

Endothelin-1 생성 저해와 멜라닌생성 저해에 의한 신선초 추출물의 미백 효과

박 선 희 · 이 방 용 · 한 창 성 · 김 진 국 · 김 경 태 · 김 기 호 · 김 영 희[†]

(주)바이오랜드 생명공학연구소
(2008년 2월 22일 접수, 2008년 6월 12일 채택)

Whitening Effect of *Angelica keiskei* Koidzumi Extract by Inhibition of Endothelin-1 Production and Melanogenesis

Sun Hee Park, Bang Yong Lee, Chang Sung Han, Jin Guk Kim, Kyoung Tae Kim, Ki Ho Kim,
and Young Heui Kim[†]

R&D center, Bioland Ltd., 39-4, Songjung-ri, Byongchon-myon, Chonan-si, Chungnam 330-860, Korea
(Received February 22, 2008; Accepted June 12, 2008)

요약: 신선초 추출물 및 그의 분획물의 미백 효과를 알아보기 위하여, B16 멜라노마와 정상 사람 표피 세포를 이용하여 멜라닌 생성에 관련된 다양한 실험을 실시하였다. 70 % ethanol 용매로 추출한 신선초 추출물을 연속적으로 분획하여 hexane, ethyl acetate, *n*-butanol, 물 분획물을 얻었다. 버섯 티로시나제 활성 실험에서 신선초 추출물 및 그의 분획물은 저해 효과를 보이지 않았으나, B16 멜라노마를 이용한 멜라닌 생성 실험에서는 hexane 분획물과 ethyl acetate 분획물에서 억제 효과를 보였다. 세포내 멜라닌 생성의 초기 단계에 작용하는 티로시나제 단백질의 활성을 조사한 결과, hexane 분획($IC_{50} < 25 \mu\text{g/mL}$)과 ethyl acetate 분획($IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$)은 알부틴($IC_{50} \leq 250 \mu\text{g/mL}$)과 비교 시 더 낮은 농도에서 현저하게 티로시나제 활성을 저해시켰다. 따라서 신선초 추출물의 미백 작용 기전을 규명하기 위하여, 멜라노사이트의 mitogen으로 작용하는 endothelin-1 (ET-1)과 UVB에 의해 생성되어 염증을 매개하는 interleukin-1 α (IL-1 α)의 생성량을 측정하였다. Hexane 및 ethyl acetate 분획물은 IL-1 α 의 생성에 영향을 끼치지 못했으나, 표피세포에서 UVB에 의해 생성된 ET-1을 농도에 따라 감소시킴으로써 멜라노사이트의 melanogenesis를 저해하는 것으로 확인되었다. 따라서 신선초 추출물은 미백 효능을 갖는 화장품 소재로써 사용 가능하리라 판단된다.

Abstract: In order to investigate the potential of a *Angelica keiskei* Koidzumi extract and its fractions as an active ingredient for whitening cosmetics, we prepared *Angelica keiskei* Koidzumi extract (70% ethanol), and the aqueous suspension was successively extracted with hexane, ethyl acetate (EA), and *n*-butanol fraction. We measured their inhibitory effects on mushroom tyrosinase and melanin synthesis in B16 melanoma cells and normal human keratinocytes *in vitro*. They did not show inhibitory activity against mushroom tyrosinase and the melanin synthesis except hexane and EA fractions. Hexane and EA fractions markedly inhibited cellular tyrosinase activity at a lower concentration (25 and 5 $\mu\text{g/mL}$, respectively) than arbutin (250 $\mu\text{g/mL}$). We also quantified the released amount of endothelin-1 (ET-1), a mitogen of melanocyte, and interleukin-1 α (IL-1 α), a mediator of UVB-induced inflammation. Hexane and EA fractions did not affect IL-1 α production, but they decreased UVB-induced ET-1 production in normal human keratinocytes in a dose dependant manner. As a result, hexane and EA fractions could inhibit the melanogenesis through the inhibition of UVB-induced ET-1 production in normal human keratinocytes. This result suggests that hexane and EA fractions of *Angelica keiskei* Koidzumi extract could be used as an active ingredient for cosmetics.

