

엉겅퀴 추출물 실리마린의 피부 미백효과

추수진·류인자·김영희·허광화·김기호*·한창성*·김수진**·김진웅***·손의동***·유익동†

한국생명공학연구원 기능성화장품신소재개발센터, *(주)바이오펀드 생명공학연구소, **(주)엘리드 임상시험연구소,
*** (주)아모레퍼시픽 기술연구원

(2009년 5월 12일 접수, 2009년 5월 21일 수정, 2009년 5월 27일 채택)

Hypopigmentary Effect of Milk Thistle Extract Silymarin

Soo Jin Choo, In Ja Ryoo, Young Hee Kim, Guang Hua Xu, Ki Ho Kim*, Chang Sung Han*, Su Jin Kim**,
Jin Woong Kim***, Eui Dong Son***, and Ick Dong Yoo†

National Cosmeceuticals Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 111 Gwahangno,
Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

*R&D Center, Bioland Ltd.

**Ellead Skin Research Center

***Amorepacific Corporation R&D Center

(Received May 12, 2009; Revised May 21, 2009; Accepted May 27, 2009)

요약: 천연물로부터 새로운 미백 소재를 개발하기 위하여 식물 추출물들의 미백활성을 조사한 결과, 엉겅퀴의 열매로부터 추출한 silymarin이 우수한 미백효과를 나타내는 것을 발견하였다. Silymarin으로부터 유효 성분을 분리하기 위하여 각종 컬럼 크로마토그래피 및 HPLC 등의 기법을 실시하여 silybin과 isosilybin을 분리한 후 이성질체인 silybin A와 B, 그리고 isosilybin A와 B를 각각 순수 분리하였다. Silymarin은 Mel-Ab melanocyte에서 세포독성에 영향을 주지 않는 동시에 멜라닌의 생성을 억제하였고 IC₅₀ 값은 28.2 µg/mL이었다. 또한 Silymarin은 cell-based tyrosinase의 활성을 저해하고, western blot 분석 결과 tyrosinase 단백질의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다. Silymarin으로부터 분리한 활성 화합물인 silybin 및 isosilybin의 미백 효과를 측정된 결과, 각각 42.25 µM 및 16.32 µM의 IC₅₀ 값을 가지며 멜라닌의 생성을 억제하였으며 tyrosinase 단백질의 발현을 감소시켰다. Diastereoisomer 형태로 존재하는 silybin A 및 B, 그리고 isosilybin A 및 B의 멜라닌 저해활성을 측정된 결과, 네 가지 화합물 모두 농도 의존적으로 멜라닌의 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 피부 미백 임상연구를 실시한 결과, silymarin 2% 함유 크림을 사용할 경우 피부 미백 효과가 유효하게 나타남을 확인하였다. 이상의 결과로부터 본 활성물질 silymarin은 피부 미백 효과가 우수한 안전한 화장품 원료로서 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract: We found that silymarin exhibited the inhibitory effect on melanogenesis in a spontaneously immortalized mouse melanocyte cell line, Mel-Ab. Silymarin is a standardized extract obtained from the dried seeds of milk thistle (*Silybum marianum* Gaertn.). Silymarin significantly prevented melanin production in a dose-dependent manner with an IC₅₀ value of 28.2 µg/mL without effects on cell viability. Also, silymarin inhibited tyrosinase activity in melanocyte, while it did not affect the catalytic activity of cell-free tyrosinase. Furthermore, Western blot analysis indicated that silymarin decreased the expression of tyrosinase protein. Silybin A/B and isosilybin A/B were also able to inhibit melanin production and tyrosinase expression in protein level. Double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 2% silymarin showed that silymarin have a significant skin whitening effect. Therefore, this study suggests that silymarin may be useful as a natural skin whitening agent.

Keywords: melanogenesis, silymarin, tyrosinase activity, silybin, skin whitening

† 주 저자 (e-mail: idyoo@kribb.re.kr)

1. 서 론

멜라닌은 피부 내 기저층에 존재하는 색소 세포인 멜라노사이트에서 합성되는 검은 색소로서 외부 환경에 대해 피부세포를 보호해주는 역할을 하는 단백질 복합체이다. 그러나 자외선 노출 및 피부 노화로 인한 멜라닌의 과잉생성은 인체에 기미, 주근깨 등을 형성하고 심하게는 피부암을 유발하는 것을 알려져 있다[1].

