

프로 비타민 D의 피부색 조절 및 면역 효능

최현정[†] · 민대진 · 최은정 · 박승한 · 김형준 · 박원석^{††}

아모레퍼시픽 R&I 센터

(2024년 5월 29일 접수, 2024년 6월 14일 수정, 2024년 6월 18일 채택)

Effects of Provitamin D on Skin Pigmentation and Immunity

Hyunjung Choi[†], Daejin Min, Eun-Jeong Choi, Seung-Han Park, Hyoung-June Kim, and Won-Seok Park^{††}

Basic Research & Innovation Division, AMOREPACIFIC R&I Center, 1920,

Yonggu-daero, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 17074, Korea

(Received May 29, 2024; Revised June 14, 2024; Accepted June 18, 2024)

요약: 비타민 D는 주로 자외선에 의해 피부에서 만들어지는 지용성 비타민이다. 멜라토닌과 함께 대표적인 ‘크로노바이오틱(chronobiotic)’ 물질로써 피부가 낮과 밤을 구분하는데 중요한 역할을 한다. 하지만 비타민 D는 조효소 역할을 하는 비타민이자 여러 종류의 유전자 발현을 조절하는 호르몬적 역할을 하기 때문에 화장품에 직접적으로 사용할 수 없다. 따라서 화장품에 사용할 수 있는 비타민 D 전구체인 프로 비타민 D (7-dehydrocholesterol)의 피부 효능에 대해서 알아보려고 하였다. 그 결과, 프로 비타민 D는 멜라닌 생성 효소인 타이로시네이스(tyrosinase)의 단백질 발현을 억제하여 멜라닌 생성을 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 피부톤 케어 효과는 인공 피부에서도 검증되었다. 또한 프로 비타민 D는 피부 염증을 일으키는 TNF α 의 발현을 억제하고, 자외선에 의해 비타민 D로 전환되면 항균 펩타이드인 CAMP (LL-37)의 발현을 증가시킨다는 것이 확인되었다. 프로 비타민 D가 멜라닌 생성을 억제하는 것은 멜라닌이 자외선을 흡수하여 프로 비타민 D가 비타민 D로 전환되는 것을 억제하기 때문인 것으로 보인다. 따라서 화장품 제형에 프로 비타민 D를 활용한다면 피부톤을 조절하고 피부 면역을 증진시킴과 동시에 일상 생활 속에서 자외선에 의해 비타민 D 전환되면 다른 피부 효능, 즉 피부 항노화, 장벽 기능 향상 등도 기대할 수 있을 것으로 생각한다.

Abstract: Vitamin D is a fat-soluble vitamin that is mainly produced in the skin by UV rays. Along with melatonin, it is a representative chronobiotic substance, and the skin plays an important role in distinguishing between day and night. However, vitamin D cannot be used directly in cosmetics because it is a vitamin that acts as a coenzyme and plays a hormonal role in regulating the expression of various types of genes. Therefore, it was to investigate the skin efficacy of provitamin D (7-dehydrocholesterol), a vitamin D precursor that can be used in cosmetics. Our findings reveal that pro vitamin D can effectively inhibit the expression of tyrosinase, the melanin-producing enzyme, thereby attenuating melanin synthesis. This skin tone regulatory effect has been corroborated *in vitro* using artificial skin models. Additionally, pro vitamin D demonstrated anti-inflammatory properties by suppressing the expression of TNF α and, upon conversion to vitamin D through UV exposure, it was observed to induce the production of the antimicrobial peptide CAMP (LL-37). The inhibitory effect of pro vitamin D on melanin production appears to be a result of it reducing the UV absorption capacity of melanin, thereby inducing the conversion of pro D to vitamin D. Utilizing pro vitamin D in cosmetic formulations could not only modulate skin tone and enhance skin immunity but also expect to contribute to other cutaneous benefits as anti-aging and barrier function improvement with everyday UV exposure. This multifaceted efficacy positions pro vitamin D as a promising ingredient in advancing the formulation of skin care products.

Keywords: vitamin D, pro-vitamin D, 7-dehydrocholesterol, melanogenesis, tyrosinase

[†] 주 저자 (e-mail: heart@amorepacific.com)
call: 031-280-5816

^{††} 교신저자 (e-mail: wspark@amorepacific.com)
call: 031-280-5822

1. 서 론

비타민 D는 지용성 비타민으로서, 골격 형성에 필요한 칼슘이 대장과 콩팥에서 흡수되는 것을 돕는다[1]. 자외선에 의한 합성, 식이를 통한 섭취, 비타민 D 보충제를 통한 섭취 등으로 공급되지만, 이중 자외선에 의해 표피 하부인 기저층/유극층에서 cholesterol 전구체인 프로 비타민 D (7-dehydrocholesterol)에서 비타민 D로 합성되는 것이 주된 공급원이다. 비타민 D 합성에는 UVB (290 ~ 315 nm) 또는 열이 관여한다고 알려져 있고, 이것은 피부 홍반 유발 자외선 spectrum과 유사하다. 비타민 D (cholecalciferol)는 다시 간과 신장을 거치면서 calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D)로 전환되는데, 이것은 2,000 개가 넘는 유전자들을 직, 간접적으로 조절하는 호르몬의 역할을 수행한다. 부족한 경우 골밀도 저하, 골절, 고혈압, 당뇨, 심혈관 질병, 암 등의 발생 위험이 증가하지만, calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D)을 고용량 사용하면 고칼슘혈증을 유발할 수 있어서 이를 회피하고 특정 조직에 효과적인 비타민 D 유도체들을 개발하려는 노력들이 진행 중이다[2]. 따라서 화장품에는 비타민 D 전구체인 프로 비타민 D (7-dehydrocholesterol)는 사용할 수 있지만 비타민이 아닌 호르몬으로 작용할 수 있는 활성 비타민 D 자체는 사용할 수 없다. 혈관의 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D, calcidiol)의 양이 50 nmol/L 이하일 때 비타민 D 결핍이라고 하는데, 한국인의 경우 90% 이상이 비타민 D 부족 상태라는 연구 결과도 있다[3].

