

청색광 조사 망막 손상 유발 랫드에서 마리골드꽃 주정 추출물의 항산화 및 황반색소 개선 효과

이민아¹ · 서유진¹ · 서이슬¹ · 셰파트 무하마드 안자르² · 조셉 모라스 바키² · 프라사드 세타일
파드마나브한² · 바디라즈 구루라즈 브하라드와즈² · 비니시 아라니모세²

¹주영엔에스(주)

²인젝스보타니컬 연구개발부

In Vivo Assessment of the Antioxidant and Macular Pigment Improvement Effects of Marigold Flower Ethanol Extract against Blue Light-Induced Damage in Experimental Rats

Mina Lee¹, Yoojin Seo¹, Yiseul Seo¹, Cheppattu Mohammed Anzar², Joseph Molath Varkey²,
Prasad Chettayil Padmanabhan², Vadiraj Gururaj Bharadwaj², and Bineesh Earanimose²

¹Ju Yeong NS Co., Ltd.

²Department of Research & Development, Ingex Botanicals Pvt., Ltd.

ABSTRACT This study examined the modulatory effects of a marigold flower ethanol extract (MFE) on the anti-oxidant enzymes and macular pigments in the macula and serum of Sprague-Dawley rats. Thirty animals, divided into five groups of six animals each, were used in this research. The animals in Groups 1 and 2 were the normal and diseased control group. The MFE was administered to groups 3, 4, and 5 (low, medium, and high) at doses of 2.57 mg/kg, 5.15 mg/kg, and 10.3 mg/kg body weight, respectively. After pre-treatment, blue light-induced retinal damage in rats was induced by irradiating blue light (10,000 lux) with the vehicle and MFE for two weeks in all groups instead of the normal control. After treatment, blood was taken for histopathological analysis. The clinical symptoms were observed throughout the study, and there was no mortality. The treatment groups and animals induced with blue light (the pathological control group) did not exhibit significant changes in feed intake and body weight. Regarding the biochemical parameters, the groups given the MFE showed significant improvement in the total anti-oxidant capacity, superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities. The plasma lipofuscin concentration decreased significantly, and the lutein and zeaxanthin concentrations increased. In addition the central macular thickness and retinal cell layer thickness reached normal levels. The MFE has dose-dependent antioxidant activity that offer macular protection against the effects of blue-light.

Keywords: marigold flower ethanol extract, macular pigment optical density, lutein, zeaxanthin

서 론

눈은 건강한 삶을 살기 위해 매우 중요하게 여겨야 하는 감각 기관으로, 빛에 의한 손상에 취약한 기관이다. 눈은 끊임없이 다양한 종류의 빛에 노출되는데, 가시광선(400~700 nm), UV-A(320~400 nm), UV-B(295~320 nm) 등의 빛들이 존재한다. 이 중 파장이 짧을수록 에너지가 커져 안구 손상 가능성이 높는데, 청색광은 가시광선 영역 중에 가장 짧은 파장영역으로 주 발생 요인은 햇빛이다(Lee 등, 2023). 청색광은 세기가 강해 망막 세포를 손상하고 광화학 반응

을 촉진할 수 있다(Cuthbertson 등, 2009). 빛 노출에 의한 시각회로 조절 장애와 과도한 산화적 광분해로 인해 생성되는 독성 대사산물은 일반적으로 망막에 악영향을 주는 것으로 알려져 있으며(Algvere 등, 2006; Hammond 등, 2019), 그중 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 광수용체에서 과도한 빛에 노출되었을 때 발생하는 세포사멸(apoptosis)에 중요한 역할을 하는 것으로(Beatty 등, 2000; Kortuem 등, 2000), 다수의 동물실험 연구 결과로 알려져 있다(Contin 등, 2013; Hafezi 등, 1999; LaVail 등, 1999; Organisciak 등, 1999). 광수용체와 망막색소상피의

Received 5 March 2025; Revised 21 March 2025; Accepted 24 March 2025

Corresponding author: Yiseul Seo, Ju Yeong NS Co., Ltd., 201, Songpa-daero, Songpa-gu, Seoul 05854, Korea, E-mail: sysns@juyeongns.com

© 2025 The Korean Society of Food Science and Nutrition.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

기능장애는 리포푸신 성분인 N-retinyl-N-retinylidene ethanolamine(A2E)(Hammond 등, 2014; Ueda 등, 2016; Wu 등, 2010)과 같이 빛에 의해 유발되는 독성 부산물의 과잉 생산으로 인해 악화한다. 망막색소상피 기능장애로 인해 망막색소변성이 유발되는데 이는 망막 광수용체세포의 세포사멸로 인해 망막변성이 일어나 중국에는 실명을 초래하는 위험한 질환으로(Van Soest 등, 1999), 국내 발생률은 100,000명당 약 1.63~1.64명으로 알려져 있다(Hwang 등, 2022).

루테인과 지아잔틴을 포함한 카로티노이드가 풍부한 식품은 근시 망막병증, 나이 관련 황반변성과 같은 망막 질환의 치료 또는 예방 목적으로 제안되어 오고 있다(Fernández-Albarral 등, 2020; Jia 등, 2017; Ma 등, 2016; Sepahi 등, 2021; Wilson 등, 2021). 망막 내 광독성과 산화 스트레스로부터 보호하는 catalase(CAT), superoxide dismutase(SOD) 및 glutathione peroxidase(GSH-Px)와 같은 항산화 효소와 루테인, 지아잔틴, 비타민 C, 비타민 E와 같은 항산화제를 적절한 수준으로 유지하고(Zarbin, 2004), 혈액이나 조직 내 ROS를 제거하는 능력인 총 항산화능(total antioxidant capacity, T-AOC)을 유지하는 것은 매우 중요하다(Bartosz, 2003).

