

프랑킨센스 오일의 피부노화 억제 효과(II) - 조직학적 관찰을 중심으로 -

최외숙, 권미화, 공민규, 이순희, 강성례¹, 김필순², 김영철*

계명대학교 공중보건학과, ¹김천대학 피부비만테라피과,
²경일대학교 뷰티코디네이션학과

Inhibition Effects of Frankincense Oil on Skin Aging (II): Focussed on Histological Observation

Oi-Sook Choi, Mi-Hwa Kwon, Min-Kyu Kong, Soon-Hee Lee,
Sung-Rye Gang¹, Pil-Sun Kim² and Young-Chul Kim*

Department of Public Health, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

¹*Department of Skin Care & Obese Therapy, Kimcheon College,
Gyeongbuk 740-704, Korea*

²*Department of Beauty Coordination, Kyung-il University,
Gyeongbuk 712-701, Korea*

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effects of frankincense oil in skin aging animal model. Skin aging was induced by both the irradiation of UVB and the application of squalene monohydroperoxide (Sq-OOH) to the back of experimental animals for 4 weeks. And at the same time experimental materials were applied topically. Six to seven weeks female SHR-1 hairless mice were divided into five groups including normal (N: saline), control (C: UVB+Sq-OOH+saline), vehicle control (VC: UVB+Sq-OOH+jojoba oil), positive control (PC: UVB+Sq-OOH+0.01% retinoic acid) and experimental (E: UVB+Sq-OOH+3% Frankincense oil) groups, five animals each group. Lipid lamella and lipid content in stratum corneum of the E group were almost intact with a regular arrangement which were similar to the N group. Collagen fibers in dermis of the E group were almost intact with a regular arrangement which were similar to the N group. Relatively much less number of mast cells and inflammatory cells were found in the E group compared to the C group. The activities of XO, SOD and CAT were no significant difference between the E and N groups. In conclusion, the application of frankincense oil to the skin aging animal model reduced both the generation of free radicals and the damage of skin tissues. Therefore, frankincense oil can be used practically for the prevention or improvement of skin aging in terms of health promotion and beauty for the people.

Key words : frankincense oil, hairless mice, skin aging, antioxidant activity

※ To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-53-580-5931, Fax: +82-53-588-5233
E-mail: yckim@kmu.ac.kr

서 론

피부노화는 연령의 증가에 따라 발생하는 생리적인 내인성 노화(intrinsic aging)와 태양광선, 누적된 외부 스트레스에 의한 외인성 노화(extrinsic aging)로 구분할 수 있다. 그 중에서 태양광선은 노화의 원인으로 잘 알려져 있으며, 태양광선 중의 자외선 노출에 의한 피부노화를 광노화(photoaging)라 한다(Bhawan *et al.*, 1992).

적당량의 자외선 조사는 활성형 Vitamin D의 생합성으로 구루병을 예방하지만 과량의 자외선은 색소침착, 깊은 주름을 형성시킨다(Kligman and Kligman, 1986). 특히 UVB량에 비례하여 표피각질 세포의 직접 손상이 유발되어 면역 및 염증 조절에 관여하는 세포활성물질(cytokine)의 분비장애가 발생한다(Bissett *et al.*, 1987). UVB는 조직 내 활성산소를 형성하고, 피부에 정상적으로 존재하고 있는 항산화 물질을 감소시켜(Darr and Fridovich, 1994) 효소적, 비효소적 항산화 방어 기구의 불균형을 가져와 산화적 스트레스를 유발시킨다. 이로 인해 세포구성성분들에 대한 손상을 야기하며, DNA에도 직접적인 손상을 유발하여 만성피부질환과 피부노화 현상에 관여한다(Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005). 광노화 과정에서 생성된 활성산소종은 멜라닌 생성을 촉진하고 주름을 생성시키는 것으로 알려져 있으며, 각질층의 수분을 감소시켜 DNA 손상을 주며(Pathak, 1972), 체내의 단백질, 세포막, 지방, 핵산 등을 산화시켜 피부세포사멸 및 악성종양을 발생시키기도 한다(Gilchrest and Yaar, 1992). 특히 진피에서는 자외선에 의해 기질금속 단백질분해효소(matrix metalloproteinase, MMPs) 활성이 증가하고, 교원질(collagen)과 탄력섬유(elastin)의 합성이 감소하여 주름의 원인이 되는 것으로 보고되고 있다(No *et al.*, 2004).

최근 천연물질에 대한 관심이 증가하면서 아로마 오일은 식품, 화장품, 약용 또는 아로마테라피 요법에 광범위하게 이용되고 있으며 자외선, 스트레스, 생활습관과 같은 다양한 요인에 의한 피부노화를 지연시키기 위해 화장품 원료나 미용 마사지 제품으로 사용되고 있다. 아로마 식물에서 성분을 추출해 농축한 천연정유(natural essential oil)는 항산화 작용이 매우 큰 것으로 알려져 있으며(Cuvelier *et al.*, 1998) 노화방지, 자극완화, 주름개선, 미백 등의 용도로 연구되고 있다(김주덕과 엄정녀, 2004).

