B (기체), C (축매제)를 이용하여 제작하였다. 제작된 모사판은 Skin Visiometer SV 600 (Courage & Khazaka, Germany)의 software를 이용하여 분석하였다.

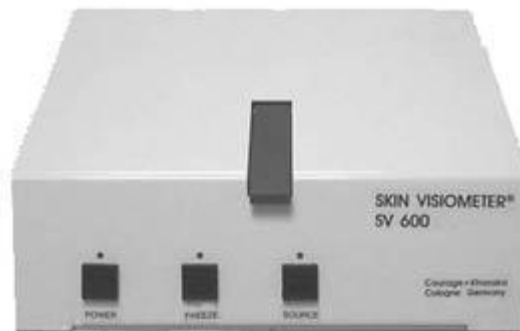


그림2. Skin Visiometer SV 600

Skin Visiometer SV 600의 분석 원리는 인공 광원에서 방출된 빛이 실리콘 재질을 투과하면서 생기는 빛의 intensity를 Lambert & Beer's Law에 의해 분석하여, 피부 주름 개선 정도를 측정하는 것이다 ( $I_{ex} = I_{in} e^{-kd}$ )

- 제작된 모사판을 Skin Visiometer SV 600 내 분석 kit에 넣고 영상을 촬영한 후 image analyzer software로 분석하였다.
- 모사판은 항상 같은 방향으로 Skin Visiometer SV 600 내에 들어가도록 주의하였다.
- Skin Visiometer SV 600에 의해 분석하고자 하는 값은 다음과 같다.

- Visiometer의 분석 결과는 R1~R5의 값으로 분석하여 정리하였다.
- R1~R5의 값이 작아질수록 눈가 주름이 개선되어 주름의 깊이가 낮아짐을 의미하며, 단위는 임의의 단위 (arbitrary unit)이다.
- Visiometer에 의한 측정 값은 다음과 같다.

R1: skin roughness

(최고 주름의 포인트와 최저 주름의 포인트와의 거리)

R2: maximum roughness

(주름을 자동적으로 5개로 분할하여 각각 R1값을 구한 후 분할된 주름 중에서 가장 높은 R1값)

R3: average roughness

(5개로 분할하여 얻은 R1값의 평균)

R4: smoothness depth

R5: arithmetic average roughness

- Visiometer에 의한 분석 parameter로는 circle, horizontal, vertical 3종류가 있으며 본 인체적용 시험에서는 circle을 이용하여 R1~R5 값을 계산하였다. 이는 미세 주름 측정기인 Visiometer의 image analyzer software로 주름분석을 함에 있어 인체의 실제 주름과 같은 그물망 조직을 분석할 수 있는 circle로 분석하는 것이 과학적이라 판단되기 때문이다.

#### (4) 피부보습기측정평가(Corneometer CM825)

각질층의 수분함량은 Corneometer CM825 (Courage & Khazaka, Germany)를 이용하여 측정하였다. Corneometer CM825는 표피층의 30~40 um 깊이 이내에 함유된 수분 함량을 측정하는 기기로서 탐침을 측정부위 피부표면에 밀착시켜 접촉한후 가볍게누르면 나타나는 수치(전기전도율)를 표시하였다. 볼(cheek)의 동일한 부위를 각5회 측정하고, 최대값과 최소값을 제외한 3개값의 평균을 구하였다. 피부보습량이 높아지면 측정값이 높고 낮아지면 측정값이 낮아진다.



그림 3. Corneometer CM825

(5)유효성 평가결과의 제시 및 분석

본 인체적용시험의 일차 유효성 평가변수는 눈가주름 육안평가, 눈가주름 기기평가(Skin Visiometer SV600 (눈가주름평가변수: R3))이며 이차유효성 평가변수는 피부보습평가(Corneometer CM825)로서 피험자들에게 시험식품을 섭취하기 전의 자료와 섭취후의 최종 평가자료를 이용하여 시험식품의 유효성을 평가하였다.

2. 주름 개선능 인체적용 유효성 평가결과

가. 육안 평가

본 인체적용시험의 일차유효성 평가변수는 눈가주름 육안평가, 눈가주름 기기평가 (Skin Visiometer SV600(눈가주름평가변수: R3))로서 피험자들에게 시험식품을 섭취하기 전의 자료와 섭취후의 최종 평가자료를 이용하여 시험식품의 기능성을 평가하였다.

표6은 PP set를 대상으로 눈가주름 육안 평가 결과이다.

표 6. 눈가 주름 육안평가 유효성 평가 결과 (PP)

평가변수		시험군 A	시험군 B	대조군	군간비교 시험군 A/ 시험군 B/ 대조군	군간비교 시험군 A/ 대조군	군간비교 시험군 B /대조군
		Mean ± S.D	Mean ± S.D	Mean ± S.D			
주름	섭취 전 (Visit3)	3.29±1.04	3.47±1.11	3.47±1.02			
	섭취 6 주 후 (Visit4)	3.19±1.14	3.34±1.18	3.44±0.95	0.391	-	-
	Δ 6 주	-0.10±0.30	-0.13±0.34	-0.03±0.18			
	p-value*	0.083	0.044	0.325			
	섭취 12 주 후 (Visit5)	2.97±1.14	3.19±1.23	3.44±0.98	0.008	0.012	0.038
	Δ 12 주	-0.32±0.48	-0.28±0.46	-0.03±0.18			
	p-value*	0.001	0.002	0.325			

Δ: 평가변수(섭취 후)-평가변수(섭취 전)

\*: significantly different between test group and control group, p<0.05

유효성 평가변수에 대한 군간 검정은 분산분석을 실시하여 사후 분석에 대한 유의 확률값(p-value)을 제시하였다.

눈가주름 육안평가 군내 비교결과, 식품 섭취전에 비하여 식품 섭취 12주후 시험군A는 0.32±0.48, 시험군 B는 0.28±0.46, 대조군은 0.03±0.18 이 감소하였고, 시험군 A와 시험군 B는 통계적으로 유의한 수준 (p<0.05)으로 감소하였다.

시험군A와 대조군간의 군간 비교 결과, 식품 섭취 12주 후 대조군에 비하여 시험군이 통계적으로 유의한 수준 (p<0.05)으로 눈가 주름이 개선되었다.

시험군B와 대조군간의 군간 비교 결과, 식품 섭취 12주 후 대조군에 비하여 시험군이 통계적으로 유의한 수준 (p<0.05)으로 눈가 주름이 개선되었다.

그림4~5는 PP set를 대상으로 눈가 주름 육안 평가 결과 및 변화량을 나타냈다.

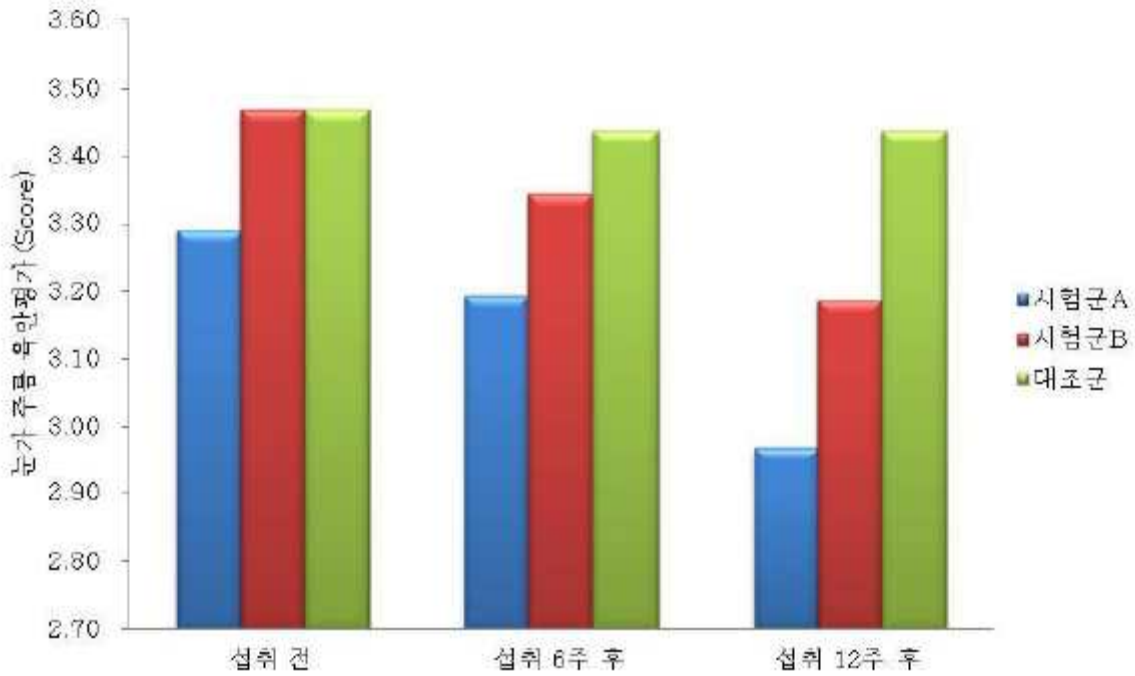


그림 4. 눈가 주름 육안평가

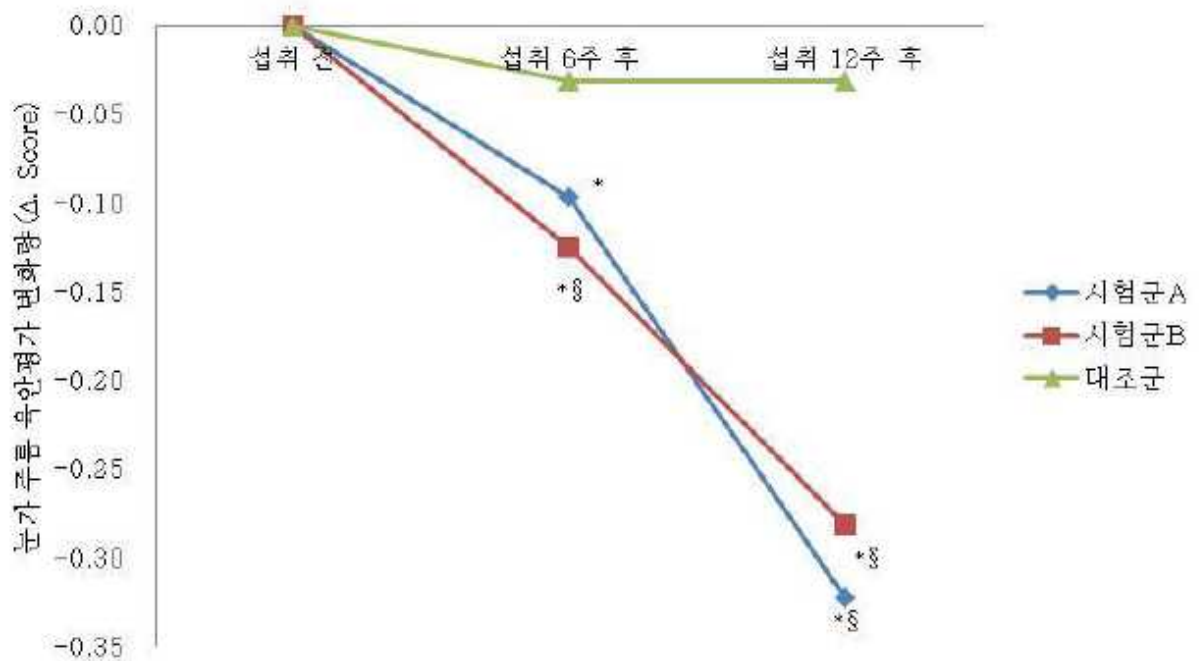


그림 5. 눈가 주름 육안평가 변화량

\*: significantly different from baseline,  $p < 0.05$

§: significantly different between test group and control group,  $p < 0.05$

## 나. 기기 평가

표7은 PP set를 대상으로 Skin Visiometer SV600을 이용한 눈가주름 평가 결과이다. 유효성 평가변수에 대한 군간 검정은 분산분석을 실시하여 사후분석에 대한 유의확률값(p-value)을 제시하였다.

표 7. 눈가 주름 기기평가 (Skin Visiometer SV600) 유효성 평가 결과 (PP)

평가변수		시험군 A	시험군 B	대조군	군간비교 시험군 A/ 시험군 B/ 대조군 p-value	군간비교 시험군 A/ 대조군 p-value	군간비교 시험군 B /대조군 p-value
		Mean ± S.D	Mean ± S.D	Mean ± S.D			
R3	섭취 전 (Visit3)	0,26±0,03	0,26±0,02	0,26±0,04			
	섭취 6 주 후 (Visit4)	0,26±0,03	0,26±0,03	0,25±0,04	0,601	-	-
	Δ 6 주	0,00±0,02	0,00±0,02	0,00±0,02			
	p-value*	0,198	0,937	0,662			
	섭취 12 주 후 (Visit5)	0,25±0,03	0,25±0,02	0,25±0,03	0,002	0,009	0,004
	Δ 12 주	-0,01±0,02	-0,01±0,02	0,00±0,01			
	p-value*	0,000	0,000	0,462			

Δ: 평가변수(섭취 후)-평가변수(섭취 전)

\*: significantly different between test group and control group, p<0,05

그림6~7은 PP set를 대상으로 Skin Visiometer SV600을 이용한 눈가 주름 평가결과 및 변화량을 나타냈다.

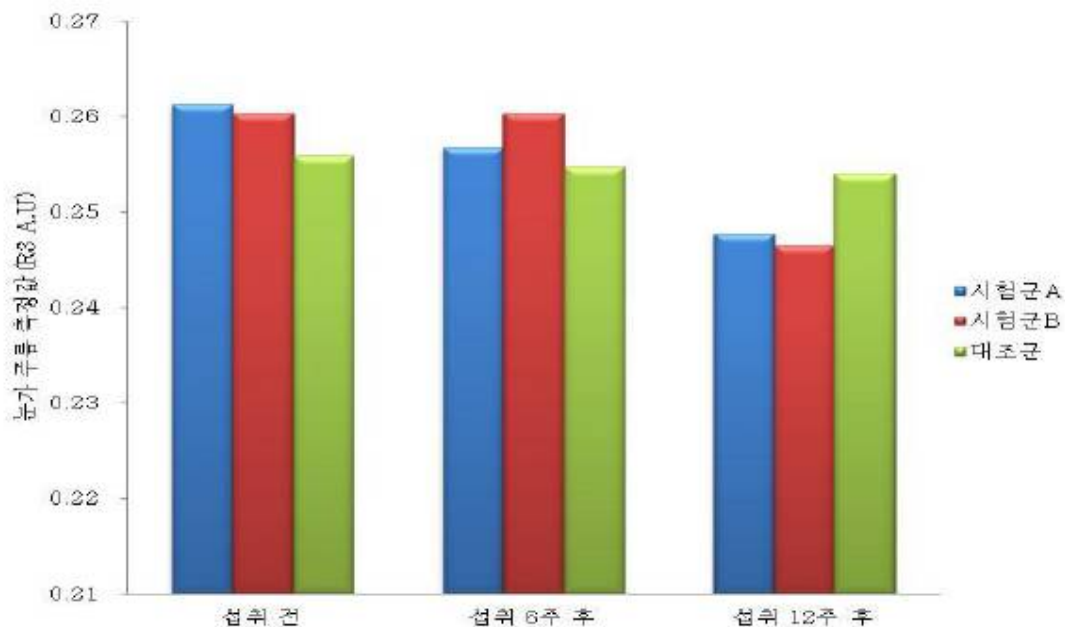


그림 6. 눈가 주름 (R3, average roughness) 측정값



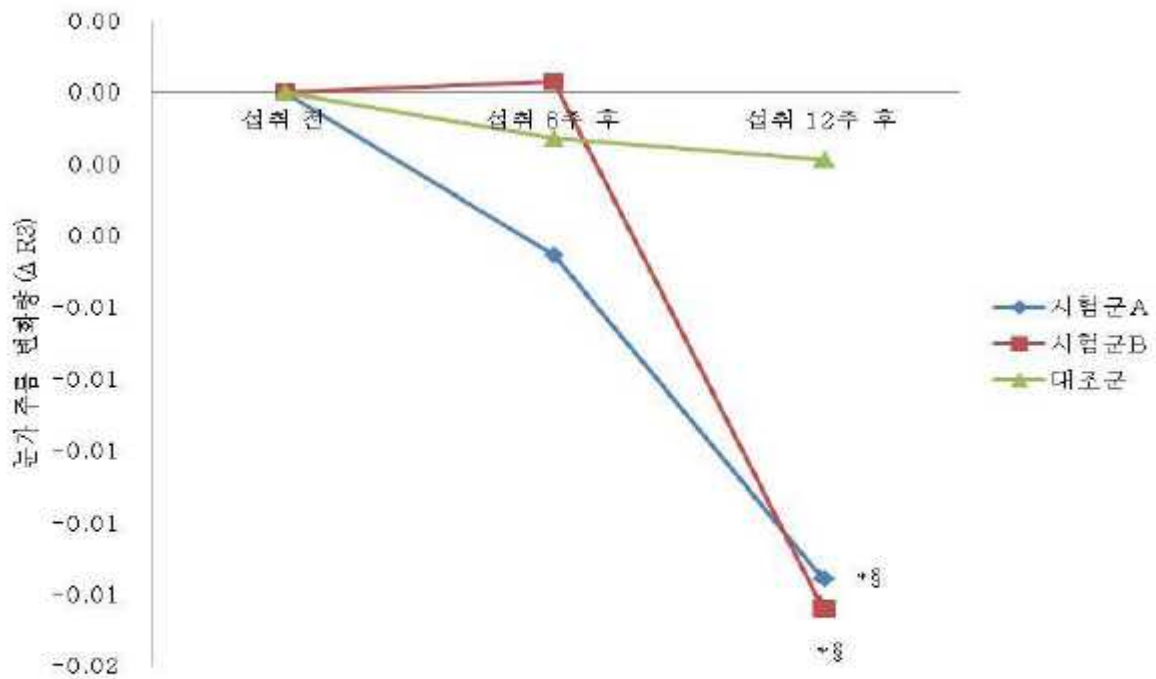


그림 7. 눈가 주름 (R3, average roughness) 변화량

\*: significantly different from baseline,  $p < 0.05$

§: significantly different between test group and control group,  $p < 0.05$

Skin Visiometer SV600의 눈가주름 평가변수 R3의 군내 비교결과, 식품 섭취전에 비하여식품 섭취12주후 시험군A는  $0.01 \pm 0.02$ , 시험군 B는  $0.01 \pm 0.02$ , 대조군은  $0.00 \pm 0.01$ 가 감소하였고, 시험군 A와 B는 통계적으로 유의한 수준 ( $p < 0.05$ ) 감소하였다.

시험군A와 대조군간의 군간 비교 결과, 식품 섭취 12주 후 대조군에 비하여 시험군이 통계적으로 유의한 수준 ( $p < 0.05$ )으로 눈가 주름이 개선되었다.

시험군B와 대조군간의 군간 비교 결과, 식품 섭취 12주 후 대조군에 비하여 시험군이 통계적으로 유의한 수준 ( $p < 0.05$ )으로 눈가 주름이 개선되었다.

### 3. 보습 개선능 인체적용 유효성 평가결과

본 인체 적용 시험의 보습능 유효성 평가변수는 Corneometer CM825로 피험자들에게 시험 식품을 섭취 하기 전의 자료와 섭취 후의 최종 평가자료를 이용하여 시험 식품의 기능성을평가하였다.

표10은 PP set를 대상으로 Corneometer CM825를 이용한 피부보습 평가결과이다. 유효성 평가 변수에 대한 군간 검정은 분산분석을 실시하여 사후분석에 대한 유의 확률값(p-value)을 제시하였다.

표 10. Corneometer CM825를 이용한 피부 보습 유효성 평가 결과(PP)

평가변수		시험군 A	시험군 B	대조군	군간비교 시험군 A/ 시험군 B/ 대조군 p-value	군간비교 시험군 A/ 대조군 p-value	군간비교 시험군 B /대조군 p-value
		Mean ± S.D	Mean ± S.D	Mean ± S.D			
보습	섭취 전 (Visit3)	59.59±11.05	56.96±8.35	61.03±7.49			
	섭취 6 주 후 (Visit4)	63.85±11.50	62.28±8.64	66.31±7.62	0.821	-	-
	Δ 6 주 p-value*	4.27±7.67 0.004	5.33±7.21 0.000	5.29±7.82 0.001			
	섭취 12 주 후 (Visit5)	68.03±9.40	65.16±8.82	64.79±6.88	0.015	0.031	0.042
	Δ 12 주 p-value*	8.45±9.48 0.000	8.20±6.67 0.000	3.77±5.06 0.000			

Δ: 평가변수(섭취 후)-평가변수(섭취 전)

\*: significantly different from baseline, p<0.05

그림8~9는 PP set를 대상으로 Corneometer CM825를 이용한 피부보습평가결과 및 변화량을 나타냈다.

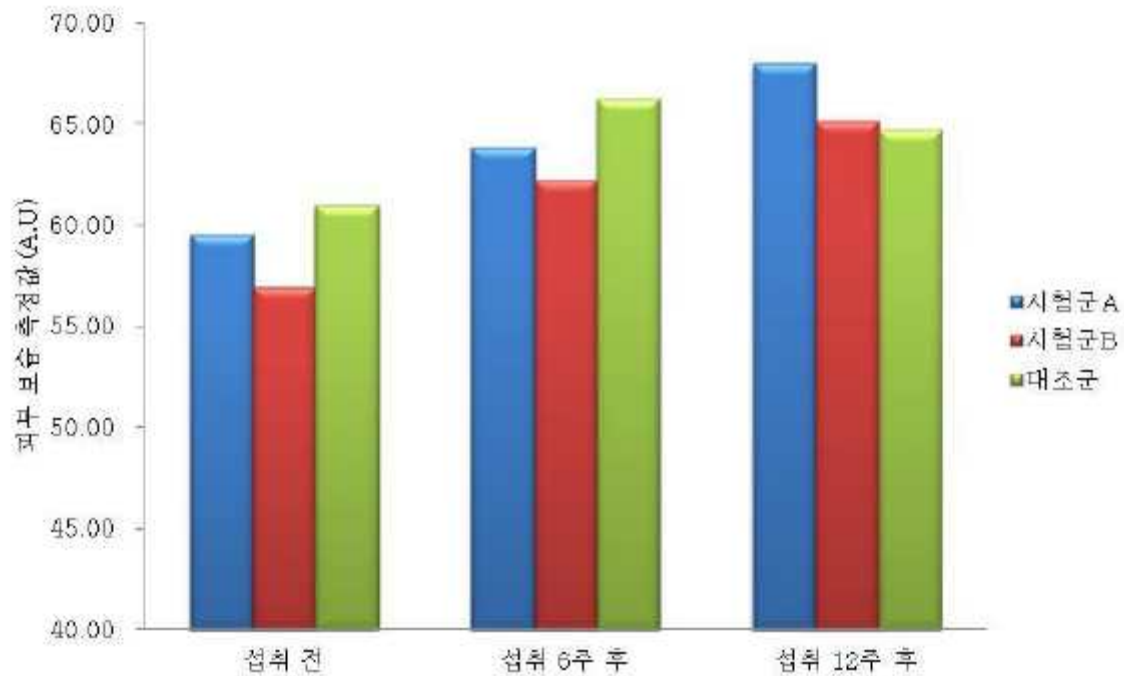


그림 8. 피부 보습 측정값

표 11. Corneometer CM825를 이용한 피부 보습 유효성 평가 결과(ITT)

평가변수		시험군 A	시험군 B	대조군	군간비교 시험군 A/ 시험군 B/ 대조군 p-value	군간비교 시험군 A/ 대조군 p-value	군간비교 시험군 B /대조군 p-value
		Mean ± S,D	Mean ± S,D	Mean ± S,D			
보습	섭취 전 (Visit3)	59.46±10.55	57.08±8.11	61.45±7.29			
	섭취 6주 후 (Visit4)	63.80±11.00	62.10±8.41	66.40±7.31	0.917	-	-
	Δ 6주	4.34±7.37	5.01±7.11	4.95±7.57			
	p-value*	0.002	0.000	0.000			
	섭취 12주 후 (Visit5)	67.61±9.10	64.80±8.67	63.49±7.00	0.001	0.002	0.005
	Δ 12주	8.15±9.13	7.72±6.76	2.04±5.79			
p-value*	0.000	0.000	0.045				

Δ: 평가변수(섭취 후)-평가변수(섭취 전)

\*: significantly different from baseline, p<0.05

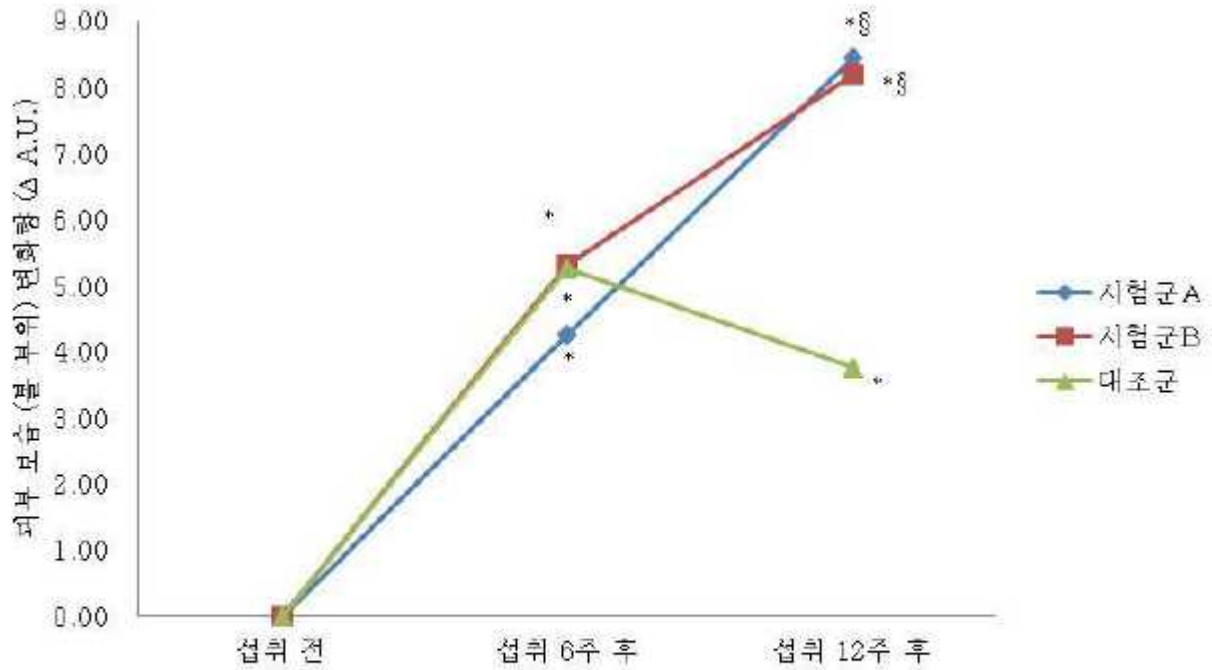


그림 9. 피부 보습 변화량

\*: significantly different from baseline,  $p < 0.05$

§: significantly different between test group and control group,  $p < 0.05$

Corneometer CM825를 이용한 피부 보습기 평가군내 비교결과, 식품 섭취전에 비하여 식품 섭취 12주후 시험군A는  $8.45 \pm 9.48$ , 시험군 B는  $8.20 \pm 6.67$  대조군은  $3.77 \pm 5.06$ 가 증가하였고, 세 군 모두 통계적으로 유의한 수준 ( $p < 0.05$ )으로 증가하였다.

시험군A와 대조군간의 군간 비교 결과, 식품 섭취 12주 후 대조군에 비하여 시험군이 통계적으로 유의한 수준 ( $p < 0.05$ )으로 피부 보습이 개선되었다.

시험군B와 대조군간의 군간 비교 결과, 식품 섭취 12주 후 대조군에 비하여 시험군이 통계적으로 유의한 수준 ( $p < 0.05$ )으로 피부 보습이 개선되었다.

#### 4. 유효성에 대한 최종결론

본 인체적용 시험의 일차유효성 평가변수는 눈가주름 육안평가, 눈가주름기기평가 (Skin Visiometer SV600 (눈가주름평가변수: R3)로서 피험자들에게 시험식품을 섭취하기 전의 자료와 섭취후의 최종 평가자료를 이용하여 시험 식품의 기능성을 평가하였다.

PP set의 눈가주름 육안평가군내 비교 결과, 식품 섭취전에 비하여 식품섭취12주후 시험군 A와 시험군B가 통계적으로 유의한 수준 ( $p < 0.05$ )으로 감소하였다.

시험군A와 대조군간의군간 비교 결과, 식품 섭취 12주 후 대조군에 비하여 시험군이 통계적으로 유의한 수준 ( $p < 0.05$ )으로 눈가 주름이 개선되었다.