마리골드 꽃(*Tagetes erecta*)은 루테인과 지아잔틴의 가장 좋은 상업적 공급원 중 하나이다(Jia 등, 2017). *Tagetes* 속은 국화과에 속하며 일반적으로 마리골드라고 불리고, 훌륭한 약리적 및 관상적 가치로 인해 전 세계적으로 재배된다. *Tagetes* 추출물은 주로 항균, 항염, 항산화 및 상처 치유와 같은 다양한 약리적 효과를 나타낸다. 또한 이 종은 루테인, 지아잔틴 및 카로티노이드와 같은 잠재적인 치료적 활성 화합물을 포함하는 것으로 알려져 있다(Gupta, 2014; Park 등, 2017; Vasudevan 등, 1997). 루테인과 지아잔틴은 다수의 설치류 동물시험에서 경구투여 시, 혈청 내 항산화 효소(CAT, SOD, GSH-Px) 농도를 증가시키며, 망막 조직 내 세포사멸 인자(Bcl-2, Bax, caspase-3)와 로돕신 발현이 증가하여 망막 내 황반 기능에 도움을 주는 것으로 알려져 있으며(Sahin 등, 2019; Sahin 등, 2023; Wang 등, 2014), 인체 적용 시험에서 황반색소 밀도를 개선하는 것으로 확인되었다(Stringham 등, 2016; Stringham 등, 2017). 그러나 광 손상에 의한 망막의 구조 및 조직학적 변화에 관한 관찰 결과 등이 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 마리골드꽃 주정 추출물이 청색광으로 인해 망막 손상이 유발된 Sprague-Dawley rat 모델에서 항산화 효소 증가로 인한 총항산화력 개선에 대한 효과와 리포푸신 억제를 통한 망막의 구조 및 조직학적 변화를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

마리골드꽃 주정 추출물 제조

마리골드꽃 주정 추출물(marigold flower extract, MFE)은 인도산 건조 마리골드꽃(*Tagetes erecta*)을 주정으로 추출하여 검화 및 결정화한 후 해바라기유와 혼합하여 제조한 것으로 루테인과 지아잔틴 비율 5:1(루테인 200 mg/g, 지아잔틴 40 mg/g)로 표준화된 원료로 Ingex Botanicals Pvt., Ltd.로부터 제공받았다.

실험동물

8~10주령의 수컷 Sprague-Dawley rat을 KCC BIO-LABS Pvt., Ltd.에서 구입하였고 적응 및 연구 기간에 물과 사료를 충분히 공급하였다. 사료(chow diet) 표준식이를 급여하여 적정환경(온도 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대 습도 30~70%)에서 사육하였다. 멸균 옥수수 속대를 깔짚으로 사용하였고 매일 교체하였다(KCC BIO-LABS Pvt., Ltd. 등록 번호: 2066/PO/RcBiBt-S/Bt-L/19/CPCSEA). 본 연구는 Radiant Research Services Pvt., Ltd.의 기관 동물윤리위원회(IAEC)에서 승인하였으며, 동물실험 통제 및 감독 위원회의 지침에 따라 수행하였다(CCSEA 등록 번호: 1803/PO/RcBiS/2015/CCSEA). 불편함, 통증을 보이는 부작용 발생 즉시 수의사와 연구책임자에 보고하도록 하였다.

실험재료

본 실험에 사용된 루테인, 지아잔틴은 Sigma Aldrich 표준품에 따라 검증된 내부 표준품이며, Dulbecco's phosphate buffer saline, 메탄올, 트리에틸아민, 포름산, 아세트 니트릴은 Merck Life Science Pvt., Ltd.에서 구입하여 사용하였다. 오르토인산은 Qualigens Pvt., Ltd.에서 구입하였으며, 카르복시메틸 셀룰로오스는 Loba Chemi Pvt., Ltd.에서 구입하여 사용하였다. Davidson 용액 제조에 사용된 포름알데히드와 빙초산은 SD Fine Chem Ltd.에서 구입하였고, 에탄올은 RCP Distilleries Pvt., Ltd.에서 구입하여 사용하였다.

실험설계

일주일 적응 후, 30마리의 동물을 무작위로 6마리씩 5개의 군으로 나누었다. G1(정상군, 0.5% carboxy methyl cellulose(CMC) 10 mL/kg), G2(대조군, 망막 손상 유발 + 0.5% CMC 10 mL/kg), G3(저농도시험군, 망막 손상 유발 + 2.57 mg/kg BW MFE), G4(중농도시험군, 망막 손상 유발 + 5.15 mg/kg BW MFE), G5(고농도시험군, 망막 손상 유발 + 10.3 mg/kg BW MFE)로, 7일 동안 경구투여하였다. 이후, 2주간 시험물질 경구투여와 함께 청색광(10,000 lux, SPI-24124003, HATCO Ind)을 조사하여 망막 손상을 유도하였다. MFE는 청색광 조사 30분 전에 투여하였다. 청색광을 하루에 1번 1시간 동안 조사하였고, 조사하는 동안 암실 조건을 24시간 동안 유지하였다. 청색광 조사 후, MFE를 2주 동안 경구투여하였다. 이소플루란 마취하에 혈액을 채취하고, 모든 랫트에게 CO₂ 가스로 마취시켜 안구를 제거하

여 조직병리학적 평가에 사용하였고, 황반 균질물을 사용하여 루테인과 지아잔틴의 총 수준을 평가하였다.

