한방안이비인후피부과학회지 제22권 제3호(2009년 12월)
The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 2009;22(3) : 36-46

大黃의 Elastase 활성 억제와 Tyrosinase 억제연구

이종철 · 김경준
경원대학교 한의과대학 안이비인후피부과학 교실

The effect of Elastase inhibition and Tyrosinase by Rheum undulatum Stokes extracts

Jong-Chul Lee · Kyung-Jun Kim

Objective : Recently, the demands for the effective and safe depigmentating and anti-aging agents of the skin have increased due to the medical, pharmaceutical and cosmetic reasons. The aim of this study is to search new materials from the traditional herbal medicines which inhibit the aging process of skin in vitro.

Methods : herbal medicines(80% ethanol or water extracts) were screened for their inhibitory activities against elastase.

Results : Rheum undulatum (final concentrstion 1 mg/ml) appeared over 30% of inhibition of elastase activity. so we are investigated anti wrinkle effects of Rheum undulatum look through MMP-1 inhibition activity. also Extracts of Rheum undulatum showed higher anti tyrosinase activity than arbutin (final concentration 1 mg/ml).

Conclusion : These results suggest that herbal medicines could be strong potential sources of inhibition of anti-aging and whitening effects for the skin.

Key words : *Rheum undulatum,* elastase, MMP-1, Tyrosinase

Ⅰ. 緖 論

피부노화는 생리적 노화인 내적노화(Intrinsic aging)와 외적 요인에 의한 광노화(photoaging) 과정으로 구분된다. 외적요인에 의한 노화는 내적 노화를 촉진시키거나 첨가적 역할을 할 뿐 아니라 그 자체로도 피부노화를 유발한다. 외적 요인에 의한 노화의 가장 중요한 요인은 자외선으로 피부노화의 주된 원인이며 대부분의 미용적인 문제를 야기한다.

노화의 기전은 명확하지 않으나 광노화는 자외선이 DNA와 세포막 또는 세포내외의 chromophore에 흡수되어 손상을 줄 것으로 추정되고, 자외선이

교신저자 : 김경준, 인천광역시 중구 용동 117번지
경원대학교 부속길한방병원 한방안이비인후피부과
(Tel. 032-770-1215, E-mail : kkjo215@hanmail.net)
• 접수 2009/10/31 • 2009/11/27 • 채택 2009/12/05
※ 이 논문은 2009년도 경원대학교 교내연구비 지원에 의하여 수행되었음.

피부 내 protease, collagenase, elastase 등의 가수분해 효소를 분비하게 하여 이들의 작용으로 광노화를 일으킬 수 있다[1]. 일반적으로 자외선A에만 자주 노출되어도 광노화를 일으켜 진피 교원질(collagen)과 탄력섬유(elastin fiber)의 손상을 초래한다[2]. 진피층의 90%를 차지하고 있는 콜라겐은 피부의 강도와 장력을 부여하여 외부의 자극으로부터 피부를 보호하는 역할을 한다. 따라서 콜라겐의 감소는 피부의 노화와 밀접한 관련이 있다[3]. 이러한 콜라겐을 분해하는 효소는 그 종류가 다양하나 가장 많이 알려져 있는 것이 기질 단백질 분해 효소-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1, collagenase)이다[4].

또한 자외선을 받으면 피부에서 색소침착이 증가되는데, 이것은 Tyrosinase의 작용으로 멜라닌양이 증가했기 때문이다[5].

현재 arbutin 및 ascorbic acid와 이들 유도체가 의약부외품과 기능성 화장품의 미백 원료로 사용되고 있으나[6], 피부 투과, 세포독성 및 체형 내에서의 안전성등과 같은 문제점들이 있어 보다 경제적이고 효율적인 천연 한방 성분에 대한 관심이 높아지고 있다[7,8].

한의학에서는 자외선에 대한 개념이 없기 때문에 이로 인한 손상에 대한 문헌적인 근거를 찾을 수 없지만 햇빛에 의한 피부손상에 대한 개념을 日晒瘡에서 찾아 볼 수 있다. 《洞天奧旨》에서는 日晒瘡에 대하여 "夏天酷熱之日曝而成者也 必先疼後破乃外熱所傷非內熱所損也."라 하여 여름에 강한 햇빛을 쬐여서 생기고 반드시 아픈 이후에야 없어지니 外熱에 의해 상한 것으로 內熱로 손상된 것은 아니다 하여 햇빛에 의한 손상을 外熱에 의한 것으로 보고 있다.

햇빛에 의한 손상은 결국 자외선으로 인하여 발생하는 것이므로 반복되는 자외선 노출은 한의학적으로는 外熱로 인한 것으로 보아야 할 것이다. 그리고 광노화의 임상적 표현이 피부가 거칠고 두꺼워지고 주름이 깊어지며 건조하게 된다는 점 등에서 착안하여 반복되는 外熱로 인한 손상으로 나타나는 燥症으로 유추할 수 있으며[9,10] 大黃이 가지는 효능 중 血分의 實熱을 瀉하는 것과 어떠한 火熱上炎의 症候라도 응용할 수 있는 것으로 보아 자외선으로 인한 광노화와 색소침착 방지에 효과가 있을 것으로 생각되었다.