시험군B와대조군간의군간 비교 결과, 식품 섭취 12주 후 대조군에 비하여 시험군이 통계적으로 유의한 수준 ( $p < 0.05$ )으로 눈가 주름이 개선되었다.

Skin Visiometer SV600의 눈가주름 평가변수R3의 군내 비교결과, 식품 섭취전에 비하여 식품섭취 12주후 시험군A와 시험군B는 통계적으로 유의한 수준 ( $p < 0.05$ )으로 감소하였

다.

시험군A와 대조군간의 군간 비교 결과, 식품 섭취 12주 후 대조군에 비하여 시험군이 통계적으로 유의한 수준 ( $p<0.05$ )으로 눈가 주름이 개선되었다.

시험군B와 대조군간의 군간 비교 결과, 식품 섭취 12주 후 대조군에 비하여 시험군이 통계적으로 유의한 수준 ( $p<0.05$ )으로 눈가 주름이 개선되었다.

본 인체적용시험의 이차 유효성 평가 변수는 피부보습평가 (피부보습 평가변수: Corneometer CM825)로서 피험자들에게 시험식품을 섭취하기 전의 자료와 섭취후의 최종 평가자료를 이용하여 시험식품의 기능성을 평가하였다.

PP set의 Corneometer CM825를 이용한 피부 보습기기 평가군내 비교결과, 식품 섭취전에 비하여 식품섭취 12주후 시험군 A는  $8.45\pm 9.48$ , 시험군 B는  $8.20\pm 6.67$  대조군은  $3.77\pm 5.06$ 가 증가하였고, 세 군 모두 통계적으로 유의한 수준 ( $p<0.05$ )으로 증가하였다.

시험군A와대조군간의군간 비교 결과, 식품 섭취 12주 후 대조군에 비하여 시험군이 통계적으로 유의한 수준 ( $p<0.05$ )으로 피부 보습이 개선되었다.

시험군B와대조군간의군간 비교 결과, 식품 섭취 12주 후 대조군에 비하여 시험군이 통계적으로 유의한 수준 ( $p<0.05$ )으로 피부 보습이 개선되었다.

## 5. 안전성평가결과

안전성평가는 ITT 분석법으로 시행하였다. 본 인체적용시험에서는 시험군 A 34명, 시험군 B 34명, 대조군35명으로 총103명의 피험자를 대상으로 안전성 분석을 시행 하였다. 안전성 평가는 무작위 배정되어 시험식품 또는 대조식품을 1회 이상 섭취한 피험자 중 안전성 관련 정보가 수집된 모든 피험자를 분석 대상으로 하였다. 안전성 평가 항목으로는 섭취순응도, 이상반응 그리고 맥박, 수축혈압, 확장혈압, 체중 등의 활력징후 변화를 관찰하였으며 이상 반응을 경험한 피험자의 보고는 없었다. 또한, 본 시험기간 동안 중대한 이상반응(SAE) 뿐만 아니라 이상 약물반응 (ADR) 및 이상 반응으로 인한 조기 종료는 없었다.

## <제1협동과제> 농산부산물 유래의 당 세라마이드 등 생리활성지질의 피부 건강개선 효능 검증

### 1. 생리활성지질의 미백 효능 *in vitro* assay

#### 가. 지질 및 재료

본 실험에 사용한 생리활성지질은 (주)두산글로넛으로부터 제공받은 대두 유래 ceramide (순도 60%)와 phosphatidyl serine(PS, 순도 95%)으로서 흡습과 산패를 방지하기 위하여 -70°C 저장고에서 보관하면서 사용하였다. Arbutin, L-DOPA, tyrosinase(from mushroom), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetra-zoliumbromide(MTT)는 Sigma (St. Louise, MO, USA)에서 구입하였으며, tyrosinase, TRP-2 antibody는 Bioworld Technology Inc.(Bioworld, MN, USA)에서 구입하였고, TRP-1 antibody는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하여 사용하였다.

#### 나. 세포 배양

B16F10 흑색종 세포는 쥐의 melanoma 세포주로 American Type Culture Collection(ATCC, USA)에서 구입하였다. 구입한 세포는 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, USA), 1% penicillin streptomycin (Gibco BRL, USA)를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 실험을 위하여 배양 플라스크에 부착되어 있는 B16F10 세포를 trypsin-EDTA (Gibco BRL, USA)로 부유시켜 1×10<sup>5</sup>로 100 mm 배양 용기에 나눈 다음, 24시간 동안 안정화시킨 후 ceramide와 PS를 처리하여 48시간 배양하였다.

#### 다. 세포 생존율

MTT 정량은 Mosmann의 방법을 변형하여 측정하였다. B16F10 melanoma 세포를 1×10<sup>5</sup> cells/well 농도로 24 well plate에 분주한 세포에 ceramide를 처리하고, 24시간 동안 배양하였다. MTT 용액(5 µg/mL)을 첨가하고 4시간 후, 상정액을 제거하고 DMSO 100 µL을 첨가한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 라. Melanin 정량

Melanin 정량은 Yasunobu 등의 방법을 사용하였다. 6 well plate에 3×10<sup>5</sup> cells/well로 세포를 분주하여 배양한 후 ceramide와 PS를 처리하고 48시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양한 세포를 수집하여 세포수를 측정하고, 1000 rpm에서 3분간 원심분리하여 침전시킨 후 1 mL homogenization buffer (50 mM sodium phosphate(pH 6.5), 1% Triton X-100, 2 mM PMSF)로 용해시켜 여기에서 얻은 pellet에 1 N NaOH 200 µL를 첨가하고 혼합 후 405

nm에서 흡광도를 측정하였다. Melanin 표준품으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 melanin 양을 산출하였다.

#### 마. Tyrosinase 활성 저해효과

Tyrosinase 저해활성은 Vanni 등의 방법에 따라 측정하였다. 0.1 M Potassium phosphate buffer (pH 6.8) 1.0 mL, 0.3 mg/mL L-tyrosine 수용액 1.0 mL, mushroom tyrosinase 0.1 mL(1250 unit/mL)를 혼합한 후 여기에 시료용액을 농도에 따라 각각 0.2 mL를 첨가하여 37°C에서 10분 동안 효소반응을 진행시켰다. 반응용액의 흡광도를 475 nm에서 측정하여 시료의 효소 저해활성을 다음 식에 따라 구하였다.

$$\text{Inhibition of tyrosinase activity (\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

A : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 475 nm에서의 흡광도

B : 시료를 첨가한 반응용액의 475 nm에서의 흡광도

#### 바. Western blot

B16F10 세포를 PBS로 3회 수세하고, RIPA(radioimmunoprecipitation buffer, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 1 µg/mL aprotinin, leupeptin, pepstatin)로 lysis를 실시하고, 14,000 rpm에서 25분간 원심분리하여 단백질을 포함하는 상정액을 얻어내어 Bradford's method에 따라 단백질을 정량하고, Laemli's sample buffer와 섞어 3분간 끓인 후 8%의 polyacrylamide gel 상에서 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 gel 상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 옮겨 10% skim milk로 blocking을 하였다. 이 후 1차 항체 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 를 각각 처리한 다음 2차 항체를 처리하였다. 항체 처리 후 enhanced chemiluminescence method로 발광시켜 X-ray 필름에 감광하였다.

#### 자. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였으며 실험치는 평균값과 표준편차로 표시하였고, 모든 실험 결과의 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 하였으며 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

## 2. 생리활성지질의 주름개선 효능 *in vitro* assay

### 가. 주름개선 효능

### (1) 지질 및 재료

본 실험에 사용한 생리활성지질은 (주)두산글로넬로부터 제공받은 대두 유래 ceramide(순도 60%)와 PS(순도 95%)로서 흡습과 산패를 방지하기 위하여 -70°C 저장고에서 보관하면서 사용하였다. 세포배양에 필요한 배지와 각종 시약은 Gibco(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, Pro-MMP-1 ELISA kit는 R&D Systems(Minneapolis, MN, USA), type I procollagen assay kit는 Takara(Kyoto, Japan)에서 구입하여 사용하였다. Anti-human MMP-1, anti-phospho-ERK, anti-ERK, anti-phospho-JNK, anti-JNK와 anti-c-Fos 항체는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)에서 구입하였고 그 외 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 그 외 실험에 사용된 모든 시약은 세포 배양 및 분석용 시약을 사용하였다.

### (2) 세포배양

실험에 사용된 섬유아세포는 신생아의 표피조직에서 분리한 human dermal fibroblast (HDF)로 American Type Culture Collection(ATCC)로부터 구입하여 분주하여 사용하였다. 구입한 섬유아세포를 IMDM 배지에 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin-streptomycin 을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 배양하여 실험에 사용하였다.

### (3) 자외선 조사 및 시료 처리

실험에 사용된 자외선은 UVB로서 20~90 mJ/cm<sup>2</sup>의 자외선을 CUBE 401 lamp를 사용하여 조사하였다. 섬유아세포를 1×10<sup>5</sup> cells/mL 농도로 24 well에서 배양하였으며 80% confluency에 도달할 때 까지 배양하였다. UV 조사전에 원배지를 제거한 후 PBS로 세척하여 배지내 serum이 완전히 제거되도록 하였다. UV 조사 후 free serum인 배지로 처리하고 당 세라마이드, PS를 각 농도별로 처리 후 24시간 배양하였다.

### (4) 세포 생존율

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay로 측정하였다. 1×10<sup>5</sup> cells/mL 수준의 배양 세포 100 μL를 96 well plate에 분주한 후, overnight시키고 각 농도별(1~10 μg/mL) 시료를 처리하여 48시간 배양한 뒤 MTT 시약을 50 μL 첨가하였다. 4시간 incubation하고 원심분리(1000 rpm, 4°C, 5분)하였으며, 상정액을 버리고 DMSO를 150 μL 처리 후 25분 동안 37°C에서 shaking incubation시키고 ELISA microplate reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### (5) Type-I pN collagen 생성 촉진능

Type-I pN collagen의 합성량 측정은 ELISA kit(Takara, Japan)를 사용하여 측정하



였다. 섬유아세포를 24-well plate에  $5 \times 10^4$  cells/mL로 분주하고, 10% FBS를 첨가한 IMDM 배지에서 24시간 배양하였다. 이후 FBS를 첨가하지 않은 IMDM 배지에 ceramide, PS를 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양하고 상정액을 회수하였다. 그 후 회수된 상정액을 이용하여 96 well plate에 coating하고 4°C에서 overnight 방치한 후, TPBS로 세척하고, 3% bovine serum albumin을 넣고 2시간 blocking하였다. Primary antibody인 anti-collagen antibody를 37°C에서 90분간 처리한 후 TPBS로 3회 세척하였다. Secondary antibody인 anti-mouse IgG를 90분간 반응시킨 후 TPBS로 세척하였다. Alkaline phosphatase substrate solution을 상온에서 30분간 반응시킨 후 microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (6) pro-MMP-1 함량

세포배양액에서의 pro-MMP-1 발현량은 Quantikine ELISA kit(R&D Systems)를 사용하여 측정하였다. 24 well plate에 섬유아세포를  $1 \times 10^5$  농도로 분주후 24시간 동안 배양한 다음, UVB( $60 \text{ mJ/cm}^2$ ) 조사 1시간전 PS를 농도별로 투여하였다. 24시간 후 세포배양 상층액을 수확하여 pro-MMP-1 발현량을 측정하였으며, 각 well의 단백질 함량을 측정하여 pro-MMP-1 함량을 보정하였다.

#### (7) Western blot

PS의 세포내 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot 분석을 실시하였다. 섬유아세포에 각 농도의 PS 및 LPS를 처리하여 24시간 동안 배양한 후 1% protease inhibitor를 넣은 RIPA buffer로 단백질을 추출한 후 4°C에서 12,000 rpm으로 25분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 정량하였다. 20-40  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 5X SDS sample buffer에 넣고 100°C에서 10분간 가열하여 denaturation시킨 후 전기영동을 실시하였다. 10% SDS polyacrylamide gel에서 120V로 2시간동안 전기영동한 후 nitrocellulose membrane으로 transfer시키고 5% skim milk를 함유한 blocking solution에서 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체를 1:500로 희석하여 상온에서 1시간동안 반응시킨 후 Tris-Buffered Saline Tween-20(TBS-T)으로 10분씩 3번 washing하였다. 그 후 1:5000의 비율로 희석한 2차 항체로 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 TBS-T로 10분씩 4번 washing하였다. ECL western blotting substrate(Thermo Scientific)을 이용하여 단백질의 발현량 차이를 luminoimager (ChemiDoc™ XRS+, BIO-RAD)이용해 관찰하였다.

#### (8) 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 평균과 표준편차로 표현하였으며, 처리구간의 통계적 유의성은 SPSS statistical software(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 Student's t-test에 의하여 검정하였다.

## 나. 항염증 효능

### (1) 지질 및 재료

실험에 사용된 PS(순도 95%)는 ㈜두산글로넬로부터 제공받았으며, dimethyl sulfoxide(DMSO), 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), lipopolysaccharide (LPS), Griess reagent, DCFH-DA, protease Inhibitor, RIPA buffer는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), streptomycin은 GIBCO사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )와 interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6(IL-6)ELISA kit는 Enzo Life Sciences, Inc.(Farmingdale, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. Hoechst 33342는 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA), NF- $\kappa$ B(p65),  $\beta$ -actin, inducible NOS(iNOS)와 COX-2 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.에서 구입하여 사용하였다.

### (2) 세포배양

Mouse macrophage인 RAW264.7 세포는 한국 세포주 은행에서 분양 받아 DMEM 배지에 10% FBS와 100 unit/mL streptomycin을 첨가하여 5%의 CO<sub>2</sub>와 37°C 조건하에서 배양하였다. 세포 배양을 위한 모든 샘플처리 및 시료의 제조는 무균 테이블에서 시행하였고, 시험에 사용된 모든 시험 기구는 고압 멸균기로 멸균하여 사용하였다.

### (3) 세포독성

PS의 RAW264.7 세포에 대한 독성 효과를 측정하기 위해 96 well plate에 1x10<sup>4</sup> cells/well씩 분주한 후 24시간 배양하였다. 그 후 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 넣고 4시간 배양하였다. 배양 후 상등액을 제거하고 DMSO를 첨가하여 세포내 미토콘드리아에서 MTT환원에 의해 생성된 formazan을 ELISA microplate reader(Infinite® 200 PRO, TECAN Group Ltd., Switzerland)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### (4) Nitric oxide(NO)

RAW264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1x10<sup>4</sup> cells/well로 조절한 후 96 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 이후 PS를 1시간전에 처리하고 LPS(1  $\mu$ g/mL)를 처리한 후 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess reagent [1%(w/v) sulfanilamide, 0.1%(w/v) naphylethylenediamine in 2.5%(v/v) phosphoric acid]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO<sup>2-</sup>를 측정하였다. 세포배양 상등액 100  $\mu$ L와 Griess 시약 100  $\mu$ L를

혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 Sodium nitrite( $\text{NaNO}_2$ )를 standard로 사용하여 정량하였다.

(5) 세포내 IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$

RAW264.7 세포를 24 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well이 되도록 분주하여 24시간 배양한 후에 PS를 1시간전에 농도별로 처리하고 LPS( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하여 24시간 배양한 후, 배양액에 함유된 TNF- $\alpha$ 와 IL-6, IL-1 $\beta$ 의 농도를 ELISA kit(Enzo Life Sciences)를 이용하여 제조사의 분석방법에 따라 측정하였다.

(6) Western blot

PS의 iNOS, COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Western blot 분석을 실시하였다. RAW264.7 세포에 각 농도의 PS 및 LPS를 처리하여 24시간 배양한 후 1% protease inhibitor를 넣은 RIPA buffer로 단백질을 추출한 후 4°C 에서 12,000 rpm으로 25분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액의 단백질은 bovine serum albumin을 표준물질로 Bradford 1xdye reagent kit(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량하였다. 50  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 4 X SDS sample buffer에 넣고 100°C에서 5분간 가열하여 denaturation 시킨후 전기영동을 수행하였다. 10% SDS polyacrylamide gel에서 120V로 2시간 동안 전기영동한 후 nitrocellulose membrane으로 transfer시키고 5% skim milk를 함유한 blocking solution에서 1 시간 동안 반응시켰다. iNOS 및 COX-2 항체를 1 : 500의 비율로 희석하여 4°C chamber room에서 overnight 시킨 후 Tris-Buffered Saline Tween-20(TBS-T)으로 10 분씩 3번 washing하였다. 그 후 1 : 2000의 비율로 희석한 2차 항체로 2 시간 동안 상온에서 반응한 후 TBS-T로 10분씩 3번 washing하였다. 세척한 nitrocellulose membrane은 ECL western blotting substrate(Thermo Scientific) 용액으로 염색한 후 단백질의 발현 정도를 luminoimager(ChemiDoc™ XRS+, BIO-RAD)를 이용하여 관찰하였다.

(7) 유세포측정기를 통한 활성산소종(ROS) 측정

DCFH-DA 시약을 사용하여 세포내의 활성산소종 농도를 측정하였다. RAW264.7 세포를 6 well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well이 되도록 분주하여 24시간 배양한 후에 PS를 농도별로 처리하고 1시간동안 배양한 후  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 10  $\mu\text{M}$  DCFH-DA 시약을 30분간 처리한 후, PBS로 2번 washing하고, PBS 1 mL로 세포를 수확후 유세포 측정기(Becton Dickinson FACScan with Cell Quest software, BD Biosciences, San Jose, USA)를 이용하여 평균형광계수를 측정하였다.

(8) 면역 형광법을 이용한 NF- $\kappa\text{B}$ (65) 핵이동 관찰

NF- $\kappa$ B의 subunit인 p65의 세포 내 위치를 확인하기 위해 RAW264.7 세포를 멸균된 cover glass를 올린 24 well에  $1 \times 10^5$ /well이 되도록 분주하여 24시간 배양하였다. 그 후 PS(50  $\mu$ g/mL)를 처리한 후 1시간동안 배양하고, 1  $\mu$ g/mL의 LPS를 처리하여 30분 동안 배양하였다. 그 후  $-20^\circ\text{C}$ 의 조건에서 methanol을 넣어 세포를 20분간 고정시킨 후 PBS로 5분간 washing 하였다. 고정된 세포를 permeabilization시키기 위해 PBS로 희석한 0.5% Triton X-100를 첨가하여 상온에서 1시간동안 반응시킨 후, PBS/0.02% Tween 20/1% BSA로 5분간 세척시켰다. Permeabilization된 cell에 1 mg/mL 의 monoclonal mouse anti-human NF- $\kappa$ B(p65)를 처리하고 실온에서 1시간동안 반응시킨 후, PBS/0.05% Tween 20/1% BSA로 5분간 washing하였다. 그 후 1:2000으로 희석시킨 2차 항원을 실온에서 60분간 반응시킨 후, PBS/0.05% Tween 20으로 세척하였다. 그 후 세포를 0.1 M의 Hoechst를 처리하고  $37^\circ\text{C}$ 에서 20분간 염색시킨 다음 washing하였다. 마지막으로, cover glass에 xylene과 malinol을 1:1로 섞은 mounting 시약을 도포후  $37^\circ\text{C}$  건조기에서 40분간 건조시켜 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다.

#### (9) 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 평균과 표준편차로 표현하였으며, 처리구간의 통계적 유의성은 SPSS statistical software(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 Student's t-test에 의하여 검정하였다.

### 3. 생리활성지질의 주름개선 효능 *in vivo* assay

#### 가. 지질

본 실험에 사용한 생리활성지질은 (주)두산글로넬로부터 제공받은 대두 유래 ceramide (순도 60%)와 PS (순도 40%)로서 흡습과 산패를 방지하기 위하여  $-70^\circ\text{C}$  저장고에서 보관하면서 사용하였다.

#### 나. 실험동물의 처치

실험동물은 ICR/HR 6주령의 암컷 hairless mouse(Skh-1)을 사용하였으며 실험이 들어가기전 1주일간의 적응기간을 거친 뒤 실험을 시작하였다. 식이와 물은 자율로 먹을 수 있도록 하였으며  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도에  $50 \pm 10\%$ 의 습도, 12시간 간격의 day/night cycle의 조건에서 사육하였다. 동물군은 정상대조군, 자외선 조사군, 자외선 조사+시험물질 경구투여군으로 나누었으며 시험물질 경구투여군은 고농도 ceramide 투여군, 중간농도 ceramide 투여군, 저농도 ceramide 투여군, 그리고 고농도 PS 투여군, 중간농도 PS 투여군, 저농도 PS 투여군으로 나누어 설정하였다.

#### 다. 자외선 조사에 의한 주름 생성

자외선 조사는 정상대조군을 제외한 실험군에 매주 3회 동일한 시간에 UV를 조사하였다. UV 조사를 위해 태양광과 유사한 UV를 방출하는 UVB 램프(UB800, Waldmann Lichttechnik GmbH, Villingen-Schwenningen, Germany)를 이용하였다. 자외선 B (ultraviolet B) 조사는 최소 홍반량(minimal erythromaldose(MED))을 60 mJ/cm<sup>2</sup>으로 하여 1주일에 3회씩 mouse의 등 부위에 조사하였으며, 1주차는 1 MED (60 mJ/cm<sup>2</sup>), 2주차는 2 MED (120 mJ/cm<sup>2</sup>), 3주차는 3 MED (180 mJ/cm<sup>2</sup>), 4주차부터 실험 종료 시까지 4 MED (240 mJ/cm<sup>2</sup>)로 조사하였고, 총 10주간 조사하였다.

#### 라. 시험물질의 투여

실험동물은 ceramide의 경우 정상군(control), 대조군(UV control), 고농도 ceramide 투여군(UV/HC), 중간농도 ceramide 투여군(UV/MC), 저농도 ceramide 투여군(UV/LC) 등 5개 동물군으로 나누어 실험을 진행하였으며, PS의 경우에는 정상군(control), 대조군(UV control), 고농도 PS 투여군(UV/HPS), 중간농도 PS 투여군(UV/MPS), 저농도 PS 투여군(UV/LPS) 등 5개 동물군으로 나누어 실험을 진행하였다. 정상군과 대조군은 생리식염수를 sonde로 경구 투여하였으며, ceramide는 고농도 200 mg/kg, 중간농도 50 mg/kg, 저농도 20 mg/kg을, 그리고 PS의 경우에는 고농도 50 mg/kg, 중간농도 25 mg/kg, 저농도 12.5 mg/kg을 식염수에 녹여 반복 경구투여하였다. 투여기간은 총 10주로 주 7일 1일 1회 동일한 시간에 투여하였다.

#### 마. 임상 증상 관찰 및 체중 측정

적응기간 및 시험 물질 처리 기간 동안 1일 1회 임상 증상의 변화 및 사망 여부를 관찰하였으며, 체중 측정은 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 시험 시작 전과 시험 기간 중 2주에 1회씩 실시하였다.

#### 바. 피부 두께 측정

2주간의 경구투여 후 micrometer (Mitutoyo Co., Kawasaki, Japan)로 mouse의 등 피부 두께를 측정하였다. 실험에 사용된 micrometer는 0.01 mm 까지 측정 가능하며, 두께에 일정한 힘을 가할 수 있는 조절기능을 갖추고 있어 같은 힘을 준 상태에서 피부의 두께 측정이 가능하였다.

#### 자. 표피 수분 측정

주름에 따른 표피 수분의 함량의 변화를 살펴보기 위하여 Corneometer CM825 (Courage & Khazaka Electronics, Cologne, Germany)를 이용하여 표피 수분 함량을 측정하였다.

#### 차. 피부의 육안 관찰 및 피부주형의 분석

주름 생성 추이를 측정하기 위하여 0주, 5주, 10주에 피부를 육안 관찰하고 10주후 피부주형을 채취하였다. 군별로 hairless mouse의 등 부위에 실리콘폴리머(Silflo, replica kit, Germany)를 잘 도포하여 마를 때 까지 기다린 후 떼어내어 피부주형(replica)을 채취하였다. 채취한 피부주형은 컴퓨터 영상분석기(Visioline VL650, Courage & Khazaka Electronics, Cologne, Germany)를 통하여 빛을 일정한 각에서 조사하였을 때 주름에 의하여 생기는 그림자의 면적을 통한 주름의 깊이와 수를 정량하여 피부 주름 면적을 분석하였다.

#### 파. 피부조직의 병리학적 관찰

조직 준비를 위하여 동물을 희생시킨 후 등쪽 피부를 떼어내어(1cmx1cm), filter paper에 편평하게 부착한 후 10% 중성 포르말린에 고정시킨 다음 조직처리 과정을 거쳐 파라핀 포매하여 4  $\mu$ m 절편을 잘라 Hematoxylin & Eosin (H&E) staining 및 Masson-Trichrome staining을 실시하였다. Epidermis의 두께는 H&E 염색 슬라이드를 현미경 상에서 200배 확대하여 시야에서 보이는 표피층의 granular layer부터 basal layer 까지의 길이를 구하였고, collagen 함량은 Masson-Trichrome 염색 슬라이드를 현미경 상에서 200배 확대하여 파란색을 나타내는 collagen의 면적을 구하였다. 이때 이미지 분석 프로그램인 Optimas 6.5 (Optimas Co., Green Bay, WI, USA)를 이용하였다.

#### 타. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였으며 실험치는 평균값과 표준편차로 표시하였고, 모든 실험 결과의 통계적 유의성은 one-way ANOVA test와 Student's *t*-test로 검정하였다.

### 4. 생리활성지질의 보습 효능 *in vivo* assay

#### 가. 지질

본 실험에 사용한 생리활성지질은 (주)두산글로넛으로부터 제공받은 대두 유래 ceramide (순도 60%)와 phosphatidyl serine(PS, 순도 95%)로서 흡습과 산패를 방지하기 위하여 -70°C 저장고에서 보관하면서 사용하였다.

#### 나. 실험동물의 처치

실험동물은 ICR/HR 6주령의 암컷 hairless mouse(Skh-1)을 사용하였으며 실험이 들어가기 전 1주일간의 적응기간을 거친 뒤 실험을 시작하였다. 식이와 물은 자율로 먹을 수 있게 하였으며 24 $\pm$ 2°C의 온도, 50 $\pm$ 10%의 습도, 12시간 간격의 day/night cycle의 조건에서 사육하였다. 실험군은 정상군, TS(tape stripping) 처리군, TS+시료 경구투여 군으로 나누었으며 시료 경구투여군은 고농도 ceramide와 저농도 ceramide, 고농도 PS와 저농도 PS로 나누어 설정하였다.

#### 다. 시험물질의 투여

실험동물은 Table 1에 제시된 바와 같이 정상대조군(Normal control), TS 대조군(Tape stripping control), ceramide 고농도군, 저농도군, PS 고농도군, 저농도군 등 총 6개 군으로 나누어 실험을 진행하였다. 정상대조군은 아무것도 처리하지 않고 대조군의 경우 생리식염수를 sonde로 경구투여하였으며, 나머지 실험군은 고농도의 경우 20 mg/kg과 저농도 10 mg/kg을 식염수에 녹여 경구 반복 투여하였다. 투여기간은 총 4주로 주 7일, 1일 1회 동일한 시간에 투여하였다.

Table 1. Experimental group and dose regimen for analysis of moisturizing effects of bioactive lipids

Group	Tape stripping	Dosage
Normal control	×	×
TS control	○	Vehicle
LC	○	Ceramide 10 mg/kg
HC	○	Ceramide 20 mg/kg
LPS	○	PS 10 mg/kg
HPS	○	PS 20 mg/kg

#### 라. 임상 증상 관찰 및 체중 측정

적응기간 및 시험 물질 처리 기간 동안 1일 1회 임상 증상의 변화 및 사망 여부를 관찰하였다. 체중 측정은 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 시험 시작 전과 시험 기간 중 1주에 1회씩 실시하였다.

#### 마. Tape stripping에 의한 피부장벽 손상

Tape stripping은 셀로판테이프(스카치TM 다용도 테이프, 3M)를 사용하였으며, 부위는 등 피부에 2x3cm의 넓이에 테이프를 일정한 힘으로 붙이고 엄지손가락의 바닥부위로 두번 견고하게 문지른 다음 엄지와 검지로 테이프의 한쪽 끝을 잡고 45도 각도를 유지하면서 머리 쪽으로 벗겨내는 방식으로 반복적으로 stripping 하였다. 10회 이상 stripping 후에는 경피수분손실 증가가 큰 변화가 없었기에 모든 실험군은 9회 stripping을 실시하였다.

#### 바. 경피수분손실(TEWL, transepidermal water loss)

경피수분손실 측정은 실내온도 24±1℃, 습도 46%의 항온항습실에서 실시되었다. 측정은 TS 실시 직후 그리고 2시간, 4시간, 24시간, 48시간, 72시간 경과 후에 Vapometer(Delfin Technology, Finland)를 이용하여 각각 이루어졌다.