관찰

연구 기간에 동물을 하루에 두 번 관찰하여 비정상적인 행동이나 모습, 빈사 상태 또는 사망한 동물을 확인하였다. 투여 후 예상되는 효과의 피크 주기를 고려하여 임상적 징후를 매일 같은 시간에 관찰하였다. 사망물을 포함한 모든 독성 지표가 기록되었으며, 지속적인 이상행동과 장기간의 분만 징후도 기록되었다. 체중은 분만 시, 무작위 배정 당일, 첫 번째 투여 전, 일주일에 한 번, 마지막 날에 기록하였다. 사료 섭취량은 연구 기간 매주 계산되어 보고되었다. 이소플루란 마취제를 사용하여 처리 기간이 끝날 때 각 동물을 희생시켰다. 또한, 루테인과 지아잔틴 수준을 측정하기 위해 한쪽 눈의 황반을 사용하였고, 나머지 눈은 조직학적 검사를 위해 사용하였다. 연구 기간이 끝날 때 모든 동물의 혈액은 생화학적 매개변수 측정을 위해 사용하였다.

루테인, 지아잔틴, 리포푸신 함량 및 항산화 효소 활성 분석

루테인과 지아잔틴의 함량을 분석하기 위해 망막의 황반 조직과 혈장 샘플을 사용하였다. 멸균상태에서 채취된 황반 조직 100 mg을 phosphate buffer saline 2 mL에 넣고 균질기(RQ-127 A/D, Remi Sales&Engineering Ltd.)를 사용하여 2,000 rpm, 2~4°C에서 균질화한 후, 3.835×g에서 10~15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 혈장 샘플은 고체상 추출법(solid phase extraction)을 사용하여 제조하였다. 혈장 샘플의 단백질을 침전시켜 불순물을 제거하여 정확도를 높이고자(Baek과 Emil, 1993), 혈장 샘플 500 µL에 아세트니트릴에 0.1% 포름산 1,500 µL를 별도로 마이크로 튜브(Eppendorf)에 넣고 2분간 진탕한 후 1,254×g에서 5분간 원심분리하였다. 표준 용액은 루테인과 지아잔틴 각각 5 mg을 정밀히 칭량하여 5 mL 메스 플라스크에 넣고, 메탄올 2 mL를 가하여 초음파 분쇄기(2KR112428, Life-Care Equipments Pvt., Ltd.)로 혼합물을 용해한 후 메탄올로 정용하여 제조하였다. 완충 용액은 정확하게 측정된 MilliQ water(Direct-Q®3, Merck)를 1,000 mL 비커에 옮기고 트리에틸아민 5 mL를 넣어 동일한 양으로 부피를 채운 다음, 오르토인산으로 pH 4.0으로 조절하여 제조하였다. 완충 용액은 분석에 사용하기 전에 여과하였다. 본 분석에서 High Performance Liquid Chromatography(HPLC; 2696 PDA detector, Waters Co.)를 사용하였으며 HPLC 분석 조건은 Table 1과 같다.

T-AOC와 항산화 효소인 SOD, CAT, GSH-Px 활성, 리포푸신(lipofucin) 함량은 ELISA kit(BT Lab)을 이용하여 측정하였다.

조직병리학적 분석

망막 조직을 Hematoxylin & Eosin(H&E) 방법으로 염색

Table 1. HPLC condition for lutein and zeaxanthin analysis

Lutein and zeaxanthin	
Instrument	HPLC (2696 PDA detector)
Column	C18 (150×4.6 mm, 5 µm)
Injection volume	10 µL
Column oven temp.	Ambient
Flow rate	0.5 mL/min
Mobile phase	0.5% triethylamine : acetonitrile (70:30)

하여 조직병리학적 변화를 평가하였다. 망막색소상피의 미세구조는 FE-SEM(Zeiss FESEM SIGMA VP 360, Zeiss Sigma)을 사용하여 측정하였다. 평균 중심황반두께(central macular thickness)와 망막상피세포층(retinal epithelial cell layer) 두께는 소프트웨어(Zeiss software (Edax-INCA))를 통해 측정하였고, 단위는 픽셀에서 마이크로미터로 변환하였다.

통계분석

Graph-Pad Prism Software(ver 5.01)를 사용하여 체중, 사료 섭취량, 임상 화학 및 바이오마커를 포함한 모든 데이터를 유의수준 $P<0.05$ 로 설정하여 판단하였다. 모든 결과는 평균±표준편차로 나타내었고, 사후검정은 Turkey's test를 사용하여 대조군과 시험군 간의 유의미한 차이를 확인하였다.

결과 및 고찰

임상증상 및 체중, 사료 섭취량

정상군을 제외한 모든 군은 망막변성을 유발하기 위해 2주 동안 청색광을 조사하였다. 연구 기간에 어떤 군에서도 사망한 동물은 없었으며, 유의미한 임상적 증상이나 행동 패턴이 관찰되지 않았다. 체중과 사료 섭취량은 정상군에서 대조군 대비 통계적으로 유의적인 차이가 나타났지만 유의미한 차이는 아니었다. 체중은 대조군(G2)과 모든 시험군(G3, G4, G5) 간 유의적인 차이는 없었다(Table 2). 사료 섭취량 또한 대조군(G2)과 모든 시험군(G3, G4, G5) 간 유의적인 차이는 없었다(Table 3).