피부에서 비타민 D의 주요 원천이자 비타민 D를 최종 활성 비타민 D로 전환할 수 있는 모든 효소를 갖추고 있는 유일한 피부 세포는 각질 형성 세포(keratinocyte)이다[4]. 비타민 D는 피부의 각질 형성 세포의 증식과 분화를 조절하고, 감염에 대한 방어역할을 하며, 아토피 피부염, 건선, 백반증, 피부암과 같은 피부질환들과 연관되어 있다고 알려져 있다. 비타민 D는 주로 7-dehydrocholesterol이 자외선에 의해 전환되어 만들어지는데, 피부가 가지고 있는 멜라닌(melanin)이 자외선을 흡수하여 이를 방해한다[5]. 그래서 흑인과 같이 피부 톤이 진한 사람들은 멜라닌 때문에 햇빛이 부족한 고위도 지방에 살게 되면 활성 비타민 D의 합성이 떨어져 구루병과 같은 뼈 발육 질환에 걸릴 수 있다[6]. 최근 화장품 영역에서는 자외선 차단제가 활성 비타민 D의 생성을 억제할 수 있지 않을까 하는 우려가 있었지만, 관련 연구 결과들에 따르면 자외선 차단제가 활성 비타민 D의 생성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다

[7]. 또한 개인마다 비타민 D 대사나 비타민 D에 대한 수용체의 발현과 활성이 달라서 큰 차이를 보인다. 예를 들어 여성이 남성보다, 나이든 사람이 젊은 사람보다, 비만인 사람이 그렇지 않은 사람보다 비타민 D level이 낮은 경우가 많다. Calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D)이 부족하면 각질 형성 세포의 apoptosis와 ceramide 생성이 억제되어 증식이 촉진되고 분화가 저해되어 아토피, 건선 등이 발생할 수 있다. 또한 비타민 D는 면역세포의 활성과 염증성 사이토카인의 생성을 억제하여 항염 효과를 보이며, 반대로 피부의 항균 펩타이드(예, CAMP, LL-37)의 발현과 IL-10과 같은 항염 사이토카인의 발현을 촉진하여 염증에 의한 피부 질환들을 완화하는 효과를 가지고 있다[8].

“크로노바이오틱(chronobiotic)”은 시간을 의미하는 ‘크로노(chrono)’와 생물학적 활성을 나타내는 ‘바이오틱(biotic)’의 합성어로, 생물학적 시계(서캐디언 리듬_circadian rhythm)에 영향을 미치는 물질을 가리키는 용어다. 대표적인 것이 수면 패턴을 조절하는 멜라토닌(melatonin)이 있다. 멜라토닌은 항산화, 면역 증강, 미토콘드리아 활성 등의 효과를 가지고 있는데, 빛에 의해 그 생성과 활성이 조절되는 등 여러 가지 면에서 비타민 D와 유사하다[9].

멜라토닌은 비타민 D 수용체(VDR)에 결합하여 비타민 D의 신호 전달과 세포 활동을 증가시킨다. 그리고 비타민 D 생성에 필요한 자외선이 피부 손상을 일으킬 때 멜라토닌이 항산화제로 작용하여 억제한다고 알려져 있다. 반대로 비타민 D는 멜라토닌 수용체의 발현을 증가시키고, 멜라토닌의 신호 전달 효과와 세포 활동을 강화한다. 또한 멜라토닌의 합성을 억제하는 효소인 CYP24A1의 발현을 감소시키면서 멜라토닌의 합성을 촉진하는 효소인 AANAT의 발현은 증가시켜 멜라토닌의 분비를 촉진한다고 한다. 그리고 비타민 D는 멜라토닌 생성을 조절하는 시계 유전자인 BMAL1과 PER2의 발현을 증가시킨다고 알려져 있다. 따라서, 비타민 D과 멜라토닌은 서로의 생성과 기능에 긍정적인 영향을 미치며, 피부에는 낮과 밤을 구분하는 중요한 인자들이라고 할 수 있다[10].

비타민 D를 활용한 데이 케어 화장품과 멜라토닌을 활용한 나이트 케어 화장품을 개발하여 적절히 사용할 수 있다면 생체 리듬이 깨진 현대인들의 피부 고민을 매우 효과적으로 케어할 수 있을 것으로 생각한다. 이에, 프로 비타민 D를 포함한 제품을 사용한 고객들이 일상생활을 통해 자외선에 노출된다면 자연스럽게 활성 비타민 D로의 전환과 그에 따른 피부 효능은 예상이 되므로, 본 연구에서는 자

외선에 의한 전환 효과 외에 프로 비타민 D 자체의 피부 효능을 알아보고자 하였다. 그 결과, 프로 비타민 D는 피부 속 멜라닌 생성을 효과적으로 억제하여 피부 톤을 조절할 수 있는 효능을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포 배양