Keywords: *Angelica keiskei* Koidzumi, melanogenesis, endothelin-1, interleukin-1 α , tyrosinase

[†] 주 저자 (e-mail: biolandrnd@biolandkorea.com)

1. 서 론

신선초(*Angelica keiskei* Koidzumi)는 미나리과에 속하는 높이 0.5 ~ 1 m의 다년생초로 일본의 팔장도에서 자생하는 것으로 아시다바(Ashidaba, 명일엽)라고 불린다[1]. 우리나라에서는 선남초, 신립초로도 불리며 고혈압, 간장병, 신경통 등 각종 성인병에 효과가 있다고 하며, 녹즙으로 많이 응용되고 있다[2,3]. 신선초의 영양 성분을 보면, 플라보노이드, 쿠마린, 사포닌, 각종 유기산 및 무기질 등이 함유되어 있으며, 불포화 지방산과 비타민의 함량이 높다. 불포화 지방산 중에서는 리놀렌 산이 전초와 줄기에 31 ~ 43 %가 함유되어 있으며, 비타민 C는 100 g 당 20 mg으로 다른 식물에 비해 2배 정도 많은 수치를 보인다[4,5].

신선초 뿌리에서 분리된 생리 활성 물질들로는, angular furanocoumarin의 일종인 archangelicin과 8(S), 9(R)-9-angeloyloxy-8,9-dihydrooroselin이, linear furanocoumarin으로는 psoralen, bergapten, 그리고 xanthotoxin이, chalcone으로는 4-hydroxyderricin, xanthoangelol, 그리고 ashitaba-chalcone이 있다[6]. 이들 중 4-hydroxyderricin과 xanthoangelol은 쥐에 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)와 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)로 피부암을 유도했을 때, 종양 형성을 저해하는 효과를 보였으며[6], 그람 양성 박테리아에 대한 성장 억제 효과를 나타냈다[7]. 또한 유전적으로 당뇨병을 가진 쥐에 적용했을 때, 인슐린과 같은 활성을 보임으로써, 당뇨의 진행을 억제시키는 효과도 보였었다[8].

UVB 조사는 사람 피부의 색소침착과정의 매우 강력한 촉진제이며, 이는 멜라노사이트의 증식과 멜라닌 생성, 그리고 표피세포로의 멜라닌 전달에 관여한다[9]. 그리고 정상 사람 표피 세포는 UVB에 의해 ET-1[10, 11], basic fibroblast growth factor (β -FGF)[12], α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) 등의 분비가 촉진되어 멜라노사이트의 mitogen으로 작용하며, adrenocorticotrophin (ACTH) 또한 멜라노코르틴 수용체(melanocortin receptor)와 결합하게 되면 멜라노사이트를 활성화시킨다[13]. Stem cell factor (SCF)와 그 수용체로 있는 c-kit도 태생기의 멜라노사이트의 유주와 증식에 중요하게 작용한다는 것이 알려져 있다[14]. 이 가운데 혈관내피 세포에서 생성되어 혈관수축작용을 하는 ET-1은 protein kinase C (PKC)와 adenylate cyclase계를 활성화하여 멜라닌세포의 증식 및 티로시나제 활성의

향진에 작용하여 색소침착을 생성시키며[15], UVB 조사된 표피 세포의 농축된 배지를 멜라노사이트에 첨가하면 멜라노사이트의 dendricity가 증가된다는 것이 보고되었다[16]. ET-1은 멜라노사이트의 세포 표면에 존재하는 ET_BR에 결합하여 G protein을 거쳐 phospholipase C (PLC)를 활성화시킨다. 활성화된 PLC에 의해 inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)와 diacylglycerol (DAG)이 생성되고, IP₃는 endoplasmic reticulum으로부터 Ca²⁺를 방출시키며 세포 내 Ca²⁺ 농도를 증가시켜 mitogen activated protein kinase (MAPK)의 upstream에 존재하는 Raf-1을 활성화시킨다. 그리고 DAG은 PKC 활성을 통해 MAPK를 활성화시키므로, ET-1은 MAPK 기작을 통해 멜라노사이트의 세포증식과 멜라닌 생성을 촉진한다[16,17].