#### 자. 피부조직의 병리학적 관찰

조직 준비를 위해 동물을 희생시킨 후 등쪽피부를 떼어내어 filter paper에 편평하게 부착한 후 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 일반적인 조직관찰과 표피층 두께 측정을 위하여 H&E 염색을 실시하였다. 피부표피층의 두께는 H&E 염색 슬라이드를 현미경상에서 읽어 200배 확대 하여 조직당 무작위로 선택한 3지점의 두께를 측정하여 평균치를 계산하였다.

#### 차. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였으며 실험치는 평균값과 표준편차로 표시하였고, 모든 실험 결과의 통계적 유의성은 one-way ANOVA test와 Student's *t*-test로 검정하였다.



## 5. 생리활성지질의 미백 효능 *in vitro* assay 결과

동물, 식물 및 미생물에 널리 존재하는 melanocyte에서 형성되는 페놀류의 고분자 물질로 인간의 피부색을 결정하는 근본적인 내적인자는 천연 피부 색소인 melanin이다. Melanin은 표피 기저층에 존재하는 melanin 세포의 melanosome에서 합성되어 수상돌기를 통해 표피의 각질세포로 이동되어 피부의 색깔을 나타내고, 자외선에 의한 세포손상을 막아주거나, 독성 물질의 흡수를 막아주는 등의 중요한 작용을 수행하는 반면, 과도한 색소침착은 기미와 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하는 등 미용적인 면에서 부정적인 기능을 나타내기도 한다. Melanocyte에서의 다단계 효소반응, 자동산화과정을 통하여 melanin 생합성이 이루어지며, 합성시 특유의 효소들이 관여하게 되는데 tyrosinase와 함께 관련 단백질 TRP-1과 TRP-2가 있다. TRP-1은 tyrosinase의 안정화에 관여하며, 5,6-dihydroxyindole carboxylic acid oxidase 활성화에 관여한다고 알려져 있다. TRP-2는 DOPAchrome tautomerase라고도 불리우는데, 중간대사산물인 DOPAchrome을 DHICA로 이성화시키면서, Melanin 생중합체 내 carboxylated subunits의 구성을 조절하는 역할을 한다고 보고되고 있다.

Melanin 과잉 생성을 억제하기 위한 연구는 다양하게 이루어지고 있으며, tyrosinase를 비롯한 melanin 형성에 관여하는 효소의 발현과 활성을 조절함으로써 미백 효과를 나타내도록 한 다양한 소재개발이 이루어지고 있다. 관련 연구들을 보면 tyrosinase의 활성을 저해하는 물질로는 대표적으로 kojic acid, arbutin, 감초추출물에 관한 연구보고가 있으며, 피부박리를 촉진시켜 melanin 색소 제거를 촉진시키는 소재로서 retinoic acid에 관한 연구가 있으나, 이들 대부분이 효과가 미미하고, 제형상 불완전하며, 피부에 대한 안전성 측면이 제한적으로 이루어지고 있다. 피부의 미백에 도움을 주는 기능성 소재를 찾기 위한 연구는 melanin 합성 전과 합성 중, 그리고 합성 이후로 나누어 진행되는데, 기존의 미백 물질들은 작용 기전에 따라 자외선 흡수제, 산란제, 항산화 활성이 큰 vitamin C, kojic acid, arbutin 등과 같은 tyrosinase저해제, 활성 산소종을 소거하는 토코페롤 등 melanin 합성 중에 관여하는 tyrosinase의 활성을 저해하는 물질에 대한 연구가 주를 이루었다. 최근에는 melanin 합성 전에 tyrosinase의 당화 및 전사체의 형성을 막아주는 물질이나 melanocyte에서 각질형성세포로의 melanin 이동을 억제할 수 있는 물질도 보고되고 있다.

### 가. 세포 생존율

정상세포에 미치는 시료의 독성 유무를 알아보기 위하여 1~40 µg/mL 농도로 처리하여 세포 증식율을 조사하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 ceramide의 경우 20 µg/mL 이하에서는 90% 이상 세포 증식율을 나타내었고, 그 이상의 농도에서는 80% 이하로 증식율이 저하되었다. PS 경우 ceramide에 비해 세포 증식율이 저하되는 것으로 나타났는데 10 µg/mL 이하 농도에서는 90% 이상의 세포 증식율을 나타내지만, 20, 40 µg/mL로 농도가 높아질수록 세포 증식율이 크게 저하되는 것을 알 수 있었다.

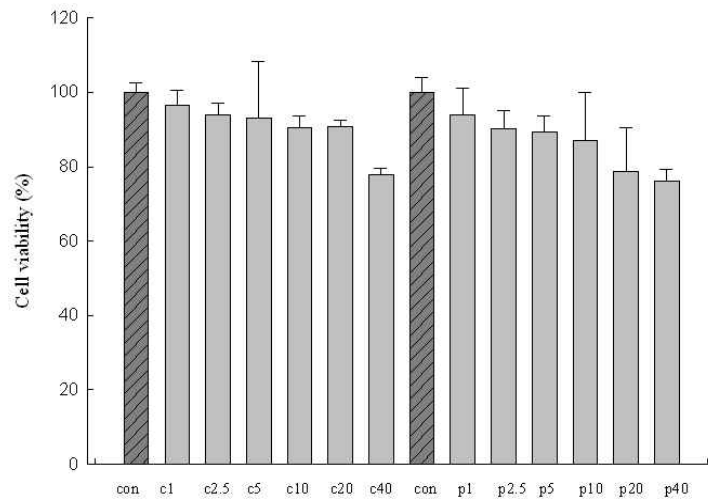


Fig. 1. Effect of ceramide and PS on the cell viability of mouse melanoma cell(B16F10) by MTT assay.

#### 나. Melanin 생합성 저해 효과

Melanin의 생성은 피부의 표피와 진피 사이에 주로 존재하는 melanocyte에서 일련의 생합성 과정에 의해 melanin으로 합성된다. Ceramide와 PS를 1~20  $\mu\text{g/mL}$  농도로 72시간 처리 후 melanin 생성량에 미치는 영향을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. Ceramide 처리구의 경우 농도 의존적이지는 않지만 melanin 생성량이 대조구에 비해 크게 감소하여 ceramide가 melanin 생성 저해 효과가 우수함을 알 수 있었다. 양성 대조구로 사용한 arbutin 5  $\mu\text{g/mL}$ 이 melanin 생성량을 대조구에 비해 약 39% 감소시키는 것으로 나타났고, ceramide는 1  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 양성 대조구보다 더 낮은 melanin 생성량을 나타내었다. PS 처리구의 경우에는 대조구보다 높은 melanin 생성량을 나타내어 PS가 melanin 생합성 저해 효과를 나타내지 않음을 확인할 수 있었다.

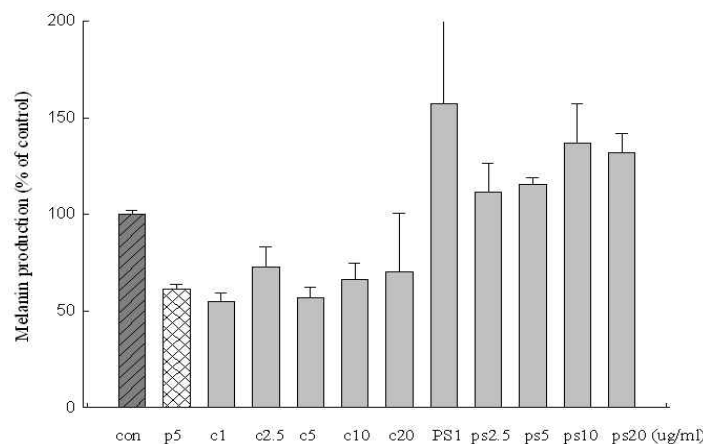


Fig. 2. Effect of ceramide and PS on melanin production in B16F10 melanoma cells. The cells were incubated with sample for 72 h. Melanin content is quantified by absorption at 405 nm calibrated with synthetic melanin as standard.

#### 다. Mushroom tyrosinase 활성 저해효과

Melanin 생합성 억제 효과가 우수한 것으로 확인된 ceramide를 농도별로 처리했을 때 mushroom tyrosinase 활성 저해 효과를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. Tyrosinase는  $\text{Cu}^{2+}$ 와 결합한 효소로 동식물, 미생물 및 사람 등에 널리 분포되어 있는 polyphenol oxidase로 melanin 합성과정에서 속도를 제한하는 등 melanin 합성의 주요한 조절 효소로 알려져 있다. 양성 대조군으로 사용한 kojic acid의 경우 농도 의존적으로 tyrosinase 활성을 억제하였으며, ceramide의 경우에는 고농도로 처리한 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ 에서 tyrosinase 활성을 11%, 12.3% 억제한 반면 저농도 1, 2.5  $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하였을 때는 각각 17.2%, 17.6%로 tyrosinase를 억제하여 고농도에서 보다 저농도에서 tyrosinase 저해 활성이 더 높았으며, 또한 저농도에서 양성 대조군 보다 더 높은 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다.

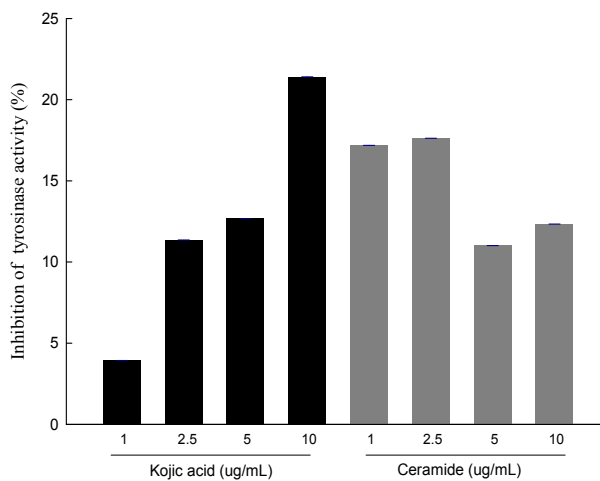
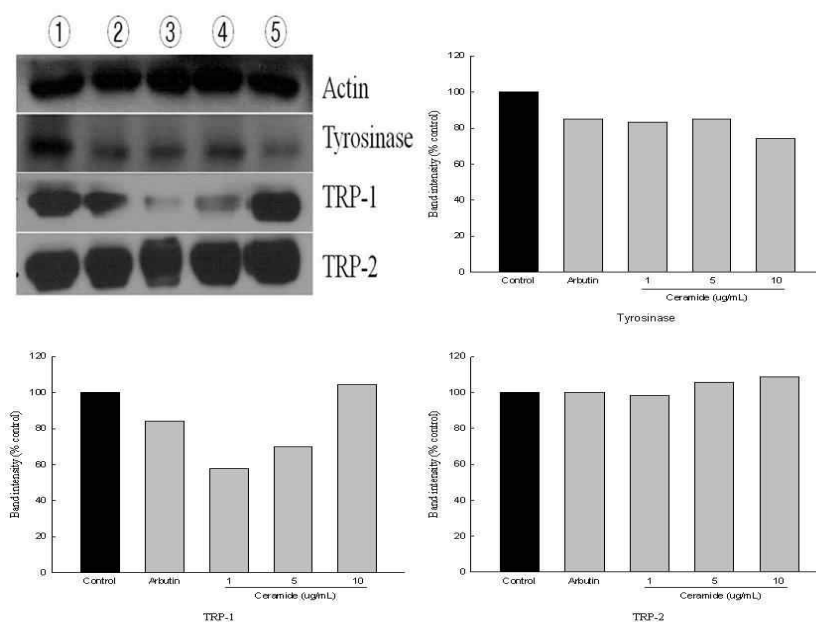


Fig. 3. Inhibitory effect of ceramide on mushroom tyrosinase activity. The results were expressed as the mean values $\pm$ S.D.

#### 라. Melanin 합성 관련 단백질 발현에 미치는 영향

Ceramide가 melanin 생성과정에 관여하는 단백질 발현 양상에 미치는 영향을 분석하였다. Melanin 합성은 tyrosinase 효소 뿐만 아니라 DOPAquinone을 DHICA (dihydroxy indole carboxylic acid)로 전환시키는 TRP-2와 DHICA indol-5,6-carboxylic acid로 전환시키는 TRP-1의 일련의 효소반응에 의하여 일어나게 된다. 앞서 실험한 tyrosinase 저해 효과와 세포 내 melanin 생합성 저해의 결과로 미루어 볼 때 ceramide는 tyrosinase 활성을 저해하여

melanin 생성을 감소시키는 것으로 판단된다. 이러한 결과가 melanin 합성 관련 단백질의 발현 과도 연관성이 있는지를 확인하기 위하여 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 항체를 이용하여 Western blot을 이용한 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 ceramide는 TRP-2의 발현에는 영향을 미치지 않지만, tyrosinase의 발현을 저해하였으며, TRP-1의 경우 ceramide 저농도(1, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 처리시 양성 대조군으로 처리한 arbutin에 비해 월등히 높은 발현 억제 효과를 나타내었다. 미백의 지표물질인 arbutin의 경우 tyrosinase의 활성 부위에서 L-tyrosine과 경쟁적 저해제로 작용함으로써 tyrosinase의 특이적인 melanin 생성에 대한 저해 효과를 보이며, 세포신호전달 경로를 저해함으로써 tyrosinase와 TRP-1 등의 melanin 생성에 필요한 효소경로를 저해하는 것으로 알려져 있다. 한편 ceramide는 TRP-2의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났는데 이는 B16F10 세포에서 몇몇 melanin 생성 활성화 인자들이 melanin 생성 촉진 과정에서 TRP-2를 오히려 억제하였기 때문인 것으로 생각된다. 단백질 발현의 density를 측정된 결과, ceramide 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 tyrosinase 활성을 26% 저해시키지만, TRP-1에서는 농도가 가장 낮은 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 43% 저해시키는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 ceramide는 melanin 생합성 경로에서 초기에 관여하는 tyrosinase의 활성을 직접적으로 억제할 뿐만 아니라, 세포신호전달에 관여하는 세포내 tyrosinase 발현을 억제함으로써 melanin 생성량을 감소시키는 것으로 판단된다. 따라서 ceramide는 melanin 생합성의 초기에 중요한 역할을 하는 tyrosinase의 활성 및 발현을 억제함으로써 melanin 생성을 감소시키는 것으로 사료된다. 또한 melanin 생성에 관련된 세포신호전달 경로를 저해함으로써 tyrosinase 및 TRP-1 등의 melanin 생성에 필요한 효소 경로를 저해하는 것으로 보인다. 따라서 향후 ceramide는 피부자극 없이 미백용도의 기능성 소재로서의 가능성을 가지고 있는 것으로 판단된다.



- ① Control
- ② Arbutin 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- ③ Ceramide 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- ④ Ceramide 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- ⑤ Ceramide 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Fig. 4. Effect of ceramide on tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 expression in B16F10 cells. The cells were treated with various concentrations of ceramide for 48 hr. Solubilized total protein (30  $\mu\text{g}$ ) was electrophoresed in 8% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membrane. Specific detection of proteins was performed with the polyclonal antibody against tyrosinase, TRP-1 and TRP-2.

## 6. 생리활성지질의 주름개선 효능 *in vitro* assay 결과

인간의 노화 현상 중 하나인 피부의 노화는 그 원인으로 크게 내적, 외적 요인으로 나누어 지는데, 그 중 외적요인으로 태양광에 의한 UV 조사는 피부노화의 생리학적, 형태학적 변화의 주된 원인으로 알려져 있다. 피부에 직접적인 영향을 주는 자외선은 피부의 표피와 진피층에 깊숙하게 투과하여 몇가지 효소반응을 포함한 다양한 과정을 거쳐서 세포 및 조직 중에서 활성산소(oxygen free radical)를 생성시키는데, 생체 내에서 과잉의 활성산소가 생성되면 돌연변이, 염증, 세포살상, 발암과 피부노화 등이 나타나게 된다. 피부에서는 활성산소가 세포막을 공격하여 이를 산화시키게 되고 산화된 지질에 의해 세포막이 손상되어 정상적인 피부세포의 기능을 손실시키게 된다. 또한 피부의 항산화 방어체계의 균형을 깨트리게 되어 피부가 지속적인 산화상태에서 회복되지 못하게 되면서 피부는 거칠고 윤기가 없어지게 되며 이러한 과정의 반복은 주름 생성을 야기하게 된다. 콜라겐 분해 효소의 증가 또한 콜라겐 섬유의 변성 및 파괴를 유발하는 중요한 원인 중의 하나인데, 생체 내에서 생성된 활성산소는 MMPs(Matrix metalloproteinase)와 같은 콜라겐 분해 효소(collagenase)의 활성을 촉진시키고 콜라겐의 합성을 억제시킴으로써 피부의 탄력을 감소시키고 주름의 생성을 촉진시킨다. 그러므로 피부노화와 주름의 개선에 있어 활성산소를 제거하는 항산화 물질이나 콜라겐 분해 효소의 작용을 억제하고 콜라겐의 합성을 촉진시키는 소재의 발굴이 중요하다고 할 수 있다.

피부 노화를 방지하기 위해 피부에 항산화제를 직접적으로 도포하는 방법이 일반적이지만 대기중에서의 불안정성 및 피부에의 투과성 등의 문제가 있기 때문에 이러한 문제점을 극복하고, 보다 장기적인 예방효과를 위하여 식생활을 통한 영양공급 및 특정 영양성분과 피부와의 연관성에 대한 관심이 증대되고 있다. 대표적인 식품 유래 물질로 녹차, 플라보노이드, 카로테노이드, 비타민 등을 경구 섭취하였을 때 피부 노화를 예방하는 과학적 작용 기작을 밝히는 연

구들이 최근 활발히 수행되고 있다.

### 가. 주름개선 효능

#### (1) 세포 생존율

정상세포에 미치는 시료의 독성 유무를 알아보기 위하여 1~10 µg/mL 농도로 처리하여 세포 증식율을 살펴보았다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 대조구에 비해 ceramide 처리시 89~96%의 증식율을, PS 처리시에는 90~98%의 증식율을 나타내어 처리 농도 구간에서는 세포 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

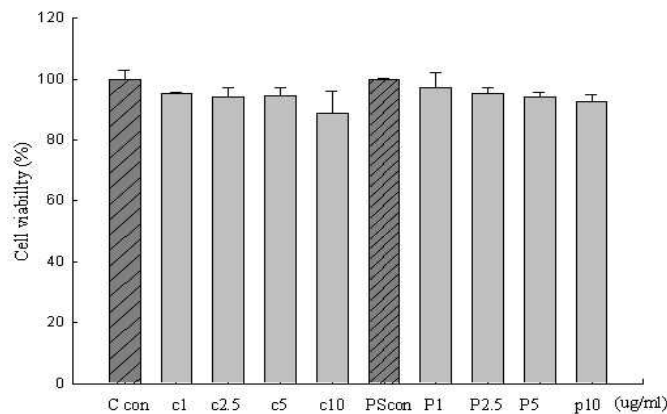


Fig. 5. Effect of ceramide and phosphatidylserine on the cell viability of human dermal fibroblast by MTT assay.

#### (2) 자외선 조사 후 세포 생존율

피부노화의 주된 요인 중 하나인 외적인 노화의 가장 큰 원인은 자외선에 있다. 자외선의 자극을 받을 경우 섬유아세포의 작용과 세포수가 감소를 하게 되고 섬유성분의 합성량이 줄어들고 구조가 느슨해져 탄력이 감소되며 피부세포 내 수분이 손실된다. 이를 확인하고자 섬유아세포에 자외선을 조사하였고, 조사량에 따라 세포의 matrix가 느슨해지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 자외선 조사량이 세포에 미치는 독성을 살펴보기 위하여 정상 대조구와 함께 조사량을 20~90 mJ/cm<sup>2</sup>으로 구분하여 세포 증식율을 조사한 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 정상 대조구에 비해 자외선을 처리한 실험구 모두 세포 증식이 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 조사량 처리가 가장 많은 90 mJ/cm<sup>2</sup> 처리구에서는 70% 증식율을 나타내어 자외선 조사량이 증가함에 따라 세포수가 비례하여 감소함을 알 수 있었다. 자외선에 의한 피부세포 손상 및 시험물질의 세포손상 억제 효능을 알아보기 위하여 정상 대조구와 더불어 세포증식율이 80% 이상인 20, 60 mJ/cm<sup>2</sup> 처리구에 시험물질을 처리하여 세포 증식율을 조사한 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 자외선을 처리하지 않은 경우 시험물질을 처리할 때 세포 증식율이 거의 차이가 없

있지만 자외선을 처리한 경우에는 시험물질 처리구에서 세포 증식율이 더욱 감소하는 것으로 나타났으며 처리량이 증가할수록 세포증식이 더욱 감소하는 것으로 나타나 시험물질이 피부세포의 손상을 억제하는 효능은 나타내지 않는 것으로 판단된다.

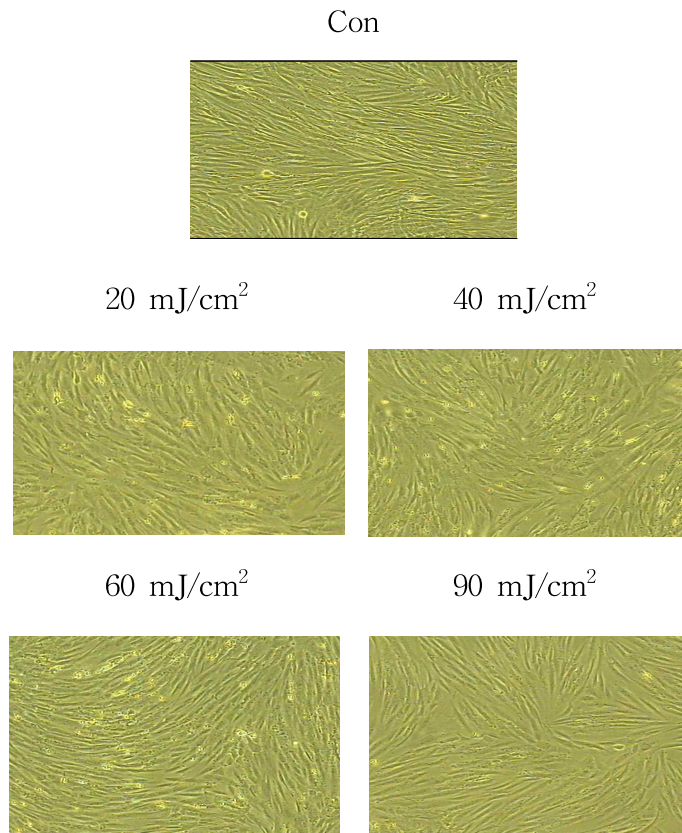


Fig. 6. Effect of UV irradiation dose on the cell features of human dermal fibroblast.

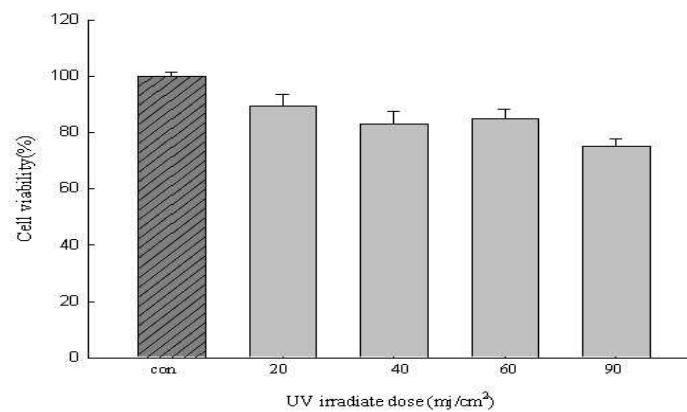


Fig. 7. Effect of UV irradiation dose on the cell viability of human dermal

fibroblast.

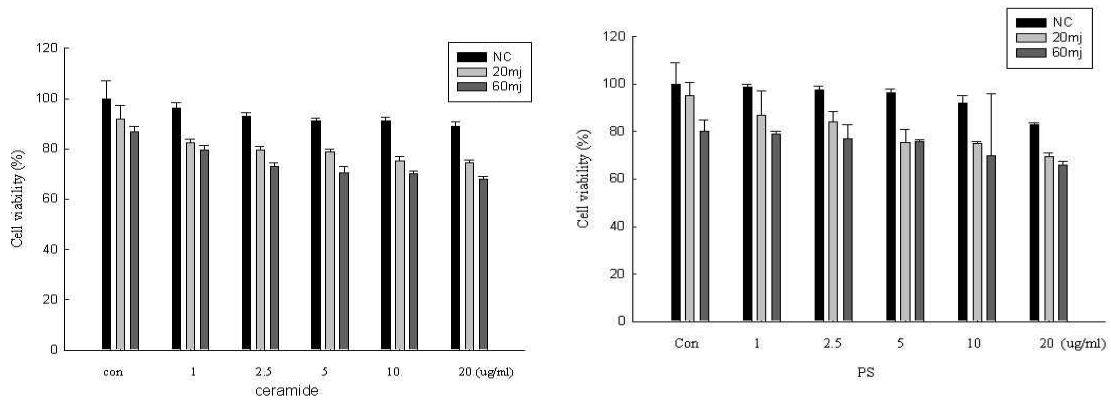


Fig 8. Effect of ceramide and PS on the cell viability of human dermal fibroblast with UV irradiation.

### (3) Type-I pN collagen 생성촉진능

Collagen(type I, II, III, IV and V)은 procollagen이라는 전구물질의 형태로 합성된다. Procollagen의 경우 아미노 말단과 카르복시 말단에 프로펩티드라는 펩티드 염기서열을 포함하게 되는데 이 프로펩티드는 세포체내에서 procollagen 분자의 결합 matrix를 도와주면서 collagen 중합반응이 일어날 때 콜라겐 분자로부터 절단, 분리되어진다. 따라서 분리된 프로펩티드의 양을 측정함으로써 세포내에서의 collagen 생합성 정도를 파악할 수 있다.

섬유아세포에 시험물질을 처리하여 배양하였을 때 collagen 생합성량을 조사한 결과는 Fig. 9와 같다. 자외선을 조사하지 않은 대조구와 UV 조사량을 달리하여 20 mJ/cm<sup>2</sup>과 60 mJ/cm<sup>2</sup> 처리구에 대한 시험물질의 collagen 합성능력을 측정하고 대조구에 비해 UV 처리구에서 collagen의 합성량이 감소하고 조사량이 증가할수록 collagen 합성량이 감소함을 확인할 수 있었다. Retinoic acid(1 µg/mL)를 처리한 양성 대조구의 경우 UV 조사와 상관없이 retinoic acid의 처리에 의해 collagen 합성량이 크게 증가하였고, ceramide와 PS를 처리한 시험물질 처리구에서도 양성대조구에는 미치지 못하지만 대조구 뿐만 아니라 UV 조사구에서도 시험물질의 처리량이 증가함에 따라 collagen 합성량이 증가하는 것으로 나타났으며, ceramide와 PS 처리구의 효과가 거의 유사한 것으로 나타났다. 이는 섬유아세포가 광노화에 의해 콜라겐 손상이 일어나지만 ceramide와 PS 처리에 의해 collagen 합성 능력이 증가되었기 때문인 것으로 추정된다. 이와 같은 ceramide와 PS의 collagen 합성량 증진 효과는 섬유아세포에서 MAP kinase와 상호 작용하여 type I pN collagen의 전사 활성을 증가시키거나 MMP-1의 활성을 억제시켜 collagen 분해 활동을 저해시키는 간접적인 영향 등 여러 가지 요인들에 의한 것일 수 있다. UVB를 조사하지 않은 경우 무첨가군에 비하여 PS를 1, 5, 10 µg/mL 농도로 첨가한 군에서는 collagen 생합성량이 각각 207.9%, 248.8%, 331.6%로 현저히 증가하는 것을 확



인할 수 있었으며, UVB를 조사한 경우에도 농도별로 112.0%, 167.4%, 212.8%로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 대조군으로 사용한 retionic acid에 비하여 PS의 collagen 생합성량은 68.6%(UVB-)와 80.4%(UVB+)로 더 높은 활성을 보여주지는 않았지만 UVB를 조사한 경우 거의 유사한 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 10).