신생아의 포피에서 분리한 normal human epidermal melanocytes (NHEMs, moderately or darkly pigmented donors)를 Cascade Biologics사 (USA)로부터 구입하여 사용하였다. NHEMs는 human melanocyte growth supplements (HMGS) (Cascade Biologics, USA)가 들어 있는 M-254 배지로 37 °C, 5 % CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 이렇게 배양한 NHEMs를 계대 수 5 이하로 60 × 15 mm cell culture dish에 dish 당 0.5 × 10⁵ cells가 되도록 깔고 그 다음날부터 시험 물질을 농도별로 처리하였다. 이틀에 한번씩 배지를 갈아주면서 시험 물질을 다시 처리하고 이렇게 일주일 이상 배양한 후 세포를 모아 western blotting으로 원하는 단백질 발현 변화를 관찰하고 멜라닌 정량을 하였다. 시험 물질은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, USA)에 최종 시험 농도의 1,000 배가 되게 녹인 후 배지에 1/1000로 희석하여 처리하였고, 대조군은 같은 양의 DMSO만 들어가도록 하였다.

Normal human epidermal keratinocytes (NHEKs)는 LONZA 사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. NHEKs는 KGM Gold keratinocyte growth medium bulletKit (LONZA, USA)로 37 °C, 5 % CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 이렇게 배양한 NHEKs를 6 well cell culture plate에 깔고, 세포가 confluent 하게 자라면 시험 물질을 농도별로 처리한 후 48 h 배양하였다. 배양이 끝나면 세포는 모아 reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR, 7500Fast, Applied Biosystems, USA)로 원하는 유전자의 발현 변화를 확인하고, 배지는 모아서 keratinocyte-conditioned media를 만들었다. Keratinocyte-conditioned media와 melanocyte media를 1 : 1로 섞어서 NHEMs에 이틀에 한번씩 처리하여 일주일 이상 배양한 후 멜라닌 정량을 하였다. 시험 물질은 DMSO에 최종 시험 농도의 1,000 배가 되게 녹인 후 keratinocyte, melanocyte 배지에 각각 1/1000로 희석하여 처리하였고, 대조군은 같은 양의 DMSO만 들어가도록 하였다.

2.2. 멜라닌(Melanin) 정량법

시험 물질을 처리하여 키운 NHEMs를 PBS (Coming, USA)로 한번 씻은 후 세포 배양기로부터 trypsin/EDTA를 사용하여 떼어내고 e-tube에 모아서 1,000 × g로 5 min 간 원심분리하여 cell pellet을 만들었다. 이렇게 만든 cell pellet을 사진 찍고, 1 N NaOH (Welgene, Korea)에 녹였다. Cell pellet이 보이지 않도록 잘 녹인 NaOH 용액을 96 well plate로 옮긴 후 ELISA plate reader (enzyme-linked immunosorbent assay, SPECTROstar Nano, BMG LABTECH, Germany)를 활용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시험군의 흡광도에서 cell pellet을 녹이지 않은 1 N NaOH 자체의 흡광도를 빼 준 후 대조군 대비 시험군의 흡광도 차이를 %로 환산하여 상대적인 멜라닌 양을 측정하였다[11].

2.3. Western Blot Analysis

Cell pellet에 phosphatase inhibitor cocktail 2와 3 (Sigma-Aldrich, USA), protease inhibitor cocktail (Roche, Swiss)을 함유하고 있는 RIPA lysis buffer (Sigma-Aldrich, USA)를 넣고 강하게 섞어서 세포를 깨주었다. 이렇게 만든 cell lysate를 13,000 rpm에서 원심분리하여 깨지지 않은 cell debris와 melanin을 제거하고 단백질 층만 분리하였다. 분리한 단백질은 BCA protein assay kit (Thermo Scientific, USA)로 정량하고 시험군 간 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, NOVEX, Life technologies, USA)를 활용하여 크기별로 분리하였다. SDS-PAGE에 크기별로 분리된 단백질을 PVDF membrane (Bio-Rad, USA)으로 옮기고, 4% (w/v) skim milk/TBST (25 mM Tris, 140 mM NaCl, and 0.05% [v/v] Tween 20)로 1 h 동안 blocking 하였다. 이후 PVDF membrane을 Santa Cruz Biotechnology사(USA)에서 구입한 1 차 항체(anti-tyrosinase antibody, 1 : 1,000, anti-GAPDH antibody, 1 : 2,000)가 들어 있는 blocking buffer에 담가 24 h 동안 4 °C에서 반응시켰다. 다음으로 각각의 1 차 항체에 맞는 HRP-conjugated 2 차 항체를 2 h 동안 붙여주고 SuperSignal West Dura HRP Detection Kit (Pierce, USA)를 이용하여 원하는 단백질 발현의 상대적 변화를 확인하였다[12].

2.4. RNA 분리 및 RT-PCR을 통한 상대적인 mRNA 발현양 분석

TRIzol™ reagent를 이용하여 제조사의 지시에 따라 세포로부터 total RNA를 분리하였다(Invitrogen, USA). 이렇게

분리된 RNA의 농도는 분광광도측정법으로 측정하고, RNA의 질적인 상태는 BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA)으로 확인하였다. RNA 4 μg 을 SuperScriptIII reverse transcriptase (Invitrogen, USA)를 이용하여 cDNA로 제작하였다. 다음으로 확인하고자 하는 유전자의 발현 정도를 quantitative real-time TaqMan PCR technology (7500Fast, Applied Biosystems, USA)로 분석하였다. 실험 조건은 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10 min 간 denaturing 단계 후 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s와 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min을 50 회 반복하였다. TNF에 대한 primer는 Hs07287353_m1, LL37 (CAMP)에 대한 primer는 Hs00189038_m1를 사용하였고, 대조군으로는 RPL13A에 대한 primer인 Hs04194366_g1을 사용하였다. 모든 primer는 Applied Biosystems (USA)에서 구입하였다[13].