혈장 내 항산화 효소 및 리포푸신 농도 변화

황반은 눈에서 ROS 생성에 가장 취약한 부위이며, 손상은 주로 외부 손상에 장기간 노출되어 발생한다(Beatty 등, 2000; Cai 등, 2000). CAT, SOD, GSH-Px와 같은 항산화 효소는 망막색소상피세포와 광수용체에 대한 산화 스트레스 관련 손상을 예방하는 데 필수적이다(Frank 등, 1999; Tokarz 등, 2013). 본 연구에서는 T-AOC와 주요 항산화 효소인 SOD, CAT, GSH-Px의 활성을 측정하였다(Table 4). 청색광이 조사된 대조군은 정상군과 비교했을 때 혈장에서 T-AOC의 수준이 유의적으로 감소하였고($P<0.0001$), SOD, CAT, GSH-Px의 활성도 유의적으로 감소하였다($P<$

Table 2. Effect of marigold flower ethanol extract on animal body weights (unit: g)

Group	Week 0	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5
G1	212.77±1.53	216.25±1.96**	222.24±2.23**	227.02±2.02**	231.69±1.99*	238.00±1.75
G2	216.07±1.20	219.69±1.32	226.73±1.57	231.40±1.37	235.41±1.28	238.48±2.55
G3	218.33±1.60	221.67±1.55	227.38±2.35	232.47±2.44	236.09±2.60	242.07±3.00
G4	216.57±2.19	220.45±2.05	228.03±1.08	233.39±1.51	238.04±1.37	243.50±1.46
G5	213.98±1.82	218.19±2.38	225.06±2.61	229.75±2.48	234.60±2.55	239.85±3.31

All results were expressed as the mean±standard deviation (n=6).

Statistical significances are compared between pathological control (G2) versus other groups (G1, G3, G4, & G5) (* $P<0.05$, ** $P<0.001$). G1: normal control (0.5% CMC), G2: pathological control (blue light induced + 0.5% CMC), G3: treatment low dose (blue light induced + 2.57 mg/kg bw/d MFE), G4: treatment medium dose (blue light induced + 5.15 mg/kg bw/d MFE), G5: treatment high dose (blue light induced + 10.3 mg/kg bw/d MFE).

CMC: carboxy methyl cellulose, MFE: marigold flower extract.

Table 3. Effect of the marigold flower ethanol extract on animal feed consumption (unit: g)

Groups	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5
G1	110.26±4.58	102.69±6.11	103.16±3.54*	109.30±6.65	107.74±5.60
G2	116.24±8.66	108.59±5.27	114.04±9.54	105.66±4.08	108.39±6.88
G3	115.47±8.89	111.16±12.54	118.51±4.83	107.73±4.41	103.01±8.93
G4	118.76±5.55	116.94±13.23	110.54±6.36	105.69±8.14	108.60±4.61
G5	115.89±10.04	118.21±15.93	118.89±8.27	112.64±5.64	106.31±10.82

All results were expressed as the mean±standard deviation (n=6).

Statistical significances are compared between pathological control (G2) versus other groups (G1, G3, G4, & G5) (* $P<0.05$). G1: normal control (0.5% CMC), G2: pathological control (blue light induced + 0.5% CMC), G3: treatment low dose (blue light induced + 2.57 mg/kg bw/d MFE), G4: treatment medium dose (blue light induced + 5.15 mg/kg bw/d MFE), G5: treatment high dose (blue light induced + 10.3 mg/kg bw/d MFE).

CMC: carboxy methyl cellulose, MFE: marigold flower extract.

0.0001). MFE를 경구투여한 시험군(G3, G4, G5) 모두에서 T-AOC, SOD, CAT, GSH-Px 활성이 대조군 대비 유의적으로 증가하였다($P<0.001$). 고농도시험군(G5)의 경우 대조군 대비 T-AOC 29.14%, CAT 38.20%, SOD 46.52%, GSH-Px 57.82% 증가하였음을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과는 Sahin 등(2023)과 Sahin 등(2019)에 의해 발표된 마리골드꽃 추출물의 광조사로 망막변성이 유발된 설치류 모델에서의 혈청 내 항산화 효소(SOD, CAT, GSH-Px) 증가 결과와 동일하며, 이를 통해 루테인과 지아잔틴을 함유한 MFE는 청색광으로 인한 망막의 산화 스트레스를 개선하는데 훌륭한 보충제로 작용할 수 있음을 재확인할 수 있었다.

리포푸신은 세포 분열이 끝난 세포인 심근세포와 뉴런과 같은 세포에서 흔히 발견되며 망막 상피세포에서 그 잔여물인 드루젠을 형성 및 축적하여 황반변성을 유발하는 것으로 알려져 있다. 혈장 내 리포푸신 함량은 중·고농도시험군(G4, G5)에서 대조군 대비 용량 의존적으로 유의하게 감소하였고($P<0.001$), 특히 고농도군(G5)에서 약 1.9배 감소한 것으로 나타났다($P<0.0001$). 이러한 결과는 MFE가 광산화에 의해 유도되는 리포푸신 축적으로 단백질 손상과 그 잔여물의 축적을 억제함으로써 황반변성 유발을 저해하는 것으로 판단된다.