실제로 기니아 피그의 피부에 UVB를 조사하면 히스타민의 양이 증가되며, 홍반 후에 색소침착이 일어남을 알 수 있다. 또 다른 염증 매개 인자인 IL-1도 표피세포에서 UVB에 의해 현저하게 생성이 증가하며[18], ET-1의 생성에도 관여한다[10].

본 연구진은 제주도의 천연자원으로부터 기능성 화장품 소재로써 사용가능한 새로운 원료를 개발하기 위하여 천연식물을 대상으로 *in vitro* 실험으로 검색을 수행하여 왔고 그 결과를 일부 보고한 바 있다[19]. 이러한 일련의 과정 중에 신선초 추출물이 버섯 티로시나제를 저해하지 않으면서, B16-멜라노마 세포에서는 멜라닌 생성을 저해하는 것을 확인하였다. 따라서, 본 연구에서는 신선초 추출물이 UVB에 의해 피부 표피 세포에서 분비되는 멜라노사이트의 성장인자 및 멜라닌 생성 촉진 인자를 감소시킴으로써 피부 미백 효과를 나타낼 수 있을 것이라 가정하여 미백에 관련된 일련의 실험을 진행하고 그 결과를 보고하고자 한다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 시 약

신선초는 국내산(경동시장)을 사용하였고, B16 멜라노마는 ATCC (American type cell collection, USA)에서 구입하였다. 정상 사람 표피 세포는 연구용으로 사용에 대한 부모의 동의를 받은 신생아의 표피로부터 분리하였으며, 4번의 계대를 거친 세포를 실험에 사용하였다. Hank's balanced salt solution (HBSS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, high glucose), keratinocyte-serum free medium (K-SFM), fetal bovine serum

(FBS)과 trypsin-EDTA 용액은 GIBCO (USA)의 것을 사용하였다. 그 외의 시약은 모두 특급으로 사용하였으며 활성실험에 사용된 시약들은 Sigma-Aldrich (USA)사의 것을 구입하여 사용하였다.

2.2. 신선초 추출물 제조 및 분획

건조된 신선초 지상부 500 g에 70 % ethanol (w/w) 6 kg을 넣어 5 일 동안 상온숙성 하였고, 여과 후 진공 건조하여 페이스트상의 농축물 204 g을 얻었다. 농축물 100 g에 정제수 600 g을 넣어 분산시켰다. 정제수와 동량의 hexane, ethyl acetate, *n*-butanol로 연속적으로 2회 분획, 여과, hexane 분획물 7.8 g, ethyl acetate 분획물 4.4 g, *n*-butanol 분획물 5.4 g, 물 분획물 72 g을 얻었다.

2.3. 버섯 티로시나제 활성 저해효과

티로시나제의 저해활성은 일반적으로 분광학적인 방법으로 측정되어지며 본 실험에서는 A. Vanni and D. Gastaldi의 방법에 따라 측정하였다[20]. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 1.0 mL, 0.3 mg/mL L-tyrosine 수용액 1.0 mL, 1250 unit/mL 버섯 티로시나제 0.1 mL를 혼합한 후 여기에 시료용액을 농도에 따라 각각 0.2 mL를 첨가하여 37 °C에서 10 min 동안 효소반응을 진행 시켰다. 반응용액의 흡광도를 475 nm에서 측정하여 시료의 효소 저해활성을 다음 식에 따라 구하고 효소활성의 50 %를 저해하는 값을 IC₅₀으로 나타내었다.

$$\text{티로시나제 활성 억제율(\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

A : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 475 nm에서 흡광도

B : 시료를 첨가한 반응용액의 475 nm에서 흡광도

2.4. B16 멜라노마를 이용한 멜라닌 생합성 억제 효과 측정

B16 멜라노마를 이용한 멜라닌생합성저해 효과는 Maeda와 Fukuda[21]의 방법을 변형하여 측정하였다. 멜라닌 생성량과 세포수를 동시에 측정하기 위하여 두 세트를 준비하였으며 모든 농도에 따른 웰 수는 3배수로 준비하였다. B16 멜라노마 세포는 10 % FBS와 1 %의 항생제를 첨가한 DMEM에 1 × 10⁵의 밀도로 분주하고 하루 동안 5 % CO₂, 37 °C에서 배양하였다. 그 후 10 % FBS가 첨가된 DMEM으로 갈아준 후 신선초 70 % ethanol 추출물 및 분획물들을 농도별로 배양판에 처리하여 3일 동안 배양하였고, 3일 후 멜라닌 양을 측정할 세트는 1 N NaOH 450 μL를 처리하여 10 min 동안 sonication하였다. 멜라닌이 완전히 용해되면 470 nm에서