2.5. 인공 피부 실험

색소침착 표피층 인공피부 모델인 MelanoDerm (MEL-300-B, MatTek, USA)을 EPI-100-NMM-113-PRF 배지(MatTek, USA)를 사용하여 5% CO₂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 조건에서 배양하였다. 물질들은 특정한 농도로 배지에 처리되었으며, 조직들은 이틀에 한번씩 배지를 교환하며 총 14 일간 배양되었다. 표피 색소침착의 변화는 광학적 및 조직학적 관찰을 통해 검사되었다. 광학적 관찰은, 디지털카메라를 이용하여 촬영한 조직사진에서 이미지 분석을 통해 배양 1 일차와 14 일차의 L값(밝기/어두움 지수)를 도출하고, 각 실험군별 L값의 변화(ΔL)를 산출하였다. 조직학적 관찰은, 우선 조직을 10% 중성 완충 포르말린(BBC

Biochemical, USA)에 고정하고 파라핀으로 포매한 후 5 μm 두께로 절단하여 각 조직의 섹션을 제작하였다. 그 후, 각 섹션에 대해 Hematoxylin-Eosin (H&E, Abcam, UK) 및 Fontana-Masson's (F-M, Abcam, UK) 염색을 실시하고 현미경으로 관찰함으로써 각 조직에서 나타난 변화들을 관찰하였다[14].

2.6. 통계 분석

데이터는 N 수를 3 이상으로 하고 독립적으로 세 번 이상 반복 실험하였으며 그 중 대표적인 실험 결과를 통계적으로 분석하여 도출하였다. 통계 분석은 1-way ANOVA (SPSS software, version 21, IBM, USA)를 사용하여 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 인간 정상 멜라닌 생성 세포의 멜라닌 생성을

억제하는 프로 비타민 D (7-dehydrocholesterol)

멜라닌 생성에 미치는 비타민 D의 영향에 대한 연구 동향을 살펴보면, 인간 정상 멜라닌 생성 세포를 활용한 연구는 많지 않다. 그중 프로 비타민 D가 자외선에 의해 전환되어 만들어지는 비타민 D (cholecalciferol)는 멜라닌 생성 세포의 멜라닌 생성을 증가시켜 자외선에 의한 피부 손상을 억제한다고 한다[15]. 그러나, 프로 비타민 D나 비타민 D의 최종 대사 산물인 calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D)의 경우에는 멜라닌 생성에 영향이 없고, 멜라닌과 비타민 D는 음의 상관 관계에 있으며, 멜라닌이 비타민 D의 수용체나 생성

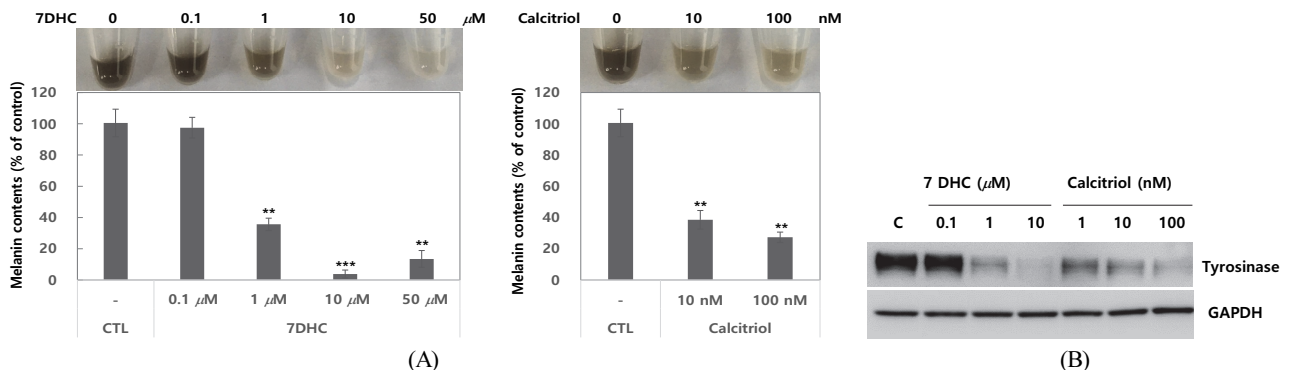


Figure 1. Inhibitory effects of pro-vitamin D (7-dehydrocholesterol) and calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D) on melanogenesis of NHEMs. Moderately-Pigmented NHEMs were treated with pro-vitamin D (7-dehydrocholesterol, 0.1 ~ 50 μM) and calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D, 10 ~ 100 nM) for 7 days. Then, an equal number of cells were collected into e-tubes and solubilized in 1 N NaOH. Images were captured post dissolution. The relative amount of melanin compared to CTL (Control) was quantified by measuring the absorbance at 475 nm, with the results being graphically represented (A). The protein expression levels of tyrosinase was analyzed. GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) was loading control (B). Data were obtained from at least 3 independent experiments and the values were presented as mean \pm SE (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

효소의 발현을 억제하기 때문에 비타민 D와 피부 색소 침착 사이에는 아직 분명한 결과가 없다고 할 수 있다[16].