이러한 사실을 바탕으로 大黃의 Elastase 활성 억제 실험과 MMP-1 억제 효능 실험을 통하여 항 주름효과와 Tyrosinase 효능 억제 실험을 통한 미백효과를 탐구 하였다. 이에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 대황은 옴니허브(Korea)에서 구입하였다. 구입한 대황은 100g을 정량 후 80% 에탄올을 가하여 30분 동안 2회에 걸쳐 초음파진동을 이용하여 추출액을 획득하였다. 지름 185㎜ 종이여과지(Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압 여과 하였다. 그 후 감압 농축기(Eyela, Japan)를 사용하여 농축한 다음, 동결 건조기(Freezedryer, Matsushita, Japan)로 동결 건조하여 분말을 얻어 DMSO에 녹여 사용하였다.

2) 시약

Elastase 억제효과를 살피기 위하여 구입한 Elastase(pancreatic from porcine pancreas) N-Succinyl-(Ala)3-p-nitroanilide, Ursolic acid와 Tyrosinase억제 효과를 살피기 위하여 mushroom tyrosinase, L-tyrosine, arbutin는 Sigma aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Amicon Ultra는 millipore Coporation(Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. Hand Hold UV lamp는 Vilber Lourmat (B.P.66-Z.I.sud france)에서 구입하였으며, MMP-1 일차 항체는 R&D system(Minneapolis, MN, USA), 이차 항체는 Jackson Immuno Reasearch Laboratories,Inc (westGone, PA, USA)에서 구입하여 실험하였다.

3) 세포주

사람의 섬유아세포인 HS-68(ATCC ,CRL1635) cell은 10% fetal bovine serum(FBS)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's media(DMEM)에 100 U/㎖ Penicillin과 100 ug/㎖ Streptomycin (P-S)을 첨가한 배지에서 2-3일 마다 배양액을 교환해 주었으며, 배양 환경은 37 ℃ 포화 습도로 유지되는 5 % CO_2배양기에서 배양하였다.

2. 방법

1) Elastase 활성 억제

$$\text{Inhibition of Elastase activity (\%)} = [1-(S-B)/C] \times 100$$

S: Elastase 효소액 및 농도에 따른 시료용액 첨가 시 흡광도 변화 값
B: S에서 Elastase 효소액 대신 100mM Tris -HCl buffer(pH 8.0) 첨가 시의 흡광도 변화 값
C: 시료 용액 대신, 100mM Tris -HCl buffer(pH 8.0) 첨가 시의 흡광도 변화 값

96-well plate에 100mM Tris -HCl buffer(pH 8.0)를 넣은 뒤 농도에 따른 한약 시료를 넣었다. 2.9 mM의 N-Succinyl-(Ala)3-p-nitroanilide(sigma, S4760)을 20 ㎕씩 분주 뒤 0.2 unit으로 조제한 Elastase 효소액(sigma, E0258) 15 ㎕을 넣고 최종양을 150 ㎕로 만들어준 뒤 조제한 것이 잘 섞이도록 파이펫팅을 해주었다. 그 후 25 ℃에서 20분 동안 방치 하였다. 얼음에서 5분간 방치하여 반응을 중지 시킨 뒤 410nm 파장의 microlpate reader기를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 ursolic acid 를 사용하였으며 음성대조군으로 elastase 효소액 대신 100 mM Tris -HCl buffer를 동량 분주하였다.

2) MTS assay

HS-68cell에 大黃을 농도별로 처리했을 때 생존율을 MTS(Promega, Madison, USA) assay로 조사하였다. stock을 분주한 후에 7일 정도 안정화를 시킨 후에, Hemocytimeter를 사용하여 개수한 다음 세포를 96-well culture plate에 각각 2×10^4 개가 되도록 심어 주었다. 24시간 배양을 한 다음 배지를 제거하고 大黃 추출물을 농도별로 처리한 후 total volume을 100 ㎕가 되게 하여 24시간 다시 배양 하였다. MTS의 최종농도를 0.25 ㎎/㎖로 넣은 뒤 암소에서 2시간 반응하였다. micro plate reader기를 490 ㎚에서 흡광도를 측정하여 大黃의 세포독성 및 증식효과에 대한 영향을 조사하였다.

3) UV 조사

Human Dermal Fibroblast인 HS-68 cell에 UV를 조사하여 MMP-1의 발현을 유도하였다. 100mm plate에 세포를 6×10^5 으로 심어 24시간 배양 하였다. 배지를 제거하고 PBS를 사용하여 두 번 헹구어준 뒤, PBS를 500㎕ 넣고 15㎝의 높이에서 UV-A(peak365 ㎚, 50 mJ/㎠)를 1분 30초 동안 쬐어 주었다. 그 후에 FBS를 넣지 않은 배지를 넣어 24시간 배양하였다. 大黃을 처리할 때 FBS를 넣지 않은 배지에 大黃 추출물을 농도별로 넣어 배양을 하였다.