멜라닌 합성 과정의 주요 효소인 tyrosinase는 L-tyrosine으로부터 L-3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA)가 합성되는 단계와 L-DOPA로부터 DOPAquinone이 합성되는 단계를 촉진하여 멜라닌의 합성을 촉진하게 된다[2]. 기존에 피부 미백제로 사용되어 오던 kojic acid, arbutin, 상백피 추출물, 감초 추출물 등이 이같이 tyrosinase의 작용을 직접 저해하여 미백 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[3,4]. 최근에는 tyrosinase의 활성을 직접적으로 억제하지 않으면서 세포 내에서 tyrosinase의 발현에 영향을 미쳐 미백 활성을 나타내는 새로운 활성물질도 보고되고 있다[5,6].

Silymarin은 국화과에 속하는 엉겅퀴(milk thistle, *Silybum marianum* Gaertn.)의 열매에서 추출한 플라보리그난(flavolignan) 계열 화합물들의 복합체로써, 엉겅퀴 추출물에는 silybin을 비롯하여 isosilybin, silychristin, silydianin 등 다양한 플라보리그난 화합물이 존재하며 이들을 총칭하여 silymarin이라 칭한다[7]. Silymarin은 간 기능 회복 효과, 항산화 효과 등을 나타내는 것으로 알려져 있고, 특히 피부암을 예방하고 피부 염증에도 간여하는 등 피부세포를 보호하는 효과를 나타낸다[8-10]. 또한 일본의 한 연구에 따르면, silymarin 화합물은 각질세포의 분화와 노화를 억제하고 세포외 매트릭스 단백질(extracellular matrix protein, ECM protein)을 축적시켜 피부의 노화를 방지한다고 알려져 있다[11]. 한편 Choo 등[12]은 silymarin 화합물이 Mel-Ab melanocyte 내에서 멜라닌의 생성 및 tyrosinase 단백질의 발현을 억제한다는 결과를 보고한 바 있다. 이에 본 연구에서는 silymarin 화합물 및 그로부터 분리한 유효성분인 silybin, isosilybin 화합물의 멜라닌 생성 억제 효과를 측정하고, 임상시험을 실시하여 silymarin 화합물의 피부 미백 원료로서의 효능을 평가하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 실험에 사용한 엉겅퀴 추출물인 silymarin은 (주)바

이오랜드에서 제공받아 사용하였다. 세포독성 및 미백효과를 측정하기 위해 silymarin 및 분리된 성분들은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 100 mg/mL stock solution을 만들어 -20 °C에서 보관하였다.

2.2. 유효 성분의 순수 분리

Silymarin으로부터 미백 효능 성분을 분리하기 위하여 각종 컬럼 크로마토그래피 및 HPLC를 실시하였다. 즉, silica gel column chromatography (chloroform : methanol = 100 : 0 ~ 0 : 100)를 실시하여 다량의 극성 성분을 제거하였다. 분획물을 이용하여 미백활성을 평가한 후, 활성 분획물을 octa-decyl silica (ODS) open column chromatography (20 ~ 100 % aq. methanol)를 실시하였다. 분획물을 이용하여 미백활성을 재평가한 후 활성 분획물을 이용하여 HPLC를 실시하였다. 즉 분취용 column을 사용하여 HPLC (50 % aq. methanol)를 실시하여 silybin A와 B가 혼합된 분획 1(silybin), 그리고 isosilybin A와 B가 혼합된 분획 2(isosilybin)를 얻을 수 있었다. 분획 1 및 2는 분석용 column을 사용하여 HPLC (50 % aq. methanol)를 실시하여 silybin A (1) 및 B (2), 그리고 isosilybin A (3) 및 B (4)를 각각 분리하였다.

2.3. 멜라닌 저해활성 측정

2.3.1. 세포 배양

Mel-Ab mouse immortalized melanocyte는 DMEM 배지에 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 nM 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA), 1 nM cholera toxin, 50 µg/mL streptomycin 그리고 50 U/mL의 penicillin을 첨가하여 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2.3.2. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 Dooley의 방법을 이용하여 crystal violet assay를 실시하여 측정하였다[13]. Mel-Ab 세포를 2×10^5 cells/well의 농도로 6-well plates에 분주한 후, 24 h 후 시료를 농도별로 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 0.1 % crystal violet 용액(in 10 % ethanol)으로 5 min 동안 염색한 후, 95 % ethanol을 이용하여 부착되어 있는 세포에 염색되어 있는 crystal violet을 추출하여 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3.3. 멜라닌 저해활성