Table 4. Effect of the marigold flower ethanol extract on biomarker parameter

Groups	T-AOC (mM)	SOD (ng/mL)	Catalase (ng/mL)	GSH-Px (ng/mL)	Lipofuscin (ng/mL)
G1	1.171±0.10***	8.36±1.03***	164.81±8.89***	87.59±2.55***	3.44±0.70***
G2	0.929±0.04	5.00±1.03	85.55±8.75	33.98±5.28	6.84±0.94
G3	1.148±0.07**	6.64±0.68**	87.13±12.53	44.33±3.72***	5.74±1.01
G4	1.155±0.08***	7.26±0.33***	112.68±4.83***	53.292±3.12***	5.07±0.56**
G5	1.311±0.13***	9.35±0.76***	138.42±3.94***	78.43±4.60***	3.56±0.53***

All results were expressed as the mean±standard deviation (n=6).

Statistical significances are compared between pathological control (G2) versus other groups (G1, G3, G4, & G5) (** $P<0.001$, *** $P<0.0001$).

G1: normal control (0.5% CMC), G2: pathological control (blue light induced + 0.5% CMC), G3: treatment low dose (blue light induced + 2.57 mg/kg bw/d MFE), G4: treatment medium dose (blue light induced + 5.15 mg/kg bw/d MFE), G5: treatment high dose (blue light induced + 10.3 mg/kg bw/d MFE).

T-AOC: total antioxidant capacity, SOD: superoxide dismutase, GSH-Px: glutathione peroxidase, CMC: carboxy methyl cellulose, MFE: marigold flower extract.

Table 5. Effect of marigold flower ethanol extract on lutein and zeaxanthin concentration from macula and plasma by HPLC (unit: ng/mL)

Groups	Lutein concentration		Zeaxanthin concentration	
	Macula	Plasma	Macula	Plasma
G1	2,754.83±14.68***	2,261.50±19.98***	1,154.00±48.10***	—
G2	— ¹⁾	—	—	—
G3	—	—	—	—
G4	—	—	—	—
G5	2,560.50±14.28***	2,551.33±15.29***	1,655.67±18.05***	—

All results were expressed as the mean±standard deviation (n=6).

Statistical significances are compared between pathological control (G2) versus other groups (G1, G3, G4, & G5) (** $P<0.0001$). G1: normal control (0.5% CMC), G2: pathological control (blue light induced + 0.5% CMC), G3: treatment low dose (blue light induced + 2.57 mg/kg bw/d MFE), G4: treatment medium dose (blue light induced + 5.15 mg/kg bw/d MFE), G5: treatment high dose (blue light induced + 10.3 mg/kg bw/d MFE).

CMC: carboxy methyl cellulose, MFE: marigold flower extract.

¹⁾Lutein and zeaxanthin levels in macula and plasma were found to be below limit of quantification (BLOQ) in G2, G3, G4 groups. Zeaxanthin levels in plasma were found to be BLOQ in all groups.

혈장 및 망막 내 루테인, 지아잔틴 농도

황반 색소의 주요 성분인 루테인과 지아잔틴은 망막의 형태학적 및 기능적으로 중요한 역할을 한다(Ma 등, 2012). 본 연구에서 망막의 루테인과 지아잔틴 수준은 대조군(G2), 저·중농도시험군(G3, G4) 외 시험군에서는 검출한계 미만으로 나타나 값을 측정할 수 없었다(Table 5). 고농도시험군(G5)에서 루테인과 지아잔틴 농도가 대조군 대비 유의 개선되어($P<0.0001$) 정상군과 유사한 수준으로 나타났다. 이러한 결과는 시험물질의 투여가 체내 루테인, 지아잔틴 정상 수준의 농도를 유지하여 빛에 의한 망막 손상으로부터 눈을 보호하고 황반부의 정상적 기능에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

조직병리학적 분석

리포푸신은 노화로 인해 망막색소상피에 축적된다. 리포푸신은 상당한 광반응성을 나타내어 망막 광 손상을 증가시키고 황반변성에 기여한다(Rózanowski 등, 1998). 또한 리포푸신의 축적과 광산화는 망막 내 바깥핵층(outer nuclear layer, ONL)의 광수용체 손상 및 사멸을 유도하여 ONL 및 망막의 두께가 감소할 수 있다(Shin 등, 2023). 본 연구에서는 청색광을 조사하여 망막변성을 유발한 랫드의 망막색소상피의 미세구조를 H&E 염색과 FE-SEM을 촬영하여 평가하였다. FE-SEM 관찰 결과 청색광 노출로 인해 대조군에서 망막 내 리포푸신 과립(lipofuscin granule)의 다량 축적이 확인됐지만, 정상군과 시험군(G3~G5)에서는 대조군보다 축적량이 적은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 또한 고농도시험군(G5)은 중심황반두께와 망막상피세포층두께가 대조군 대비 유의적으로 증가하여($P<0.001$) 정상군 수준에 도달하였다(Table 6). H&E 염색을 통한 망막 조직의 구조적 분석 결과, 망막의 ONL의 두께가 대조군은 정상군 대비 얇아졌으나, 시험군(G3~G5)은 대조군 대비 두꺼운 것을 확인할 수 있었고 중·고농도시험군은 정상군 수준의 ONL 두께를 나타내어 MFE의 투여는 용량 의존적으로 ONL의 두께

Table 6. Effect of marigold flower ethanol extract on central macular thickness (CMT) and retinal epithelial cell layer (RECL) thickness (unit: μ m; converted from pixel values)

Groups	CMT	RECL thickness
G1	368.50±7.42***	267.17±41.15***
G2	122.00±8.75	109.80±15.56
G3	143.75±10.33	124.83±10.57
G4	210.17±12.61***	142.50±21.85
G5	301.50±38.63***	165.61±20.60**

All results were expressed as the mean±standard deviation (n=6). Statistical significances are compared between pathological control (G2) versus other groups (G1, G3, G4, & G5) (** $P<0.001$, *** $P<0.0001$).