4) Western blot 분석

자외선에 의하여 생성되는 MMP-1은 HS-68 세

포의 배지를 회수하여 배지에 분비된 MMP-1의 발현량을 분석하는 방법을 사용하여 원하는 단백질을 얻었다. 배양하였던 세포의 배지를 회수한 후 Amicon(millipore, U.S.A.)을 이용하여 농축을 하였다. 농축된 배지 26 ㎕에 Loading buffer 4 ㎕를 넣은 후 10% acrylamide gel을 만들어 전기영동하였다. 이것을 nitrocellulose membrane (Schleicher&Schuell Bioscience, Dassel, Germany)에 transfer하여 PBS-T에 1% skim milk와 1% BSA가 든 blocking 용액에서 1시간 동안 blocking한 후 PBS-T로 5분간 3회 세척하였다. Anti MMP-1(R&D systems, Moimmeapolis, MN, USA)를 이용하여 1차 항체반응을 4 ℃에서 16시간 반응 시킨 다음 PBS-T로 세척을 하였다. Mouse-IgG(Jackson Immuno Reserch Laboratories, Inc, westGrone, pa, USA) 2차 항체반응을 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS-T로 10분, 15분, 30분간 세척한 후 ECL(Amersham Biosciences, UK)로 발광하여 X-ray film에 노출시켜 단백질 발현 분석을 실시하였다.

5) Tyrosinase 활성 억제 효과

大黃에 대한 Tyrosinase 저해 활성 측정은 96-well을 사용하여 흡광도를 측정하였다. 96-well micro plate에 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.5)를 분주한 후 大黃에서 추출한 시료를 농도 별로 넣는다. 그 후 2000unit/ml의 mushroom tyrosinase(fluka, 93898)를 potassium phosphate buffer에 녹여서 만든 것을 10㎕씩 넣은 뒤 15 mM의 tyrosine(sigma, T3754)을 20 ㎕씩 분주 후 최종 양을 150㎕로 만든 뒤 잘 섞어주고 37 ℃에서 20분간 반응을 시켰다. 신속하게 얼음에서 5분간 방치하여 반응을 중단 시키고, 490 ㎚에서 흡광도를 측정하고 tyrosinase 효소 활성 억제율을 구하였다.

양성대조군으로 arbutin을 사용하였으며 음성대조군으로 tyrosinase 대신 0.1 M sodium phosphate buffer를 동량 분주하였다.

$$\text{Inhibition of tyrosinase activity (\%)} = [1-(S-B)/C] \times 100$$

S: 효소액 및 시료용액 첨가 시 흡광도 변화 값
B: 효소액 대신 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 첨가 시의 흡광도 변화 값
C: 시료 용액 대신, 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 첨가 시의 흡광도 변화 값

6) 통계처리

결과는 mean±SD 값으로 표기하였다. 자료를 통계학적으로 유의한 수준으로 분석하기 위하여 SPSS system을 이용하였으며, 같은 실험을 최소 3번 이상 시행하여 그 결과를 처리하였다. 자료 상호 간 유의할 만한 차이를 판가름하는 P값은 0.05 미만으로 설정하였다.

Ⅲ. 結 果

1. 大黃 Elastase 억제 효과

물 추출과 80% 에탄올 추출을 한 大黃에 대하여 elastase assay를 통하여 大黃이 가지고 있는 억제 활성을 탐색하여 보았다. 모두 20분 동안의 반응 시간을 주었으며, 1000 ㎍/㎖의 농도를 사용하여 시험하였다. 양성 대조군으로는 ursolic acid(500 ㎍/㎖)를 사용하였다. 반응 후 얼음으로 반응을 정지시킨 후 micro reader기를 사용하여 측정한 결과, 물 추출물인 大黃에서 매우 높은 elastase 억제활성을 가지는 것으로 나타났다. 매우 효능이 뛰어났던 大黃의 농도별 Elastase 활성억제 실험을 하였다. 100, 500, 1000(㎍/㎖)의 세가지 농도에서 관찰을 한 결과 100(㎍/㎖), 500(㎍/㎖)그

리고 1000(㎍/㎖)의 농도에서 Elastase를 농도 의존적으로 억제 활성을 가지는 것을 알 수가 있었다.