흡광도를 측정하였다. 세포 수 측정용 세트는 배지를 제거하고 0.25 mg/mL의 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, M5655, Sigma, USA)를 1 mL 처리하여 37 °C에서 4 h 동안 반응시키고, 그 후 MTT를 제거한 후 dimethylsulfoxide (DMSO)를 2 mL 첨가하여 발색정도를 ELISA reader (Sunrise Tecan, Austria)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. B16 멜라노마를 이용한 티로시나제 활성 저해효과

B16 멜라노마를 100 mm dish에 5 × 10⁵ cell/well로 분주하여 1일 후 10 % FBS가 함유된 DMEM으로 갈아주면서 시료를 농도별로 첨가하였다. 3일 배양 후 배지를 버리고 PBS로 두 번 washing 후 세포를 scraper로 떼어 내어 1.5 mL e-tube에 넣어 원심분리하여 세포의 pellet을 얻었다. 세포에 1 % Triton X-100과 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma, USA)이 첨가된 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 1 mL를 넣고 ice 상에서 1 h 동안 초음파 주사하였다. 그 후 15,000 rpm, 4 °C에서 30 min 동안 원심분리하여 상층액(cell lysates)을 모아 상층액 0.3 mL에 1.5 mM L-Tyrosine (Sigma, USA) 0.3 mL을 첨가하여 37 °C에서 1 h 동안 반응시켜 ELISA reader로 470 nm에서 흡광도를 측정하였다[22]. 단백질은 BCA 방법(Sigma, USA)에 따라 562 nm에서 흡광도로 정량하였다.

2.6. 정상 사람 표피 세포를 이용한 세포 독성 측정

정상 사람 표피 세포를 24-well 배양판에 50 μg/mL bovine pituitary extract (BPE, Gibco, USA)와 5 ng/mL epidermal growth factor, human recombinant (EGF, Gibco, USA)가 첨가한 K-SFM 배지를 사용하여 24-well 배양판에 1 × 10⁵의 밀도로 분주하고 하루 동안 5 % CO₂, 37 °C에서 배양하였다. 그 후 BPE와 EGF가 첨가되지 않은 새 배지로 갈아준 후 시료를 농도별로 배양판에 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 0.25 mg/mL의 MTT를 1 mL 처리하여 37 °C에서 4 h 동안 반응시키고, 그 후 MTT를 제거한 후 DMSO를 1 mL 첨가하여 발색정도를 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 파장(reference wavelength) 620 nm 흡광도 값을 뺀 후 세포 독성을 구한다.