G1: normal control (0.5% CMC), G2: pathological control (blue light induced + 0.5% CMC), G3: treatment low dose (blue light induced + 2.57 mg/kg bw/d MFE), G4: treatment medium dose (blue light induced + 5.15 mg/kg bw/d MFE), G5: treatment high dose (blue light induced + 10.3 mg/kg bw/d MFE).

CMC: carboxy methyl cellulose, MFE: marigold flower extract.

를 회복시켰다(Fig. 2). 이와 같은 결과로 MFE 투여 시, 광산화로 인해 유발되는 리포푸신 침착을 억제하고 망막 손상을 보호하여 망막의 기능뿐만 아니라 구조적 변성을 억제할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

눈은 건강에 해로운 생활 방식, 알코올 중독, 흡연, 자외선 손상, 컴퓨터 및 모바일 기기에서 장시간의 청색광 노출, 당뇨병 및 비만에 의해 시력 저하, 망막변성 등이 유발될 수 있다. 특히 청색광은 망막 및 안구 산화 손상의 원인이며 리포푸신 축적으로 인한 망막의 변화는 황반변성으로 이어질 수 있다. 루테인과 지아잔틴은 황반에 축적되어 항산화제로서 유익한 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에 따르면 루테인과 지아잔틴을 함유한 마리골드꽃 주정 추출물은 청색광으로 인한 망막변성이 유발된 랫드에서 체내 루테인, 지아잔틴 수준과 항산화 효소(SOD, CAT, GSH-Px)

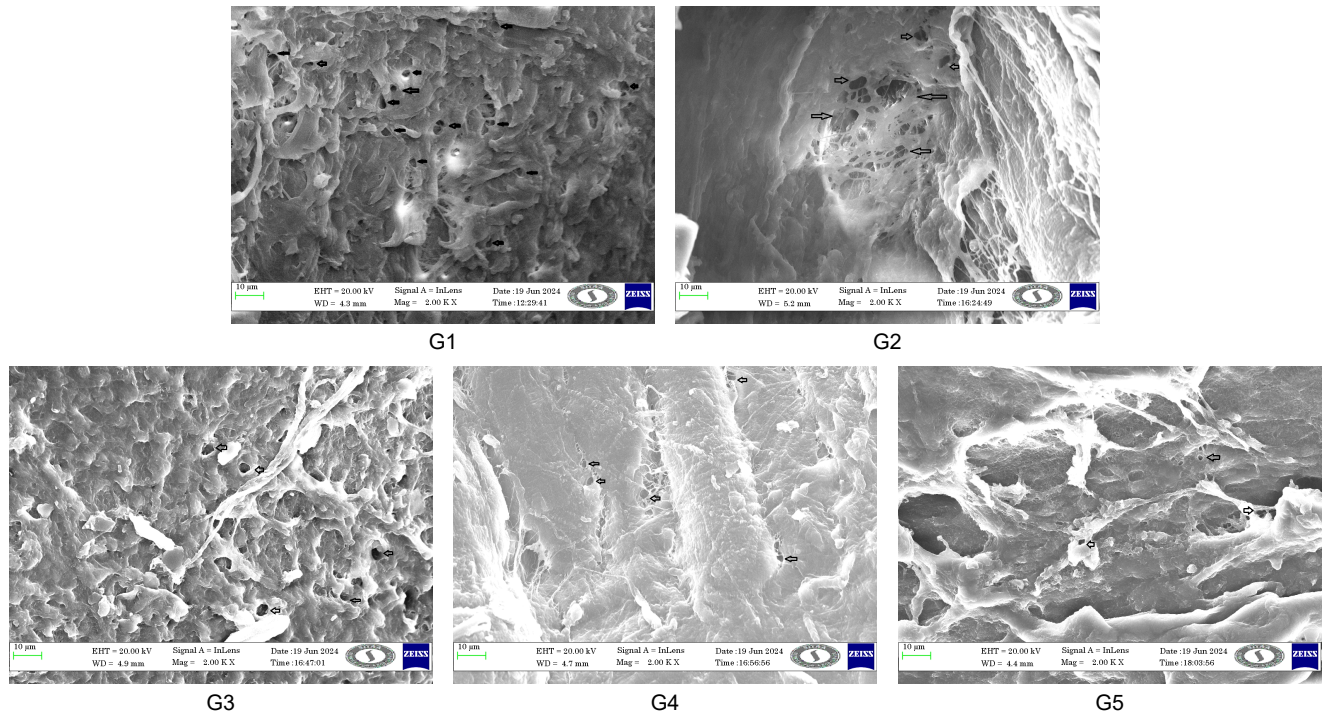


Fig. 1. Effect of marigold flower ethanol extract on eye histopathology by field emission scanning electron microscope (FE-SEM). G1, G2, G4: ultrastructure RPE retinal layer, FE-SEM images obtained as indicated, black arrows point to some lipofuscin granules, scale bar=10 µm; G3, G5: retinal RPE region, FE-SEM images obtained as indicated black arrows point to some lipofuscin granules, scale bar=10 µm. RPE: retinal pigment epithelium.