따라서, 본 연구에서는 인간의 정상 멜라닌 생성 세포에 자외선을 조사하지 않고 프로 비타민 D와 비타민 D의 최종 대사 산물인 calcitriol을 처리하여 멜라닌 생성에 변화가 있는지 실험해보았다. 그 결과, 프로 비타민 D와 calcitriol이 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 매우 강하게 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 1). 이렇게 멜라닌 생성이 억제 되는 것은 멜라닌 생성 효소인 tyrosinase의 단백질 발현이 프로 비타민 D와 calcitriol에 의해서 억제되기 때문에 나타나는 결과임을 western blotting 방법으로 검증하였다. 이상의 결과로부터 프로 비타민 D와 그의 최종 대사 산물인

calcitriol은 자외선에 의해 대사되지 않더라도 그 각각이 멜라닌 생성을 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.

3.2. 인공 피부를 통한 프로 비타민 D의 피부톤 케어 효능 검증

멜라닌 생성 세포와 각질 형성 세포를 포함한 인공피부에서도 프로 비타민 D와 calcitriol이 미백 효과를 나타낼 수 있는지 추가 실험을 진행해보았다. 인공 피부에서는 프로 비타민 D와 calcitriol이 미백 효과를 보였으나, 그 양상이 세포 실험 결과와는 상이하였다. 먼저 프로 비타민 D의 경우에는 50 μ M에서만 통계적으로 유의미한 미백 효과를 나타내었다. 반면 calcitriol은 겉보기 효과(delta L값)로 보

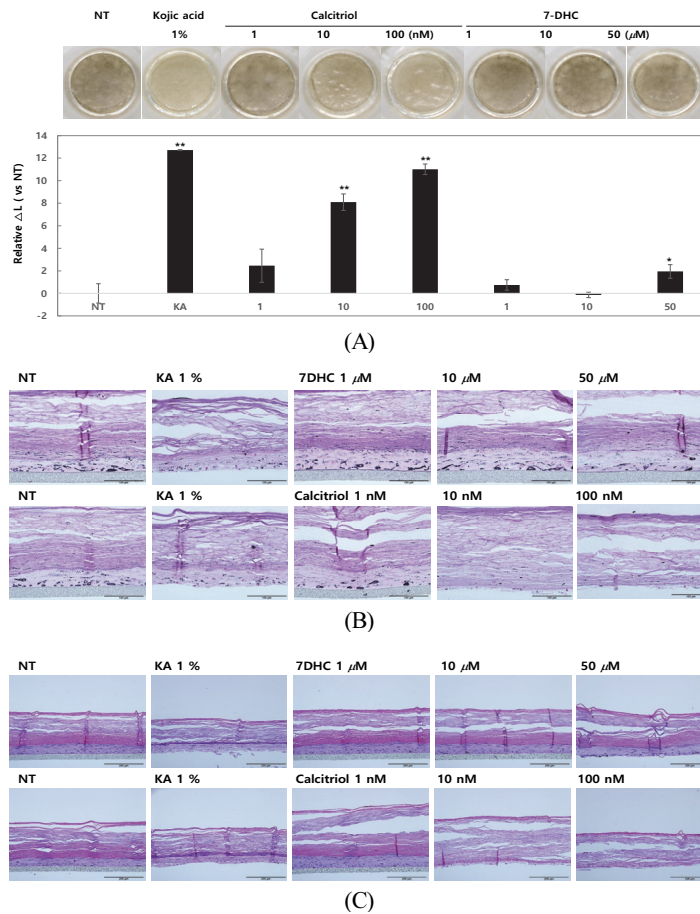


Figure 2. Inhibition effects of pro-vitamin D and calcitriol on human skin pigmentation.

Photographs of 3-dimensional human skin substitutes treated with KA (Kojic acid, 1%), pro-vitamin D (7DHC : 7-dehydrocholesterol, 0.1 ~ 50 μ M), or calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D, 10, 100 nM) for 14 days were taken and the pigmentation of the skin substitutes was measured and Δ L was calculated between the NT (non-treated, control) and treated groups (A). Melanin in the human skin model was histological visualized by Fontana-Masson Stain (B) and integrity of that was decided by Hematoxylin-Eosin stain (C). Data represent the mean \pm SE of 3 experiments (* p < 0.05, ** p < 0.01).

면 미백 효과가 있는 것으로 보이거나 조직 염색을 통해 확인해본 결과 이것은 독성으로 인해 나타나는 현상으로 확인되었다. 아마도 calcitriol이 고농도로 처리되면 피부에 비타민이 아닌 호르몬으로 작용하여 특정 농도에서 표피의 생성과 분화에 좋지 않은 영향을 미치는 것이 아닌가 생각된다(Figure 2).

3.3. 프로 비타민 D의 멜라닌 생성 억제 효과에 각질 형성 세포가 미치는 영향

프로 비타민 D의 미백 효과가 인공 피부에서 약하게 나타나는 이유가 세포 실험과 달리 인공 피부에 추가된 각질 형성 세포(keratinocyte)의 영향 때문인지를 알아보기 위해서, 각질 형성 세포에 프로 비타민 D를 처리하여 2 일간 배양 후 그 배양 배지(keratinocyte-conditioned media)를 멜라닌 생성 세포(melanocyte)에 처리하여 멜라닌 생성 세포의 멜라닌 변화량을 확인해보았다. 그 결과, 같은 농도의 프로 비타민 D의 경우 각질 형성 세포를 거치면 프로 비타민 D를 직접 멜라닌 생성 세포에 처리했을 때보다 멜라닌 생성 억제 효능이 통계적으로 유의미하게 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 프로 비타민 D가 각질 형성 세포에 의해 대사되면서 멜라닌 생성 세포에 미치는 영향이 반감된 결과가 아닌가 추측된다. 대조군은 세포 없이