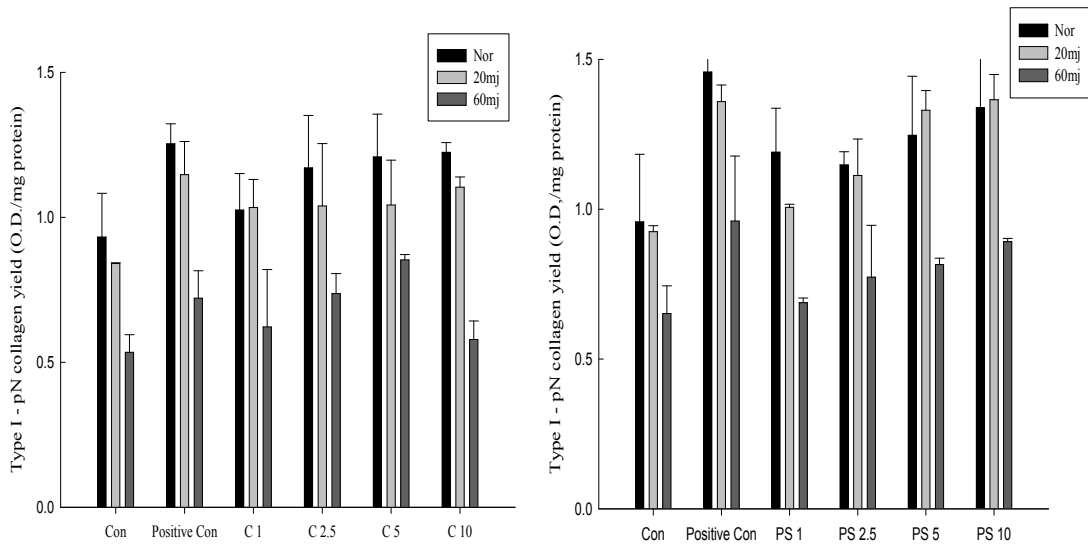


Fig. 9. Effect of ceramide and PS on type I procollagen synthesis in normal human dermal fibroblast with UV irradiation.

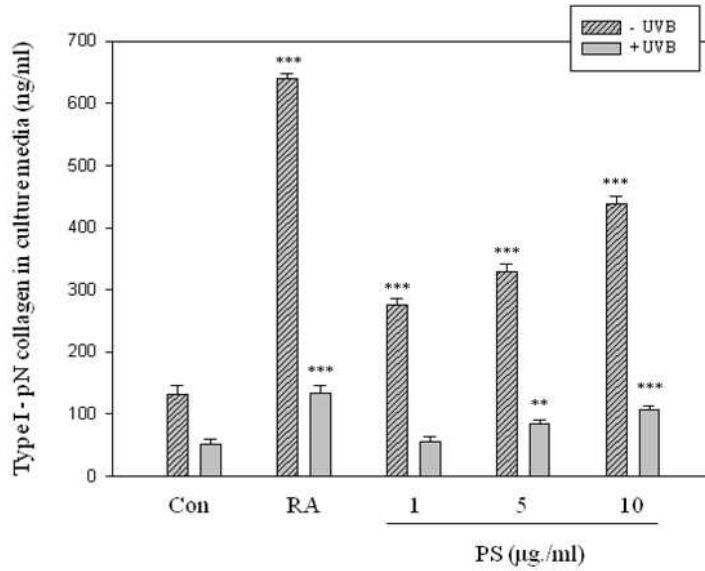


Fig. 10. Effect of PS on type-I procollagen levels in HDF cells with or without UV irradiation. These were performed using commercial ELISA assay kit according to the manufacturer's instruction. 80% Confluent HDFs were pretreated with different concentrations of PS and irradiated with UV (60 mJ/cm<sup>2</sup>). Irradiated cells were cultured for 24 h and media supernatants were harvested. Each value was expressed as the mean±SD of triplicate experiments. \*,P < 0.05, \*\*,P < 0.01 and \*\*\*,P < 0.001 as compared to control group.

#### (4) pro-MMP-1 및 MMP-1 발현 저해 효능

섬유아세포에 UVB를 조사한 후 PS의 pro-MMP-1 및 MMP-1의 발현 저해효능을 살펴 보았다(Fig. 11). 섬유아세포에 UVB를 조사한 결과 pro-MMP-1 및 MMP-1의 발현이 모두 증가하였지만, PS를 10 µg/mL 농도로 처리한 경우 세포배양액에서의 pro-MMP-1 농도가 무첨가군에 비하여 8.7% 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 11b). 또한 활성화된 MMP-1의 농도를 Western blot으로 확인한 결과, PS를 10 µg/mL 농도로 투여한 경우 MMP-1의 발현량이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 11a). 이러한 결과로 볼 때 PS는 불활성의 pro-MMP-1의 발현을 크게 감소시키지는 못하였지만, 이들의 활성화를 감소시켜 MMP-1의 발현을 현저히 억제하는 것으로 판단된다.

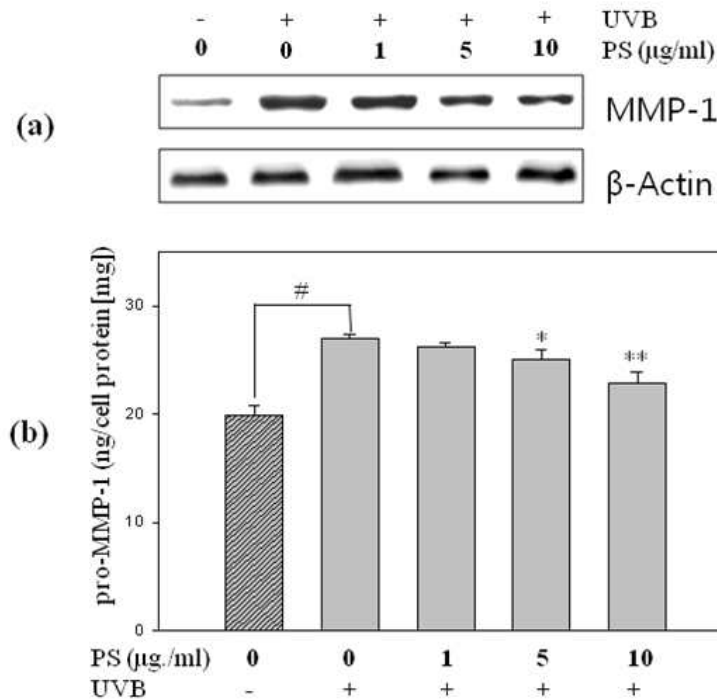


Fig. 11. Inhibitory effect of PS against MMP-1 expression levels(a) and pro-MMP-1 secretion(b) in UVB-induced HDF. 80% Confluent HDFs were treated with different concentrations of PS and irradiated with UV (60 mJ/cm<sup>2</sup>). After incubation for 24 h, MMP-1 expression was determined by western blotting and media supernatants were harvested to evaluate extracellular secretion of pro-MMP-1. Each value was expressed as the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*, P < 0.05, and \*\*, P < 0.01 as compared to control groups.

##### (5) MAPKs 저해효능

MMP-1 저해효능에 대한 PS의 세포내 signaling cascade를 확인하기 위하여 MMP-1 발현에 중요한 역할을 하는 MAPKs(JNK, ERK, P38)의 인산화 억제효능을 Western blot을 이용하여 확인하였다. MAPKs는 세포의 성장과 외부 스트레스 반응에 있어 매우 중요한 역할을 할뿐만 아니라 MMP-1 유전자의 전사를 조절하는 AP-1의 활성화에 관여하는 신호전달 단백질이다. Fig. 12에서와 같이 UVB 조사와 PS의 첨가에 따른 JNK, ERK, P38의 세포내 발현량에는 변화가 없으나, UVB를 조사한 경우 모든 MAPKs의 인산화가 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 PS를 첨가함에 따라 농도의존적으로 모든 MAPKs의 인산화가 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 ERK의 경우 PS를 10  $\mu\text{g/mL}$ 으로 처리한 경우 UVB를 조사하지 않은 세포와 비슷할 정도로 인산화가 억제됨을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 PS가 AP-1의 활성화를 조절하는 MAPKs의 UVB에 의한 인산화를 억제함으로써 MMP-1의 발현을 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

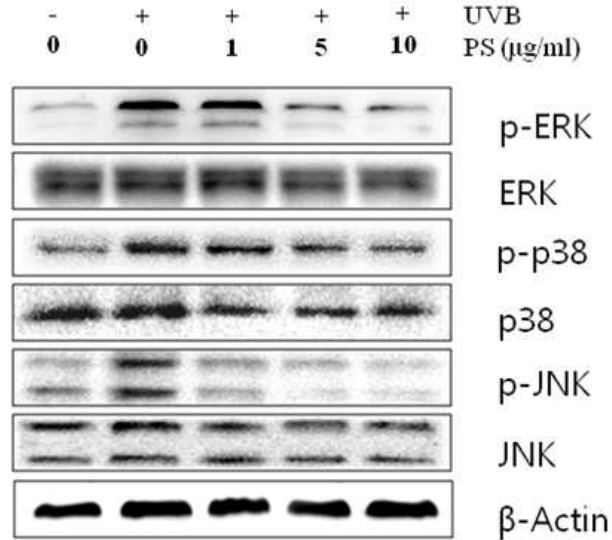


Fig. 12. Effect of PS on MAPKs activation in UVB-induced HDF cells. Cells were grown at  $5 \times 10^5$  cell/well and treated with various concentrations of PS at 1 h before UVB irradiation ( $60 \text{ mJ/cm}^2$ ). After incubation for 1 h, cell lysates were collected and subjected to SDS-PAGE and Western blots.  $\beta$ -Actin were used as an internal control. The antibody bindings were detected by enhanced chemiluminescence reagent using luminoimager.

#### (6) AP-1 저해효능

AP-1은 c-Jun과 c-Fos라는 단백질이 결합된 전사인자로 MMP-1의 발현을 매개함으로써 최종적으로 collagen을 분해시켜 피부 주름형성을 촉진시킨다. 앞에서의 결과와 같이 PS가 UVB에 의한 AP-1의 활성화에 억제효능을 가지는지 확인하기 위해 c-Jun과 c-Fos의 발현량 변화를 Western blot을 이용하여 분석하였다. Fig. 13에서 보는 바와 같이 섬유아세포에 UVB를 조사한 결과 control에 비하여 c-Jun과 c-Fos의 발현이 크게 증가하였지만, PS를 첨가한 경우 농도의존적으로 이들의 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 PS는 AP-1의 활성을 저해함으로써 UVB에 의하여 유도된 MMP-1의 발현과 procollagen의 분해를 억제하는 것으로 확인되었다.

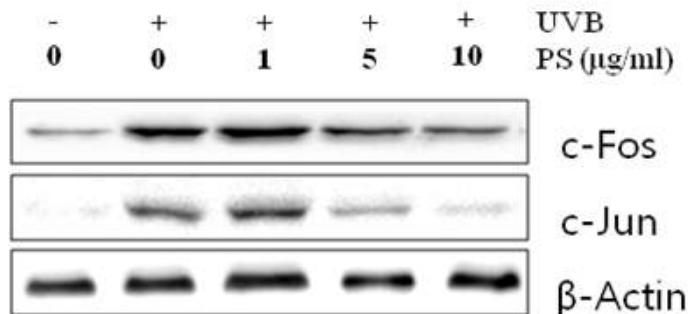


Fig. 13. Effect of PS on protein expression of AP-1 family in UVB-induced HDF cells. Cells were grown at  $5 \times 10^5$  cell/well and treated with various concentrations of PS at 1 h before UVB irradiation ( $60 \text{ mJ/cm}^2$ ). After incubation for 24 h, cell lysates were collected and subjected to SDS-PAGE and Western blots.  $\beta$ -Actin was used as an internal control. The antibody bindings were detected by enhanced chemiluminescence reagent using luminoimager.

## 나. 항염증 효능

### (1) 세포독성

PS의 염증 저해효능을 평가하기 이전에 MTT assay을 이용하여 RAW264.7에 대한 세포독성을 평가하였다. Fig. 14에서 보는 바와 같이 최고 농도인  $50 \mu\text{g/mL}$ 까지 세포에 대한 독성이 없음을 확인하였으며, 이를 최고 농도로 설정하여 이후 실험을 수행하였다.

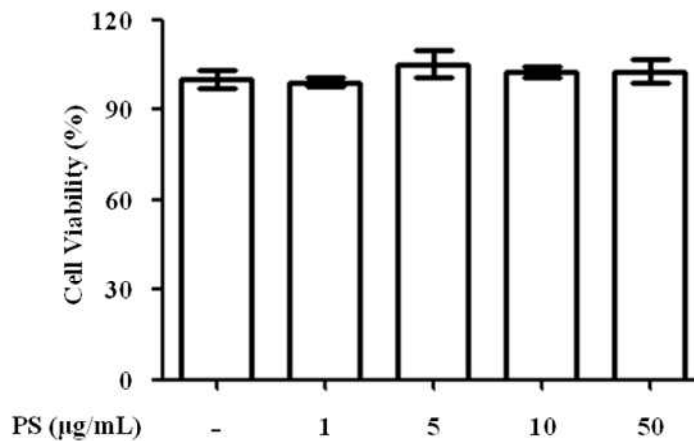


Fig. 14. Cytotoxic effect of PS on cell viabilities of RAW264.7. Cells were grown at a density of  $1 \times 10^4$  cells/well and different concentrations of PS were treated. After 24 h incubation, MTT solution was treated to each well and incubate for 4 h. DMSO was added to solubilize formed formazan salt and its amount was determined by measuring the OD at 570 nm. Each value was expressed as the mean $\pm$ SD of triplicate experiments.

## (2) Nitric Oxide(NO)생성 억제효능

PS의 항염증효능을 확인하기 위하여 Grease 시약을 이용하여 LPS로 유도된 RAW264.7의 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. NO는 혈압조절, 혈소판 응집 및 염증을 유도하는 신호전달 물질로써 염증반응에 있어 중요한 역할을 하는 매개인자중에 하나이다. PS를 1~50 µg/mL의 농도로 처리후 LPS로 염증 반응을 유도하였다. Fig. 15에서 보는 바와 같이 24시간 배양후 세포 상층액에서의 NO 생성을 측정된 결과, LPS 처리하지 않거나 PS만 50 µg/mL로 처리한 경우 NO가 거의 생성되지 않았으나 LPS를 처리한 대조군의 경우 10배 이상 NO 생성량이 늘어나 염증반응이 유도되었음을 확인할 수 있었다. 또한 PS를 처리한 경우 NO 생성이 농도의존적으로 억제되었으며, 50 µg/mL의 경우 대조군에 비하여 69.7%로 NO생성을 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

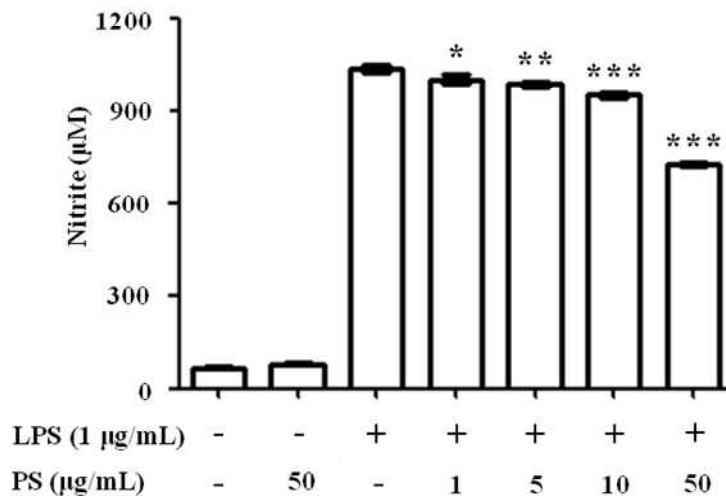


Fig. 15. Effect of PS on LPS-induced NO production in RAW 264.7 macrophages. Cells were grown at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well and treated with different concentrations of PS for 1 h before incubation with LPS(1 µg/mL) for 24 h. Collected culture supernatants were analyzed for nitrite production level using the Griess reagent. Each value was expressed as the mean±SD of triplicate experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 as compared to LPS-treated cells(1µg/mL).

## (3) Pro-inflammatory cytokine(IL-6, IL-1β, TNF-α)발현 억제 효능

PS의 pro-inflammatory cytokine에 대한 영향을 조사하기 위하여 주요 염증성 매개인자인 IL-6, TNF-α, IL-1β의 발현량을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. LPS로 염증반응 유도시켜 24시간 배양한 다음 이들의 발현량을 측정된 결과(Fig. 16~18), 측정된 염증성 매개인자 모두 LPS에 의하여 발현량이 크게 증가하였다. 하지만 PS를 첨가한 경우 모든 염증성 매개인자의 발현량이 농도의존적으로 감소하였으며, PS를 50 µg/mL의 농도로 처리한 경우

IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 발현량이 대조군에 비하여 각각 34.2%, 21.4%, 57.3%로 크게 줄어, PS가 LPS로 인하여 유도된 염증성 매개인자를 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

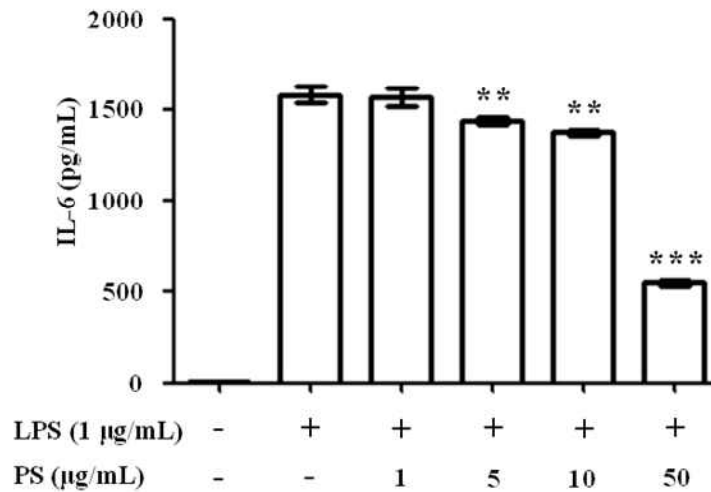


Fig. 16. Effect of PS on LPS-induced IL-6 production in RAW 264.7 macrophages. Cells were grown at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well and treated with different concentrations of PS for 1 h before incubation with LPS(1 µg/mL) for 24 h. The IL-6 concentration was measured in culture media using a commercial ELISA kit. Each value was expressed as the mean $\pm$ SD of triplicate experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 as compared to LPS-treated cells(1µg/mL).

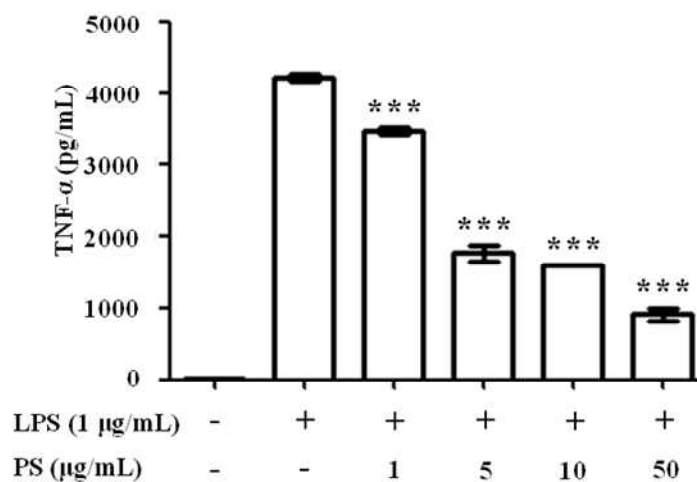


Fig. 17. Effect of PS on LPS-induced TNF- $\alpha$  production in RAW 264.7 macrophages. Cells were grown at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well and treated with different concentrations of PS for 1 h before incubation with LPS(1 µg/mL) for 24 h.

The TNF- $\alpha$  concentration was measured in culture media using a commercial ELISA kit. Each value was expressed as the mean $\pm$ SD of triplicate experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 as compared to LPS-treated cells(1 $\mu$ g/mL).

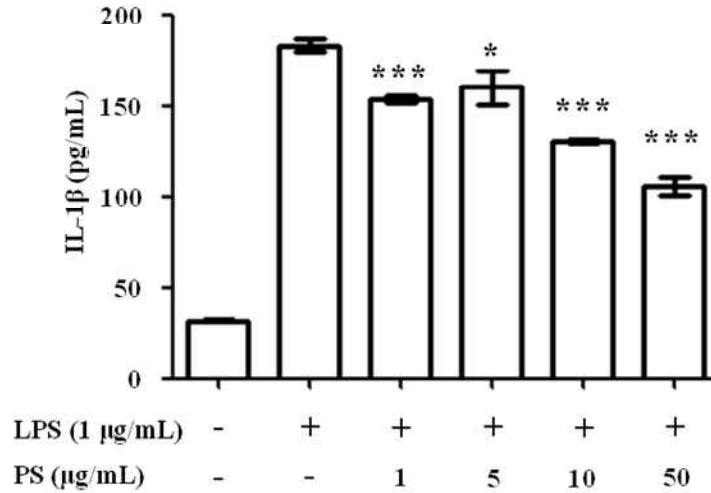


Fig. 18. Effect of PS on LPS-induced IL-1 $\beta$  production in RAW 264.7 macrophages. Cells were grown at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well and treated with different concentrations of PS for 1 h before incubation with LPS(1  $\mu$ g/mL) for 24 h. The IL-1 $\beta$  concentration was measured in culture media using a commercial ELISA kit. Each value was expressed as the mean $\pm$ SD of triplicate experiments. \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 as compared to LPS-treated cells(1 $\mu$ g/mL).

#### (4) iNOS 및 COX-2 발현 억제 효능

iNOS와 COX-2는 염증반응에 관여하는 NO와 PGE<sub>2</sub>와 같은 염증매개인자를 각각 생성하여 체내에서 염증반응을 일으키는 중요한 전구염증매개 효소이다. 이러한 iNOS와 COX-2의 발현억제를 통하여 염증반응을 감소시키거나 예방할 수 있다. Fig. 19에서와 같이 Western blot을 통해 LPS로 유도된 iNOS와 COX-2 발현량에 대한 PS의 영향을 살펴본 결과, LPS로 유도된 세포에서 iNOS와 COX-2 발현량이 현저하게 증가하였다. PS를 처리한 세포의 경우 iNOS는 농도의존적으로 발현량이 뚜렷하게 감소하는 것을 확인하였으나, COX-2의 경우에는 50  $\mu$ g/mL 농도에서 약간의 발현감소를 확인할 수 있었다.



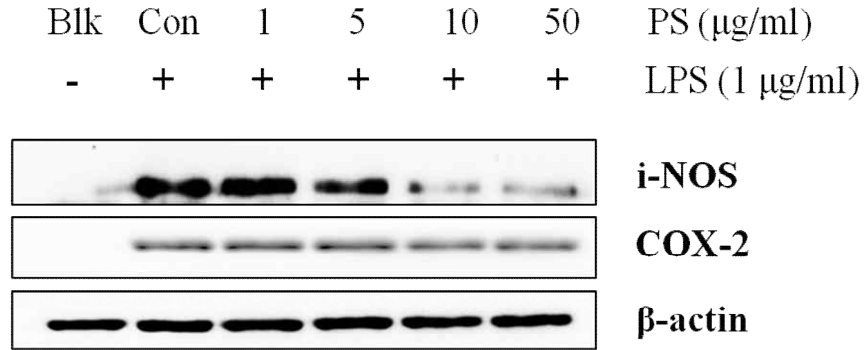


Fig. 19. Effect of PS on LPS-induced iNOS and COX-2 expressions in RAW 264.7 macrophages. Cells were grown at  $5 \times 10^5$  cell/well and treated with various concentrations of PS at 1 h before LPS( $1 \mu\text{g/ml}$ ) treatment. After incubation for 24 h, Cell lysates were collected and subjected to SDS-PAGE and Western blot using antibodies specific for iNOS and COX-2.  $\beta$ -actin was used as an internal control. The antibody bindings were detected by enhanced chemiluminescence reagent using luminoimager.

#### (5) 세포내 ROS 소거능

염증반응이나 외부 스트레스로 인하여 생성된 ROS는 발암, 노화, 알레르기 등 다양한 질환 유발시키며 염증매개물질의 유전자 발현도 증가시킨다. ROS는 염증세포에서 생체방어물질로 분비되지만 과량 생성된 ROS는 다른 조직의 손상을 유발하여 염증반응 매개한다. 염증을 매개하는 세포내 ROS에 대한 PS의 소거능을 확인하기 위하여 ROS에 의하여 활성화되는 DCFH-DA로 RAW264.7 세포를 염색하여 flow cytometry를 이용하여 평균형광값을 측정하였다(Fig. 20). LPS로 염증이 유도된 세포에서는 ROS에 의하여 활성화된 세포의 평균 형광값이 427.09까지 증가 하였으나, PS를 처리한 세포의 경우 농도의존적으로 감소하였고 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 195.26까지 감소하였다. 이러한 결과로 볼 때 PS는 염증을 매개하는 세포내 ROS를 효과적으로 소거하여 염증반응을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

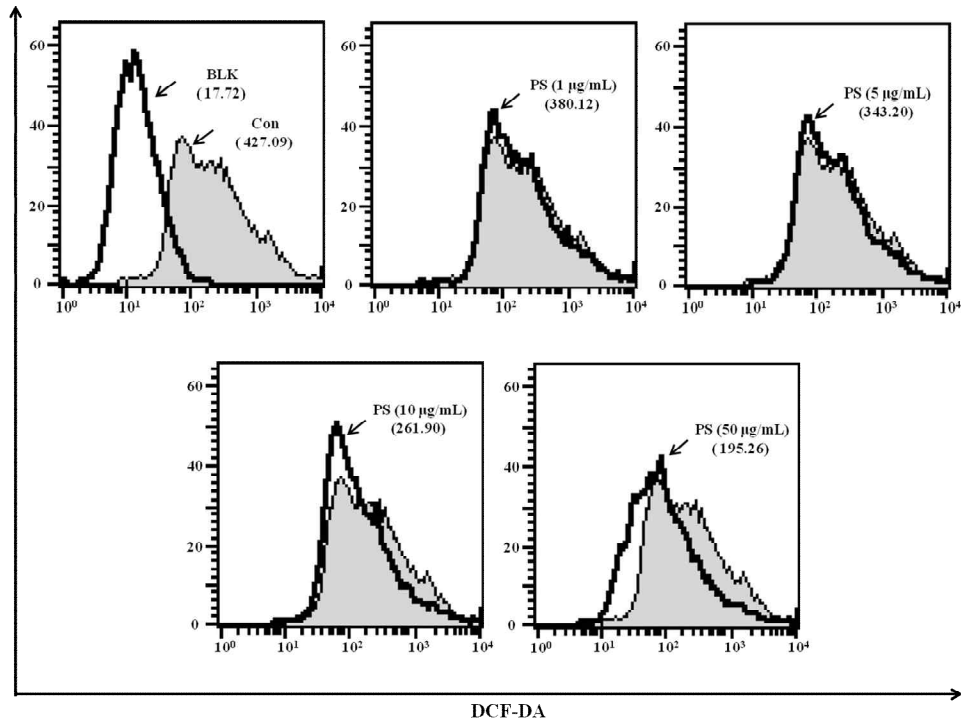


Fig. 20. Cellular radical scavenging activities of PS on RAW264.7 macrophages. Cells were labeled with DCFH-DA and treated with different concentrations of PS for 1h. After washing the cells with PBS for three times, LPS(1 µg/mL) was added to cells(blank: -LPS, Control: +LPS). The levels of intracellular ROS in the collected cells were determined using flow cytometer(488 nm excitation, 530 nm emission). The results were expressed as the average DCF-DA fluorescence intensities of the cells to determine the free radical scavenging activity.

#### (6) NF-κB(p65)의 세포핵내 이동 억제효능

NF-κB는 AP-1과 함께 염증매개물질의 유전자 발현을 증가시키는 전사인자로 주로 세포질에서 p65, p50과 IκBa가 complex형태로 존재하지만, IκBa가 인산화되면서 핵내로 이동하여 염증매개인자의 유전자를 전사시킨다. Fig. 21에서 보는 바와 같이 LPS로 유도된 세포에서 NF-κB의 핵내 이동을 형광현미경으로 확인할 수 있다. LPS 처리하지 않은 세포의 경우 Hoechst로 염색된 핵 가장자리로 p65가 분포되어 있는 반면, LPS 처리군의 경우 핵내로 유입된 것을 확인할 수 있다. 하지만 PS를 50 µg/mL로 처리한 경우 LPS처리군 보다 핵내 이동이 현저하게 줄어 든 것으로 확인할 수 있었다.