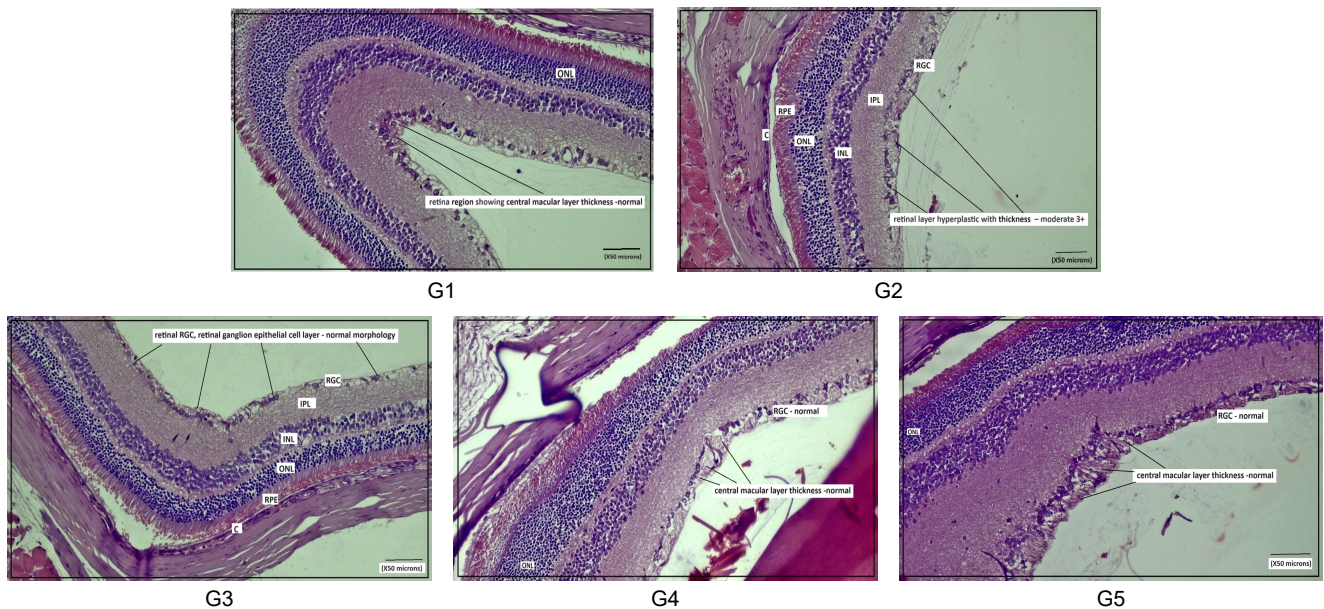


Fig. 2. Effect of marigold flower ethanol extract on eye histopathology by H and E staining. G1: central macular layer thickness-normal (100×), black scale bar=50 microns (µm); G2: central macular layer congestion with oedematous-mild 2+ (100×), black scale bar=50 µm; G3: central macular layer thickness-normal (100×), black scale bar=50 µm; G4: central macular layer thickness-normal (100×), black scale bar=50 µm; G5: central macular layer thickness-normal (100×), black scale bar=50 µm. RGC: retinal ganglion cells.

활성을 증가시킴으로써 총항산화력을 증가시켜 망막의 산화 스트레스를 완화함을 확인하였다. 또한 혈액 내 리포푸신 수준과 망막의 리포푸신 과립 축적을 감소시켜 망막 손상을

억제하였으며, 또한 ONL과 중심황반 두께와 망막상피세포 층 두께를 증가시켜 정상군 수준으로 회복시켰다. 이러한 결과는 마리골드꽃 주정 추출물의 항산화 기능으로 인한 망

막 보호 효과를 재입증했을 뿐만 아니라, 새롭게 확인된 중심황반 두께와 망막상피세포층 두께 개선은 마리골드꽃 주정 추출물이 망막의 구조적 변성을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 Inge Botanicals Pvt., Ltd.에서 재원을 받아 수행된 연구입니다.