아로마 오일 중 프랑킨센스 오일은 세포재생 촉진작용으로 손상된 피부를 회복하고 건성과 거친 피부, 흉터, 상처, 주름에 효과적이며 노화를 지연시키는 것으로 알려져 있다(Lawless, 1999). 그러나 현재까지 프랑킨센스 오일의 효능을 실험적으로 입증한 연구보고는 확인되지 않고 있다. 이에 본 연구는 hairless 마우스에 반복적으로 UVB 조사와 squalene monohydroperoxide (Sq-OOH)를 도포하여 피부노화를 유발시키고, 이와 병행하여 프랑킨센스 오일을 도포하여 피부의 조직학적 관찰을 통하여 피부노화 억제효과를 확인하고 아울러 피부조직 내 유해산소 대사효소들의 활성을 알아보았다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

Hydrogen peroxide는 Junsei 사(Japan)의 제품을, hematoxylin, retinoic acid, polyethylene glycol은 Sigma 사(USA)의 제품을 사용하였으며 그 외 일반시약들은 특급품을 사용하였다. 프랑킨센스 오일(francincense oil)은 유기농 인증기관으로부터 인정받은(ECOCERT-F-22043) 100% 순도 천연 정유인 Sanoflore 사(France) 제품을, 호호바 오일(jojoba oil)은 Desert Whale 사(USA) 제품을 사용하였다.

실험기기 중 자외선 조사장치는 UVB sunlamp (UVM-225D, Mineralight Lamp UVP, USA)를, 자외선 측정장치는 UV-radiometer (HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하였고 조직표본관찰은 Inverted microscope (Axiovert 200, Carl Zeiss, Germany)와 Fluorescence microscope (Axio imager, Carl Zeiss, Germany)를 사용하였고 혈구 분석은 자동혈구분석기(Hemavet 850+, CDC Technologies Inc., USA)를 사용하였다.

2. 실험동물 및 처치

실험동물은 6~7주령의 SHR-1 hairless mouse (Charles-River, Japan)를 분양받아 1주일간 사육실에서 적응시킨 후 실험 전 기간 동안 사료와 물은

자유로이 공급하였다. 사육실은 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 5\%$, 조명주기 12시간씩 밤낮을 유지하였다. 실험군은 5군으로 나누었으며 각 군당 5마리씩 총 25마리를 실험에 사용하였다. 실험동물은 실험 4주째 되는 날 4시간 전부터 절식시킨 다음 에테르로 마취한 후 개복하여 피부를 적출한 후 일부는 10% 중성 포르말린 용액에 고정하여 조직학적 검사에 사용하였고 나머지는 냉동시켜 효소측정에 사용하였다.

<실험군의 분류>

정상군(normal group, N): 아무런 처치를 하지 않은 군

대조군(control group, C): 자외선 조사+Sq-OOH 도포+생리식염수 도포군

용매대조군(vehicle control group, VC): 자외선 조사+Sq-OOH 도포+호호바 오일 도포군

양성대조군(positive control group, PC): 자외선 조사+Sq-OOH 도포+0.01% Retinoic acid 도포군

실험군(experimental group, E): 자외선 조사+Sq-OOH 도포+3% 프랑킨센스 오일도포군

3. 피부노화 유발 및 시료도포

자외선 조사장치의 광원은 302 nm의 UVB를 방출하는 sunlamp를 사용하였다. 자외선 조사량은 UV-radiometer로 측정하였으며, 마우스를 자외선 조사용 cage에 가둔 후 등 부위에 균등하게 120 mJ/cm^2 의 광량으로 격일 간격으로 1주일에 3회, 4주 동안 조사하였다. 피부거침과 주름형성을 촉진하기 위하여 Sq-OOH를 1일 2회, 주 6일, 4주 동안 매회 $100 \mu\text{L}$ 씩 도포하였다. 호호바 오일에 3%로 희석한 프랑킨센스 오일과 용매(호호바 오일), 생리식염수는 1일 2회, 주 6일, 4주 동안 매회 $100 \mu\text{L}$ 씩 도포하였다. Retinoic acid는 polyethylene glycol에 0.01%로 희석하여 1일 2회, 주 6일, 4주 동안 매회 $100 \mu\text{L}$ 씩 도포하였다.

4. 피부의 조직학적 관찰

1) H & E 염색 관찰

절취한 피부조직을 실온에서 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정한 후 통상적인 방법으로 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거친 다음 paraffin에 포매

하고 $4 \mu\text{m}$ 두께로 절편을 만들어 hematoxylin and eosin (H & E)으로 염색 후 광학현미경과 형광현미경으로 피부조직의 변화양상을 관찰하였다.

2) Oil Red O 염색 관찰

절취한 피부조직을 실온에서 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정한 후 10% formal-calcium에 1주일 동안 산화 처리한 다음 30% sucrose 용액에 cryo-protection한 후 냉동 절편기로 $10 \mu\text{m}$ 두께의 냉동절편을 제작하여 Oil Red O 염색 후 표피 각질층 내 지방과 lipid lamella 분포양상을 광학현미경과 형광현미경으로 관찰하였다.

3) Masson's Trichrome 염색 관찰

절취한 피부조직을 실온에서 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정한 후 통상적인 방법으로 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거친 다음 paraffin으로 포매하고 $4 \mu\text{m}$ 두께로 절편을 만들어 실온에서 bouin 용액에 하룻밤 담구고 Masson's Trichrome 염색 후 진피 내 collagen fiber의 양과 형태를 광학현미경과 형광현미경으로 관찰하였다.