멜라닌 정량은 Tsuboi의 방법을 이용하여 측정하였다 [14]. Mel-Ab 세포를 2×10^5 cells/well의 농도로 6-well plates에 분주한 후, 24 h 후 시료를 농도별로 처리하여 72 h 동안 배양하였다. 세포를 수집하여 1 N NaOH 용액 1 mL을 첨가하고 vortex 후, 100 °C에서 30 min 동안 용해시킨 후, 16,000 × g에서 20 min 동안 원심분리하여 얻어진 상층액의 흡광도를 400 nm에서 측정하였다.

2.3.4. Tyrosinase 활성 측정

Cell-based tyrosinase 활성은 Busca의 방법을 이용하여 측정하였다 [15]. Mel-Ab 세포를 2×10^5 cells/well의 농도로 6-well plates에 분주한 후, 24 h 후 시료를 농도별로 처리하여 72 h 동안 배양하였다. 세포를 수집하여 용해시킨 후 원심분리하여 동일한 단백질량이 포함되도록 phosphate buffer를 첨가하여 얻어진 상층액 90 μ L와 10 mM L-DOPA 10 μ L을 혼합하여 37 °C에서 1 h 동안 반응시키며 매 10 min 간격으로 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell-free tyrosinase 활성은 mushroom tyrosinase를 이용하여 측정하였다. 즉, 각 시료가 농도별로 포함된 phosphate buffer (pH 6.8) 170 μ L와 2,000 U/mL mushroom tyrosinase 10 μ L를 혼합한 후, 10 mM L-DOPA 20 μ L을 첨가하여 37 °C에서 10 min 동안 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3.5. Western Blot 분석

Silymarin, silybin 및 isosilybin이 미백 관련 단백질들의 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 Western blot analysis를 실시하였다. 즉, Mel-Ab 세포를 2×10^5 cells/well의 농도로 6-well plates에 분주한 후, 24 h 후 각 시료를 농도별로 처리하여 72 h 동안 배양하였다. 세포를 수집 후 용해하여 얻어진 각 시료 단백질을 20 μ g을 10 % SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 이를 PVDF membrane으로 이전시킨 후, tyrosinase (SC-7833, 1 : 500), TRP-1 (SC-10443, 1 : 500), TRP-2 (SC-10452, 1 : 500) 및 actin (SC-1616, 1 : 1,000) 항체와 각각 반응시켰다. 4 °C에서 overnight한 후, horseradish peroxidase-conjugated anti-goat (tyrosinase, TRP-1, TRP-2) 및 anti-mouse (actin) IgG 항체를 1 : 1,000의 비율로 각각 희석하여 실온에서 2 h 동안 반응시킨 후, chemiluminescence method (ECL kit, Amersham, UK)를 이용하여 분석하였다.

2.3.6. 자료 분석 및 통계 처리

Silybin A, B Isosilybin A, B의 멜라닌 생성 저해 효과는 1회 측정하여 나타내었으며 silymarin, silybin 및 isosilybin에 대한 모든 실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 하였으며 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

2.4. 피부미백 임상평가

2008년 4월 14일부터 2008년 6월 20일까지 silymarin의 피부미백효능에 대해 피시험자 21명을 대상으로 임상 연구를 수행하였다. 연구는 이중 맹검 대조-시험군 비교 연구(double-blind test)를 이용하였으며, 시료는 silymarin 2 %를 함유한 크림 제형과 비교군으로써 무첨가 크림 제형을 각각 사용하였다.

2.4.1. 피시험자의 선정

22명의 지원자를 대상으로 선정기준에 적합한 37세부터 52세의 여성 21명을 최종 선발하였다. 대상자의 평균 연령은 44.3세이었으며, 색소 침착을 위한 1회(1.0 MED) 조사 광량(mJ/cm^2)은 평균 30.7이었다.

2.4.2. 시험화장품의 도포

각 피시험자의 등에 1,000 W xenon arc lamp (ozoneless)가 장착된 인공 자외선 방출기(Oreil solar UV stimulator, Oriel Instrument, USA) 1개의 light guide를 통하여 직경 8 × 8 inches 크기로 자외선을 일정하게 방사하였다. 첫 번째 방문 24 h 후부터 24 h 간격으로 피시험자의 등에 1.0 MED에 해당하는 광량을 총 3회 조사하였다. 마지막 자외선 조사 일주일 후부터 광조사된 시험부위를 “가”군과 “나”군으로 무작위 분류하여 대조제품과 시험 제품을 하루 1차례(5회/1주)씩 총 8주 동안 도포하였다.