REFERENCES

- Algvere PV, Marshall J, Seregard S. Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard. *Acta Ophthalmol Scand*. 2006. 84:4-15.
- Baek CS, Emil TL. High performance liquid chromatographic assay of acebutolol and its acetyl metabolite in plasma. *J Kor Pharm Sci*. 1993. 23:133-137.
- Bartos G. Total antioxidant capacity. In: Spiegel HE, Nowacki G, Hsiao KJ, editors. *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier Science. 2003. p 220-272.
- Beatty S, Koh HH, Henson D, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 2000. 45:115-134.
- Cai J, Nelson KC, Wu M, et al. Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retinal Eye Res*. 2000. 19:205-221.
- Contín MA, Arietti MM, Benedetto MM, et al. Photoreceptor damage induced by low-intensity light: Model of retinal degeneration in mammals. *Mol Vis*. 2013. 19:1614-1625.
- Cuthbertson FM, Peirson SN, Wulff K, et al. Blue light-filtering intraocular lenses: Review of potential benefits and side effects. *J Cataract Refract Surg*. 2009. 35:1281-1297.
- Fernández-Albarral JA, De Hoz R, Ramírez AI, et al. Beneficial effects of saffron (*Crocus sativus* L.) in ocular pathologies, particularly neurodegenerative retinal diseases. *Neural Regen Res*. 2020. 15:1408-1416.
- Frank RN, Amin RH, Puklin JE. Antioxidant enzymes in the macular retinal pigment epithelium of eyes with neovascular age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 1999. 127:694-709.
- Gupta P. Carotenoids of therapeutic significance from marigold. *Nat Prod Chem Res*. 2014. 2:1000e110. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000e110>
- Hafezi F, Marti A, Grimm C, et al. Differential DNA binding activities of the transcription factors AP-1 and Oct-1 during light-induced apoptosis of photoreceptors. *Vision Res*. 1999. 39:2511-2518.
- Hammond BR, Johnson BA, George ER. Oxidative photodegradation of ocular tissues: Beneficial effects of filtering and exogenous antioxidants. *Exp Eye Res*. 2014. 129:135-150.
- Hammond BR, Sreenivasan V, Suryakumar R. The effects of blue light-filtering intraocular lenses on the protection and function of the visual system. *Clin Ophthalmol*. 2019. 13:2427-2438.
- Hwang JH, Nah SK, Lew YJ, et al. Clinical characteristics at initial diagnosis of Korean patients with retinitis pigmentosa. *J Korean Ophthalmol Soc*. 2022. 63:352-360.
- Jia YP, Sun L, Yu HS, et al. The pharmacological effects of lutein and zeaxanthin on visual disorders and cognition diseases. *Molecules*. 2017. 22:610. <https://doi.org/10.3390/molecules22040610>
- Kortuem K, Geiger LK, Levin LA. Differential susceptibility of retinal ganglion cells to reactive oxygen species. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000. 41:3176-3182.
- LaVail MM, Gorin GM, Yasumura D, et al. Increased susceptibility to constant light in *nr* and *pcd* mice with inherited retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999. 40:1020-1024.
- Lee SJ, Choi HD, Kim MJ, et al. Changes in soft contact lens parameters according to exposure time to blue light. *J Korean Ophthalmic Opt Soc*. 2023. 28:167-175.
- Ma L, Liu R, Du JH, et al. Lutein, zeaxanthin and meso-zeaxanthin supplementation associated with macular pigment optical density. *Nutrients*. 2016. 8:426. <https://doi.org/10.3390/nu8070426>
- Ma L, Yan SF, Huang YM, et al. Effect of lutein and zeaxanthin on macular pigment and visual function in patients with early age-related macular degeneration. *Ophthalmology*. 2012. 119:2290-2297.
- Organisciak DT, Darrow RA, Barsalou L, et al. Light-induced damage in the retina: Differential effects of dimethylthiourea on photoreceptor survival, apoptosis and DNA oxidation. *Photochem Photobiol*. 1999. 70:261-268.
- Park YJ, Park SY, Valan Arasu M, et al. Accumulation of carotenoids and metabolic profiling in different cultivars of *Tageetes* flowers. *Molecules*. 2017. 22:313. <https://doi.org/10.3390/molecules22020313>
- Rózanowsk AM, Wessels BJ, Boulton CM, et al. Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media. *Free Radic Biol Med*. 1998. 24:1107-1112.
- Sahin E, Orhan C, Sahin N, et al. Lutein/zeaxanthin isomers quercetagen combination safeguards the retina from photo-oxidative damage by modulating neuroplasticity markers and the Nrf2 pathway. *Pharmaceuticals*. 2023. 16:1543. <https://doi.org/10.3390/ph16111543>
- Sahin K, Gencoglu H, Akdemir F, et al. Lutein and zeaxanthin isomers may attenuate photo-oxidative retinal damage via modulation of G protein-coupled receptors and growth factors in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019. 516:163-170.
- Sepahi S, Ghorani-Azam A, Hossieni SM, et al. Pharmacological effects of saffron and its constituents in ocular disorders from in vitro studies to clinical trials: A systematic review. *Curr Neuropharmacol*. 2021. 19:392-401.
- Shin CY, Sun EM, Min J, et al. Inhibitory effect of an extract containing lutein and zeaxanthin on retinal damage. *Korean J Food Sci Technol*. 2023. 55:112-119.
- Stringham JM, O'Brien KJ, Stringham NT. Macular carotenoid supplementation improves disability glare performance and dynamics of photostress recovery. *Eye Vis*. 2016. 3:30. <https://doi.org/10.1186/s40662-016-0060-8>
- Stringham JM, Stringham NT, O'Brien KJ. Macular carotenoid supplementation improves visual performance, sleep quality, and adverse physical symptoms in those with high screen time exposure. *Foods*. 2017. 6:47. <https://doi.org/10.3390/foods6070047>
- Tokarz P, Kaarniranta K, Blasiak J. Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Biogerontology*. 2013. 14:461-482.
- Ueda K, Zhao J, Kim HJ, et al. Photodegradation of retinal bisretinoids in mouse models and implications for macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016. 113:6904-6909.
- Van Soest S, Westerveld A, De Jong PTVM, et al. Retinitis pigmentosa: Defined from a molecular point of view. *Surv Ophthalmol*. 1999. 43:321-334.

- Vasudevan P, Kahsyap S, Sharma S. *Tagetes*: A multipurpose plant. *Bioresour Technol.* 1997. 62:29-35.
- Wang S, Wang M, Zhang S, et al. Oxidative stress in rats with hyperhomo-cysteinemia and intervention effect of lutein. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014. 18:359-364.
- Wilson LM, Tharmarajah S, Jia Y, et al. The effect of lutein/zeaxanthin intake on human macular pigment optical density: A systematic review and meta-analysis. *Adv Nutr.* 2021. 12: 2244-2254.
- Wu Y, Yanase E, Feng X, et al. Structural characterization of bisretinoid A2E photocleavage products and implications for age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010. 107:7275-7280.
- Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.* 2004. 122:598-614.