2.7. Endothelin-1 (ET-1) mRNA, 단백질 생성량 및 Interleukin-1α (IL-1α) 생성량 측정

정상 사람 표피 세포를 6-well 배양판에 BPE와 EGF

가 첨가한 K-SFM 배지를 사용하여 5×10^4 의 밀도로 분주하고 하루 동안 5 % CO₂, 37 °C에서 배양하였다. 그 후 Ca²⁺ 및 Mg²⁺이 포함되어 있지 않은 HBSS로 두 번 행군 후 HBSS 1 mL 처리 후 UVB 50 mJ/cm²를 조사하였다. UVB 조사 후 HBSS를 버리고 새 배지로 교체하고 시료를 농도별로 처리한 다음 5 % CO₂, 37 °C에서 배양하였다. 48 h 동안 배양 후 배지를 수거하여 IL-1 α 및 ET-1의 분비량 측정 실험에 사용하였다. Endogen사의 사람 IL-1 α ELISA 키트와 IBL (Immuno-Biological Laboratories, Japan)사의 ET-1 키트를 사용하였으며, 방법은 키트의 매뉴얼에 따라 실시하여 ELISA reader로 450 nm에서 측정하였다. 단백질은 BCA 방법(Sigma, USA)에 따라 562 nm에서 흡광도로 정량하였다. ET-1 mRNA 발현량을 조사하기 위해 배지 수거 후 세포에 Trizol (Invitrogen, USA) 1 mL을 첨가하여 Invitrogen사의 RNA 분리법에 따라 RNA를 분리하였다. 자외선 검출기를 이용하여 260 nm에서 RNA 양을 정량한 후, 역전사 중합 반응(reverse transcription-polymerase chain reaction)을 실시하였다. 역전사 중합 반응은 올인원 역전사 중합 반응 키트(all-in-one RT-PCR kit: Superbio, Korea)를 사용하였고, 프라이머와 반응 조건은 아래와 같고, 올인원 역전사 중합 반응 키트의 매뉴얼에 따라 실험을 진행하였다.

ET-1 : sense : 5'-TTTCAGAATGGATTATTTGCTVATG-3'
antisense : 5'-GAAGTCTGTCACCAATGTGCTCG-3'
50 °C에서 30 min 동안 역전사 후 96 °C에서 3 min 동안 역전사 효소를 불활성화, 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min 동안 30 cycle로 PCR 반응

Actin : sense : 5'-GAGACCTTCAACACCCAGCC-3'
antisense : 5'-GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'
50 °C에서 30 min 동안 역전사 후 96 °C에서 3 min 동안 역전사 효소를 불활성화, 94 °C 1 min, 62 °C 1 min, 72 °C 1 min 동안 22 cycle로 PCR 반응

3. 결과 및 고찰

3.1. 버섯 티로시나제 활성 저해효과

신선초 추출물 및 각 분획물의 버섯 티로시나제 활성 저해 효과를 측정된 결과, 최고 농도 400 μ g/mL에서 저해 효과를 보이지 않았다(데이터 생략).

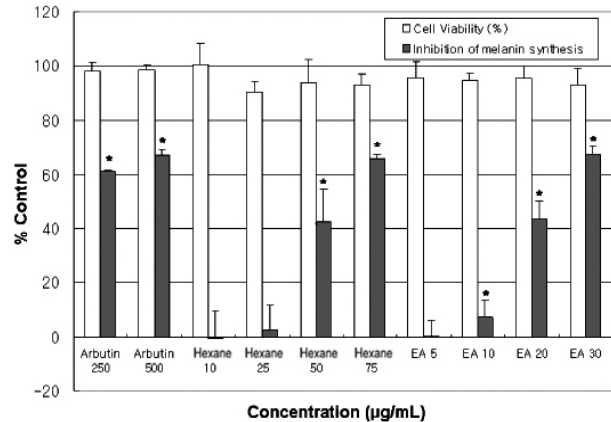


Figure 1. Inhibitory effect of *Angelica keiskei* Koidzumi extracts on melanogenesis using B16 melanoma. The results were expressed as the mean values \pm S.D. (* p < 0.05).

3.2. B16 멜라노마를 이용한 멜라닌 생합성 억제 효과 측정

쥐 유래의 암세포주인 B16 멜라노마를 이용한 멜라닌 생합성량을 Maeda와 Fukuda[21]의 방법을 변형하여 측정하였다. 신선초 추출물 및 각 분획물 중에서 hexane 및 EA 분획물을 제외한 나머지, 즉 신선초 추출물, *n*-butanol 그리고 물 분획물은 멜라닌 생합성량에 영향을 주지 못했다(데이터 생략). Hexane 및 EA 분획물은 Figure 1에서 보는 바와 같이 전 실험 농도에서 세포 독성은 거의 나타나지 않았으며, 농도에 따른 매우 높은 멜라닌 생성 억제 효과를 보였다. 두 분획물 모두 알부틴보다 낮은 농도에서 즉, hexane 분획물은 75 μ g/mL에서, EA 분획물은 30 μ g/mL에서 IC₅₀을 넘었으며, 특히 EA 분획물의 효과가 뛰어나다.