프로 비타민 D만 2 일간 incubator에 넣어둔 것을 사용하여 배양 배지 안에서 물질이 자연히 분해되어 없어지는 것에 따른 효능 감소는 배제하고자 하였다. 하지만, 각질 형성 세포가 프로 비타민 D를 다른 물질로 대사하여 프로 비타민 D에 의한 미백 효과를 감소시키는 것인지 아니면 단순히 세포에 의한 물질 소비 때문에 나타나는 현상인지는 추가 실험이 필요하다. 다만, 프로 비타민 D는 자외선이 없으면 각질 형성 세포의 7-dehydrocholesterol reductase에 의해 cholesterol로 변환된다고 알려져 있다[17]. 그런데 이렇게 만들어진 cholesterol과 피부색과의 직접적인 상관관계는 알려진 바가 거의 없다 (Figure 3). 멜라닌은 피부에서 자외선을 흡수하여 자외선에 의한 피부 손상을 억제한다 [18]. 즉, 멜라닌이 비타민 D와 자외선을 얻기 위해 경쟁을 한다고 할 수 있는데, 본 연구 결과에서 프로 비타민 D와 활성 비타민 D가 멜라닌 생성을 억제하는 것은 프로 비타민 D가 활성 비타민 D로 전환되는데 필수 요소인 자외선을 확보하기 위해 경쟁자인 멜라닌을 제거하는 작용 기작이 아닌가 생각된다.

3.4. 프로 비타민 D의 면역 증진 및 항염 효능

활성 비타민 D인 calcitriol은 Ca²⁺과 함께 keratinocyte의 분화를 유도하는 대표적인 인자이다. 또한 피부 섬유아세

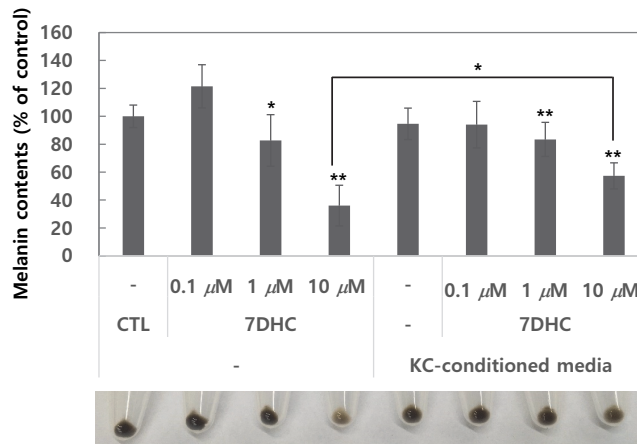


Figure 3. Influence of keratinocyte-conditioned media treated with pro-vitamin D on melanogenesis of NHEMs. Keratinocytes from normal human skin were treated with pro-vitamin D (7DHC : 7-dehydrocholesterol, 0.1, 1, 10 μM) and cultured for 2 days. The collected keratinocyte-conditioned culture media were subsequently applied to normal human melanocytes every other day over a period of 7 days. An equal number of melanocytes were harvested into e-tubes and solubilized in 1N NaOH. Photographs were taken, and the absorbance at 475 nm was measured to quantify relative melanin content. The results were graphically represented. Each experiment was conducted independently at least three times with a sample size of N ≥ 3 to ensure the reproducibility of the results. A representative figure from these experiments is presented. Statistical significance was denoted as follows: *p < 0.05, **p < 0.01 compared to control (CTL).

포의 세포 외 기질인 콜라겐의 발현을 높여 피부 항노화 효능을 가진다고 알려져 있다[19]. 하지만 그의 전구체인 프로 비타민 D는 이와 같은 피부 효능에 대해 연구가 거의 없다. 그래서 프로 비타민 D가 각질 형성 세포의 분화에 어떤 영향을 미치는지 실험을 진행해보았다. 그 결과, 자외선이 없는 무자극에서는 프로 비타민 D가 각질 형성 세포의 분화 유전자 발현에 일관된 변화를 주지 않는 것으로 확인되었다. 다만, 피부 세포에서의 대표적인 염증 인자인 TNF α 의 유전자 발현을 통계적으로 유의미하게 프로 비타민 D가 농도 의존적으로 감소시키는 것이 확인되었다(Figure 4). 그러나, IL-1 α 나 IL-8과 같은 다른 염증 인자의 유전자 발현에는 억제 효능이 없었다.

피부 항균 펩타이드 중 하나인 CAMP (LL-37)는 건선이나 아토피와 같은 피부 질환 환자에서 발현이 크게 감소되어 있어 치료제 개발의 바이오 타겟으로 큰 관심을 받고 있다[20]. 그 이유는 CAMP가 없으면 포도상구균과 같은 피부 유해 미생물로부터 피부가 손상되는 것을 막을 수 없기 때문인데, 활성 비타민 D가 이를 높여 피부 질환을 크

게 개선할 수 있다고 한다. 프로 비타민 D도 자외선에 의해 활성 비타민 D인 calcitriol로 변환되면 CAMP의 발현을 높일 수 있다고 알려져 있는데, 실제 실험 결과에서도 각질 형성 세포에 calcitriol을 처리하면 자외선 유무와 상관없이 CAMP의 유전자 발현이 크게 증가하지만, 프로 비타민 D의 경우에는 그 자체로는 CAMP의 발현을 크게 높이지 않았고, 자외선과 프로 비타민 D를 동시에 처리했을 때만 CAMP의 발현이 calcitriol을 처리한 경우처럼 급격히 증가함을 관찰할 수 있었다(Figure 4). 그런데 프로 비타민 D를 활성 비타민 D로 전환하기 위해 피부에 자외선을 조사한다면 주사(rosacea)나 아토피 피부염에서 증가하는 LL-37이 같이 늘어날 수도 있고 다른 자외선에 의한 피부 손상도 유발될 수 있기 때문에, 예를 들어 열이나 적외선과 같은 프로 비타민 D를 활성 비타민 D로 전환하는 다른 방법을 사용하거나, 직접적으로 활성 비타민 D나 그의 유도체를 사용하는 것이 피부 면역 증진 또는 항염 효능으로 피부 질환을 치료하는데 더욱 효과적일 수 있다고 생각한다[21].