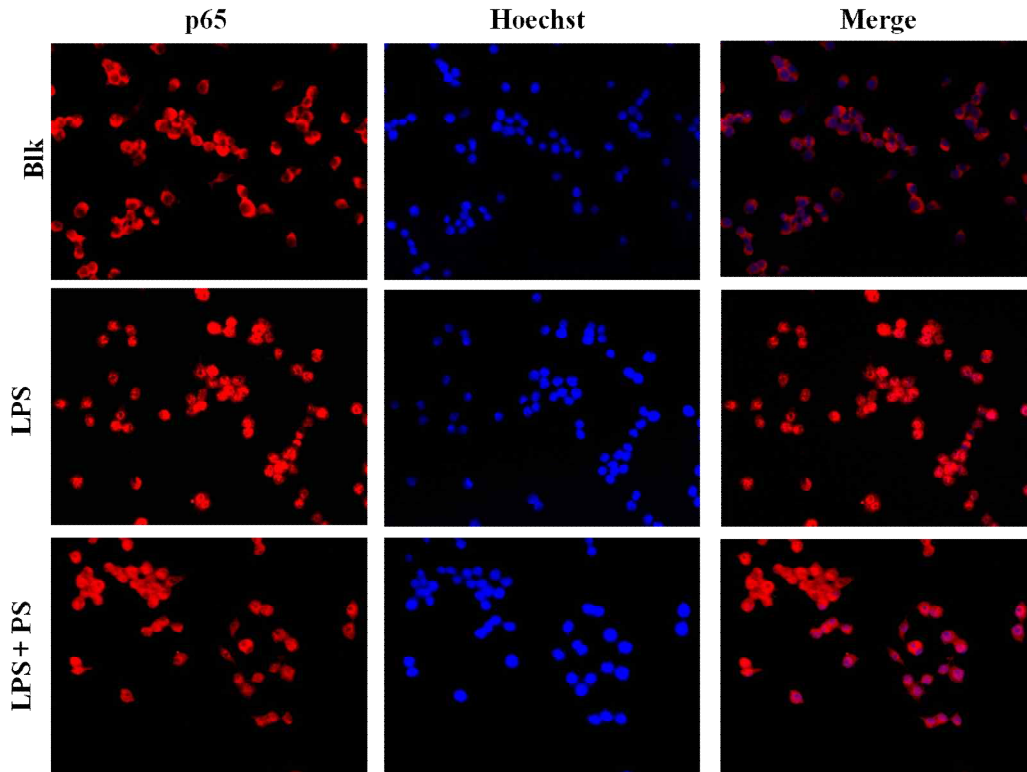


Fig. 21. Effects of PS on NF- $\kappa$ B nuclear localization in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage. Cells were pretreated with the 50  $\mu$ g/mL of PS for 1 h before stimulation with LPS(1  $\mu$ g/mL). After incubation for 30 min, cells were then fixed and labeled. Images of NF- $\kappa$ B nuclear translocations were analyzed using fluorescence microscopy.

## 7. 생리활성지질의 주름개선 효능 *in vivo* assay 결과

### 가. Ceramide

#### (1) 임상증상 및 사망동물의 관찰

Table 2에서 나타낸 바와 같이 정상군을 포함한 모든 시험군에서 시험 기간 10주 동안 사망한 동물은 관찰되지 않았으며, 시험물질 투여로 인한 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다.

Table 2. Clinical signs and death rate in hairless mice orally administrated with ceramide

Group	Sex	Clinical signs	Mortality(%) <sup>2)</sup>
Con	female	NAD <sup>1)</sup>	0
UV/Con	female	NAD	0
HC	female	NAD	0
MC	female	NAD	0
LC	female	NAD	0

<sup>1)</sup>No abnormalities detected

<sup>2)</sup>No. of dead/No. of treated animals

## (2) 체중변화

실험군 분리시 각 동물의 체중은  $23 \pm 1.2$  g으로 고른 체중범위를 나타내었으며, ceramide 투여기간 중 정상군을 포함한 시험군 모두가 고른 체중 증가를 나타내었고 최종 체중범위는  $28.52 \pm 1.74$  g이었다(Fig. 22). 전 시험기간 중 체중에 대한 통계적인 유의한 구간 변화는 관찰할 수 없었다. 시험 전 기간에 걸쳐 사료, 음수 소비량도 군별로 큰 차이를 보이지 않았다.

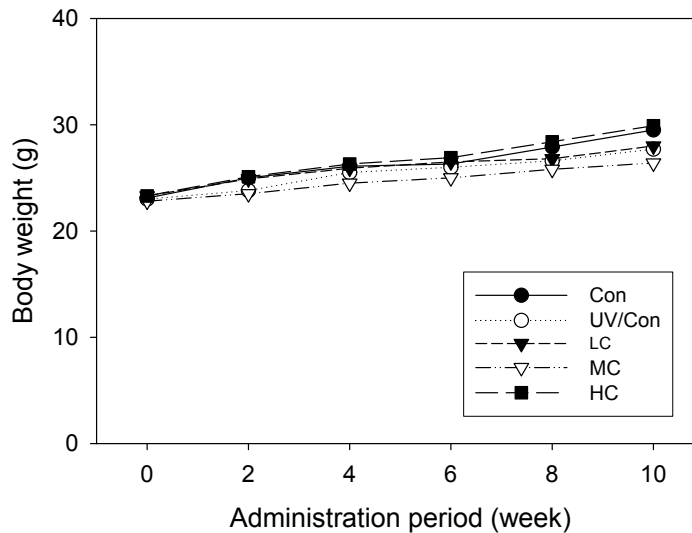


Fig. 22. Body weights in hairless mice orally administrated with ceramide.

### (3) 피부 두께 및 수분 변화

Ceramide를 경구 섭취한 hairless mouse의 피부 수분함량을 측정한 결과 정상군에 비해 자외선을 조사한 UV 대조군에서 수분 함유량이 감소하였으며, ceramide를 투여한 시험군 모두에서 수분 함유량이 증가하는 것을 알 수 있었다(Table 3). 피부 두께의 경우 UV 대조군의 피부가 가장 두껍게 나타났으며, ceramide를 투여한 시험군은 UV 대조군에 비해 두께가 감소하는 것을 확인할 수 있다.

Table 3. Effect of ceramide on the skin moisture of hairless mice exposed to the chronic UV irradiation

Group	Skin moisture(%)
Con	100.0±5.3
UV/Con	65.6±6.9
HC	63.8±11.7
MC	69.6±5.5
LC	81.1±9.1

Table 4. Effect of ceramide on the skin thickness of hairless mice exposed to the chronic UV irradiation

	Skin thickness(mm)/weeks				
	2	4	6	8	10
Con	0.76	0.75	0.88	0.76	0.84
UV/Con	1.94	1.67	1.80	1.62	1.63
HC	1.36	1.44	1.38	1.41	1.14
MC	1.56	1.41	1.32	1.46	1.10
LC	1.63	1.55	1.42	1.29	1.23

#### (4) Replica 영상분석

Fig. 23에서 보는 바와 같이 육안으로 관찰시 정상군에 비해 UV 대조군의 피부 주름 증가가 뚜렷하였으며, 이에 비해 ceramide를 섭취한 시험군은 UV 대조군에 비해 주름 증가가 적고, 피부 상태가 양호하였다. 주름의 깊이는 정상군에 비해 UV 대조군에서 주름의 깊이가 깊게 나타나는 것을 확인 할 수가 있으며, ceramide를 섭취한 시험군에서 주름의 깊이가 낮은 것을 알 수 있었다. 또한 주름 면적을 분석한 결과 ceramide 섭취에 의해 주름 면적이 감소하는 것으로 나타나 ceramide를 섭취할 경우 자외선의 영향에서 보호되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 24).

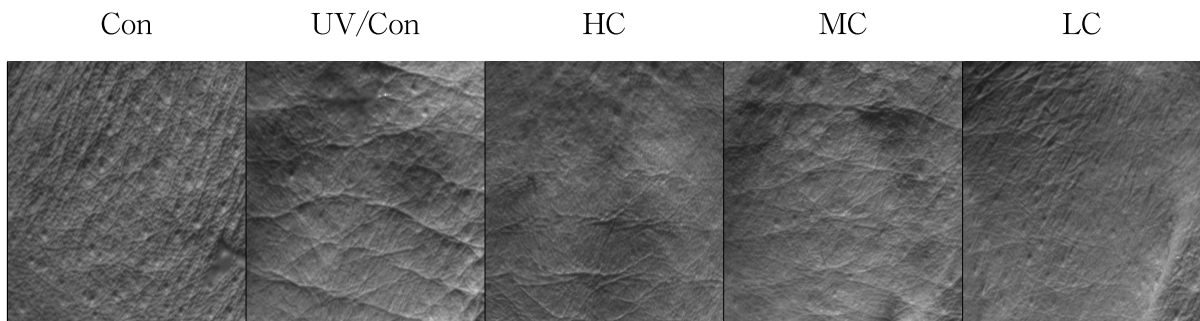


Fig. 23. Features of dorsal skin of hairless mice at the end of the UV irradiation period (10 weeks).

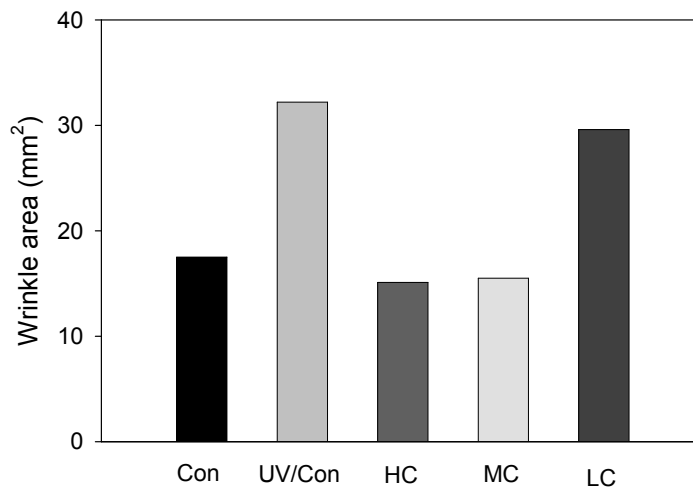


Fig. 24. Effect of ceramide on the wrinkle area of hairless mice exposed to the chronic UV irradiation.

### (5) 피부조직의 병리학적 관찰

Fig. 25에서 보는 바와 같이 정상군에 비해 자외선 노출된 UV 대조군에서 2배가량 표피가 두꺼워진 것을 볼 수 있었으며, 저농도 ceramide 투여군에서 표피 두께가 30% 이상 감소되는 것을 볼 수 있었다. 진피 조직에서의 교원질의 분포 또한 변형된 구조를 보이는 UV 대조군과 달리 저농도 ceramide 투여군에서 손상이 감소된 변화를 살펴 볼 수 있었다. H&E 염색의 결과를 살펴보면, Fig. 26에서 보는바와 같이 ceramide 투여군에서는 UV 대조군에 비해 표피층과 진피층의 감소가 확연하게 나타났으며, 저농도일 때 감소의 폭이 큰 것을 확인 할 수 있었다. Masson-Trichrome 염색을 통한 피부 조직 내 collagen 함량을 측정한 결과, 정상군에 비해 UV 대조군의 경우 collagen 함량이 약간 감소하였으며 ceramide 투여에 의해 collagen 함량이 정상군 보다도 더 많이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 27).

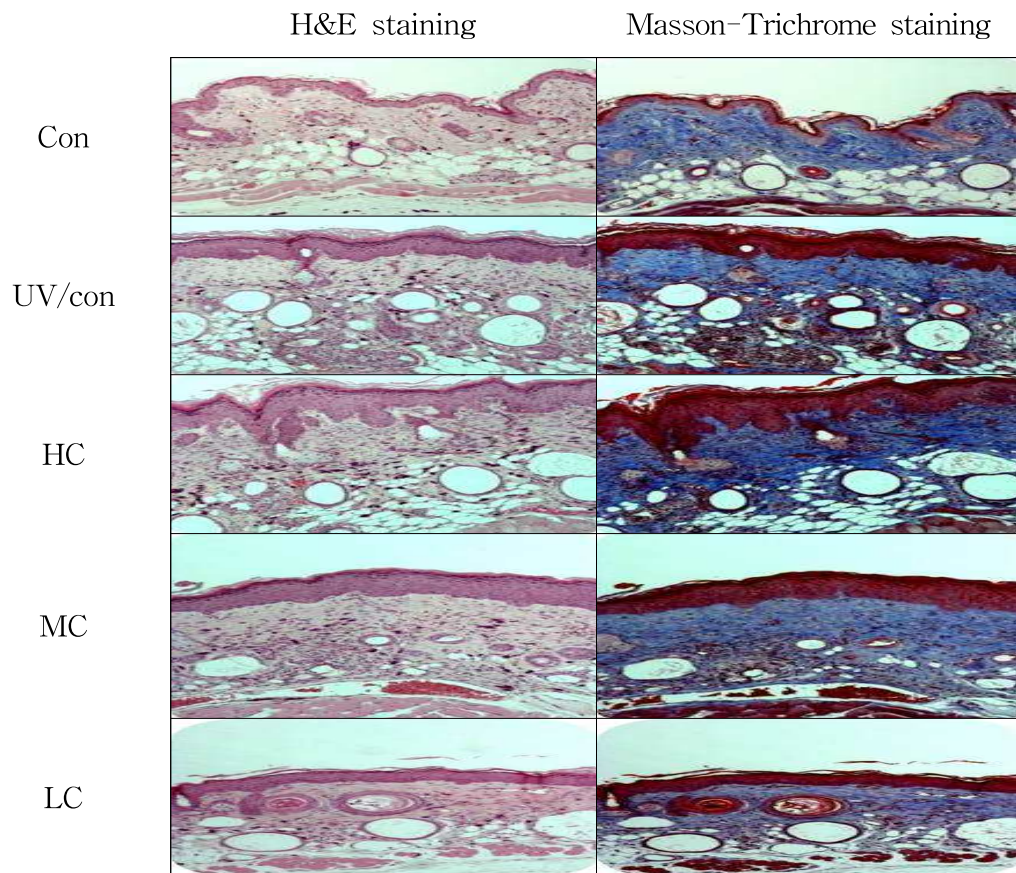


Fig. 25. Histological section of dorsal skin of hairless mice exposed to the chronic UV irradiation. At the end of an 10 week oral administration of ceramide, skin biopsies were obtained from central dorsal skin to measure epidermal thickness. H&E and Masson-Trichrome staining (X200).

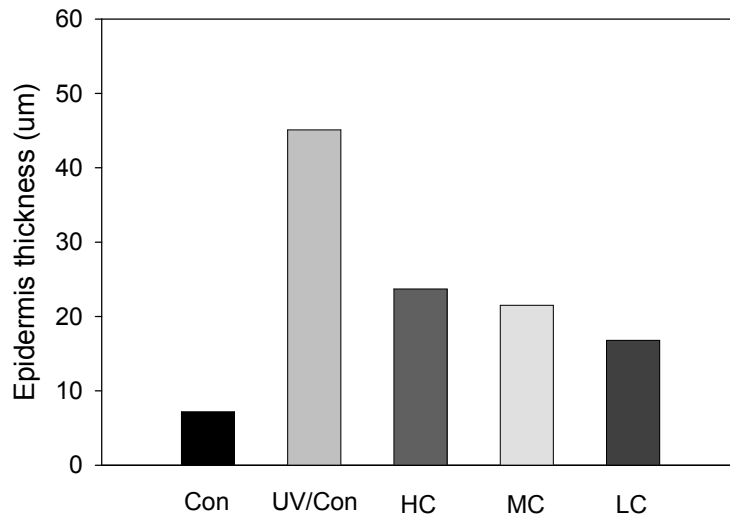


Fig. 26. Effect of ceramide on the epidermal thickness of hairless mice exposed to the chronic UV irradiation. At the end of an 10 week oral administration of ceramide, skin biopsies were obtained from central dorsal skin to measure epidermal thickness.

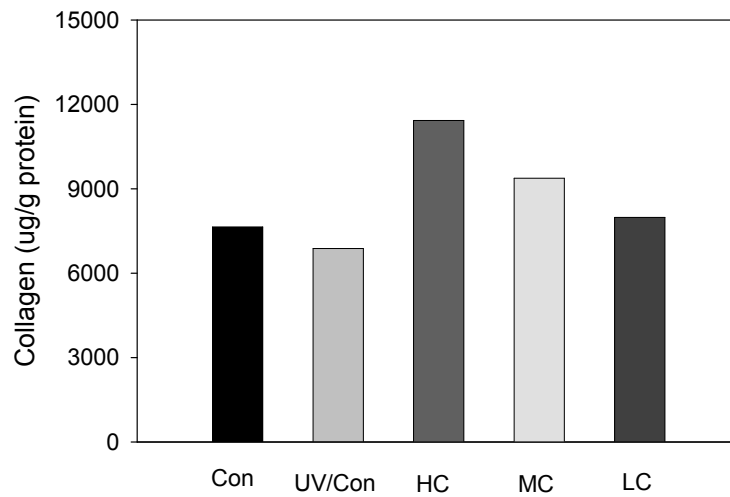


Fig. 27. Effect of ceramide on the collagen content of hairless mice exposed to the chronic UV irradiation. At the end of an 10 week oral administration of ceramide, skin biopsies were obtained from central dorsal skin to measure epidermal thickness.



## 나. PS

### (1) 임상증상 관찰 및 체중변화

정상대조군을 포함한 모든 실험군에서 시험 기간 10주 동안 사망한 동물은 관찰되지 않았으며, 전 동물에서 PS 투여로 인한 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다. UV 조사를 이용한 주름 유발 전 실험군 분리시 각 동물의 체중은  $24.0 \pm 2.4$  g으로 고른 체중범위를 나타내었다 (Fig. 28). PS 투여기간 중 정상대조군을 포함한 실험동물의 최종 체중범위는  $27.6 \pm 0.7$  g이었다. 시험기간 중 체중에 대한 통계적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 시험 기간에 걸쳐 사료, 음용수 소비량도 실험군별로 큰 차이를 보이지 않았다.

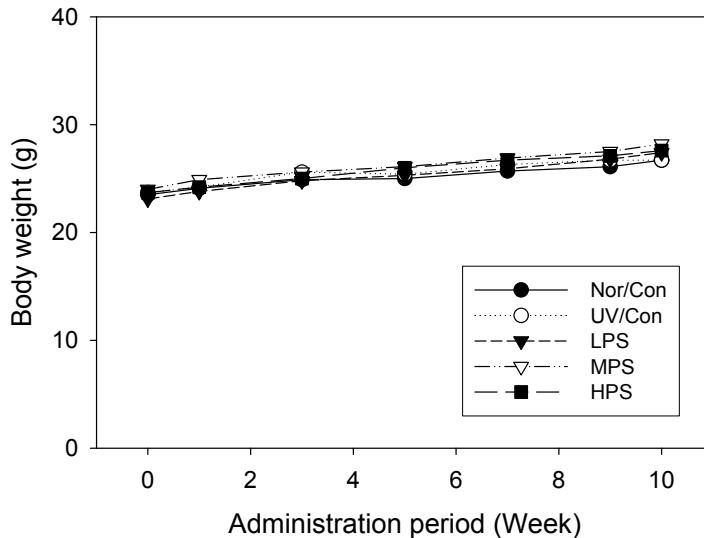


Fig. 28. Body weights in hairless mouse orally administrated with PS.

### (2) 피부 수분 및 두께 변화

자외선에 의한 광노화가 일어날 경우 피부의 진피층 보호를 위해 각질층의 형성이 증가하여 피부의 두께는 두꺼워지고, 각질층으로 인한 피부의 건조함이 일어나 수분함량이 감소하게 된다. UV 조사에 의한 광노화 현상으로 피부의 두께가 두꺼워졌다는 것은 그만큼 노화에 의한 피부 손상이 크다는 것을 의미한다. PS를 경구 섭취한 실험동물의 피부 수분함량을 측정 한 결과 Fig. 29에서 보는 바와 같이 정상대조군에 비해 자외선을 조사한 UV 대조군에서 수분 함유량이 실험 5주차와 10주차에 각각 정상대조군의  $62.7 \pm 3.6\%$ 와  $40.0 \pm 5.0\%$  수준으로 크게 감소하였으며, 모든 PS 투여군에서는 UV 대조군에 비해 수분 함유량이 각각 정상대조군의  $70.8 \pm 5.5 \sim 78.6 \pm 4.6\%$ 와  $56.3 \pm 7.6 \sim 72.1 \pm 4.2\%$  수준으로 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. PS 투여군의 피부 두께를 측정 한 결과 정상대조군의 피부 두께가 실험 5주차와 10주차에 각각

0.82±0.07 mm와 0.93±0.06 mm이었으며 UV 대조군은 각각 1.55±0.16 mm와 1.65±0.17 mm로 나타나 UV 조사에 의해 피부 두께가 크게 증가함을 알 수 있었다(Fig. 30). PS 투여군에서는 피부 두께가 실험 5주차와 10주차에 각각 1.01±0.21~1.10±0.12 mm와 1.05±0.10~1.36±0.16 mm로 UV 대조군에 비해 유의적으로 크게 감소함을 알 수 있었다.

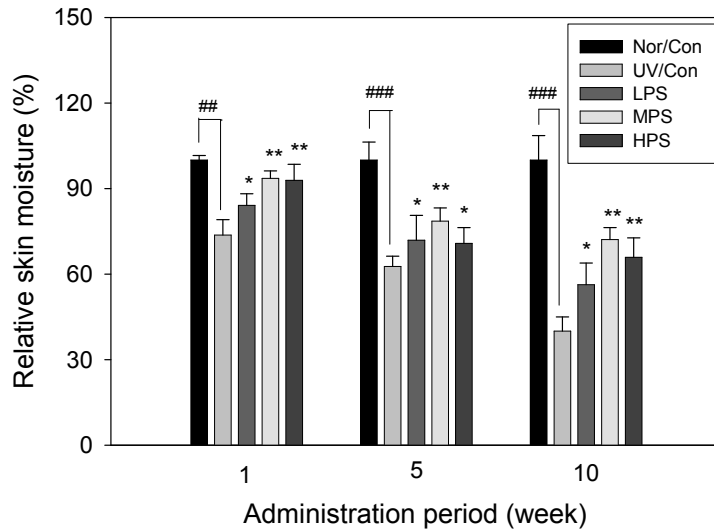


Fig. 29. Effect of PS on the relative skin moisture of hairless mice exposed to the chronic UV irradiation with different administration period. Each value was expressed as the mean±SD of triplicate experiments. ## and ### represent significant difference between Nor/Con and UV/Con,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively. \* and \*\* represent significant difference compared to UV/Con,  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

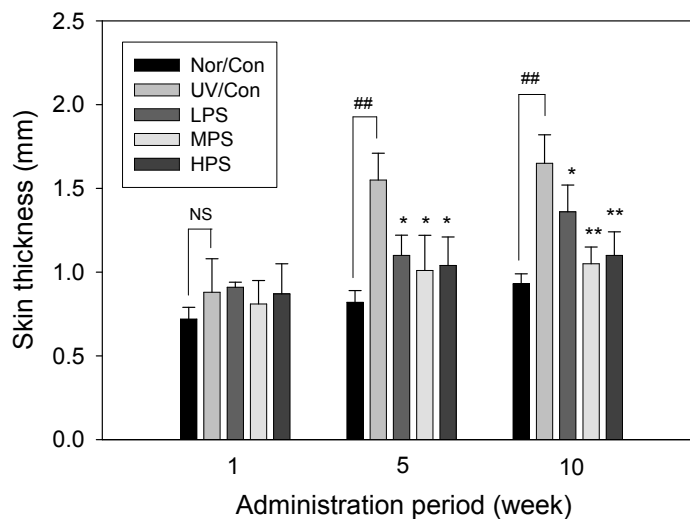


Fig. 30. Effect of PS on the skin thickness of hairless mice exposed to the chronic UV irradiation with different administration period. Each value was expressed as the mean±SD of triplicate experiments. ## represents significant difference between Nor/Con and UV/Con, P<0.01. \* and \*\* represent significant difference compared to UV/Con, P<0.05 and P<0.01, respectively. NS represents no significance between 2 samples.

### (3) Replica 영상 분석

실험동물의 주름 생성 정도를 육안으로 관찰했을 때 정상대조군과 UV 대조군 간의 주름 생성 차이는 뚜렷하게 확인되었고 PS 투여에 의한 피부주름 개선 정도도 확인되었다. 이를 정량화하기 위하여 Skin visioline을 이용하여 피부주형을 분석한 결과 Fig. 31에서 보는 바와 같이 정상대조군에 비해 UV 대조군의 피부 주름이 깊어지고 개수도 크게 증가함을 알 수 있었으며, PS 투여군은 UV 대조군에 비해 주름이 얕아지고 개수도 크게 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 PS 투여량이 증가할수록 더욱 명확하게 나타났다. 각 실험군의 피부주형에서의 주름 면적을 계산한 결과 Fig. 32에서 보는 바와 같이 자외선 조사에 의해 정상대조군의  $53.5 \pm 7.5 \text{ mm}^2$ 에서 UV 대조군의  $123.8 \pm 12.6 \text{ mm}^2$ 으로 주름 면적이 크게 증가하는 것으로 나타났으며 PS 섭취에 의해  $67.0 \pm 2.5 \sim 83.3 \pm 15.3 \text{ mm}^2$ 으로 농도의존적으로 주름면적이 크게 감소하는 것으로 나타나 PS 경구섭취가 자외선 조사에 의한 피부 주름 생성을 크게 감소시킴을 알 수 있었다.

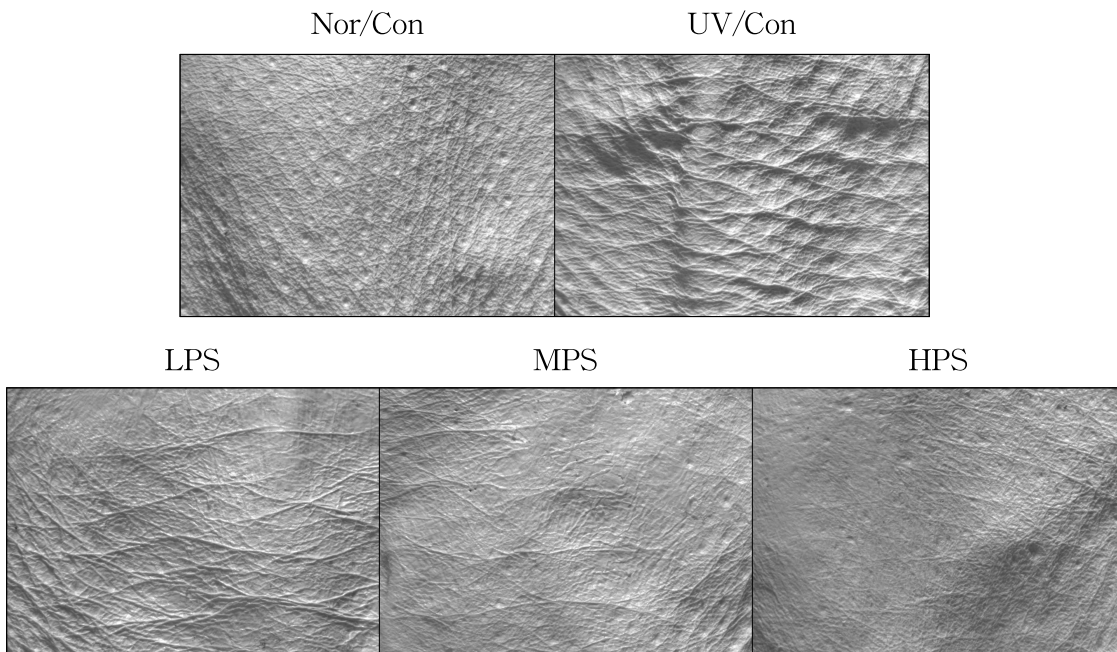


Fig. 31. Features of dorsal skin of hairless mice orally administrated with PS at the end of the administration period.

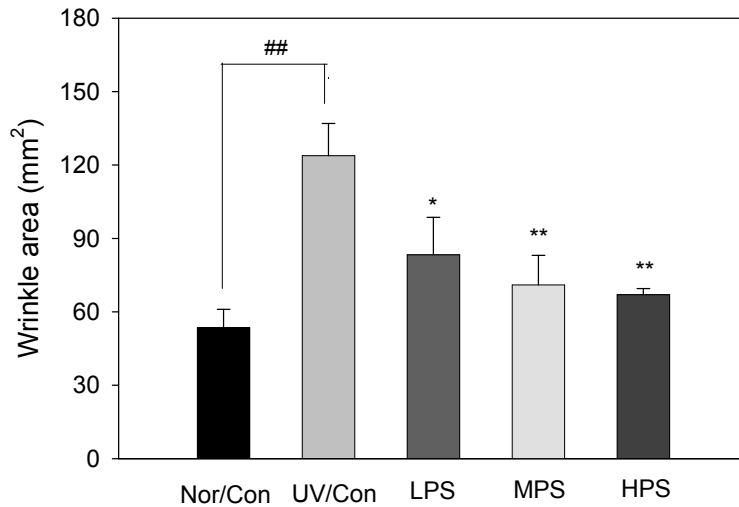


Fig. 32. Effect of PS on the wrinkle area of hairless mice exposed to the chronic UV irradiation. Each value was expressed as the mean±SD of triplicate experiments. ## represents significant difference between Nor/Con and UV/Con,  $P<0.01$ . \* and \*\* represent significant difference compared to UV/Con,  $P<0.05$  and  $P<0.01$ , respectively.