Table 1. The effects of Elastase inhibition by Rheum undulatum extracts.

ursolic (500㎍/ml)	*Rheum undulatum*(㎍/ml)		
	100	500	1000
39.01±2.26	8.52±6.62	24.76±8.69	34.76±2.69

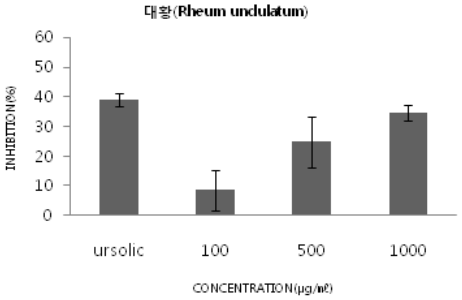

Fig. 1. Rheum undulatum extracts inhibited the elastase activity. Ursolic acid was using as the positive control that final concentration was 500㎍/㎖. Rhus javanica Linne examined on final concentration of 100, 500 and 1000㎍/㎖.

2. HS-68 cell의 세포 생존율 측정

elastase에 대한 억제 활성을 가장 높게 가지는 大黃에 대하여 HS-68 세포의 세포 생존률을 MTS assay를 통하여 살펴보았다. HS-68 세포를 세 번 정도 계대하여 안정화 시킨 후 실험 하였다. 100, 250, 500, 그리고 1000(ug/ml)의 大黃의 농도를 통하여 관찰한 결과 control이 100%의 생존율을 가질 때 각각의 값을 구하고 그래프로 나타내었다. 그 결과 모두 98%이상의 세포 생존율을 보이면서 세포에 대한 독성이 보이지 않음을 관찰을 할 수가 있었고 세포에 대하여 시료 처리에 대한 농도를 참고하여 지표로 삼을 수 있었다.

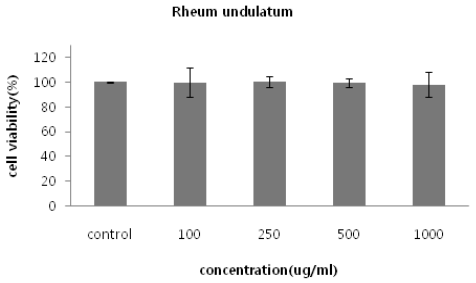

Fig. 2. The effect of Cell Rheum undulatum in HS-68 cell Human Dermal Fibroblast cell. Rheum undulatum was examined on final concentration of 10, 50, 100 and 250㎍/㎖. final concentration of MTS was 250㎍/㎖. Results are provided as percentage of total cells and represent mean±S.E.M.. of three to six independent experiments(P<0.05).

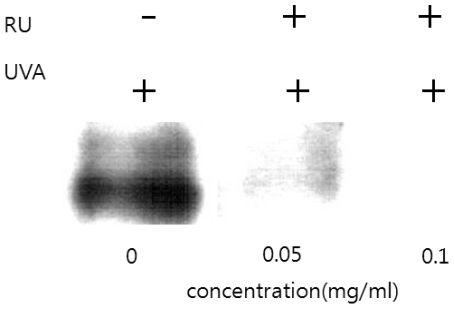

Fig. 3. The effects of Rheum undulatum Stokes extract on the product of matrix metalloprotein-1 cause by ultraviolet A irradiation of cultured human skin fibroblasts. HS-68 cell was irradiated UV-A(70mJ/㎠) for 2min and treated by Rheum undulatum(50 ㎍/㎖).

3. 大黃에 의한 MMP-1의 발현 억제

자외선을 조사하여 발현하는 MMP-1에 대한 大黃의 발현을 억제하는 효과를 탐구하기 위하여 western blot의 방법을 사용하여 MMP-1의 발현 정도를 측정하였다. MMP-1은 자외선에 노출이 되

면 세포의 밖으로 분비되는 이유로 세포의 배지를 회수하여 실험을 하였다. 배지를 농축하여 10 KDa 이상의 단백질만을 모아서 전기영동을 한 결과이다. UV-A를 2분 동안 쬐인 HS-68 세포는 MMP-1의 발현을 많이 한 것으로 나타났다. 하지만 똑같이 UV-A를 2분 동안 조사하고 大黃을 50 ㎍/ml, 100㎍/ml의 농도로 넣어 준 HS-68 세포는 大黃의 농도가 높아질수록 현저하게 감소시키는 것으로 나타났다.

4. Tyrosinase 활성 억제효과를 통한 大黃의 미백 효능

Elastase 를 억제하는 효능을 가진 大黃이 항 주름 효과 뿐 아니라 미백에 관여하는 효소인 Tyrosinase에 대하여 어떠한 효능을 지녔는지 알아보기 위하여 Tyrosinase 효소를 이용하여 大黃의 농도별로 실험을 하여 표와 그래프로 나타낸 결과이다. Tyrosinase 와 기질인 L-tyrosine을 넣고 大黃을 농도 별로 처리한 후 37℃에서 반응을

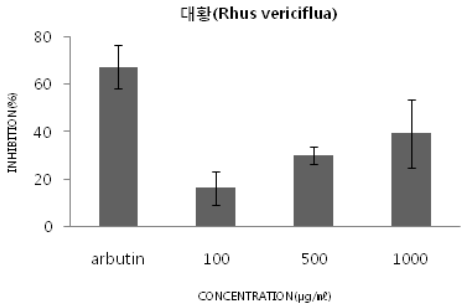

Fig. 4. tyrosinase inhibition effect of Rheum undulatum extracts. Arbutin was used to positive control of Tyrosinase activity inhibition. Final concentration of arbutin was 1000㎍/㎖. Results are provided as percentage of total cells and represent mean±S.E.M. of three to six independent experiments(P<0.05).