4) Toluidine Blue 염색 관찰

절취한 피부조직을 실온에서 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정한 후 통상적인 방법으로 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거친 다음 paraffin으로 포매하고 $4 \mu\text{m}$ 두께로 절편을 만들어 Toluidine Blue 염색 후 진피 및 피하층 내 mast cell의 분포양상 및 탈과립 정도를 광학현미경과 형광현미경으로 관찰하였다.

5. 혈액학적 검사

채취한 혈액을 혈액응고 방지제인 $\text{K}_2\text{-EDTA}$ 가 포함된 채혈 tube에 담아 coulter mixer기 위에서 5분 이상 혼합한 뒤 동물 전용 혈액학적 분석기를 이용하여 백혈구수, 호중구수, 호산구수, 호염구수, 림프구수, 단핵구수를 측정하였다.

6. 피부조직의 유해산소 대사효소 활성도 측정

1) 효소시료의 조제

피부조직 중 일정량을 칭량한 후 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 넣고 glass teflon homogenizer를 이용하여 20% (w/v) 마쇄균질액을 만들었다. 이 균질액을 $600 \times \text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미

마쇄부분을 제거한 상층액을 10,000×g에서 20분간 원심분리한 후 그 상층액을 효소활성도 측정에 사용하였다.

2) 피부조직의 단백질 함량 측정

피부조직 중 단백질 함량은 Lowry *et al.* (1951)의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준품으로 사용하여 측정하였다.

3) Xanthine oxidase (XO)

피부조직 중 XO의 활성도는 xanthine을 기질로 사용하여 30°C에서 20분간 반응시켜 생성된 요산을 292 nm에서 흡광도를 측정하는 Stripe, Della (1969)의 방법에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 효소액 중에 함유된 단백질 1mg이 1분간 반응하여 기질인 xanthine으로부터 생성된 uric acid의 양을 nmole로 표시하였다.

4) Superoxide dismutase (SOD)

피부조직 중 SOD의 활성도는 hematoxylin 자동산화의 억제 정도를 관찰하는 Martin *et al.* (1987)의 방법에 따라 0.1 mM EDTA가 함유된 50 mM 인산완충액 (pH 7.5)에 10 μM hematoxylin 및 효소액을 가해 25°C에서 반응시켜 생성된 hematein을 560 nm에서 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 활성도 단위는 효소액을 넣지 않은 반응액 중의 hematoxylin 자동산화를 50% 억제하는 정도를 1 unit로 단백질 1mg이 1분 동안 반응한 unit로 표시하였다.

5) Catalase (CAT)

피부조직 중 CAT 활성도는 hydrogen peroxide를 기질로 하여 환원되는 정도를 파장 240 nm에서 그 흡광도를 읽고 분자흡광계수 ($E=0.04 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 이용하여 활성을 산출하는 Aebi (1974)의 방법에 준하였다. 활성도 단위는 피부조직 중에 함유된 단백질 1mg이 1분 동안 반응하여 감소되는 hydrogen peroxide 양을 nmole로 표시하였다.

7. 자료 분석

통계적 분석은 SPSS WIN (v12.0)를 이용하여 정상군, 대조군, 용매대조군, 양성대조군, 프랑킨센스 오일 도포군 간의 차이를 비교하기 위하여 Student's *t*-test로 분석하였고, 통계적 유의수준은 0.05로 하

였다.

결과 및 고찰

1. 피부의 조직학적 관찰

1) H & E 염색 관찰

자외선에 노출되면 피부의 초기반응으로 염증이 생기는데, 생체 내 면역 방어계 역할을 하는 호중구가 염증부위에 제일 먼저 이주하고 염증성 세포의 침윤이 일어난다(Burns *et al.*, 2004). 또한 자외선에 만성적으로 노출되면 표피의 과립층과 각질층을 증가시켜 표피층의 비후와 함께 진피 내 변성된 탄력섬유의 증가로 인한 탄력섬유증(elastosis)이 발생한다(Kligman, 1996). Chiba *et al.* (2003)은 Sq-OOH를 반복적으로 도포한 hairless 마우스에서 과각화증, 표피비후와 함께 피지선의 증식이 관찰됨을 보고하였다. 피부조직 형태 및 염증관련 세포를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 정상군은 표피와 진피층 배열이 규칙적이며 염증관련 세포들이 거의 보이지 않은 반면, 대조군은 진피 내 림프구, 대식구 및 호중구가 상당수 관찰되었고, 표피층과 진피층의 비후와 피지선의 증식이 관찰되었다. 이에 비해 양성대조군과 프랑킨센스 오일 도포군은 림프구, 대식구 및 호중구와 같은 염증관련 세포들이 대조군에 비해 많이 줄어들어 있음을 확인하였다.