3.3. B16 멜라노마를 이용한 티로시나제 활성 저해효과

티로시나제는 멜라닌 생합성 과정의 속도결정단계인 초기 반응에 작용하는 효소로서, 티로신을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)으로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPAquinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다[23]. B16 멜라노마의 세포내 티로시나제 활성 저해 효과를 측정할 결과, hexane 분획물은 25 μ g/mL, EA 분획물은 5 μ g/mL의 농도부터 IC₅₀을 넘어 뛰어난 티로시나제 활성 저해 효과를 보였으며, 대조군으로 사용된 알부틴(250 μ g/mL)보다 더 낮은 농도에서 비슷한 효과를 보임을 알 수 있다(Figure 2).

따라서, 신선초 hexane 분획과 EA 분획은 멜라닌 생

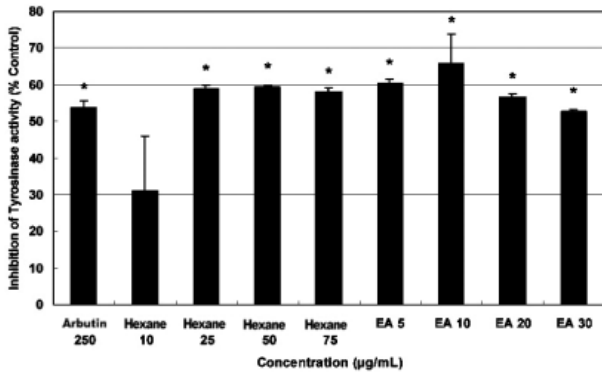


Figure 2. Inhibitory effect of *Angelica keiskei* Koidzumi extracts on tyrosinase activity in B16 melanoma. The results were expressed as the mean values \pm S.D. ($p < 0.05$).

합성 과정의 upstream에 작용하는 티로시나제 단백질의 활성을 저해함으로써, downstream으로의 진행을 저지하여 B16 멜라노마의 멜라닌 합성 억제 효과에 직접적으로 관여하는 것으로 사료된다.

3.4. 정상 사람 표피 세포를 이용한 ET-1 mRNA 발현량과 IL-1 α 및 ET-1 분비량 측정

신선초의 hexane 및 EA 분획물의 정상 사람 표피 세포에 대한 세포 독성을 측정하여(Figure. 3) 독성이 없는 범위에서 ET-1 mRNA 발현량, IL-1 α 그리고 ET-1 분비량을 RT-PCR 및 ELISA 키트를 이용하여 측정하였다.

신선초의 분획물이 표피 세포에서 UVB에 의해 유도된 ET-1의 발현을 감소시켜 궁극적으로 멜라노사이트의 멜라닌 생성을 억제시키는 지 알아보기 위해 정상 사람 표피 세포에 UVB 50 mJ/cm²를 조사하여 RT-PCR 방법으로 ET-1 mRNA 양과 배지로 분비된 ET-1의 양을 측정하였다. Negative control로 사용된 phosphoramidon은 big-ET를 ET로 전환시키는 효소를 저해하는 물질로 세포 배지 내 ET-1 생성량을 줄여들게 하며, 따라서 ET-1 mRNA 발현량에는 영향을 끼치지 않는다. 20 nM의 phosphoramidon을 처리하였을 때, ET-1의 생성량이 줄어들을 알 수 있었다(Figure 4). Hexane 및 EA 분획물은 UVB에 의해 유도된 IL-1 α 의 생성량 감소에 전혀 영향을 끼치지 못했으나, 농도에 따라 ET-1 mRNA와 단백질 생성량을 감소시켰으며, 이는 표피세포에서 UVB에 의해 생성된 ET-1을 감소시켰으므로, 멜라노사이트의 melanogenesis에 영향을 끼쳐 궁극적으로 melanin 생성량을 감소시키는 것으로 사료된다.