2.4.3. 피부과 전문의에 의한 피부미백 효과의 육안평가

시험 부위의 피부 색상은 두 명의 피부과 전문의에 의해 이중 맹검법(double-blind test)로 평가되었다. 자외선 조사에 의한 마지막 인공색소 침착한지 1주(0주), 4주(4주), 8주(8주) 경과 후 피험자들의 피부 색상을 8단계의 척도로 구분하여 평가하였다. 0: none, 1: none/mild pigmented, 2: mild pigmented, 3: mild/moderate pigmented, 4: moderate pigmented, 5: moderate/severe pigmented, 6: severe pigmented, 7: very severe pigmented. 시험제품 도포 전과 도포 4주 및 8주 후의 색상을 비교하여 피부 색상 변화를 평가하였다.

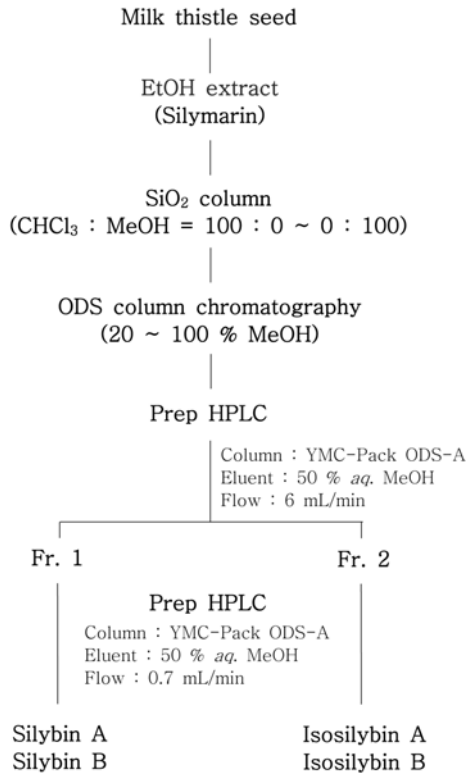


Figure 1. Extraction and isolation of silybin A/B and isosilybin A/B from milk thistle seeds.

2.4.4. Chromameter를 이용한 기기적 평가

Chromameter (CR-400, Minolta, Japan)에 의한 피부 미백효과 측정은 피부과 전문의에 의한 효과 판정 시기와 동일하게 색소 침착된 부위의 L*, a*, b* value 변화를 총 5회 측정하여 평가하였다. L*: Luminosity, a*: Green to red spectrum, b*: Blue to yellow spectrum.

2.4.5. 피부이상평가

피부과 전문의는 시험 부위에서 제품 도포 4주 및 8주 경과 후 피험자들을 대상으로 피부 이상반응의 존재 여부를 관찰하고 이상반응의 정도에 따라 등급을 표시하였다(0: 없다, 1: 약하다, 2: 양호하다, 3: 심하다).

2.4.6. 통계분석

전문의에 의한 육안 평가 및 chromameter CR-400을 이용한 기기적 평가는 paired t-test를 통해 시험제품과 대조제품간의 유의성 여부를 가설 평균차 5 %로 확인하여 p-value가 0.05 이하일 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

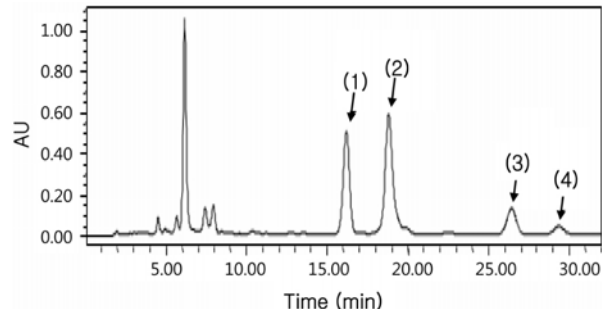


Figure 2. HPLC chromatogram of silybin A (1), silybin B (2), isosilybin A (3), isosilybin B (4) from silymarin complex. Eluent system: methanol : water = 50 : 50 (v/v).