2) Oil Red O 염색 관찰

피부 각질층은 각질세포와 lamella body에서 분비한 지질로 형성된 lipid lamella로 구성되어 있으며 전해질과 수분손실을 억제하고 외부의 물리적 손상과 자극성 물질로부터 생체를 보호하는 피부장벽의 중요한 기능을 담당한다(Gopinathan, 2002). 과량의 UVB 피부노출과 Sq-OOH 도포는 superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$)과 singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)과 같은 활성산소종을 생성하여 진피결합조직의 손상과 함께 피부장벽을 붕괴시켜 유분 및 수분 감소와 함께 피부노화를 초래한다(Chiba *et al.*, 2003). 표피 각질층 내 lipid lamella의 형태 및 지방량을 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 정상군은 lipid lamella가 규칙적이며 지방량이 많은 반면, 대조군은 lipid lamella가 많이 부서져 형태가 불규칙적이고 지방량이 적었다. 양성대조군과 프랑킨센스 오일

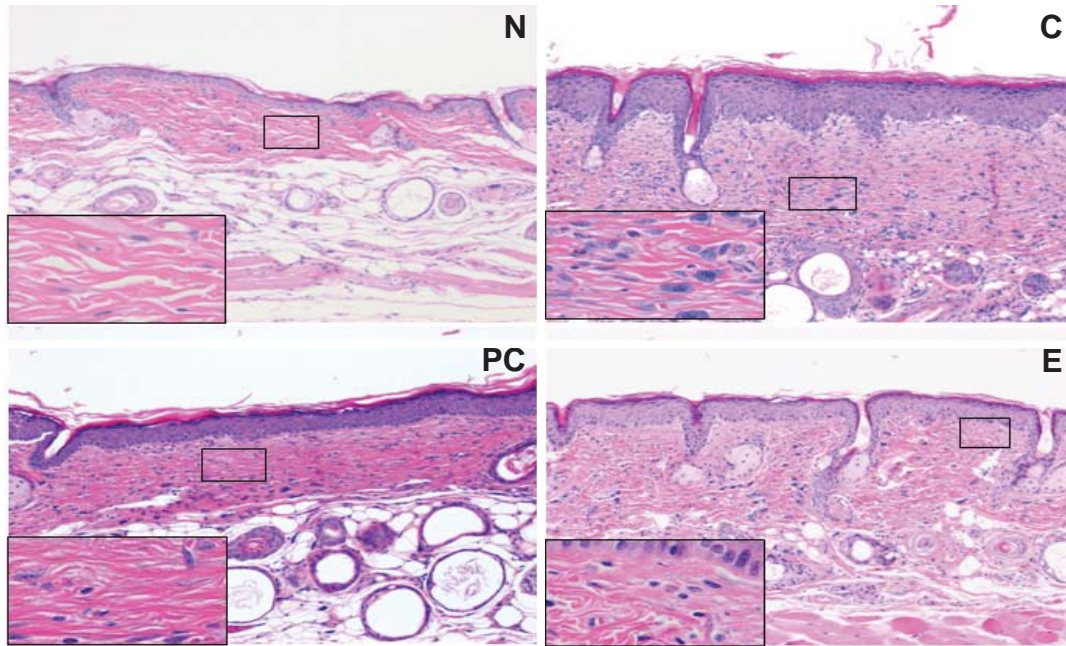


Fig. 1. Histological observation on SHR-1 hairless mice skin after 4 weeks-skin aging inhibition effect experiment. H & E stain, $\times 100$ & 400 . N: No treatment group; C: UVB irradiation+Squalene-OOH+Saline application group; PC: UVB irradiation+Squalene-OOH+0.01% Retinoic acid application group; E: UVB irradiation+Squalene-OOH+3% Frankincense oil application group.

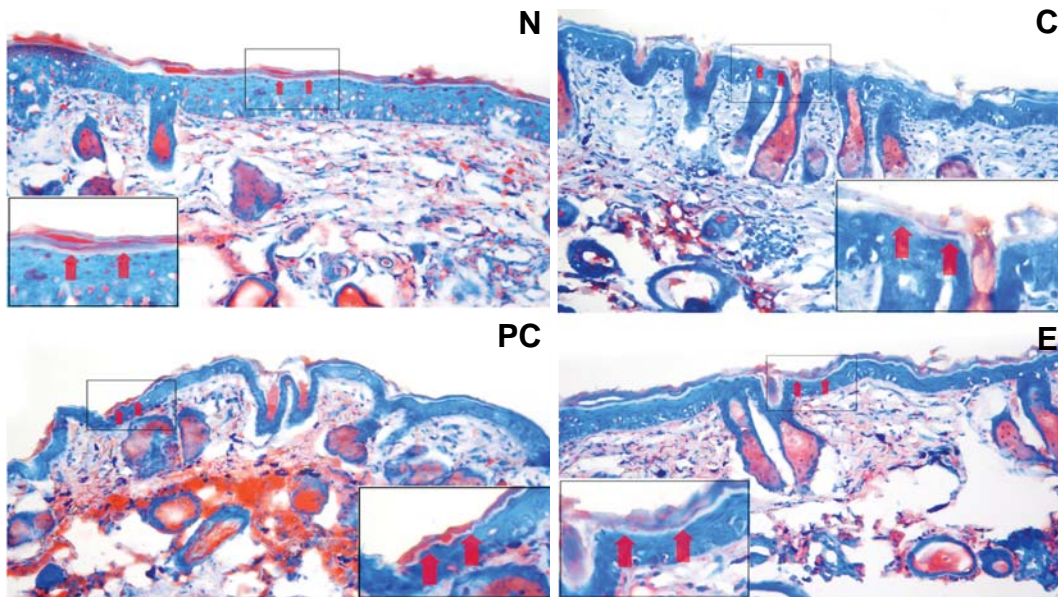


Fig. 2. Histological observation on SHR-1 hairless mice skin after 4 weeks-skin aging inhibition effect experiment. Oil Red O stain, $\times 200$ & 400 . N: No treatment group; C: UVB irradiation+Squalene-OOH+Saline application group; PC: UVB irradiation+Squalene-OOH+0.01% Retinoic acid application group; E: UVB irradiation+Squalene-OOH+3% Frankincense oil application group.