Table 2. Tyrosinase inhibition effect of Rheum undulatum Stokes extracts.

arbutin(ug/ml)	*Rheum undulatum*(ug/ml)		
1000	100	500	1000
67.54±8.96	16.49±7.17	30.20±3.72	39.41±14.53

한 다음 얼음으로 반응을 정지하고 micro plate reader기를 사용하였다. 大黃은 100, 500, 1000(㎍/㎖)의 모든 농도에서 대조군인 arbutine (68.21±7.43%)의 Tyrosinase 억제 활성력 보다 월등한 효능을 지닌 것으로 나타났다.

Ⅳ. 考 察

피부는 나이가 들어감에 따라 얇아지며 신체 대사기능이 감소하여 노화가 빠르게 진행된다. 표피세포의 증식이 억제되고 각질내의 수분이 감소함에 따라 피부탄력이 줄어들게 되므로 근육을 움직이는 방향에 따라 표피와 진피 모두에서 주름이 형성된다.

피부노화는 생리적 노화인 내적노화와 외적 요인에 의한 노화 과정으로 구분된다. 외적요인에 의한 노화는 내적 노화를 촉진시키거나 첨가적 역할을 할 뿐 아니라 그 자체로도 피부노화를 유발한다. 외적 요인에 의한 노화의 가장 중요한 요인은 자외선으로, 자외선에 의한 노화는 시간에 비례하여 누적된다. 장기간에 걸친 태양광선 특히 자외선의 노출로 인한 임상적 혹은 조직학적인 피부변화를 광노화라고 한다[18].

일반적으로 자외선은 지표에 도달하는 태양광선의 약 6%를 차지하고 있지만, 이 적은 양의 자외

선은 표피를 통과하며 전체 자외선의 1% 정도가 진피에 도달하며 파장에 따라 UV-C, UV-B, UV-A 세 가지 종류로 분류되는데 성층권 오존층은 이러한 종류의 UV를 모두 흡수하는 것이 아니라 일부분을 흡수한다.

UV-A는 장파장으로 320-400 ㎚의 파장을 가지고 있으며 유리나 커튼을 통과하여 실내에서도 노출된다. 날씨나 시간 계절에 영향을 받지않고 일정하며, 오존층에서도 흡수되지 않는다. 피부에서는 표피와 진피의 유두층에서 망상층에까지 영향을 미치는데 피부에 멜라닌 산화에 의한 즉시형 색소침착을 일으키고 피부노화를 촉진한다.

UV-B는 중간파장으로 280-320 ㎚의 파장을 가지고 있으며 유리나 커튼에 의해 차단되어 실내에서는 노출이 안 된다. 대부분은 오존층에 흡수되지만, 일부는 지표면에 도달한다. 피부 각질층에 의해 흡수되고, 과립층에서 유두층까지 영향을 미친다. 노출이 심하면 표피가 얇아지며 피부 깊숙이 침투하여 피부에 화상을 일으키며 멜라닌 세포를 자극해서 멜라닌의 생성을 촉진하여 지연형 색소침착이 발생한다.

UV-C는 단파장으로 100-280 ㎚의 파장을 가지고 있으며 피부에 매우 해로운 자외선이지만 오존층에 거의 완전히 흡수된다. 세균과 세포를 파괴하는 힘이 매우 강해서 멸균 소독에 쓰이고 95~99%가 표피에서 저지된다. 피부색과는 관계가 없고 결막염 피부박리, 피부암 유발의 원인으로 작용한다[1,8-10].

자외선이 DNA와 세포막 또는 세포내외의 chromophore에 흡수되어 손상을 줄 것으로 추정하는데, 자외선이 피부 내 protease, collagenase, elastase 등의 가수분해 효소를 분비하게 하여 이들의 작용으로 광노화를 일으킬 수 있다[1].

광노화의 발생 기전이 반복되는 外熱로 인한 손상으로 나타나는 燥症으로 유추하여 보면, 東醫寶鑑 ≪燥宜養血編≫에 經曰 燥者 潤之養血之謂也 積液固能生氣積 氣亦能生液 宜服瓊玉膏(方見身形)〈入門〉라 하여 養血을 기본으로 하였다.

여기에 관련된 처방을 東醫寶鑑에서 보면 瓊脂膏 天門冬膏 地仙煎 生血潤膚飮 防風通聖散 當歸承氣湯을 들 수 있고 單方으로는 山藥, 天門冬, 麥門冬, 生地黃, 熟地黃, 大黃 등을 쓴다[19,20].