#### (4) 피부조직의 병리학적 관찰

장기간 자외선 노출시 나타나는 피부 조직의 일반적인 병리학적 특징은 표피두께가 2-3배 증가하게 되고, 표피층에서는 유극 세포의 증가, 각질세포의 다형성 등이 관찰되며, 진피층에서는 collagen과 elastin의 섬유 구조가 변형되고 탄력섬유의 증가로 인한 elastosis가 관찰된다. 실험동물로부터 등 피부를 떼어내어 H&E와 Masson-trichrome 염색을 실시하여 조직병리학적으로 관찰한 결과 Fig. 33에서 보는 바와 같이 정상대조군에 비해 자외선에 노출된 UV 대조군에서 정상대조군보다 표피와 진피가 크게 두꺼워진 것을 볼 수 있었으며, PS 투여군에서는 표피와 진피가 크게 감소하였고 PS의 투여량이 증가할수록 그 효과가 큰 것으로 나타났다. 그리고 진피 조직에서의 교원질의 분포 또한 변형된 구조를 보이는 UV 대조군과 달리 PS 투여군에서 이러한 조직 손상이 감소됨을 확인할 수 있었다. 따라서 자외선 조사에 의한 표피 및 진피, 피하지방층에서의 손상에 대한 PS의 예방 효과를 관찰할 수 있었다. H&E 염색 결과를 토대로 표피의 두께를 분석한 결과 정상대조군의  $28.3\pm 0.8 \mu\text{m}$ 에서 UV 대조군의  $65.3\pm 3.9 \mu\text{m}$ 로 자외선 조사에 의해 표피두께가 크게 증가하였으며, PS 투여군의 경우 PS 투여량이 12.5~50 mg/kg으로 증가할수록 표피두께도  $35.2\pm 2.1\sim 50.0\pm 2.1 \mu\text{m}$ 로 유의적으로 크게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 34). Masson-Trichrome 염색을 통한 피부 조직 내 collagen 함량을 측정된 결과, 정상대조군에 비해 UV 대조군의 경우  $503.8\pm 19.8 \text{ mg/g protein}$ 에서  $391.4\pm 10.2 \text{ mg/g protein}$ 으로 collagen 함량이 감소하였으며, PS 투여군의 경우 통계적으로 유

의적이지는 않지만 collagen 함량이  $398.5 \pm 10.2 \sim 414.9 \pm 11.4$  mg/g protein으로 자외선 대조군에 비해 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 35).

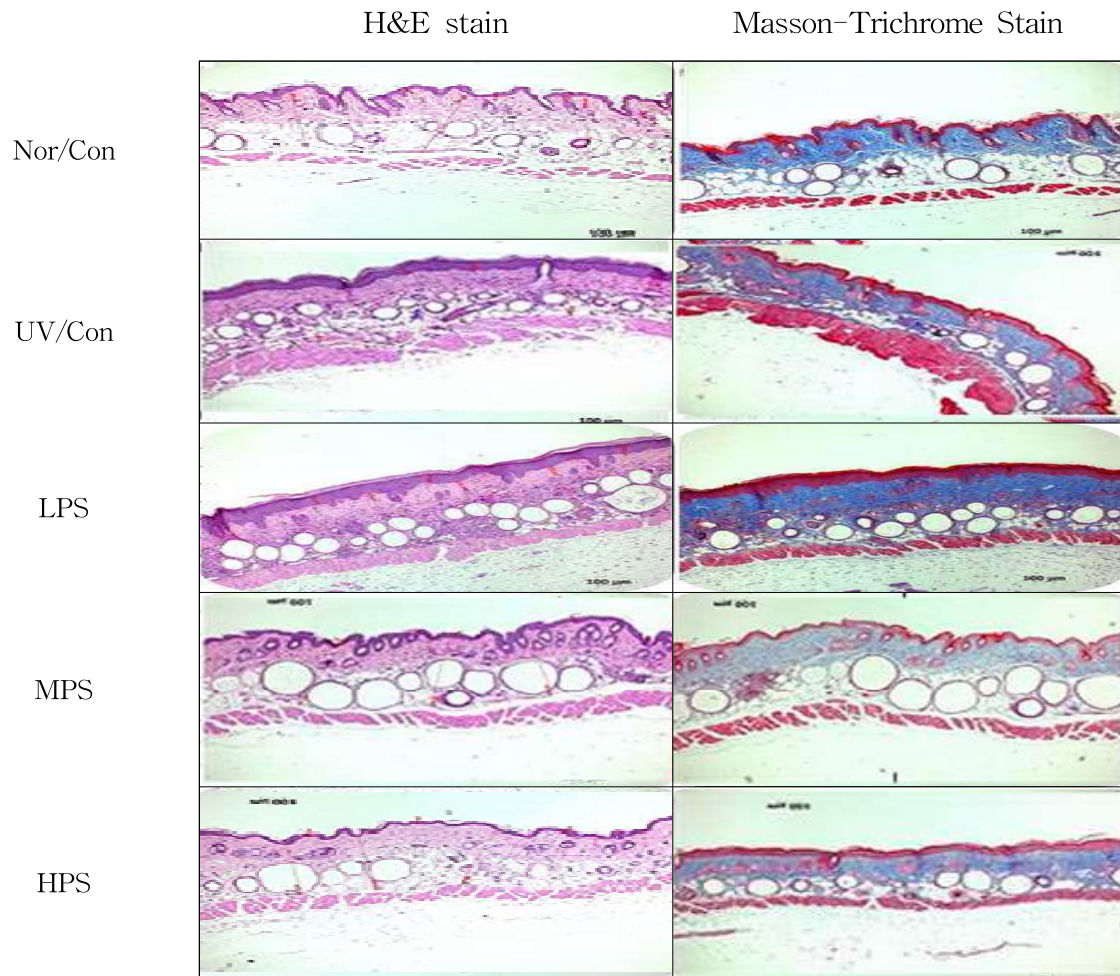


Fig. 33. Histological section of dorsal skin of hairless mice exposed to the chronic UV irradiation. At the end of an 10 week oral administration of PS, skin biopsies were obtained from central dorsal skin to measure epidermal thickness. H&E and Masson-Trichrome staining (X200).

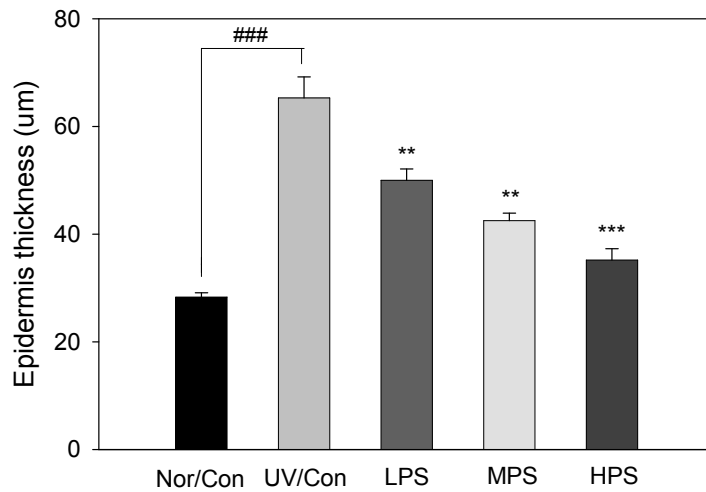


Fig. 34. Effect of PS on the epidermal thickness of hairless mice exposed to the chronic UV irradiation. At the end of an 10 week oral administration of PS, skin biopsies were obtained from central dorsal skin to measure epidermal thickness. Each value was expressed as the mean±SD of triplicate experiments. ### represents significant difference between Nor/Con and UV/Con,  $P < 0.001$ . \*\* and \*\*\* represent significant difference compared to UV/Con,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively.

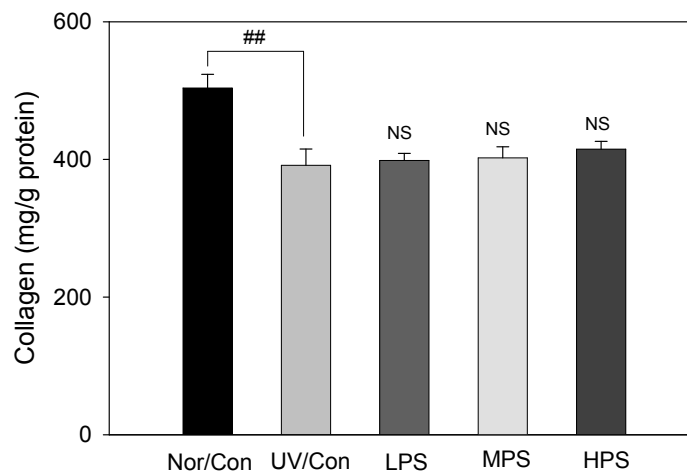


Fig. 35. Effect of PS on the collagen content of hairless mice exposed to the chronic UV irradiation. At the end of an 10 week oral administration of PS, skin biopsies were obtained from central dorsal skin to measure epidermal thickness. Each value was expressed as the mean±SD of triplicate experiments. ## represents significant difference between Nor/Con and UV/Con,  $P < 0.01$ . NS represents no significance between 2 samples.

광노화에 의한 피부조직내 변화는 외부물질의 피부 흡수 및 수분증발을 조절하는 정

상적인 피부장벽 기능에 손상을 입히고, 피부 두께를 증가시키며 진피층의 구조를 손상시켜 궁극적으로 주름을 유발시키게 된다. 급성피부장벽 손상 모델을 이용한 여러 연구 결과에 의하면 손상된 피부 장벽의 복구과정은 다양한 신호전달체계가 관여하여 결손된 지질의 보충 및 새로운 생합성을 유도하면서 진행되는 역동성을 나타내며 대표적 회복신호로서 경피수분 손실량의 개선 및 피부 두께의 개선 등을 들 수 있다. Chung 등은 각질세포의 분화를 촉진함으로써 피부 ceramide 함량을 증가시키고 경피수분손실을 감소시켜 궁극적으로 피부장벽을 강화한다고 보고한 바 있다. 본 연구에서도 UV 조사에 의해 실험동물의 표피 수분량이 정상군에 비해 크게 감소하였지만 PS 처리에 의해 UV 대조군에 비해 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 또한 피부 두께의 경우에도 UV 조사에 의해 피부 두께가 크게 증가하였지만 PS 처리시 UV 대조군에 비해 피부 두께가 유의적으로 감소하는 것으로 나타나 UV 조사에 의한 피부장벽 손상이 상당히 개선됨을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 동물실험을 통해 PS의 섭취에 의한 주름생성 억제 효과를 검증하고자 하였다. UV 조사에 의해 실험동물의 외관상 주름과 epidermis의 두께가 크게 증가하였지만 PS 처리에 의해 농도의존적으로 UV 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 또한 collagen 양의 경우에 있어서도 UV 조사에 의해 collagen 양이 크게 감소하지만 PS 처리시 유의적이지는 않지만 UV 대조군에 비해 증가하는 것으로 나타나 PS 처리가 UV 조사에 의한 주름생성을 상당히 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.

PS를 장기간 경구 섭취할 경우, UV에 의해 발생된 진피층의 구조 손상에 따른 주름 발생과 탄력저하를 완화시킬 뿐만 아니라 피부 장벽 기능 개선에도 도움을 주어 피부의 수분 함유 능력 증강, 피부 건조 방지 등의 표피 보호 효능을 가질 수 있음을 확인하였다. 이는 PS의 섭취가 피부 진피층 매트릭스 개선 뿐 아니라 표피와 피부 장벽 개선에도 도움을 주는 등 피부 보호에 대한 dual effect를 가질 수 있음을 의미하며, PS가 향후 피부 기능 보호 및 주름 생성 완화를 위한 기능성 식품 소재로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 8. 생리활성지질의 보습 효능 *in vivo* assay 결과

### 가. 임상증상 및 사망동물의 관찰

정상군을 포함한 모든 시험군에서 시험 기간 4주 동안 사망한 동물은 관찰되지 않았으며, 전 동물에서 실험물질 투여로 인한 특이한 임상증상은 관찰되지 않았다(Table 5).

Table 5. Clinical signs and death rate in hairless mice orally administrated with bioactive lipids

Group	Sex	Animal No.	Clinical signs	Mortality(%) <sup>2)</sup>
Con	female	6	NAD <sup>1)</sup>	0
TS/Con	female	6	NAD	0
HC	female	6	NAD	0
LC	female	6	NAD	0
HPS	female	6	NAD	0
LPS	female	6	NAD	0

<sup>1)</sup>No abnormalities detected

<sup>2)</sup>No. of dead/No. of treated animals

#### 나. 체중변화 및 식이 섭취

각 군 간 체중 변화는 Fig. 36에서 보는 바와 같이 각 동물의 체중은  $26.29 \pm 0.46$  g으로 고른 체중범위를 나타내었다. 시험물질 투여기간 중 정상군을 포함한 시험군 모두 약간의 체중 증가를 나타내었으며, 최종 체중범위는  $27.77 \pm 0.42$  g이었다. 시험 전 기간에 걸쳐 사료, 음수 소비량은 군별로 큰 차이를 보이지 않았다.

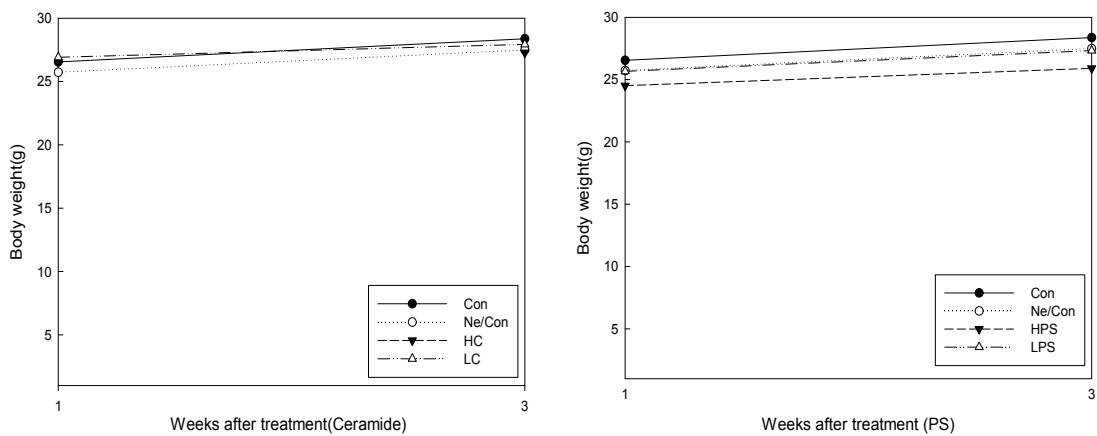


Fig. 36. Changes in body weights in hairless mice orally administrated with bioactive lipids.



#### 다. 경피수분손실도

실험동물의 등 부위를 균일한 힘으로 9회 tape stripping한 직후, 2시간 후, 4시간 후, 24시간 후, 48시간 후 그리고 72시간 후 경피수분손실량의 변화를 관찰한 결과는 Table 6과 같다. TS 대조군의 경우 정상군에 비해 TS후 급격히 경피수분손실량은 증가되고, 2시간 후 지속 될 때 까지 수분손실량이 증가하는 것을 알 수 있었으며, 전반적으로 TS 후 증가된 경피수분손실량은 시간이 지남에 따라 회복되는 것으로 나타났다. TS 대조군에 비해 시험물질 투여군에서는 TS 처리시 피부 장벽손상이 적게 일어나 낮은 TEWL 값을 나타냄을 확인할 수 있었다. 특히 저농도 ceramide 투여군에서는 피부손상도 적게 일어나고, 회복 속도도 꾸준히 증가하는 것을 알 수 있었다. 반면 PS 투여군에서는 저농도 처리군에서 TS 대조군에 비해 피부장벽 손상도 감소하고 빠르게 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 토대로 시험물질로 사용한 ceramide와 PS 모두 피부손상 및 수분손실에 대한 예방효과를 나타냄을 알 수 있었고 특히 ceramide의 경우 저농도에서도 경구섭취를 통해 피부의 민감도 및 피부 장벽 손상에서 효과적으로 예방 및 회복력을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

Table 6. Effect of bioactive lipids on TEWL of hairless mice skin-damaged by tape stripping

	Con	TS/Con	LC	HC	LPS	HPS
after TS	3.1±1.1	17.9±7.2	13.8±5.2	18.3±19.0	16.8±6.7	29.5±14.6
2h	2.8±1.6	29.0±11.7	9.9±5.8	10.3±5.2	20.1±10.8	17.7±12.0
4h	3.4±1.5	23.3±12.2	9.0±2.8	11.6±13.4	12.4±4.3	21.0±17.5
24h	6.2±2.2	26.6±11.5	12.7±4.1	11.5±3.6	16.7±6.7	16.8±4.7
48h	5.2±1.6	12.1±6.7	8.4±4.1	7.8±3.6	9.0±3.0	10.2±7.1
72h	5.1±1.6	12.6±5.0	5.9±2.4	7.8±4.5	6.8±2.8	5.8±1.6

#### (5) 피부조직의 병리학적 관찰

실험동물로부터 등 피부를 떼어내어 H&E 염색을 실시하여 조직병리학적으로 관찰한 결과 Fig. 37에서 보는 바와 같이 정상대조군에 비해 TS 대조군에서 정상대조군보다 표피가 크게 두꺼워진 반면 ceramide와 PS 투여군에서는 표피가 크게 감소한 것으로 나타났다. 그

리고 이를 이미지 분석 프로그램을 이용하여 분석하였을 때에도 Fig. 38에서 보는 바와 같이 동일한 결과를 나타내었다.

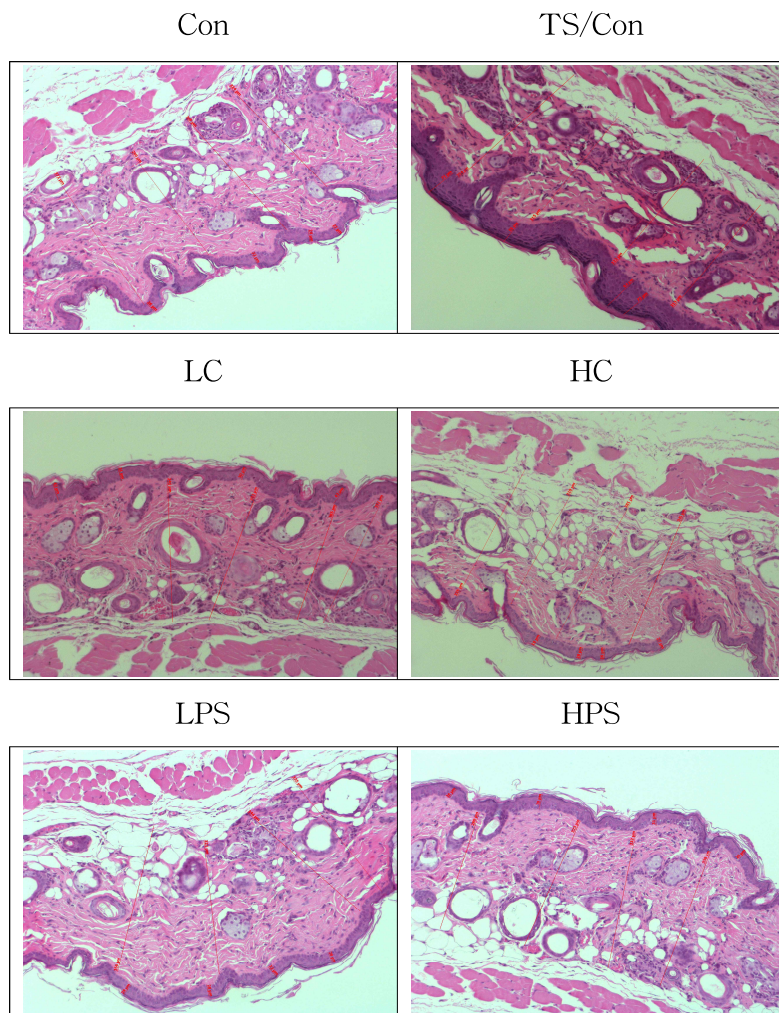


Fig. 37. Histological section of hairless mouse dorsal skin exposed to chronic UV irradiation.

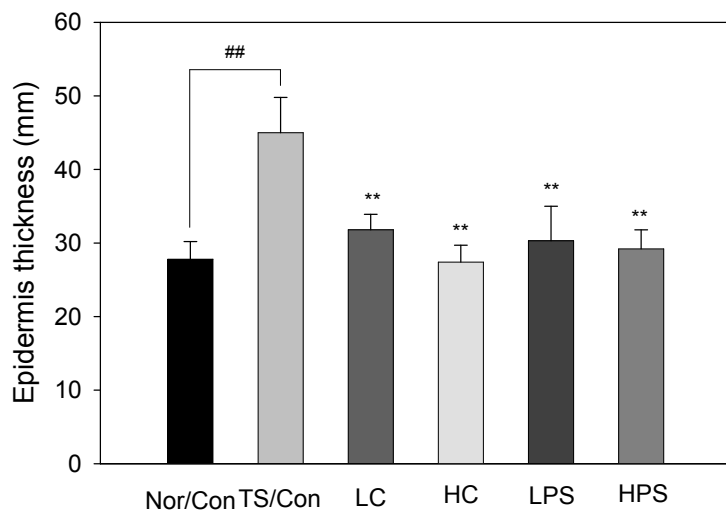


Fig. 38. Effect of PS on the epidermal thickness of hairless mice skin-damaged by tape stripping. Each value was expressed as the mean $\pm$ SD of triplicate experiments. ## represents significant difference between Nor/Con and UV/Con, P<0.01. \*\* represents significant difference compared to UV/Con, P<0.01.

## 제2협동과제: 생리활성지질의 항염증 및 염증성 피부질환 치료 효능 분석 및 작용기전 연구

### I. *In vitro* system을 이용한 항염증 효과 분석

#### 1. RAW264.7 대식세포주에서 당세라마이드의 항염증 효과

CB60의 항염증 효과를 관찰하기 위하여 RAW264.7 대식세포주에서 MTT cytotoxic assay, IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 와 같은 proinflammatory cytokine의 발현 변화 분석을 실시하였다.

##### 가. RAW264.7에서 CB60의 세포독성 효과

RAW264.7에 대한 CB60의 농도별 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였다. CB60을 농도별 처리 24시간 후에 세포독성을 측정하였다 (Fig. 1). 100  $\mu\text{g/ml}$  농도 이하에서는 세포 독성을 보이지 않았으며, LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )로 염증이 유도된 상황에서도 100  $\mu\text{g/ml}$  농도 이하에서는 세포 독성을 보이지 않았다.

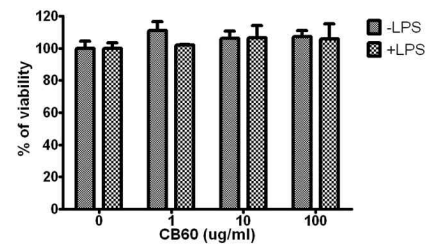


Fig.89 Effect of glucosylceramide on RAW 264.7 cell viability using MTT assay.

##### 나. RAW264.7에서 CB60의 IL-1 $\beta$ 및 TNF- $\alpha$ 발현 억제 효과

CB60에 의한 대표적인 proinflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$  발현에 대한 억제 효과를 알아보기 위해, RAW264.7 세포에 LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ )를 사용하여 IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$  발현을 유도한 후 CB60을 농도별로 처리하고 24시간 후 IL-1 $\beta$  및 TNF- $\alpha$  발현 억제 정도를 RT-PCR 및 ELISA assay를 통하여 알아보았다. 우선 LPS에 의해 뚜렷하게 증가한 IL-1 $\beta$ 의 mRNA 및 단백질의 발현은 CB60에 의해 농도의존적으로 강하게 저해되었다 (Fig. 2). TNF- $\alpha$ 의 경우, LPS에 의해 증가된 단백질의 발현은 CB60에 의하여 뚜렷이 저해되었으나, mRNA의 발현에 대해서는 영향을 미치지 않았다 (Fig. 3). 하지만 TNF- $\alpha$ 는 초기 염증 단계에 관여하는 인자로, CB60이 TNF- $\alpha$  mRNA 발현에 미치는 영향을 살펴보는데 있어 24시간의 처리 시간이 다소 길었다 사료된다.

**결론:** RAW264.7 대식세포주에서 CB60은 세포독성을 지니지 않고, 염증성 cytokine의 발현 억제를 통해 염증억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

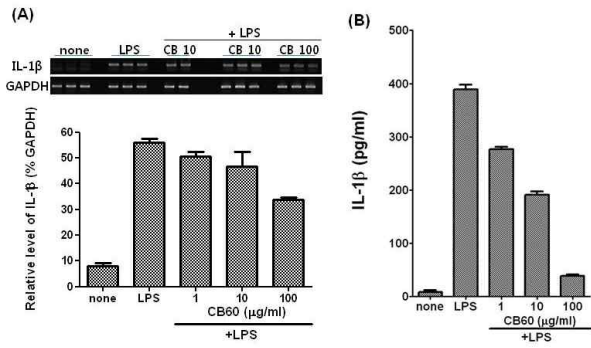


Fig. 90 The effect of glucosylceramide on the expression levels of IL-1 $\beta$  mRNA and protein in RAW 264.7 cells. RT-PCR (A) and ELISA (B) analyses were performed for quantitative measurements of the expression levels.

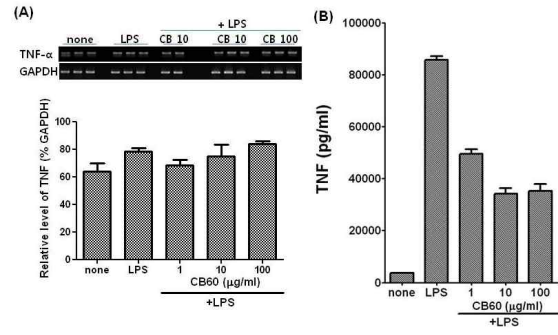


Fig. 91 The effect of glucosylceramide on the expression levels of TNF- $\alpha$  mRNA and protein in RAW 264.7 cells. RT-PCR (A) and ELISA (B) analyses were performed for quantitative measurements of the expression levels.

## 2. 류마티스 환자 유래 fibroblast-like synoviocyte (FLS)에서 당세라마이드의 항염증 효과

활막세포는 IL-1이나 IL-6, IL-8과 같은 염증성 cytokine 분비 및 PGE2의 합성 등 다양한 기전을 통하여 류마티스관절염의 중요한 병인 중 하나인 것으로 알려져 있다. 따라서 CB60의 항관절염 효과 검증에 앞서 류마티스관절염 환자 유래 FLS 세포에서 IL-6와 IL-8와 같은 염증성 cytokine과 PGE2의 합성에 대한 CB60의 효과를 검증하였다.

### 가. FLS 세포에서 당세라마이드의 IL-6 및 IL-8 발현 억제 효과

CB60에 의한 IL-6 및 IL-8 발현에 대한 억제 효과를 알아보기 위해, FLS 세포에 IL-1 $\beta$  (1ng/ml)을 사용하여 IL-6 및 IL-8 발현을 유도하였고, 이때 CB60을 농도별로 처리하고 24시간 후 PGE2 발현 억제 정도를 ELISA assay를 통하여 알아보았다. 우선 IL-1 $\beta$  처리시 IL-6 및 IL-8 발현은 뚜렷하게 증가했다. CB60은 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 IL-6 및 IL-8 발현을 농도의존적 방식으로 저해하였다(Fig. 4).

### 나. FLS 세포에서 CB60의 PGE2 발현 억제 효과

CB60에 의한 PGE2 발현에 대한 억제 효과를 알아보기 위해, FLS 세포에 IL-1 $\beta$  (1ng/ml)을 사용하여 PGE2 발현을 유도하였고, 이때 CB60을 농도별로 처리하고 24시간 후 PGE2 발현 억제 정도를 ELISA assay를 통하여 알아보았다. 우선 IL-1 $\beta$  처리시 PGE2의 합성은 뚜렷하게 증가했다. CB60은 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 PGE2의 합성을 강력히 억제하였으며, 특히 농도의존적 방식으로 저해하였다(Fig. 5).

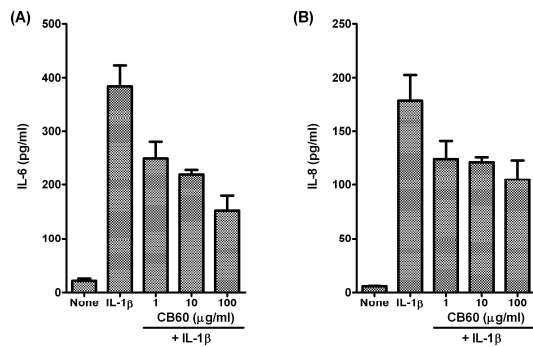


Fig. 92 The effect of glucosylceramide on the expression of proinflammatory cytokine, IL-6 (A) and IL-8 (B), in FLS cells. ELISA analyses were performed for quantitative measurements of the expression levels.