Table 1. Hematological values of SHR-1 hairless mice after 4 weeks-skin aging inhibition effect experiment

Group	Normal		Control			Experimental
	N	C	VC	PC	E	
WBC (k/ μ L)	1.305 \pm 0.72	3.130 \pm 0.77 ^{a)}	2.915 \pm 1.45	2.060 \pm 0.67	2.150 \pm 0.83	
Neutrophil (k/ μ L)	0.273 \pm 0.15	1.243 \pm 0.24 ^{**a)}	1.165 \pm 0.49 ^{a)}	0.443 \pm 0.24 ^{**b)}	0.730 \pm 0.54	
Lymphocyte (k/ μ L)	0.895 \pm 0.53	1.673 \pm 0.63	1.463 \pm 0.81	1.393 \pm 0.42	1.305 \pm 0.34	
Monocyte (k/ μ L)	0.103 \pm 0.05	0.098 \pm 0.05	0.183 \pm 0.18	0.183 \pm 0.05	0.105 \pm 0.03	
Eosinophil (k/ μ L)	0.025 \pm 0.02	0.103 \pm 0.04 ^{a)}	0.083 \pm 0.05	0.033 \pm 0.02 ^{**b)}	0.010 \pm 0.01 ^{**b)c)}	
Basophil (k/ μ L)	0.008 \pm 0.01	0.020 \pm 0.00 ^{a)}	0.028 \pm 0.02	0.010 \pm 0.01	0.003 \pm 0.01 ^{**b)}	

Values are mean \pm SD of 5 mice.

N: No treatment group.

C: UVB irradiation+Squalene-OOH+Saline application group.

PC: UVB irradiation+Squalene-OOH+0.01% Retinoic acid application group.

E: UVB irradiation+Squalene-OOH+3% Frankincense oil application group.

^{a)}Significantly different from the normal group by t-test (*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$).

^{b)}Significantly different from the control group by t-test (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$).

^{c)}Significantly different from the vehicle control group by t-test (*: $p < 0.05$).

도포군은 대조군에 비해 lipid lamella가 비교적 규칙적이고 지방량도 많음을 확인하였다.

3) Masson's Trichrome 염색 관찰

UV 광선은 피부연결조직을 손상시키고 keratinocyte와 fibroblast 세포표면의 성장인자(growth factor)와 cytokine receptor를 활성화시켜 AP-1을 생성하고, AP-1은 세포기질의 matrix metalloproteinase (MMP) 유전자의 발현을 촉진한다(Fisher *et al.*, 2002). MMP는 진피층의 콜라겐과 세포외 기질(extracellular matrix)을 구성하는 단백질을 파괴하여 진피층의 불완전한 복구가 발생할 경우 세포 진피층은 구조적·기능적으로 취약해지며 반복된 자외선 노출에 의해 진피층의 손상은 결국 광노화 피부의 특징인 주름을 생성시킨다(Van der Geer *et al.*, 1994). Sq-OOH를 도포하여 노화를 유발한 피부조직에서도 collagen 함량이 감소되며 과각화증(hyperkeratosis) 및 표피의 과립층이 증가하였다는 연구보고가 있다(Lee *et al.*, 2005). 진피 내 collagen의 양과 형태를 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. 정상군은 collagen fiber의 밀도가 조밀하고 배열이 규칙적인 반면, 대조군은 collagen fiber가 파괴되어 밀도가 영성하고 배열이 불규칙적이고 양도 많이 줄어있었다. 양성대조군과 프랑킨센스 오일 도포군은 대조군에 비해 collagen fiber의 밀도가 조밀하고 배열이 규칙적으로 나타났다.

4) Toluidine Blue 염색 관찰

자외선에 노출되면 피부의 초기반응으로 염증이

생기는데 이로 인해 진피층과 피하층 내 mast cell이 증가하고 염증이 심한 경우 mast cell의 탈과립과 함께 히스타민이 방출되어 소양증을 동반한다(Soter, 1990; Chiba *et al.*, 2003). 진피 및 피하층 내 mast cell의 분포양상과 탈과립 정도를 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 정상군은 mast cell이 적게 관찰되었고 탈과립이 거의 없는 반면, 대조군은 mast cell이 현저히 많이 관찰되었고 탈과립 정도가 심하게 나타났다. 양성대조군과 프랑킨센스 오일 도포군은 대조군에 비해 mast cell 수가 적게 관찰되었고 탈과립 정도도 경미하게 나타났다.

2. 혈액학적 변동

혈액학적 변동을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 정상군에 비해 대조군에서 염증성 관련 세포인 백혈구($p < 0.05$), 호중구($p < 0.001$), 호산구($p < 0.05$), 호염구($p < 0.05$)가 유의하게 높았고 용매대조군에서 호중구($p < 0.05$)가 유의하게 높았다. 대조군에 비해 양성대조군과 프랑킨센스 오일 도포군은 백혈구 수치가 전반적으로 낮았으며, 백혈구 중에서 양성대조군은 호중구($p < 0.01$)와 호산구($p < 0.05$)가 유의하게 낮았고, 프랑킨센스 오일 도포군은 호산구($p < 0.01$)와 호염구($p < 0.001$)는 유의하게 낮았다. 이와 같은 결과는 피부의 조직학적 소견과 일치하는 결과로써 retinoic acid와 프랑킨센스 오일이 자외선으로 발생한 피부조직의 염증을 경감시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