여기서 大黃을 살펴보면 大黃은 蓼科(마디풀과 : *Polygonaceae*)에 속한 다년생 초본인 금문대황(*Rheum palmatum L.*), 장군풀(*R. coreanum Nakai*) 서대황(*R. tanguticum Maxim*) 또는 이들의 중간잡종의 근과 근경을 건조한 것이다.

그 性은 寒 無毒하고 味는 苦하다. 효능으로 보면 瀉熱通腸하고 凉血解毒하며 逐瘀經痛한다. 이 약은 anthraquinone계 화합물인 chrysophanol, emodin, aloe-emodin, rhein, physcion, sennoside A, B, C, D, E등을 함유하고, 스틸벤계 화합물인 rhaponticin, piceid, deuxyrhapinticin 등을 함유한다[21].

本藥은 性味의 苦寒으로 泄熱하는 작용과 비교적 강한 攻下作用이 있어 腸胃中의 積滯를 蕩滌할 수 있으므로 주로 熱結便秘, 또는 高熱神昏 등의 實熱에 속한 壅滯의 證候에 응용되니 淸熱瀉火의 作用이 있다.

또한 下行하여 血分의 實熱을 瀉하는 效力이 있으므로 어떠한 火熱上炎의 症候라도 응용할 수 있다. 火熱의 亢盛으로 인한 迫血上溢, 다시 말하면 血熱妄行으로 인한 吐血·衄血등의 증과 血分實熱에 속한 目赤腫痛·熱毒瘡癤 등의 症을 다스린다.

活血逐瘀作用 및 引血下行의 作用이 있기 때문에 産後의 瘀滯腹痛 또는 瘀血凝滯로 인한 月經不通 혹은 跌打損傷·瘀滯作痛 등의 증을 다스린다[21-23].

이러한 大黃의 효능과 약성으로 보아 大黃이 자외선으로 인한 피부손상 및 광노화에 적절한 효과를 나타낼 것으로 생각되어 실험 대상으로 선택하였다.

피부의 탄력성을 잃게 하는 주된 요인인 Elastase 억제활성을 측정하여 본 결과 大黃이 매우 높은 억제 활성을 갖는 것으로 나타나 광노화에 효과가 있는 것으로 생각되었다. 大黃을 농도별로 넣은 후 Elastase 억제 활성을 측정하여 관찰을 한 결과 농도가 높아질수록 더욱 더 효능이 뛰어난 것으로 나타났다. HS-68 세포는 사람의 진피세포로 주름이 생성 되는 지역인데, 大黃을 이 HS-68 세포에 처리하여 세포에 대한 大黃의 처리농도를 결정하기 위하여 MTS를 사용하여 세포의 생존률을 측정한 결과 250 ug/㎖까지 세포가 안전한 것으로 사료 되었다.

사람의 진피는 콜라겐과 엘라스틴이 서로 엉켜 그물처럼 형성하고 있는데 콜라겐을 끊어 주름을 생성케 만드는 MMP-1(matrix metalloproteinase-1)은 자외선을 받게 되면 자외선으로 인하여 활성산소(free radical)를 생성하고 이것들이 신호전달 과정을 거치면서 세포의 핵에서 JNK 와 p38을 생성하고 유전자의 AP-1 지역에서 c-FOS와 c-JUN이 합쳐져 이형 접합을 하게 된다. 그 결과로 Pro collagen 합성 프로모터가 저해되고 MMP-1의 프로모터가 활성화 되면서 MMP-1, 즉 collagenase가 생성이 되어 콜라겐의 fiber구조를 끊게 되고 주름을 유발하게 되는 것이다[1].

따라서 콜라겐의 생성을 감소시키는 MMP-1의 효소 성장을 억제하고 콜라겐의 합성을 향상시키면 주름을 억제하는 효과가 있다고 본다.

이러한 사실을 바탕으로 MMP-1의 단백질의 발현 정도를 관찰하기 위하여 Western Blot 분석방법을 사용하였다. 그 결과 UV-A에 의하여 다량 발현을 한 MMP-1이 大黃을 50 ug/㎖ 과 100 ug/㎖ 의 농도로 처리한 HS-68에서는 눈에 띄게 줄어드는 탁월한 효능을 보이는 것으로 나타나 적은 양으로도 MMP-1를 저해하는 우수한 효과가 있다고 사료가 되었다.

피부색이 변화한다는 것은 피부조직내의 멜라닌 양이 증가하거나 감소하여 색이 침착, 결손 또는 탈색되는 것을 말한다. 피부에서 멜라닌이 만들어지는 곳은 멜라닌 생성세포로서 표피와 진피의 경계선상의 기저세포들 사이에 있다. 이 생성세포는 신경절에서 유래하는 세포로서 멜라닌 형성은 정신적인 여러 인자와도 연관성이 있다. 색소세포의 수는 인종에 따라 별반 차이는 없는데 Tyrosinase의 활성정도에 따라 백인과 흑인의 피부색이 결정된다.