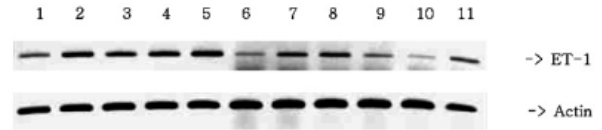


Figure 3. Inhibitory effect of *Angelica keiskei* Koidzumi extracts on UVB-induced ET-1 gene expression in normal human keratinocytes. Lane 1: control, 2: UVB 50 mJ, 3: UVB 50 mJ + hexane 5 μ g/mL, 4: UVB 50 mJ + hexane 10 μ g/mL, 5: UVB 50 mJ + hexane 25 μ g/mL, 6: UVB 50 mJ + hexane 50 μ g/mL, 7: UVB 50 mJ + EA 3 μ g/mL, 8: UVB 50 mJ + EA 4 μ g/mL, 9: UVB 50 mJ + EA 5 μ g/mL, 10: UVB 50 mJ + EA 10 μ g/mL, 11: UVB 50 mJ + phosphoramidon 20 nM.

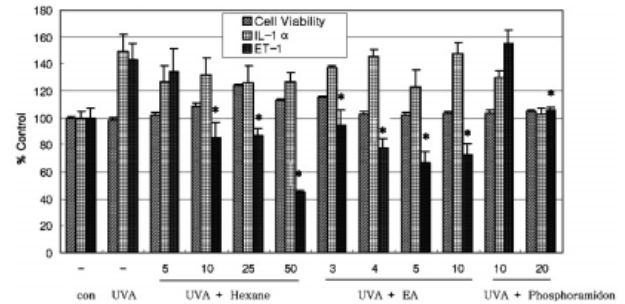


Figure 4. Inhibitory effect of *Angelica keiskei* Koidzumi extracts on UVB-induced IL-1 α and ET-1 release in normal human keratinocytes. The data were expressed as the mean values \pm S.D. IL-1 α and ET-1 release were calculated as the percentage per mg protein. ($p < 0.05$, concentration: μ g/mL; phosphoramidon: nM).

4. 결 론

정상 사람 표피 세포에서 UVB에 의해 유도된 ET-1 유전자 발현과 ET-1 및 IL-1 α 의 단백질 생성량에 대한 신선초 추출물의 hexane 및 EA 분획물의 영향을 조사한 결과, hexane 및 EA 분획물은 IL-1 α 의 생성량은 감소시키지 못했으나, ET-1 유전자 발현 및 단백질 생성량을 감소시켰음을 알 수 있었다. 이 결과로 신선초 추출물의 hexane 및 EA 분획물에 의한 ET-1 생성량의 감소 효과가 IL-1 α 생성량 감소에 의한 것이 아니라, 또 다른 경로 차단에 의한 효과임을 알 수 있다. 또한 이들 분획물들은 직접적으로 B16 멜라노마의 티로시나제 단백질의 활성을 저해시켰으므로 멜라닌 생성을 억제하므로, 멜라닌 생성 억제에 있어서 이중 효과를 가진다.