3. 결과 및 고찰

3.1. 유효성분의 분리 및 구조 결정

Silymarin으로부터 유효 성분을 분리하는 과정을 Figure 1에 나타내었다. 즉, silica gel column, ODS open column chromatography 및 reverse phase preparative HPLC (50 % aq. methanol)를 실시하여 silybin A와 B가 diastereoisomer로써 혼합된 분획 1(silybin), 그리고 isosilybin A와 B가 diastereoisomer로써 혼합된 분획 2(isosilybin)를 얻을 수 있었다. 분획 1 및 2는 분석용 column을 사용하여 HPLC (50 % aq. methanol)를 실시하여 silybin A (1) (t_R 16.2) 및 silybin B (2) (t_R 18.8), 그리고 isosilybin A (3) (t_R 26.4) 및 isosilybin B (4) (t_R 28.3)를 각각 순수 분리하였다(Figure 2). 순수하게 분리한 유효 성분들의 ESI-MS 및 1H , ^{13}C -NMR, HMBC, HMQC, COSY 등의 스펙트럼을 측정하고 기존의 문헌과 비교 분석하여, 본 화합물들의 화학 구조를 결정하였다[16].

3.2. Silymarin의 미백 효과

3.2.1. Silymarin의 세포 독성 및 멜라닌 저해 활성

Mel-Ab melanocyte를 이용하여 silymarin 화합물의 세포독성 및 멜라닌 저해활성을 측정하였다(Figure 3(A)). 그 결과, silymarin은 0 ~ 50 $\mu g/mL$ 의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않는 안전한 화합물임을 알 수 있었다. 또한 10, 20 및 50 $\mu g/mL$ 에서 각각 38.5 %, 46.9 % 및 64.9 %의 멜라닌 생성 저해활성을 보이는 것으로 나타났다. Silymarin의 멜라닌 생성 저해에 대한 IC_{50} 값은 28.2 $\mu g/mL$ 로 나타났다.

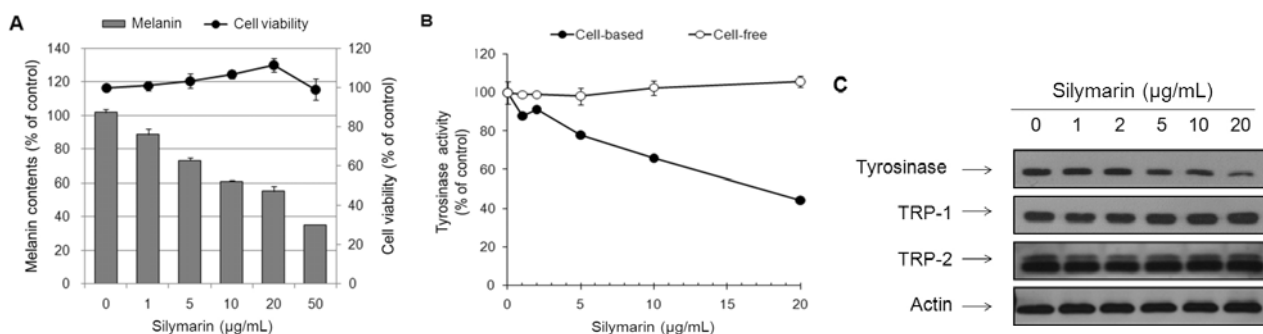


Figure 3. Effects of silymarin on melanogenesis in Mel-Ab cells. Melanin contents and cell viability (A), cell-based or cell-free tyrosinase activity (B) and Western blot analysis of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 (C) were measured as described in Materials and Methods.