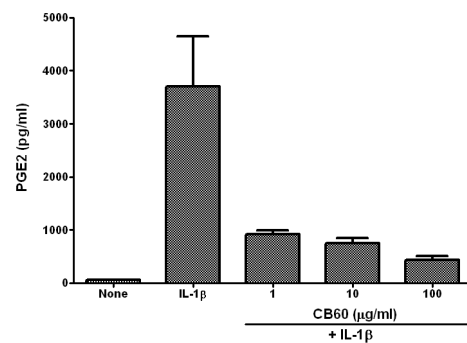


Fig. 93 The effect of glucosylceramide on the expression of PGE2 in FLS cells. ELISA analysis was performed for quantitative measurements of the expression levels.

### 다. FLS 세포에서 GluCer의 total MMP-1의 발현 억제 효과

GluCer에 의한 MMPs 발현의 억제 효과를 알아보기 위해, IL-1 $\beta$  (1ng/ml)을 사용한 FLS 세포의 활성화를 통해 MMPs의 발현을 유도하였고, 이때 GluCer를 농도별로 처리하고 24시간 후 대표적인 연골 파괴 관련 MMPs인 MMP-1의 발현 억제 정도를 ELISA assay를 통하여 알아보았다. IL-1 $\beta$  처리 후 total MMP-1의 발현은 뚜렷하게 증가하였다. GluCer는 IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 total MMP-1의 발현을 농도의 존적 방식으로 저해하였다 (Fig.6).

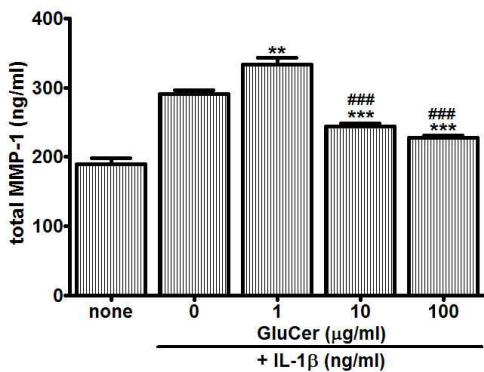


그림 The effect of GluCer on the expression of total MMP-1 in FLS cells. ELISA analysis was performed for quantitative measurements of the expression levels.

**결론:** 류마티스관절염 환자 유래 FLS 세포에서 CB60은 강력한 항염증 효과를 나타내었다. 이는 CB60의 항관절염 효과 가능성을 암시한다고 사료된다.

### 3. Bovine Aortic Endothelial Cell (BAEC)에서 angiogenesis에 대한 당세라마이드의 효과

신혈관형성이란 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 과정으로, 혈관내피세포가 활성화됨으로써 일어나는 분열(proliferation), 이동(migration), 관형성(tube formation)을 포함한 다단계 과정을 통해 일어난다. 신혈관형성은 태아의 발생, 상처치유과 같은 정상적인 과정에서 뿐만 아니라, 류마티스 관절염과 같은 염증성 질환, 암의 성장과 전이와 같은 질병 등의 비정상적인 과정에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 BAEC에서 proliferation, cell migration, tube formation에 대한 CB60의 효능 분석을 통해 신혈관형성 기전에 대한 CB60의 효과를 검증하였다.

#### 가. CB60이 BAEC 혈관내피세포의 세포 증식에 미치는 영향

BAEC 세포에서 CB60의 세포 독성 실험을 통하여, 세포 증식에 대한 CB60의 효과를 시험하였다. 24시간 배양했을 때 세포 독성 효과는 물론, 세포 증식 효과도 보이지 않았다 (Fig. 7).

나. CB60이 BAEC 혈관내피세포의 세포 이동에 미치는 영향

BAEC 세포에서 wounded area로 이동한 세포수의 측정을 통해 CB60의 세포 이동에 미치는 영향을 관찰하였다 (Fig. 8). 7  $\mu\text{g/ml}$  이하의 농도에서는 세포 이동에 대해 영향을 미치지 않았다. 70  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 30% 가량 세포 이동을 억제하였다.

다. CB60이 BAEC 혈관내피세포의 튜브형성(tube formation)에 미치는 영향

BAEC 세포에서 CB60이 세포 분화에 미치는 영향을 관찰하기 위해, 튜브 형성에 대한 CB60의 영향을 관찰하였다. 대조군에서는 세포들이 분화하여 튜브가 분명하게 형성되었다. 50  $\mu\text{g/ml}$  이하의 농도에서는 튜브형성에 대해 거의 영향을 미치지 않았다 (Fig. 9).

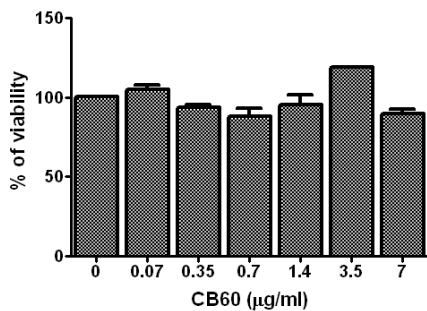


Fig. 95 Effect of glucosylceramide on BAEC cell viability using MTT assay.

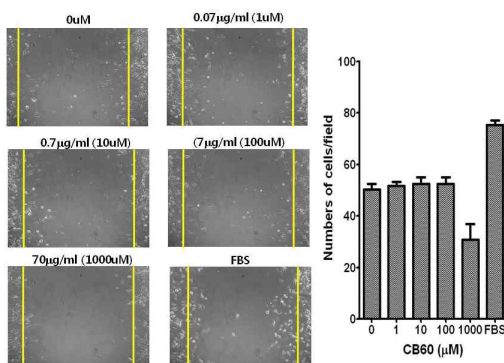


Fig. 96 Effect of glucosylceramide on cell migration in BAEC cells

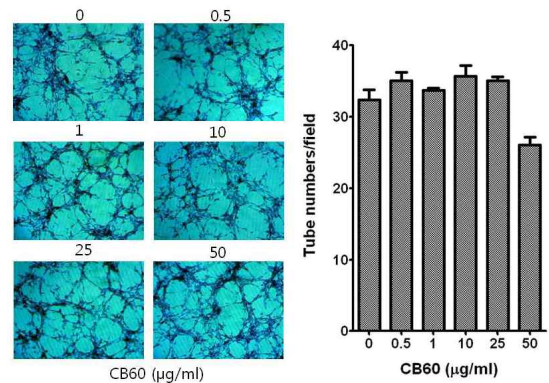


Fig. 97 Effect of glucosylceramide on tube formation in BAEC cells

**결론:** CB60의 처리는 BAEC 세포의 세포 증식, 세포 이동, 튜브 형성에 영향을 미치지 못하였다. 비록 세포 이동에 있어 70  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 다소 억제 효과를 나타내었으나, CB60의 신혈관형성 억제 효과에 대한 기대는 매우 낮다고 판단된다. 하지만 독성에 대한 재실험을 통하여 본 연구에서 보다 높은 새로운 농도 설정하여 재검토할 필요가 있는 것으로 사료된다.



## II. In vivo 동물모델을 이용한 항염증 효과 분석

### 1. 관절염 동물 모델에서 당세라마이드의 항관절염 및 항진통 효과

Carrageenan으로 유도된 흰쥐의 급성 관절염 모델에서 CB60을 경구투여시 말초 진통 및 항염증 효과를 체중분배비율(WDR, weight distribution ratio) 및 슬관절 직경을 통해 관찰하였다.

#### 가. 당세라마이드가 carrageenan으로 유도된 통증에 미치는 영향

CB60은 류마티스 환자 유래 FLS 세포에서 PGE2의 합성을 뚜렷이 억제하였다. 따라서 carrageenan으로 유도된 흰쥐의 급성 관절염 모델에서 WDR을 통하여 CB60의 진통효과를 확인하였다(Fig. 10). 정상군의 경우 우하지의 체중분배비가 50% 내외로 균형 있게 나타났다. 염증 대조군에서는 유발 후 1일에 최저치를 나타내었으며 점차 증가하는 양상을 보였다. 양성대조군인 prednisolone 처리군은 유발 후 제 2일째 큰 폭의 증가를 시작으로 지속적으로 정상군 수준까지 증가하였다. CB60을 투여한 각 실험군 또한 제 2일부터 대조군에 비해 우하지의 체중분배비가 뚜렷이 증가하여 그 수준을 유지하였다. 100 mg/kg와 200 mg/kg 처리군 사이에 차이는 거의 없었다.

#### 나. 당세라마이드가 carrageenan으로 유도된 부종에 미치는 영향

CB60이 carrageenan으로 유도된 흰쥐의 급성 관절염 모델에서 부종에 미치는 영향을 살펴 보았다. 부종은 슬관절의 직경 변화량으로 측정되었다(Fig.11). 염증 대조군에서 슬관절의 직경은 염증 유발 1일 후 가장 크게 증가 후 지속되었다. 양성대조군인 prednisolone 처리군은 유발 후 제 2일째 큰 폭의 감소하여 지속적으로 정상군 수준까지 감소하였다. CB60을 투여한 각 실험군 또한 제 2일부터 염증 대조군에 비해 감소하여 그 수준을 유지하였다. 100 mg/kg와 200 mg/kg 처리군 사이에 차이는 거의 없었다.

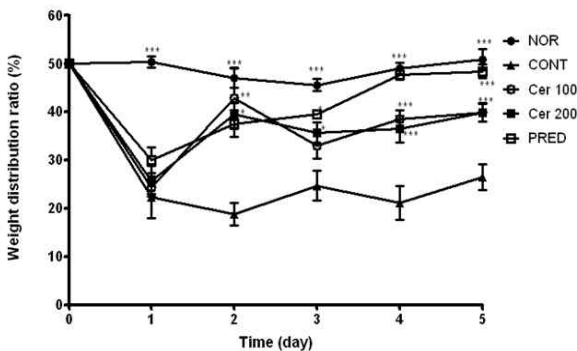


Fig. 98 Effect of glucosylceramide on weight distribution ratio between two hind limbs in carrageenan-induced arthritis rats

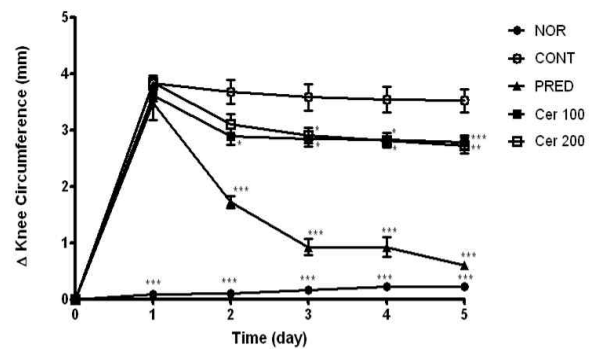


Fig. 99 Effect of glucosyl ceramide on knee circumference in carrageenan-induced arthritis rats

#### 다. Carrageenan으로 유도된 조직학적 변화에 대한 GluCer의 효과

전년도 연구에서 carrageenan으로 유도된 흰쥐의 급성 관절염 모델에서 GluCer의 경구투여에 의한 관절 부종의 억제와 말초 진통 효과를 확인하였다. 이에 carrageenan에 의한 무릎 관절 내의 염증 정도를 조직학적 변화를 통해 확인하였다. 관절염군(CONT)에서 상피하층이 두꺼워지고, 염증세포의 침윤 및 활액막의 비대가 관찰되었다. GluCer의 구강 투여는 상피하층의 두께를 감소시켰으며, 염증세포의 침윤 및 활액막의 비대 또한 억제시켰다(Fig. 12).

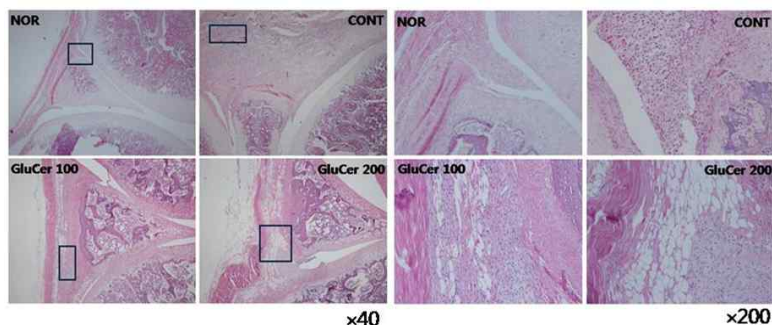


Fig. 100 Effects of GluCer on histological features of knee joint in carrageenan-induced arthritis rats using Hematoxylin and eosin stain.

결론: Carrageenan으로 유도된 흰쥐의 급성 관절염 모델에서 당세라마이드의 경구투여는 말초 진통 및 항염증 작용에 효과적이다. 특히 WDR 실험에서 그 회복력이 부종을 억제하는 것보다 큰 것을 미루어 볼 때, 통증에 보다 효과적인 것으로 추측되며, 이는 CB60의 PGE2의 합성 억제 효과와 밀접한 관계가 있을 것으로 예상된다. 따라서 추후 COX-2 및 PGE2 등의 분석이 필요한 것으로 사료된다.

## 2. 아토피성 피부염 동물 모델에서 당세라마이드의 항아토피성 효과

14일 간 지속적으로 trimellitic anhydride (TMA)를 도포한 동물은 아토피성 피부염의 중요한 특징을 나타내는데, 이는 NC/Nga mice 모델보다 짧은 시간에 모델 확립이 가능하고 개체간 차이가 적다는 점에서 보다 효율적이라 할 수 있다. 따라서 TMA 유발 아토피 동물 모델을 이용하여 CB60의 항아토피성 효과를 관찰하였다.

### 가. 당세라마이드가 귀의 피부 및 두께 변화에 미치는 영향

생쥐의 귀에 TMA의 반복적인 도포는 귀에서 사람의 아토피 피부염과 유사한 증상인 erythema, scarring/dryness, erosion이 나타났다(Fig.13). CB60을 처치한 실험군은 귀에서 erythema, scarring /dryness, erosion이 감소하였으며, CB60의 처치량이 증가할수록 현저한 감소를 나타내었다. TMA의 반복적인 도포에 의한 귀의 swelling은 귀의 두께 변화로 측정하였다(Fig.14). 귀의 육안 관찰 결과와 마찬가지로 아토피 대조군에서 크게 증가한 귀의 두께는 CB60 투여군에서 농도의존적인 방법으로 유의적으로 감소하였다. 염증성 피부의 변화 및 피부 내로의 염증세포 침윤 정도를 조직학적 방법으로 살펴보면, 역시 아토피대조군에서 강력한 염증세포의 침투와 acanthosis가 관찰된다. 이런 변화는 CB60 투여군에서 농도의존적 수단으로 피부조직 내로 염증관련세포들의 침윤 또한 감소하고 염증이 회복되고 있음을 알 수 있다 (Fig. 15).

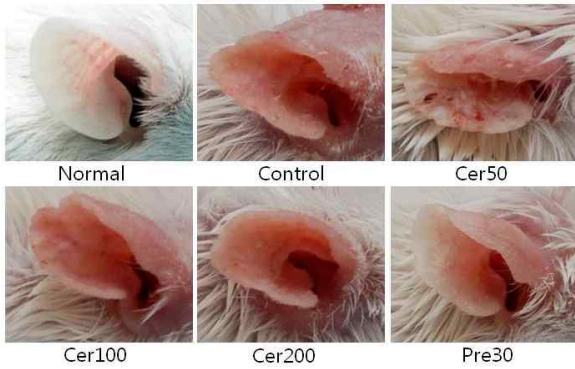


Fig.101 Effects of glucosylceramide on clinical observation of ear skin in TMA-induced atopic mice

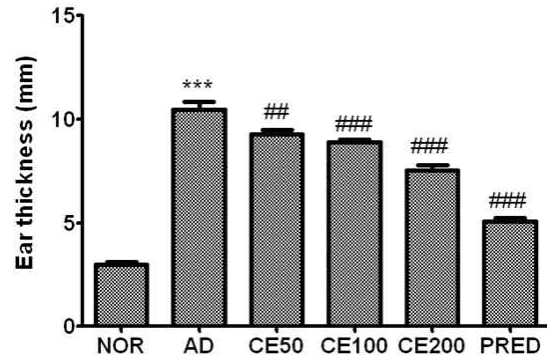


Fig.102 Effect of glucosylceramide on ear thickness in TMA-induced atopic mice.

#### 나. 당세라마이드가 lymph node 무게 변화에 미치는 영향

아토피와 같은 알레르기 반응에서 lymph node 세포의 증식과 면역세포의 침윤으로 인하여 auricular lymph node의 무게가 증가한다(Fig.16). 아토피 대조군에서 크게 증가한 lymph node의 무게는 CB60 투여군에서 농도 의존적인 방법으로 유의적으로 감소하였다.

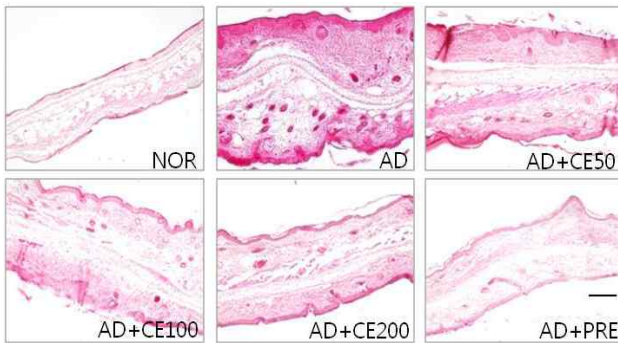


Fig.103 Effects of glucosylceramide on histological features of ear skin lesions in TMA-induced atopic mice. Scale bar = 100  $\mu$ m

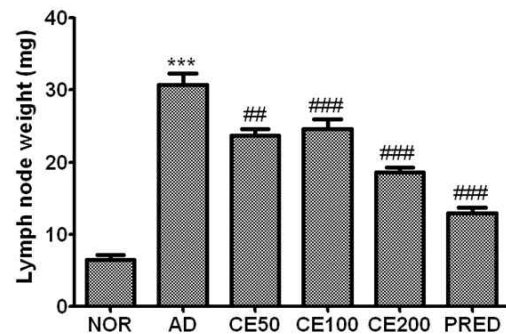


Fig. 104 Effects of glucosylceramide on lymph node weight in TMA-induced atopic mice

#### 다. TMA로 유도된 혈청 내 IL-4 농도에 미치는 GluCer의 영향

생쥐의 귀에 TMA의 반복적인 도포는 혈청 내 아토피의 마커인 IL-4의 농도를 증가시켰다. GluCer의 경구 투여는 농도 의존적 수단으로 혈청 내 IL-4의 농도 증가를 억제하였다 (Fig. 17).

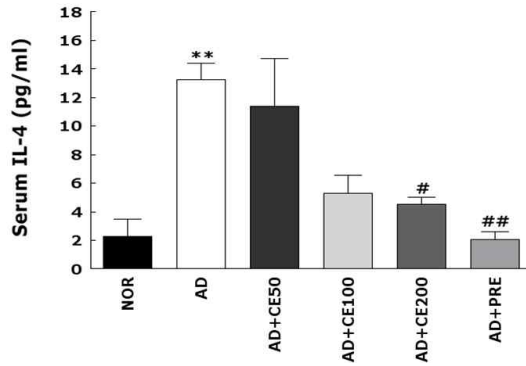


Fig. 105 Effect of GluCer on serum IL-4 in TMA-induced atopic mice.

라. TMA로 유도된 피부 내 비만세포(mast cell)의 침윤에 미치는 GluCer의 영향  
비만세포(mast cell)은 알레르기의 주요인이 되는 면역 세포이다. 생쥐의 귀에 TMA의 반복적인 도포는 피부 염증 부위로 다량의 비만세포의 침윤을 초래하였다. GluCer의 경구 투여는 농도 의존적 수단으로 피부 염증 부위로 비만세포의 침윤을 현저히 저해하였다 (Fig. 18).

#### 마. 피부 내 사이토카인 프로파일에 미치는 GluCer의 영향

아토피는 알레르기 질환으로, 일반적으로 “Th1/Th2 밸런스”에 기인한다. 아토피와 같은 알레르기 질환에서는 “Th2” 측으로 기울어지는 것으로 알려져 있다. 생쥐의 귀에 TMA의 반복적인 도포는 염증 피부 내 Th1 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 와 Th2 사이토카인인 IL-4의 mRNA 발현을 증가시켰다. GluCer의 경구 투여는 IFN- $\gamma$ 와 IL-4의 mRNA 발현을 모두 억제시켰고, 특히 Th2 사이토카인인 IL-4의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 보다 현저히 저해시켰다 (Fig. 19A). 또한 GluCer의 경구 투여는 염증 피부 내에서 증가한 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현 역시 농도 의존적인 수단으로 억제하였다(Fig. 19B).

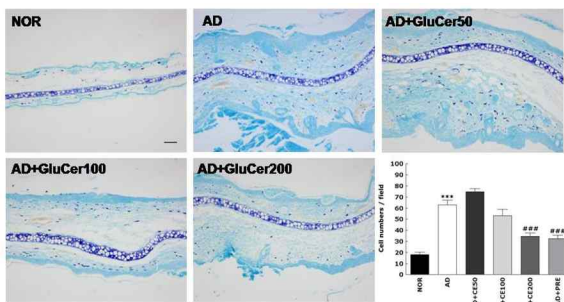


Fig. 106 Effects of GluCer on mast cell infiltration into ear skin lesions in TMA-induced atopic mice. (toluidine blue, Scale bar = 100  $\mu$ m)

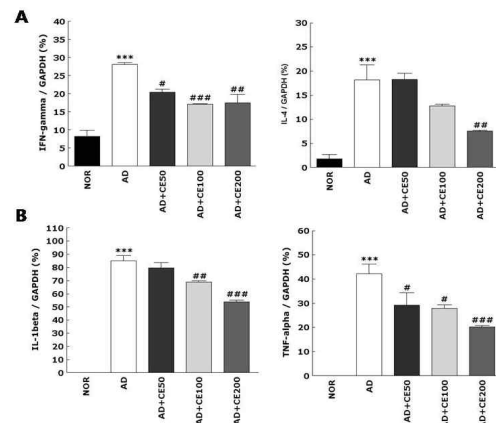


Fig. 107 Effects of GluCer on cutaneous cytokine profile in TMA-induced atopic mice. Expression of type 1 cytokines (IFN- $\gamma$ ) and Th2 cytokines (IL-4) (A) as well as of the inflammatory cytokines, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (B) is given on mRNA level.

### 바. 림프절 내 사이토카인 프로파일에 미치는 GluCer의 영향

생쥐의 귀에 TMA의 반복적인 도포는 림프구의 세포 증식과 면역 세포 침윤에 의한 림프절 무게 증가를 초래한다(Fig.20). TMA의 반복적인 도포는 림프절 내 Th1 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 와 Th2 사이토카인인 IL-4의 mRNA 발현 또한 증가시켰다. GluCer의 경구 투여는 림프절 내 IFN- $\gamma$ 와 IL-4의 mRNA 발현을 모두 억제시켰다(Fig. 21A). 더불어 GluCer의 경구 투여는 림프절 내에서 증가한 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ 와 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현 역시 억제하였다(Fig. 21B).

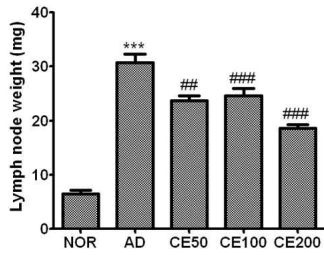


Fig. 108 Effects of GluCer on lymph node weight in TMA- induced atopic mice

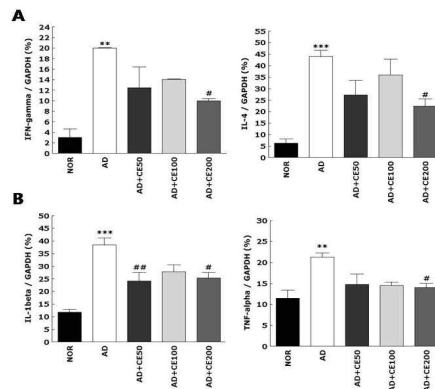


Fig. 109 Effects of GluCer on cytokine profile in lymph node from TMA-induced atopic mice. Expression of type 1 cytokines (IFN- $\gamma$ ) and Th2 cytokines (IL-4) (A) as well as of the inflammatory cytokines, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (B) is given on mRNA level.

결론: TMA로 유발된 아토피성 피부염의 동물모델에서 CB60의 경구투여는 표피의 두께 감소, lymph node 무게 감소, 염증 세포 침윤을 저하 등 아토피성 피부염의 증상을 완화시키는 효과가 있었다. 생쥐의 귀에 TMA의 반복적인 도포에 의해 유도된 생쥐의 아토피성 피부염 동물 모델에서 GluCer의 경구 투여는 아토피 마커인 IL-4의 혈중 내 농도를 감소시키고, 염증 피부로 알레르기 주요 면역세포인 비만세포의 침윤을 억제하였으며, 염증 피부 뿐 아니라 림프절 내에서 증가된 Th1과 Th2 사이토카인 및 염증성 사이토카인의 발현을 현저히 억제하였다. 이는 아토피성 피부염의 완화를 위한 기능성 화장품 및 그 치료제로써 GluCer의 적용 가능성을 의미한다.

### 3. 습진성 피부염 동물 모델에서 당세라마이드의 효능 분석

습진성 피부염에 대한 GluCer의 효능을 검증하기 위해, oxazolone으로 유도된 피부습진 동물모델 구축하였고, 확립된 동물 모델에서 피부손상 및 염증정도, aquaporin-3 발현 등을 통해 GluCer의 효능을 검증하였다.

#### 가. Oxazolone 유도 습진 피부염 동물 모델에서 귀의 피부 및 두께 변화에 미치는 GluCer의 영향

생쥐의 귀에 oxazolone의 반복적인 도포는 귀에서 erythema, scarring/dryness, erosion이 나타났다. GluCer을 처치한 실험군은 귀에서 erythema, scarring /dryness, erosion이 감소하였으며, 당세라마이드의 처치량이 증가할수록 현저한 감소를 나타내었다(Fig.22A). oxazolone의 반복적인 도포에 의한 귀의 swelling은 귀의 두께 변화로 측정하였다(Fig.22B). 귀의 육안 관찰 결과와 마찬가지로 습진 피부염 대조군에서 크게 증가한 귀의

두께는 GluCer 투여군에서 농도의존적인 방법으로 유의적으로 감소하였다. 염증성 피부의 변화 및 피부 내로의 염증세포 침윤 정도를 조직학적 방법으로 살펴보면, 역시 아토피대조군에서 강력한 염증세포의 침윤이 관찰된다(Fig.23). 이런 변화는 GluCer 투여군에서 농도의존적 수단으로 피부조직 내로 염증관련세포들의 침윤 또한 감소하고 염증이 회복되고 있음을 알 수 있다.

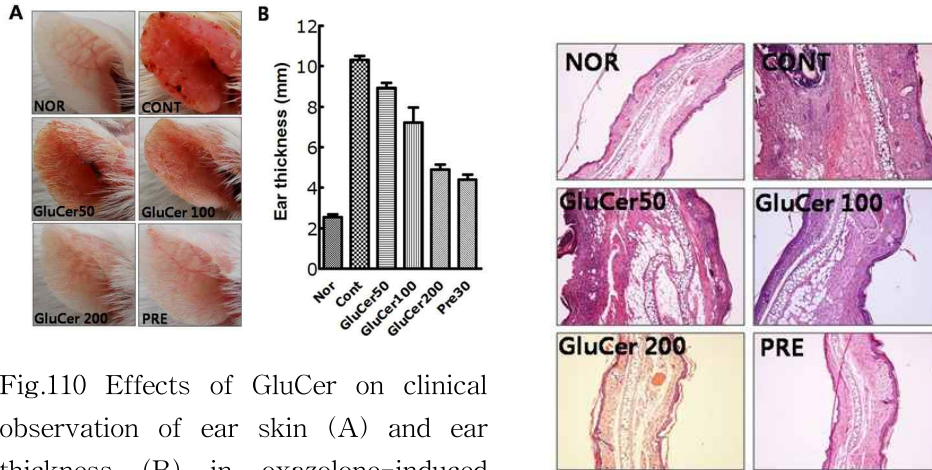


Fig.110 Effects of GluCer on clinical observation of ear skin (A) and ear thickness (B) in oxazolone-induced ear eczema in mice.