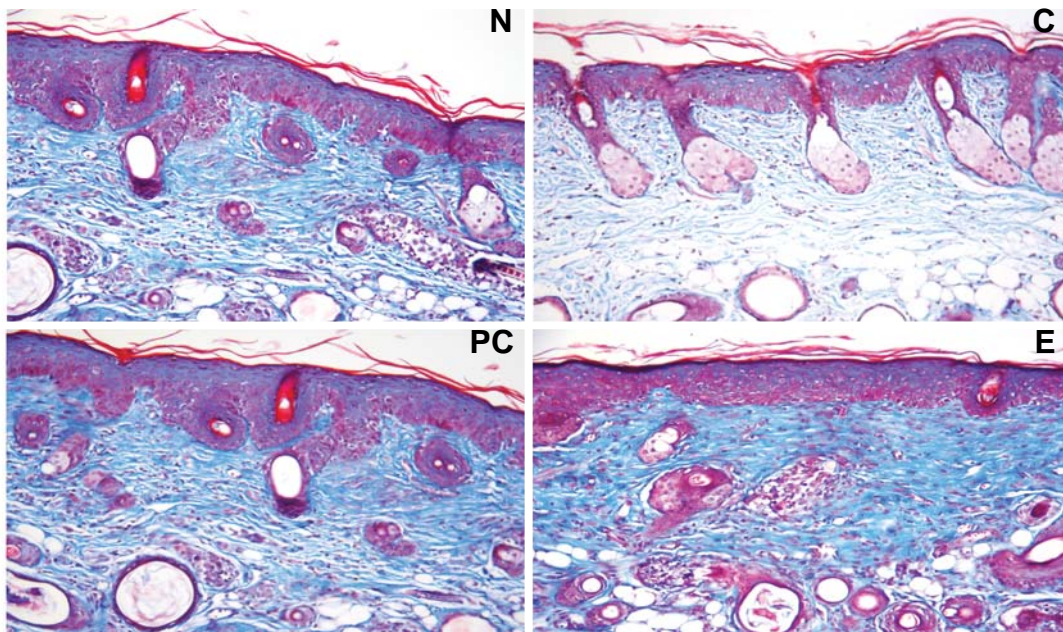


Fig. 3. Histological observation on SHR-1 hairless mice skin after 4 weeks-skin aging inhibition effect experiment. Masson's Trichrome stain, $\times 200$. N: No treatment group; C: UVB irradiation+Squalene-OOH+Saline application group; PC: UVB irradiation+Squalene-OOH+0.01% Retinoic acid application group; E: UVB irradiation+Squalene-OOH+3% Frankincense oil application group.

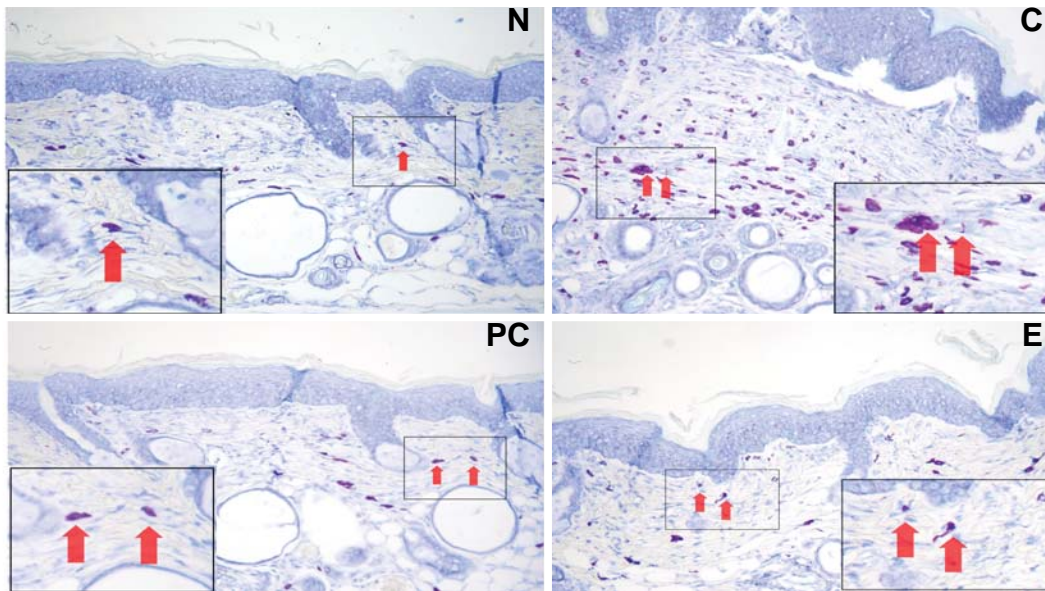


Fig. 4. Histological observation on SHR-1 hairless mice skin after 4 weeks-skin aging inhibition effect experiment. Toluidine Blue stain, $\times 200$ & 400 . N: No treatment group; C: UVB irradiation+Squalene-OOH+Saline application group; PC: UVB irradiation+Squalene-OOH+0.01% Retinoic acid application group; E: UVB irradiation+Squalene-OOH+3% Frankincense oil application group.