이상의 결과에서 신선초 추출물은 색소침착의 방지와

개선에 효과 있는 원료로써 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서 구명하지 못했던 hexane 및 EA 분획물의 유효 성분들에 대한 분리가 진행되어야 하며, 분리된 유효성분들의 작용 기작을 밝혀내기 위하여 유전자 수준에서의 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 2006년 산업자원부 지역산업공통기술개발사업 “제주식물자원을 이용한 화장품 소재 개발 및 제품화 연구(Subject Number 2006-10027299)”의 일환으로 이루어진 것으로 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. K. Mitsugi, M. Nobuko, B. Kimiye, and H. Kiyoshi, Components of the roots of *Angelica keiskei* Koidzumi, II. *The Structure of the Chalcone Derivatives*, **98**, 210 (1978).
2. W. G. Im and J. J. Yu, Private medical plant, 141, Osung Publishing company, Seoul (1989).
3. H. Mitsuhahi, Illustrated medicinal plants of the world in colour, 350, Hokuryukan Co. Ltd., Tokyo (1988).
4. T. Hirayama, Nutrition and cancer-large scale cohort study-In: eds. I. Knudsen and R. Alan, Genetic toxicology of the diet, 94, New York, Liss, Inc. (1986).
5. O. K. Kim, S. S. Gung, W. B. Park, M. H. Lee, and S. S. Ham, The nutritional components of aerial whole plant and juice of *Angelica keiskei* Koidz, *Korea J. Food Sci. Technol.*, **24**, 592 (1992).
6. T. Okuyama, M. Takata, J. Takayasu, T. Hasegawa, H. Tokuda, A. Nishino, H. Nishino, and A. Iwashima, Anti-tumor-promotion by principles obtained from *Angelica keiskei*, *Planta Med.*, **57**, 242 (1991).
7. Y. Inamori, K. Baba, H. Tsujibo, M. Taniguchi, K. Nakata, and M. Kozawa, Antibacterial activity of two chalcones, xanthoangelol and 4-hydroxyderricin, isolated from the root of *Angelica keiskei* Koidzumi, *Chem. Pharm. Bull.(Tokyo)*, **39**, 1604 (1991).
8. T. Enoki, H. Ohnogi, K. Nagamine, Y. Kudo, K. Sugiyama, M. Tanabe, E. Kobayashi, H. Sagawa, and I. Kato, Antidiabetic activities of chalcones isolated from a Japanese Herb, *Angelica keiskei*, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 6013, (2007).
9. G. Imokawa, M. Kawai, Y. Mishima, and I. Motegi, Differential analysis of experimental hypermelanosis induced by UVB, PUVA, and allergic contact dermatitis using a brownish guinea pig model, *Arch. Dermatol. Res.*, **278**, 352 (1986).
10. G. Imokawa, Y. Yada, and M. Miyagishi, Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes, *J. Biol. Chem.*, **267**, 24675 (1992).
11. J. J. Yohn, J. G. Morelli, S. J. Walchak, K. B. Rundell, D. A. Norris, and M. R. Zamora, Cultured human keratinocytes synthesize and secrete endothelin-1, *J. Invest. Dermatol.*, **100**, 23 (1993).
12. R. Halaban, R. Langdon, N. Birchall, C. Cuono, A. Baird, G. Scott, G. Moellmann, and J. McGuire, Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes, *J. Cell Biol.*, **107**, 1611 (1988).
13. I. Suzuki, R. D. Cone, S. Im, J. Nordlund, and Z. A. Abdel-Malek, Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis, *Endocrinology*, **137**, 1627 (1996).
14. J. Grabbe, P. Welker, E. Dippel, and B. M. Czarnetzki, Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes, *Arch. Dermatol. Res.*, **287**, 78 (1994).
15. G. Imokawa, M. Miyagishi, and Y. Yada, Endothelin-1 as a new melanogen: coordinated expression of its gene and the tyrosinase gene in UVB-exposed human epidermis, *J. Invest. Dermatol.*, **105**, 32 (1995).
16. G. Imokawa, Y. Yada, and M. Kimura, Signalling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes, *Biochem. J.*, **314**, 305 (1996).
17. G. Imokawa, T. Kobayashi, M. Miyagishi, K. Higashi, and Y. Yada, The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis, *Pigment Cell Res.*

- 10, 218 (1997).
18. M. Yoshida, S. Hirotsu, M. Nakahara, H. Uchiwa, and Y. Tomita, Histamine is involved in ultraviolet B-induced pigmentation of guinea pig skin, *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 255 (2002).
19. Y. H. Kim, K. S. Kim, C. S. Han, H. C. Yang, S. H. Park, K. I. Ko, S. H. Lee, K. H. Kim, N. H. Lee, J. M. Kim, and K. H. Son, Inhibitory effects of natural plants of Jeju Island on elastase and MMP-1 expression, *J. Cosmet. Sci.*, **58**(1), 19 (2007).
20. A. Vanni, D. Gastaldi, and G. Giunata, Kinetic investigations on the double enzymatic activity of the tyrosinase mushroom, *Annali di Chimica*, **80**, 35 (1990)
21. K. Maeda and M. Fukuda, *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes, *J. Soc. Cosmetic Chem.*, **42**, 361 (1991).
22. J. R. Wirathall, C. Oliver, S. Silagi, and E. essner, Suppression of pigmentation in mouse melanoma cells by 5-bromodeoxyuridine: effects on tyrosinase activity and melanosome formation, *J. Cell. Biol.*, **57**, 406-423 (1973).
23. V. J. Hearing and K. Tsukamoto, Enzymatic control of pigmentation in mammals, *FASEB J.*, **5**, 2902 (1991).