멜라닌의 전구물질은 Tyrosine이라는 단백질로 Tyrosinase라는 효소에 의해 L-DOPA(L-3,4-dihydroxyphenylalanin)로 전환하는 가수분해 활성과 L-DOPA를 DOPA quinone으로 전환시키는 산화과정을 거쳐서 멜라닌이 형성이 된다[5].

멜라닌은 멜라닌 생성세포에서 만들어져 여러 가지 경로를 통하여 피부 밖으로 나간다. 흔히 1개월 정도 피부에 머문다고 하는데 상황에 따라 달라진다. 보통 안에서 밖으로 밀려와 각질 세포와 함께 떨어져 나간다. 그러나 멜라닌이 진피에 걸쳐 형성되었을 경우에는 피부 바깥으로 떨어져 나가기가 매우 어렵지만 진피 내 혈관과 림프관의 통로를 통하여 체외로 나올 수 있다.

피부에서 미백효과가 나타나게 할 수 있는 방법을 살펴보면 첫째, 멜라닌생성 자극호르몬을 억제시키는 방법 둘째, Tyrosine의 산화시 촉매역할을 하는 Tyrosinase의 작용을 억제하는 방법, 셋째 DOPA의 산화를 억제하는 방법 넷째 각질세포의 박리를 도와 이미 있는 멜라닌세포를 제거하는 방법 등이 있다[1,18].

이중 Tyrosinase를 억제한다면 멜라닌 생성이 억제 될 것이라고 가설을 하고, 이 실험 방법을 통하여 大黃이 가지는 미백효과를 탐구하였다[9]. 그 결과 大黃은 39.41 ± 14.53% (1000 ug/㎖)의 값을 나타내며 대조군인 Arbutin의 68.21 ± 7.43% (1000 ug/㎖)보다 큰 효과를 지니지는 못하지만 멜

라닌을 저해 시키는 효능을 지니는 것으로 나타났다.

역대 문헌에서 미백제와 관련된 처방으로는 玉容散, 玉容丸, 酒製四物湯, 升麻白芷湯 등이 소개되었고 약물로는 白芷, 白附子, 杏仁, 密, 鷄子白, 密陀僧, 白茯苓, 白蘞, 防風, 鹽 등이 다용되었다[24-29].

그리고 외용제와 관련된 처방으로는 如意金黃散, 忠和膏, 回陽玉龍膏, 玉露散, 生肌散 등이, 약물로는 白芷, 南星, 輕粉, 硫黃, 乳香, 麝香, 當歸, 大黃, 黃柏, 甘草등이 다용되었다[28-32].

본 연구에서는 大黃추출물을 통하여 주름을 억제하는 효능을 탐색하였으며, 항 주름 효과뿐 만 아니라 大黃이 가지는 멜라닌 생합성의 첫 단계에 관여하는 효소인 Tyrosinase 활성 억제 효과를 알아보았다.

大黃은 매우 높은 Elastase 저해 활성력을 나타냈으며 UV-A를 쬐임으로 인하여 생성되는 콜라겐을 저해효소인 MMP-1을 탁월하게 저해하는 효과를 관찰할 수가 있었다. Tyrosinase를 농도 의존적으로 억제함이 관찰되어 大黃이 미백에도 효능을 가지고 있다는 사실을 알 수가 있었다.

이상의 연구결과로 볼 때 물 추출을 한 大黃은 주름을 억제시키는 효능을 가졌으며, 미백에도 좋은 효과를 미치는 것으로 사료된다.

Ⅴ. 結 論

본 연구는 大黃의 주름억제 효과와 미백효과를 규명하기 위한 실험으로, 물과 80% ethanol로 추출한 大黃이 HS-68 세포에서 Elastase와 UV-A를 쬐임으로 인하여 생성되는 콜라겐을 저해효소인 MMP-1, Tyrosinase에 미치는 영향에 대해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 大黃 추출물을 100 ㎍/㎖, 500 ㎍/㎖, 1000 ㎍/㎖로 HS-68세포에 넣은 결과 농도 의존적으로 Elastase 억제 활성을 가지는 것으로 나타났다.
2. 大黃 추출물을 농도 50 ㎍/㎖, 100 ㎍/㎖로 HS-68세포에 넣은 결과 농도가 높을수록 MMP-1이 현저하게 감소시키는 것으로 나타났다.
3. 大黃 추출물을 100 ㎍/㎖, 500 ㎍/㎖, 1000 ㎍/㎖로 HS-68세포에 넣은 결과 모든 농도에서 월등한 Tyrosinase 억제 활성력이 나타났다.

이상의 연구결과로 볼 때 물 추출을 한 大黃은 아주 높은 항 주름 효과가 있을 뿐 만 아니라 大黃이 가지는 멜라닌 생합성의 첫 단계에 관여하는 효소인 Tyrosinase 활성 억제 효과가 관찰되므로 미백에도 좋은 효과를 미치는 것을 분자생물학적으로 확인하였다.