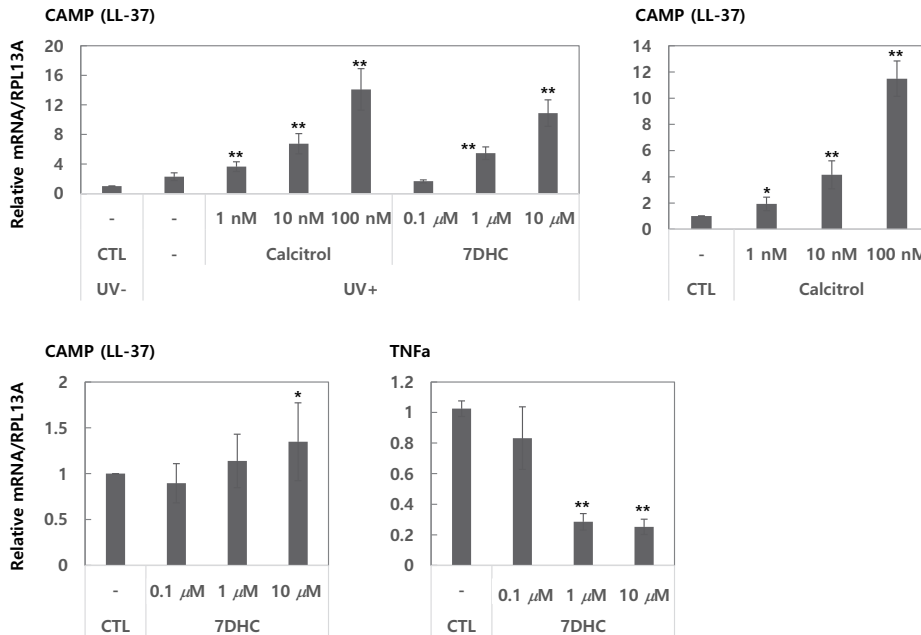


Figure 4. Immuno-enhancing and anti-inflammatory effects of pro-vitamin D.

Normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) were treated with various concentrations (0.1 ~ 10 μ M) of pro-vitamin D (7DHC : 7-dehydrocholesterol) and calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D, 10 ~ 100 nM) for 2 days. Post-treatment, RNA was extracted from the cells, and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was utilized to measure mRNA expression levels of LL-37 and TNF α . The relative expression levels were depicted graphically. Each set of experiments was carried out independently at least three times with a sample size of N \geq 3, ensuring the validity of the results. The figures presented herein show a representative outcome of these experiments. Statistical significance is indicated by * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with the control group (CTL).

4. 결 론

종합적으로, 프로 비타민 D의 피부 효능은 피부 색소 침착 억제와 자외선에 의한 피부 손상 회복, 그리고 부분적인 항염 및 면역 효과에 국한되어 있음을 확인할 수 있었다. 하지만, 피부는 일상생활 속에서 필수불가결하게 자외선에 노출이 될 수밖에 없으므로, 프로 비타민 D의 효능은 활성 비타민 D의 효능으로까지 확장될 수 있다고 생각한다. 이에 본 연구는 프로 비타민 D가 활성 비타민 D로 전환되지 않더라도 일정 부분 피부 미용에 긍정적인 효과를 가질 수 있음을 보여주는데 의의가 있다고 하겠다.

또한 활성 비타민 D의 전구체인 프로 비타민 D (7-dehydrocholesterol, 7DHC)는 자외선이 있으면 활성 비타민 D로 전환이 되고, 자외선이 없으면 cholesterol로 대사되기 때문에, 비타민 D는 영양유전체학(nutritional epigenomics)에서 매우 중요하게 다루는 소재이기도 하다[22]. 본 연구에서 살펴본 바와 같이 프로 비타민 D의 피부 색소 침착 억제 효과가 *in vitro* 세포 실험과 인공 피부 실험에서 차이를 보이는 것은 이와 같은 효능 물질들의 피부에서의 대사 최종 표적에 대한 작용 기작이 다르기 때문으로 생각된다.

따라서 향후에는 효과적인 소재를 개발하기 위해서 소재가 피부 장벽을 통과하여 들어갈 수 있는 기술뿐만 아니라 효능 물질들이 피부에서 어떻게 변하는지에 대한 약리학적 관점의 연구를 수행하고자 한다. 그리고 활성 비타민 D가 skin exposome에서는 어떤 역할을 하는지, 멜라토닌과 함께 "크로노바이오틱(chronobiotic)" 관점에서는 어떤 역할을 하는지 연구하여 시간과 환경에 따른 맞춤 케어가 가능한 소재를 개발하고자 한다.