Table 2. Comparison in xanthine oxidase, superoxide dismutase and catalase activities of SHR-1 hairless mice skin after 4 weeks-skin aging inhibition effect experiment

Group	Normal		Control		Experimental
	N	C	VC	PC	E
XO ¹⁾	1.93±0.34	3.01±0.47 ^{**a)}	2.05±0.34 ^{**b)}	2.48±0.33 ^{*a)}	2.01±0.35 ^{**b)}
SOD ²⁾	11.60±3.32	7.79±2.23	8.80±3.53	8.84±3.68	10.00±3.57
CAT ³⁾	4.41±1.21	2.52±0.37	2.92±0.84	3.96±2.88	6.58±3.62

Values are mean±SD of 5 mice.

N: No treatment group.

C: UVB irradiation+Squalene-OOH+Saline application group.

PC: UVB irradiation+Squalene-OOH+0.01% Retinoic acid application group.

E: UVB irradiation+Squalene-OOH+3% Frankincense oil application group.

¹⁾Unit: nmole uric acid formed/mg protein/min.

²⁾Unit: U (50% inhibition of autoxidation of hematoxylin)/mg protein/min.

³⁾Unit: nmole H₂O₂ reduced/mg protein/min.

^{a)}Significantly different from the normal group by t-test (*: p<0.05, **: p<0.01).

^{b)}Significantly different from the control group by t-test (**: p<0.01).

3. 피부조직의 유해산소 대사효소 활성변동

인체의 표피층은 다른 조직보다 뛰어난 항산화능을 가지고 있어 미생물, allergen 등의 외부 침입으로부터 방어하는 역할을 하며 이러한 항산화능의 감소는 피부노화의 원인으로 제시되어져 왔다 (Kohen and Gati, 2000). UVB 조사와 Sq-OOH 도포는 활성산소를 생성하여 항산화 방어기구에 불균형을 초래하여 피부노화를 일으킨다 (Chiba *et al.*, 2003). XO는 생체조직에 존재하면서 세포상해와 관련한 유해산소 생성계 효소로 알려져 있으며 이 효소에 의해 생성된 superoxide anion radical (O₂^{-·})은 세포상해의 직접적인 원인으로 작용하는 세포의 지질과산화물을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Im *et al.*, 1985). 자외선이나 Sq-OOH 도포에 의해 생성된 O₂^{-·}을 생체방어기구의 하나인 SOD가 H₂O₂로 전환시키면 CAT는 H₂O₂를 세포에 무해한 물질인 물과 산소로 분해시킴으로써 세포의 지질과산화물을 억제하여 산화적인 손상을 예방한다 (Pence and Naylor, 1990; Hasegawa, 1992).

1) Xanthine oxidase (XO)

정상군에 비해 대조군은 56.0% (p<0.01), 양성대조군은 28.5% (p<0.05)로 유의하게 높았으나, 프랑킨센스 오일 도포군은 정상군과 유의한 차이가 없었고 대조군과 양성대조군에 비해서는 각각 33.2% (p<0.01), 19.0% 낮았다.

2) Superoxide dismutase (SOD)

대조군, 용매대조군, 양성대조군은 정상군에 비해 각각 32.8%, 24.1%, 23.8% 낮았다. 프랑킨센스 오일 도포군은 정상군에 비해 13.8% 낮았으며 대조군과 양성대조군에 비해서는 각각 28.4%, 13.1% 높았다.

3) Catalase (CAT)

대조군, 용매대조군, 양성대조군은 정상군에 비해 각각 42.9%, 33.8%, 10.2% 낮은 반면, 프랑킨센스 오일 도포군은 정상군에 비해 49.2% 높은 수치를 보였으며 유의한 차이가 없었고 대조군과 양성대조군에 비해서는 각각 161.1%, 66.2% 높았다.

이와 같이 대조군의 경우 정상군에 비해 XO 활성의 유의한 증가와 함께 SOD와 CAT 활성의 감소는 UVB 조사와 Sq-OOH 도포로 인해 유해산소의 생성을 높게 하고 이들 생성된 유해산소를 제거하기 위해 해독계 효소가 많이 사용됨으로써 항산화 방어기구의 불균형을 가져와 산화스트레스가 심함을 의미한다. 반면, 프랑킨센스 오일 도포군은 대조군에 비해 XO 활성은 유의하게 낮았고 SOD와 CAT 활성은 높게 나타나 우수한 항산화 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 조직학적 관찰에서 프랑킨센스 오일 도포군이 대조군에 비해 피부 손상을 적게 초래한 일련의 결과와 부합하는 결과이다.

결 론

본 연구에서 UVB 조사와 Sq-OOH를 도포한 대조군은 표피의 비후와 함께 각질층 내 lipid lamella가 많이 부서져 형태가 불규칙적이고 지방량이 적게 나타나 피부장벽에 심한 손상이 있음을 확인하였다. 또한 진피층의 비후와 피지선의 증식, 진피층 내 림프구, 대식구 및 호중구와 같은 염증관련 세포들의 침윤과 함께 mast cell 수의 증가와 탈과립의 증가가 관찰되었고 진피층 내 collagen fiber가 파괴되어 밀도가 영성하고 배열이 불규칙적이고 양도 많이 줄어들음을 확인하였다. 아울러 XO 활성의 유의한 증가와 함께 SOD와 CAT 활성의 상당한 감소를 확인함으로써 산화스트레스가 심함을 알 수 있었다.