참고문헌

1. 김기연, 김광옥, 김현주, 박선희, 박영호, 배정하, 송선영, 오유경, 장예섭, 한경아. 피부과학. 수문사. 2001:103-113.
2. 김기연. 피부의 자연노화와 광노화에 관한 비교연구. 한국미용학회지. 1997;3(1):21-43.
3. Young Ho Cho, Jin Hui Kim,Dong Hwan Lee, Bum Chun Lee and Hyeong Bae Pyo, Effect of Etyl Acetate Fraction from Melothria Heterophylla on Antioxidant Activity and Metrix Metalloproteinase - 1 Expression in Ultraviolet-A irradiated human Dermal Fibroblast, J, Soc. Cosmet. Scientists Korea. 2005;31(1):103-9.
4. Gwan Sub, Jin Hwa Kim et al,

Anti-Oxidative and Inhibitory Effect of Saussurea involucrata on MMP-1 in UVA-irradiated Human Dermal Fbroblast, J, Soc. Cosmet. Scientists Korea. 2005;31(4): 329-35.

5. V. J Hearing and K. Tsukamoto, Bio chemical control of melanogenesis and melanomal organization, J. Invest. Dermatol, 4, 24(1999).
6. T, Ikeda and T. Tsutsumi, fuction and skin depigmental activity of crude drugs, Fragrance J.,6, 56(1990).
7. 김지영, 이연희, 김주연, 노보경. 익모초 추출물의 항산화 작용에 관한 연구. J. soc. Cosmet. Scientists korea. 2005;31(2):189-96.
8. Qui, F., Komatsu, K. I., Satio, K. I., K. Kawasaki, X. Yao and Y. Kano Pharmacological properties of traditional medicine. XⅢⅠ. . Pharmacokinetic study of mulberroside A and its metabolites in rat, Biol. Pharm. Bull. 1996;19(11):1463.
9. 전재홍, 홍승욱. 紫雲膏가 자외선에 의한 피부 손상 및 光老化에 미치는 영향. 大韓眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 2007;20(1):130-144.
10. 윤재일. 자외선에 의한 피부반응. 방사선방어학회지. 1995;20(3):181-186.
11. L. Ritti´e, G.J. Fisher. Ageing Research Reviews 1. 2002:705-720.
12. J.-H. HWANG AND B. M. LEE, INHIBITORS OF TYROSINASE AND MELANIN SYNTHESIS, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A.2007;70:393-407.
13. J-H et al,Inhibitory effect of Aucubin isolated from Eucommia ulmoides against UVB-induced matrix metalloproteinase-1 production in human skin fibroblasts,J, Biosci. Biotechnol. Biochem. 2005;69(11): 2227-31.
14. Berneburg et al., Photoaging of human skin, Photodermatol Photoimmunol Photomed 2000;16:239–244.
15. Kim, S. J., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S. and Kim, H. P. Tyrosinase inhibitory prenylated flavonoids from Sophora flavescens, Biol Pham Bull. 2003; 26(9):1348-50.
16. K-K. LEE ,J-H KIM et.al., Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity, and their anti-inflammatory effects., International Journal of Cosmetic Science 1999:21,71-82.
17. Masahiro Mori, norikazu Lkeda et. al., Inhibition of elastase activity by essential oils in vitro.,Journal of Cosmetic Dermatology ,1,183-187.
18. 이유신. 임상피부과학. 여문각. 1998:296-297.
19. 허준. 東醫寶鑑. 남산당. 2001:209-211, 416-7.
20. 허준. 동의보감. 법인문화사. 1096-1098.
21. 韓方藥理學教材編纂委 저. 韓方藥理學. 도서출판신일상사. 서울. 2005:552-7.
22. 全國韓醫科大學 本草學教授共著. 本草學. 영림사. 서울. 1994:242-4.
23. 신민교. 臨床本草學 영림사. 서울. 1996:463-4.
24. 박인기, 김경준. 雀斑에 대한 文獻的 考察. 東醫學會紙. 2001:5(1):139-166.
25. 신연상, 노석선. 기미에 관한 文獻的 考察. 大韓外官科學會誌. 1998;11(1):82-98.
26. 박혜준, 고우신. 雀斑의 原因, 證狀 및 治方에 관한 文獻的 考察. 大韓外官科學會誌. 1997: 10(1):247-262.
27. 남혜정, 채병윤. 肝斑에 관한 文獻的 考察. 大

韓外官科學會誌. 1996;9(1):16-23.
28. 정동욱, 채병윤. 肝斑의 外用藥에 관한 文獻的 考察. 大韓外官科學會誌. 1989;2(1):33-40.
29. 조재훈, 김혜정, 김윤범. 鹽, 醋, 香油의 미백 효과에 관한 연구. 大韓眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 2003;16(2):79-95.
30. 이태헌, 김혜정, 김윤범. 보리·현미·율무의 미백 효과에 관한 연구. 大韓眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 2003;16(2):57-78.
31. 채병윤. 한방외과. 고문사. 1991:397.
32. 지선영. 동의피부과학. 일중사 1996:368.