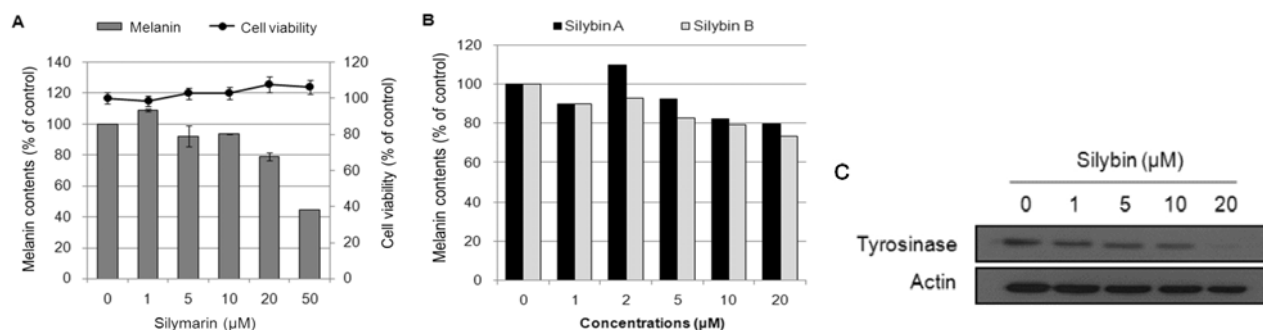


Figure 4. Effects of silybin, silybin A and silybin B on melanogenesis in Mel-Ab cells. Melanin contents and cell viability of silybin (A), melanin contents of silybin A and silybin B (B) and Western blot analysis of tyrosinase (C) were measured as described in Materials and Methods.

3.2.2. Silymarin의 Tyrosinase 저해 활성

멜라닌 생성 과정 중 속도 조절 단계에 작용하는 tyrosinase 효소에 대한 저해활성을 평가하기 위하여 cell-based tyrosinase 및 mushroom tyrosinase에 대한 저해활성을 평가하였다. 그 결과, silymarin은 5, 10 및 20 μg/mL의 농도에서, 각각 21.9 %, 33.8 % 및 55.5 %의 cell-based tyrosinase 저해활성을 나타내었다(Figure 3(B)). 하지만, mushroom tyrosinase를 이용하여 cell-free tyrosinase 활성을 평가한 결과, silymarin 화합물이 100 μg/mL의 농도까지 mushroom tyrosinase 저해활성을 나타내지 않는 것으로 보아, 이는 silymarin 화합물이 멜라닌 생성 과정 중 tyrosinase가 L-DOPA를 산화시키는 속도 조절 단계를 직접적으로 저해하는 것이 아니라, 세포 내에서 tyrosinase의 발현을 조절한다는 가능성을 나타낸다.

3.2.3. Silymarin의 Tyrosinase 단백질 발현 저해 효과
Silymarin이 세포 내 멜라닌 생성 과정의 주요 효소인

tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 효소의 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 Western blot을 실시하였다(Figure 3(C)). 그 결과, silymarin 화합물은 tyrosinase의 발현을 저해하는 것으로 나타났다. 하지만, TRP-1 및 TRP-2의 발현에는 영향을 미치지 않았다. Tyrosinase는 첫 번째 단계인 L-tyrosine이 L-DOPA로 oxidation되는 과정 및 두 번째 단계인 L-DOPA가 DOPQuinone으로 hydroxylation되는 두 과정에 작용하는 제한 효소로서 멜라닌의 생성을 결정짓는 가장 중요한 효소로 알려져 있으며, 본 silymarin 화합물은 tyrosinase의 발현을 억제하여 멜라닌의 생성을 저해하는 것으로 사료된다.

3.3. Silybin A 및 B의 미백 효과

Silymarin 복합체로부터 분리한 활성 화합물인 silybin A 및 silybin B가 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하였다(Figure 4). Silybin은 50 μM의 농도까지 세포독성을 나타내지 않는 동시에 농도 의존적으로 멜라닌의 생성을 저해하였으며 멜라닌 저해 활성에 대한 IC₅₀ 값은

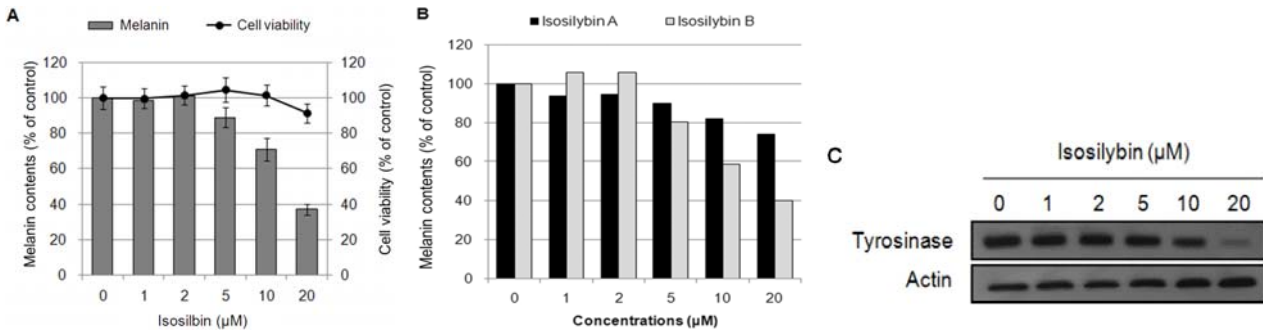


Figure 5. Effects of isosilybin, isosilybin A and isosilybin B on melanogenesis in Mel-Ab cells. Melanin contents and cell viability of isosilybin (A), melanin contents of isosilybin A and isosilybin B (B) and Western blot analysis of tyrosinase (C) were measured as described in Materials and Methods.