이에 비해 프랑킨센스 오일 도포군은 대조군에 비해 피부 각질층 내 lipid lamella가 비교적 규칙적이고 지방량도 많음을 관찰함으로써 피부장벽 손상이 상대적으로 적음을 확인하였다. 진피층에서는 염증관련 세포들의 침윤, mast cell 수와 탈과립 정도가 대조군에 비해 상대적으로 적음을 관찰하였고 진피층 내 collagen fiber의 밀도가 비교적 조밀하고 배열이 규칙적임을 확인하였다. 아울러 대조군에 비해 XO 활성은 유의하게 낮았고 SOD와 CAT 활성은 높게 나타났으며 정상군 수준의 항산화 방어기구의 균형을 가지고 있음을 확인하였다.

이상의 피부의 조직학적 관찰과 피부조직의 유해산소 대사효소의 활성을 분석한 실험결과를 종합해 볼 때, 프랑킨센스 오일은 유해산소의 발생을 감소시키고 유해산소 해독계 효소의 활성을 증가시키는 우수한 항산화 능력을 지니므로 인해 UVB 조사와 Sq-OOH 도포로 인한 피부조직의 손상을 적게 시킴으로써 피부노화를 억제시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

김주덕, 엄정녀. 한방 화장품 구매행동에 관한 실증적 연구, *대한화장품학회지* 2004; 30(1): 93-102.
 Aebi, H. *Method of Enzymatic Analysis*, Vol. 2. New York, Academic Press, 1974.
 Bhawan J, Oh C and Lew R. Histopathologic differences in

the photoaging process in facial versus arm skin, *Am J Dermatopathol* 1992; 14: 224-230.
 Bissett DL, Hannon DP and Orr TV. An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin, *Photochem Photobiol* 1987; 46: 367-378.
 Burns T, Breathnach S, Cox N and Griffiths C. *Rook's Textbook of Dermatology*, Massachusetts, Blackwell Science, 2004.
 Chiba K, Kawakami K, Sone T and Onoue M. Characteristics of skin wrinkling and dermal changes induced by repeated application of squalene monohydroperoxide to hairless mouse skin, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2003; 16: 242-251.
 Cuvelier ME, Richahard H and Berset C. Antioxidative activity of phenolic composition of pilot plant and commercial extracts of sage and rosemary, *J Am Oil Chem Soc* 1998; 73: 645-652.
 Darr D and Fridovich I. Free radicals in cutaneous biology, *J Invest Dermatol* 1994; 102: 671-675.
 Debacq-Chainiaux F, Borlon C, Pascal T, Royer V, Eliaers F and Ninane N. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta 1 signaling pathway, *J Cell Sci* 2005; 118: 743-758.
 Fisher GJ, Kang SW, Varani J, Zsuzsanna BC, Wan Y, Datta S and Voorhees JJ. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging, *Arch Dermatol* 2002; 138: 1462-1470.
 Gilchrist BA and Yaar M. Ageing and photoageing of the skin: observations at the cellular and molecular level, *Br J Dermatol* 1992; 127: 25-30.
 Gopinathan KM. New insights into skin structure: Scratching the surface, *Adv Drug Delivery Rev* 2002; 54: S3-17.
 Hasegawa T. Changes in lipid peroxide levels and activity of reactive oxygen scavenging enzymes in skin, serum and liver following UVB irradiation in mice, *Life Sci* 1992; 50: 1893-1903.
 Im MJ, Manson PN, Bulkley GB and Hoopes JE. Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps, *Ann Surg* 1985; 201: 357-359.
 Kligman LH. The hairless mouse model for photoaging, *Clin Dermatol* 1996; 14: 183-195.
 Kligman LH and Kligman AM. The nature of photoageing: Its prevention and repair, *Photodermatology* 1986; 3: 215-227.
 Kohen R and Gati I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress, *Toxi-*

- cology 2000; 148: 159-167.
- Lawless J. The illustrated encyclopedia of essential oils, New York, Elements Books, 1999.
- Lee BS, Son WC, Hyun JS, Jung KM, Rho HS, Kim DH, Shim YC and Kim BH. Comparison of skin wrinkles induced by topical squalene monohydroperoxide treatment and chronic UVB irradiation to the hairless mice, *Lab Ani Res* 2005; 21(1): 5-10.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Far AL and Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- Martin JP, Dailey M and Sugarman E. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation, *Arch Biochem Biophys* 1987; 255: 329-336.
- No KO, Cho HS, Park SK, Lee HS, Chang MY, Lee MH, Kang SJ, Cho WG, Park HJ and Hong JT. Effects of LGNC-5 on the ultraviolet-induced wrinkle formation and pigmentation in hairless mice and brown guinea pigs, *Kor J Lab Ani Sci* 2004; 20(4): 363-364.
- Pathak MA. Formation of thymine dimers in mammalian skin by ultraviolet radiation in vivo, *Photochem Photobiol* 1972; 15: 177-185.
- Pence BC and Naylor MF. Effects of single-dose ultraviolet radiation on skin superoxide dismutase, catalase, and xanthine oxidase in hairless mice, *J Invest Dermatol* 1990; 95: 213-216.
- Soter NA. Acute effects of ultraviolet irradiation the skin, *Dermatol* 1990; 9(1): 11-15.
- Stirpe F and Della CE. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O), *J Biol Chem* 1969; 244: 3855-3863.
- Van der Geer P, Hunter T and Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine, kinases and their signal transduction pathways, *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10: 251-337.