References

1. C. Bergqvist and K. Ezzedine, Vitamin D and the skin: what should a dermatologist know?, *G Ital Dermatol Venereol.*, **154**(6), 669 (2019).
2. J. R. Wu-Wong, J. Tian, and D. Goltzman, Vitamin D analogs as therapeutic agents: a clinical study update, *Curr Opin Investig Drugs.*, **5**(3), 320 (2004).
3. K. M. Kim, H. S. Choi, M. Choi and H. Y. Chung, Calcium and vitamin D supplementations: 2015 position statement of the Korean society for bone and mineral research, *J Bone Metab.*, **22**(4), 143 (2015).
4. D. D. Bikle, Vitamin D and the skin: Physiology and pathophysiology, *Rev Endocr Metab Disord.*, **13**(1), 3 (2012).
5. P. P. Naik and S. N. Farrukh, Influence of ethnicities and skin color variations in different populations: A review, *Skin Pharmacol Physiol.*, **35**(2), 65 (2022).
6. T. L. Clemens, J. S. Adams, S. L. Henderson, and M. F. Holick, Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D₃, *Lancet*, **1**(8263), 74 (1982).
7. D. Kockott, B. Herzog, J. Reichrath, K. Keane, and M. F. Holick, New approach to develop optimized sunscreens that enable cutaneous vitamin D formation with minimal erythema risk, *PLoS One*, **11**(1), e0145509 (2016).
8. J. W. Wang, P. G. Hogan, D. A. Hunstad, and S. A. Fritz, Vitamin D sufficiency and *Staphylococcus aureus* infection in children, *Pediatr Infect Dis J.*, **34**(5), 544 (2015).
9. D. M. Minich, M. Henning, C. Darley, M. Fahoum, C. B. Schuler, and J. Frame, Is melatonin the "Next vitamin D"?: A review of emerging science, clinical uses, safety, and dietary supplements, *Nutrients.*, **14**(19), 3934 (2022).
10. D. X. Tan, L. C. Manchester, E. Esteban-Zubero, Z. Zhou, and R. J. Reiter, Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism, *Molecules*, **20**(10), 18886 (2015).
11. J. Kim, J. Lee, and H. Choi, Intense pulsed light attenuates UV-induced hyperimmune response and pigmentation in human skin cells, *Int J Mol Sci.*, **22**(6), 3173 (2021).
12. H. J. Choi, J. H. Shin, E. S. Kim, S. J. Park, I. H. Bae, Y. K. Jo, I. Y. Jeong, H. J. Kim, Y. Lee, H. C. Park, H. B. Jeon, K. W. Kim, T. R. Lee, and D. H. Cho, Primary cilia negatively regulate melanogenesis in melanocytes and pigmentation in a human skin model, *PLoS One*, **11**(12), e0168025 (2016).
13. J. E. Bae, H. J. Choi, D. W. Shin, H. W. Na, N. Y. Park, J. B. Kim, D. S. Jo, M. J. Cho, J. H. Lyu, J. H. Chang, E. H. Lee, T. R. Lee, H. J. Kim, and D. J. Cho, Fine particulate matter (PM_{2.5}) inhibits ciliogenesis by increasing SPRR3 expression via c-Jun activation in RPE

- cells and skin keratinocytes, *Sci Rep*, **9**(1), 3994 (2019).
14. C. S. Lee, W. H. Jang, M. Park, K. Jung, H. S. Baek, Y. H. Joo, Y. Ho. Park, and K. M. Lim, A novel adamantyl benzylbenzamide derivative, AP736, suppresses melanogenesis through the inhibition of cAMP-PKA-CREB-activated microphthalmia-associated transcription factor and tyrosinase expression, *Exp Dermatol.*, **22**(11), 762 (2013).
 15. Y. Tomita, W. Torinuki, and H. Tagami, Stimulation of human melanocytes by vitamin D3 possibly mediates skin pigmentation after sun exposure, *J Invest Dermatol*, **90**(6), 882 (1988).
 16. A. Markiewicz, A. A. Brożyna, E. Podgórska, M. Elas, K. Urbańska, A. M. Jetten, A. T. Slominski, W. Józwicki, J. Orłowska-Heitzman, G. Dyduch, and B. Romanowska-Dixon, Vitamin D receptors (VDR), hydroxylases CYP27B1 and CYP24A1 and retinoid-related orphan receptors (ROR) level in human uveal tract and ocular melanoma with different melanization levels, *Sci Rep.*, **9**(1), 9142 (2019).
 17. A. V. Prabhu, W. Luu, L. J. Sharpe, and A. J. Brown, Cholesterol-mediated degradation of 7-dehydrocholesterol reductase switches the balance from cholesterol to vitamin D synthesis, *J Biol Chem.*, **291**(16), 8363 (2016).
 18. M. Brenner and V. J. Hearing, The protective role of melanin against UV damage in human skin, *Photochem Photobiol*, **84**(3), 539 (2008).
 19. G. Bocheva, R. M. Slominski, and A. T. Slominski, The impact of vitamin D on skin aging, *Int J Mol Sci.*, **22**(16), 9097 (2021).
 20. Y. Dombrowski and J. Schaubert, Cathelicidin LL-37: a defense molecule with a potential role in psoriasis pathogenesis, *Exp Dermatol.*, **21**(5), 327 (2012).
 21. E. Suhng, B. H. Kim, Y. W. Choi, H. Y. Choi, H. Cho, and J. Y. Byun, Increased expression of IL-33 in rosacea skin and UVB-irradiated and LL-37-treated HaCaT cells, *Exp Dermatol.*, **27**(9), 1023 (2018).
 22. C. Carlberg, M. Raczyk, and N. Zawrotna, Vitamin D: A master example of nutrigenomic, *Redox Biol.*, **62**, 102695 (2023).