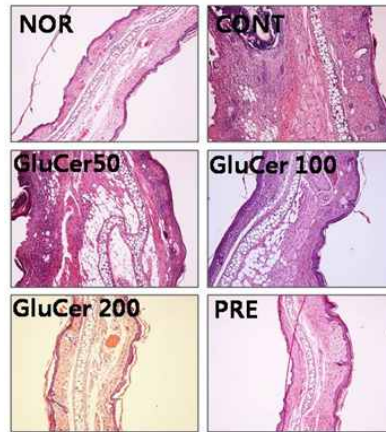


Fig.111 Effects of GluCer on histological features of ear skin lesions in oxazolone-induced ear eczema mice. (Hematoxylin and eosin staining, X100)

#### 나. Oxazolone 유도 습진 피부염 동물 모델에서 피부 내 수분 함량에 미치는 GluCer의 영향

생쥐의 귀에 oxazolone의 반복적인 도포는 귀에서 건성습진과 유사한 증상인 피부 내 수분 함량을 현저히 저하시키며, 세포막을 통한 선택적인 수분과 글리세롤 이동을 촉진시키는 수분통로 단백질인 aquaporin-3 (AQP-3)의 발현을 감소시켰다. GluCer의 경구 투여는 농도 의존적인 수단으로 피부 내 수분 함량을 상당한 수준으로 회복시켰으며, AQP-3의 발현 역시 정상군 수준으로 회복되었다(Fig.24)

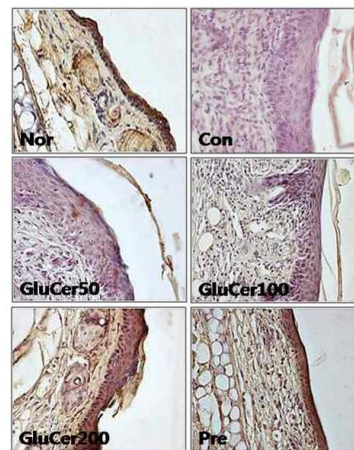


Fig. 112 Effects of GluCer on water contents of the ear skin lesions (A) and the expression of AQP-3 (B) in oxazolone-induced ear eczema in mice.

결론: 생쥐의 귀에 oxazolone의 반복적인 도포에 의해 유도된 생쥐의 건성습진 동물 모델에서 GluCer의 경구 투여는 건성습진 피부의 염증으로 인해 증가된 피부 두께의 감소 등과 같은 육안적 회복은 물론 염증 피부로의 염증성 세포의 침윤 억제 등 조직학적 소견 완화를 나타내었다. 특히 건성습진 피부 내 감소되었던 수분 함량일 회복되었으며, 이는 AQP-3의 발현이 정상 수준으로 회복됨에 의한 것으로 사료된다. 이는 건성습진 피부염 완화를 위한 기능성 화장품이나 치료제의 개발에 있어 GluCer의 가치가 있음을 의미한다.

#### 4. 관절염 동물 모델에서 대두 유래 phosphatidylserine (PS)의 항관절염 및 항진통 효과

Carrageenan으로 유도된 흰쥐의 급성 관절염 모델에서 대두 유래 phosphatidylserine(PS)를 경구 투여시 말초 진통 및 항염증 효과를 체중분배비율(WDR, weight distribution ratio) 및 발목 관절의 부종 변화, 관절 굴절에 의한 울음 소리 측정을 통해 관찰하였다.

##### 가. PS가 carrageenan으로 유도된 통증에 미치는 영향

Carrageenan으로 유도된 흰쥐의 급성 관절염 모델에서 WDR과 관절 굴절에 의한 울음 소리 측정을 통하여 PS의 진통효과를 확인하였다. WDR은 아픈 다리 쪽에 체중이 적게 실리는 것을 응용한 시험법으로, 주로 하지의 통증 정도를 측정하는데 사용된다. 정상군의 경우 우하지의 체중분배비, 즉 WDR은 50% 내외로 균형을 이루는 반면, 관절염 대조군의 WDR은 10%까지 감소한 후 점차 증가하는 양상을 보였다. 양성대조군인 prednisolone 처리군에서 WDR은 빠르게 회복되는 것을 확인할 수 있었다. PS을 투여한 각 실험군 또한 관절염 대조군에 비해 WDR이 뚜렷이 증가하였으며, 특히 50 mg/kg 처리군에서 양성 대조군과 유사한 결과를 나타내었다 (Fig. 25). 관절 굴절에 의한 울음 소리 측정법은 관절의 통증 정도를 측정하는 방법으로, 관절의 굴절에 따른 실험동물의 울음 횟수를 측정하는 것이다. 정상군은 실험 종료까지 굴절에 의한 울음소리가 거의 나타나지 않았으나, 관절염 대조군에서는 제 1일째부터 최고 수치를 보이기 시작하여 실험 종료까지 지속되었다. 양성대조군인 prednisolone 처리군에서 제 4일째부터 회복되기 시작하여 반복되는 prednisolone 처치와 함께 현저히 회복되었다. PS을 투여한 각 실험군 또한 관절염 대조군에 비해 회복되는 추세를 나타냈으며, 특히 50 mg/kg 처리군에서 양성 대조군과 유사한 결과를 나타내었다 (Fig. 26).

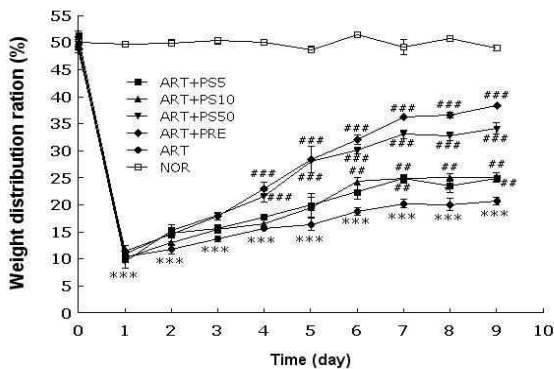


Fig. 25 Effect of PS on weight distribution ratio between two hind limbs in carrageenan-induced arthritis rats

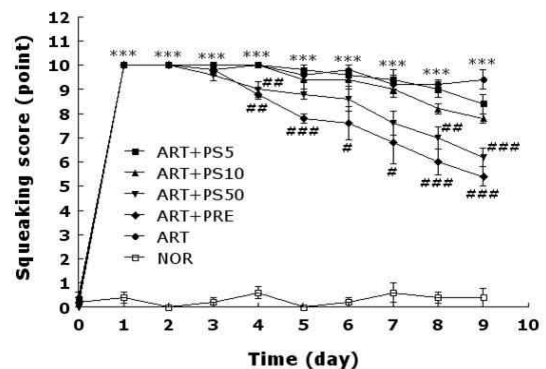


Fig. 26 Effect of PS on squeaking score in carrageenan-induced arthritis rats

##### 나. PS이 carrageenan으로 유도된 부종에 미치는 영향

Carrageenan으로 유도된 흰쥐의 급성 관절염 모델에서 부종에 미치는 PS의 영향을 살펴보았다. 부종은 무릎 관절의 부피 변화 정도로 측정되었다. 관절염 대조군에서 무릎 관절의 부피 변화는 염증 유발 1일 후 가장 크게 증가 후 지속되었다. 양성대조군인 prednisolone 처리군은 유발 후 제 2일째 큰 폭의 감소하기 시작하여 지속적으로 감소하였다. PS을 투여

한 각 실험군 또한 제 2일부터 관절염 대조군에 비해 감소하였으며, 특히 50 mg/kg 처리군에서 양성 대조군과 유사한 결과를 나타내었다 (Fig.27).

결론: Carrageenan으로 유도된 흰쥐의 급성 관절염 모델에서 PS의 경구투여는 말초 진통은 물론 항염증 작용에 효과적이었다. 이는 PS의 항관절염 제로의 사용 가능성을 시사한다.

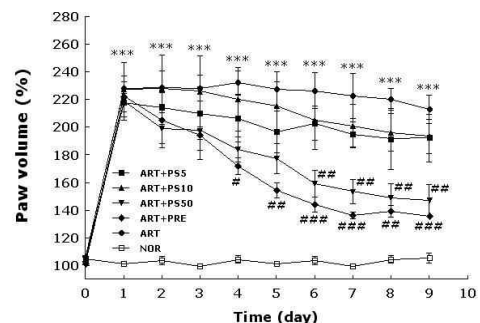


Fig. 27 Effect of PS on paw volume in carrageenan- induced arthritis rats

### 5. 아토피성 피부염 동물 모델에서 PS의 항아토피 효과

14일 간 지속적으로 trimellitic anhydride (TMA)를 도포한 동물은 아토피성 피부염의 중요한 특징을 나타내는데, 이는 NC/Nga mice 모델보다 짧은 시간에 모델 확립이 가능하고 개체간 차이가 적다는 점에서 보다 효율적이라 할 수 있다. 따라서 TMA 유발 아토피 동물 모델을 이용하여 대두 유래 PS와 새우 유래 PS의 항아토피성 효과를 관찰하였다.

가. TMA로 유도된 혈청 내 IgE 농도에 미치는 PS의 영향

생쥐의 귀에 TMA의 반복적인 도포는 혈청 내 아토피의 마커인 IgE의 농도를 증가시켰다. PS의 경구 투여는 농도 의존적 수단으로 혈청 내 IgE의 농도 증가를 억제하였다. 대두 유래 PS와 새우 유래 PS는 유사한 효과를 나타내었다 (Fig.28).

나. TMA로 유도된 피부 내 비만세포(mast cell)의 침윤에 미치는 PS의 영향

비만세포(mast cell)은 알레르기의 주요인이 되는 면역 세포이다. 생쥐의 귀에 TMA의 반복적인 도포는 피부 염증 부위로 알레르기의 주요인이 되는 면역 세포인 비만세포의 대량 침윤을 초래하였다. PS의 경구 투여는 농도 의존적 수단으로 피부 염증 부위로 비만세포의 침윤을 현저히 저해하였으며, 대두 유래 PS와 새우 유래 PS는 유사한 효과를 나타내었다 (Fig.29).

다. 피부 내 IL-4에 미치는 PS의 영향

아토피와 같은 알레르기 질환에서는 “Th1/Th2 밸런스”의 균형이 깨져 “Th2” 측으로 기울어지는 것으로 알려져 있다. 생쥐의 귀에 TMA의 반복적인 도포는 염증 피부 내 Th2 사이토카인인 IL-4의 mRNA 발현을 현저히 증가시켰다. PS의 경구 투여는 농도 의존적 수단으로 IL-4의 mRNA 발현을 억제시켰으며, 대두 유래 PS와 새우 유래 PS는 유사한 효과를 나타내었다 (Fig.30).



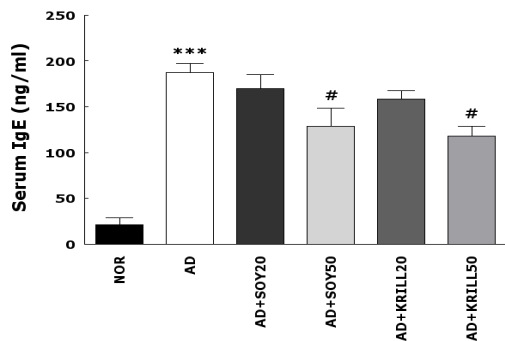


Fig.28 Effect of GluCer on serum IgE in TMA-induced atopic mice.

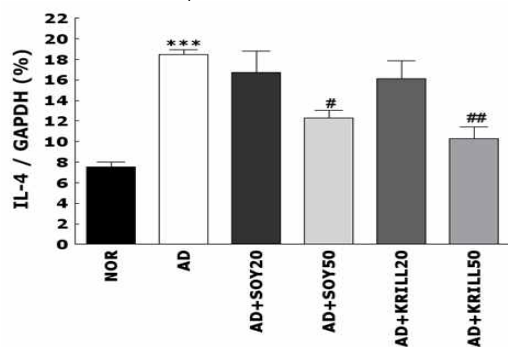


Fig.30 Effects of PS on cutaneous Th2 cytokine, IL-4 in TMA-induced atopic mice

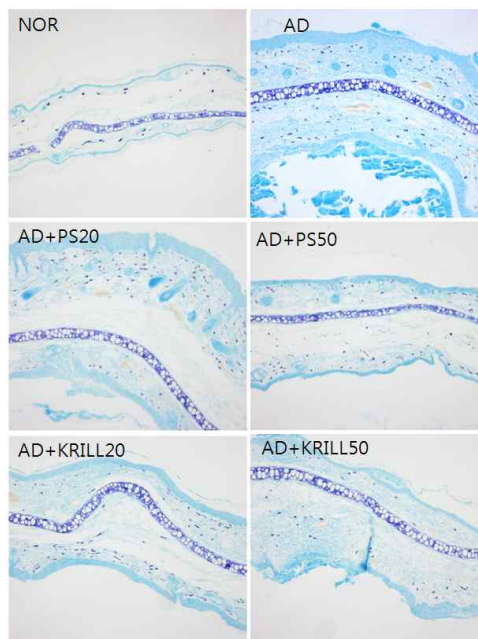


Fig.29 Effects of GluCer on mast cell infiltration into ear skin lesions in TMA-induced atopic mice. (toluidine blue, Scale bar = 100  $\mu$ m)

결론: TMA 유도 아토피성 피부염 동물 모델에서 PS의 경구 투여는 아토피 마커인 IgE의 혈중 내 농도를 감소시키고, 아토피성 피부 내의 알레르기 주요 면역세포인 비만세포의 침윤을 억제하였으며, 아토피성 피부 내에서 증가된 Th2 사이토카인의 발현 증가를 현저히 억제하였다. 이는 아토피성 피부염의 완화를 위한 기능성 화장품 및 그 치료제로써 PS의 적용 가능성을 의미한다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
1 차 년도 (2009)	<b>제1세부과제:</b> 농산부산물로부터 기능성 생리활성 지질의 대량생산 및 수용성 나노가용화 기술 개발	농산부산물에서 식물세라마이드를 비롯한 생리 활성지질의 분포 확 인 및 분리 정제 조건 수립	100	- 기능성 지질의 탐색을 위한 정성 및 정량법 수립  - 비지박, 미강박, 대두유검 등으로 부터 식물 세라마이드 등 기능성 지질 분포 확인  - 농산 부산물로부터 식물세라마이 드 분리, 정제 제조 공정의 수립  - 실험실 수준 및 대량 생산 테스트
	<b>제1협동과제:</b> 농산 부산물 유래 식물 세라마이드 등 생리활성 지질 의 피부 건강 개 선 효능 검증	생리활성지질의 미백 효능 in vitro assay 구축	100	- tyrosinase 활성 억제 효과 조사 - B16 melanoma의 세포 생존에 미치는 영향 - melanin 생성억제 효과 조사 - melanin 합성 관련 유전자 발현 에 미치는 영향 조사
		생리활성지질의 주름개선 효능 in vitro assay 구축	100	- 섬유아세포의 세포생존에 미치는 영향 - collagen 생합성 및 MMP-1 저 해활성 조사 - collagen 관련 유전자 발현에 미 치는 영향 조사
	<b>제2협동과제:</b> 생리 활성지질의 항염증 및 염증성 피부질환 치료 효능 분석 및 작용기전 연구	염증성 macrophage를 타겟으로 한 CB60의 효능 분석	100	LPS로 자극된 macrophage에서 proinflammatory cytokine 분석을 통해 CB60의 항염증 효과를 규명 함.
		류마티스 환자조직유래 fibroblast -like synoviocyte를 타겟으로 한 CB60의 효능 분석	100	류마티스 활막세포에서 염증 지표 의 분석을 통해 CB60의 항염 효능 을 검증함
		혈관 endothelial cell을 타겟으로 한 CB60의 효능 분석	100	Angiogenesis와 관련하여 CB60의 효과를 분석함.
		관절염 동물 모델에서 CB60의 항 관절염 효과 (당초 2차년도 연구 내용)	100	관절염 동물 모델에서 행동학, 조 직병리학 및 분자생물학적 분석을 통해 CB60의 항관절염 효능을 규 명함.
		아토피성 피부염 동물모델에서 기 능성 생리활성지질의 항아토피 효 능 검증 및 작용기전 규명 (당초2 차년도 연구내용)	100	아토피성 피부염 동물모델에서 염 증정도의 지표를 면역학 및 분자생 물학적 분석을 통해 CB60의 항아 토피 효능을 분석함.

2 차 년도 (2010)	<b>제1세부과제:</b> 농산부산물로부터 기능성 생리활성 지질의 대량생산 및 수용성 나노가 용화 기술 개발	대량 생산법 확립	100	효능이 확인된 후보 물질의 40% 이상 순도로 정제 및 조성분석 - 미강박, 비지박, 대두검 등의 원료 원가경쟁력, 원료표준화, 안전성 비교평가 및 대량생산법 확립
		나노 가용화 기술개발	100	- 물에 난용성인 선발 소재의 음료화를 위한 유화제의 선발 및 나노 유화액 개발
	<b>제1협동과제:</b> 농산부산물 유래 식물 세라마이드 등 생리활성지질 의 피부 건강 개 선 효능 검정	생리활성 지질의 주름 개선 효능 검정 (in vivo)	100	- 피부 두께 및 주름 측정, 육안 관찰 - collagen 생성량 및 MMP-1 활 성 조사 - 조직병리학적 관찰 - collagen 관련 유전자 발현에 미 치는 영향 조사
		생리활성 지질의 보습 효능 검정 (in vivo)	100	- ceramide 함량 - ceramide 관련 유전자발현에 미 치는 영향 - 피부의 경피 수분 손실량 (TEWL) - 조직병리학적 관찰
	<b>제2협동과제:</b> 생리 활성지질의 항염증 및 염증성 피부질환 치료 효능 분석 및 작용기전 연구	다양한 염증 관련 세포주들의 <i>in vitro</i> system을 이용한 기능성 생 리활성지질의 항염증 효과 분석	100	• 류마티스 환자 유래 fibroblast-like synoviocyte에서 glucosylceramide (GluCer)의 항염증 효능 분석 - IL-1 $\beta$ 로 inflammation을 유도 후, 염증성 cytokine의 발현 정 도를 RT-PCR 및 ELISA assay를 통해 검증
		다양한 염증 질환 관련 <i>in vivo</i> 동 물 모델을 이용한 기능성 생리활 성지질의 항염증 효과 분석	100	• 관절염 동물 모델에서 GluCer 및 PS의 항염증 효능 분석 - Carrageenan으로 유도된 흰쥐 의 급성관절염 동물 모델 이용 - 염증성 cytokine의 발현 정도 를 면역조직화학법을 통해 검 증 • 아토피성 피부염 동물 모델에서 GluCer 및 PS의 효능 분석 - TMA로 유도된 아토피성 피 부염 동물 모델 이용 - 피부조직에서 다양한 염증 지 표의 발현 정도를 (면역)조직 학, RT-PCR assay를 통해 검 증 - ELISA assay를 통한 IgE와 같 은 혈액지표물질의 발현 정도 를 검증 • 습진 피부염 동물 모델에서

				<p>GluCer의 효능 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Oxalozone으로 유도된 피부습진 동물모델 구축</li> <li>- 발굴된 생리활성지질의 효능에 대한 행동학적 분석 (피부손상, aquaporin-3 발현, 염증정도)</li> </ul>
3 차 년도 (2010)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
	제1 세부과제: 임상시험-전문병원 피부건강 기능 개선 효과 임상 연구	선발 생리활성지질의 인체 적용 시험	100	대두 유래 식물 세라마이드 및 대두 검질 유래 레시틴을 활용한 포스파티딜세린의 피부 보습 효능 및 주름 개선 효능 인체 적용 test
	제1 세부과제: 임상시험-선발 생리 활성 물질의 대량 생산	선발 생리활성지질의 대량생산 및 건강 기능식품 제형 테스트	100	대두 유래 식물 세라마이드 및 대두 검질 유래 레시틴을 활용한 포스파티딜세린의 생산 및 연직 캡셀 제조 및 임상 시험에 이용

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

#### (1) 연구성과 목표 및 성과

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타 (학술발표)
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표								2	
	달성									2
2차년도	목표	1						4		
	달성							1		3
3차년도	목표		1							
	달성								2	2
4차년도	목표									
	달성									
5차년도	목표									
	달성									
계	목표	1	1					4	2	
	달성							1	2	7

#### (2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
목표	2	2				
달성						

#### <국내외 전문 학술지 논문 게재>

1. Sang-Hoon Lee, Ji-Hee Yang, Yong-Kon Park, Jeong-Jun Han, Guk-Hoon Chung, Dae-Hyun Hahm, Hee-Don Choi. Protective effect and mechanism of phosphatidylserine in UVB-induced human dermal fibroblasts. European Journal of Lipid Science and Technology (심사중)

2. Ji-Hee Yang, Sang-Hoon Lee, Yun-Sook Kim, Jeong-Jun Han, Guk-Hoon Chung, Dae-Hyun Hahm, Hee-Don Choi. Effect of phosphatidylserine on the UV-induced wrinkle formation in the hairless mice. Journal of Medicinal Food (심사중)

3. Sang-Hoon Lee, In-Wook Choi, Ho-Young Park, Jeong-Jun Han, Guk-Hoon Chung, Dae-Hyun Hahm, Hee-Don Choi. Anti-inflammatory effect of phosphatidylserine on LPS-induced RAW264.7. *Lipids* (투고준비중)
4. Inhibitory Effect of Phosphatidylserine on Atopy-like Dermatitis in NC/Nga Mice  
Bong-Jun Sur, Bombi Lee, Mijung Yeom, Jeong-Jun Han, Hee-Don Choi, Hyejung Lee, Seok Joong Kim, Suk Hoo Yoon, and Dae-Hyun Hahm, *Food Sci. Biotechnol.* 19(6): 1513-1518 (2010)
5. Mijung Yeom, Hyun-Jung Park, Hyun-Soo Shim, Insop Shim, Jeong-Jun Han, Song Her, Dae-Hyun Hahm. *In vitro* anti-inflammatory activity of squid-derived phosphatidylserine in Raw 264.7 cells. *Korean Journal of Stress Research* (2011) 19(1), 89-95
6. Mijung Yeom, Sung-Hun Kim, Bombi Lee, Jeong-Jun Han, Guk Hoon Chung, Hee-Don Choi, Hyejung Lee, Dae-Hyun Hahm. Oral administration of glucosylceramide ameliorates inflammatory dry-skin condition in chronic oxazolone-induced irritant contact dermatitis in the mouse ear. *Journal of Dermatological Science* (in press),
7. Mijung Yeom, Dae-Hyun Hahm, Bong-Jun Sur, Bombi Lee, Jeong-Jun Han, Hye-Jung Lee, Hyung-In Yang, and Kyoung-Soo Kim. Phosphatidylserine inhibits inflammatory responses in IL-1beta-stimulated fibroblast-like synoviocytes and alleviates carrageenan-induced arthritis in rat. *Nutrition Research* (심사중)
8. Glucosylceramide down-regulates the LPS-induced cytokine production in RAW264.7 cells, *Cellular Immunology* (준비중)

#### <학술발표>

1. Investigation of Anti-wrinkle Effect of a Glucosyl-ceramide Derived from Soybean in Hairless Mice  
Jeong-Jun Han , JiheeYang, Il-Choi1, Gukhoon Chung ,Dae-Hyun Hahm, Seokyun Jung ,Inwook Choi, Yongkon Park, Yoon sook Kim, HeedonChoi
2. Investigation of Anti-wrinkle Effect of a Phosphatidylserine Derived from Soy Lecithin in Hairless Mice  
Jeong-Jun Han , JiheeYang, Il-Choi1, Gukhoon Chung ,Dae-Hyun Hahm, Seokyun Jung ,Inwook Choi, Yongkon Park, Yoon sook Kim, HeedonChoi

3. 양지희, 정석윤, 한정준, 함대현, 최인욱, 김윤숙, 최희돈. 피부 미백개선에 미치는 당 세라마이드의 효능 및 작용기전. 2009년 한국식품영양과학회 국제 심포지엄 및 학술대회 2009. 11. 4-11. 6 창원컨벤션센터
4. 양지희, 정석윤, 한정준, 함대현, 박용곤, 박호영. 자외선에 의해 피부가 손상된 Hairless mouse에서의 당 세라마이드 경구 반복투여시 피부 주름 생성 예방 효과. 2009년 한국식품영양과학회 국제 심포지엄 및 학술대회 2009. 11. 4-11. 6 창원컨벤션센터
5. Bong-Jun Sur, Bombi Lee, Mijung Yeom, Sunoh Kwon, Hyejung Lee, Dae-Hyun Hahm. Inhibition effect of phosphatidylserine on atopic dermatitis-like skin lesions in TMA-induced mouse model. 2010 한국분자세포생물학회 동계학술대회(KSMCB) Jan 26-28, 2011
6. Mijung Yeom, Jinhee Park, Jeong-Jun Han, Hyejung Lee, Dae-Hyun Hahm. Glucosylceramide Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Cyclooxygenase-2 Expression by Negatively Regulating Nuclear Factor-kappa B in RAW 264.7 Macrophages Cells. Lorne Infection & Immunity Conference 2012. Feb 5-7
7. Mijung Yeom, Sung-Hun Kim, Jinhee Park, Bongjun Sur, Jeong-Jun Han, Hyejung Lee, Dae-Hyun Hahm. Oral administration of glucosylceramide inhibits inflammatory dry skin condition in oxazolone-induced chronic contact dermatitis in mouse. 2012 생화학분자생물학회 동계학술대회(KSBMB) Mar 1-3

#### <실용화, 산업화 계획>

피부 건강 기능 개선 효능을 가진 생리활성지질을 선별하고 이의 대량생산 체제를 구축하여 피부기능개선 및 염증성 피부질환 치료 효능의 미용식품 소재 개발하고자 하였다. 피부 생리활성 지질 후보군으로서 식물 세라마이드외에 대두유 부산물인 대두 검질로부터 정제하여 얻은 인지질을 효소반응을 통해 제조한 포스파티딜세린을 생리활성 후보군으로 결정하였으며 이에 대한 효능 검증을 위해 세포실험, 동물 실험 그리고 임상 시험을 수행하였다.

그 결과 글루코실세라마이드 및 PS는 in vitro 및 in vivo에서 항염증 효과를 나타내었으며, 이는 관절염, 아토피, 접촉성 피부염과 같은 염증성 질환을 완화 시키는 효능을 나타냄을 확인 할 수 있었다. 동물 실험을 통해 경구섭취 시 피부의 민감도 및 피부 장벽 손상에서 효과적으로 예방 및 회복력을 갖게 하며 피부 보습능 증진 및 주름 개선 효능을 나타냄을 확인 할 수 있었다. 피부 보습능 및 주름 개선 효능에 대해 국내 전문 임상 기관에서 임상 시험을 수행하였다.

그 결과 대두 유래 식물 세라마이드 및 포스파티딜세린은 모두 섭취전에 비하여 섭취 12주 후 피부보습개선효과가 대조군에 비해 시험군이 통계적으로 유의한 수준 ( $p < 0.05$ )으로 개선시키는 것으로 나타났다. 피부 주름 개선 효능에 있어서는 안전성 평가 결과, 이상반응을 경험한 피험자의 보고는 없었고, 포스파티딜세린과 식물세라마이드 눈가 주름 및 피부 보습 개선에 효과가 있는 소재라고 판단할 수 있었다.

피부 관련 건강 기능 식품 소재로서 타겟 효능에 있어서는 항염증, 아토피 개선 등의 효능 효과는 국내 건강 기능식품 법규상 취득하기 불가능한 효능이므로 보습과 주름 개선이 건강 기능 식품 소재로서 적합한 효능 claim으로 판단이 된다.

상기 두가지 소재에 있어서 임상에 이용했던 유효 dosage로 비교해 본 경제성 평가로 볼 때 식물 세라마이드의 가격은 10%로 400만원/kg 수준이며 PS의 경우 20%함량의 제품은 30만원/kg 수준이 된다. 임상 시 사용한 dosage는 대두 유래 당 세라마이드의 경우 하루 30mg 섭취, PS의 경우 하루 300mg 섭취가 기준이었다. 따라서 유효 dosage로 볼 때 단순히 원료비만으로 비교해보면 대두 유래 당세라마이드의 가격은 대두 포스파티딜세린에 비해 3배에 달하게 된다. 보습 및 주름 개선 효능에 있어서 비슷한 효능을 나타내고 있는 바 대두 포스파티딜세린의 피부 효능 claim을 식약청으로부터 인정 받고 사업화하는 것이 더 타당해 보인다. 특히 대두 포스파티딜세린은 이미 “노화로 인한 인지 능력 저하 개선”으로 식약청에서 뇌기능으로 인정 받은 소재이고 두산은 이미 포스파티딜세린의 대량 생산 체제를 갖추고 있고 있는 바 식약청에서 기능성을 추가로 얻을 경우 피부 관련 시장에도 진입하기 용이할 것으로 판단된다. 따라서 임상 관련 자료를 취합하여 식약청에 제출하여 피부 보습 및 주름 개선 건강 기능식품 소재로 인증 받는 절차를 밟을 예정이다.

특히, 대두 포스파티딜세린은 뇌기능 관련 기능성이 이미 식약청으로부터 인정받은 바 피부 관련 효능으로 기능성을 추가하여 뇌기능과 피부 관련 효능을 동시에 주장하도록 하여 우선적으로 사업화 하려 하며 건강 기능 식품 소재화와는 별도로 해외에는 피부 관련 효능 자료를 토대로 하여 소재의 프로모션을 적극적으로 수행 할 예정이다.

음료 적용을 위한 소재 제품으로서 개발된 식물세라마이드 및 포스파티딜세린 유화액은 우유, 요구르트 등에 적용이 가능하므로 적극적으로 프로모션 중이며, 이상의 소재 제품들을 해외 전시회 및 해외 대리점 망을 통해 제품 사업화에 결실이 맺어지도록 박차를 가할 것이다.