45.25 μM로 나타났다. Silybin으로부터 분리 정제한 silybin A 및 silybin B 화합물 모두 농도 의존적으로 멜라닌의 생성을 억제하였으며 두 화합물간의 큰 차이는 나타나지 않았다. 또한 Western blot을 실시한 결과, silybin이 tyrosinase 단백질의 발현을 탁월하게 저해하는 것으로 나타나, 본 활성 화합물 silybin은 세포 내에서 tyrosinase 단백질의 발현을 조절함으로써 멜라닌 저해 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

3.4. Isosilybin A 및 B의 미백 효과

Silymarin 복합체로부터 분리한 활성 화합물인 isosilybin A 및 isosilybin B가 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하였다(Figure 5). Isosilybin은 20 μM의 농도까지 세포독성을 나타내지 않는 동시에 농도 의존적으로 멜라닌의 생성을 저해하였으며 멜라닌 저해 활성에 대한 IC₅₀ 값은 16.32 μM로써 silybin보다 우수한 활성을 나타내었다. Isosilybin으로부터 분리 정제한 isosilybin A 및 isosilybin B의 멜라닌 저해활성을 비교한 결과, 2R, 3R, 7S, 8S의 입체구조를 갖는 isosilybin B가 2R, 3R, 7R, 8R의 입체구조를 갖는 isosilybin A에 비해 더 우수한 멜라닌 저해활성을 갖는 것으로 나타났다. 또한 Western blot을 실시한 결과, isosilybin이 tyrosinase 단백질의 발현을 탁월하게 저해하는 것으로 나타나, 본 활성 화합물 isosilybin은 세포 내에서 tyrosinase 단백질의 발현을 조절하여 멜라닌 저해 활성을 나타내는 것임을 확인하였다.

3.5. Silymarin의 피부 미백 효과에 대한 임상연구

Silymarin의 피부 미백 효과를 평가하기 위하여 21명의 피험자를 대상으로 8주동안 인체적용 시험을 시행하였다. 피험자에게 시험제품과 대조제품을 1일 1회(5회/1주) 사용하게 하였고, 자외선 조사에 의한 인공색소 침착

Table 1. Visual Assessment of Skin Color by Dermatologist

	Placebo	Silymarin	p-Value
4 Weeks	-0.67 ± 0.60	-0.76 ± 0.29	0.54021
8 Weeks	-1.74 ± 0.71	-2.05 ± 0.85	0.01550

Table 2. Change in Skin Brightness (ΔL* Value) by a Chromameter

	Placebo	Silymarin	p-Value
4 Weeks	1.91 ± 0.60	2.21 ± 1.18	0.19388
8 Weeks	2.57 ± 0.90	3.12 ± 1.27	0.01546

후(자외선 3회 조사 후), 7일 경과 후(0주), 제품 도포 4주 경과 후(4주) 및 8주 경과 후(8주) 피부과 전문의에 의한 육안 평가, 기기적 평가 및 피부이상반응에 대한 평가를 실시하였다. 그 결과, Table 1 및 2에 나타난 바와 같이 silymarin 제품 사용 8주 후부터 통계적으로 유의한 수준의 피부 미백 효과를 나타내었으며, 기기적 평가 결과에서도 시험제품(silymarin)이 대조제품(placebo)에 비해 유의성이 있는 피부 미백 개선효과를 나타내었다. Figure 6에 대조군과 시험군의 8주 후 피험자의 미백 개선 상태를 0주와 비교하여 전문의에 의한 육안 평가 결과 및 사진으로 나타내었으며 시험군이 대조군에 비해 색소 침착정도가 더 많이 완화되었음을 알 수 있었다. 또한 시험제품과 대조제품 모두 사용 후 특별한 피부 이상반응이 관찰되지 않아 본 제품은 매우 안전한 미백소재가 될 것으로 판단되었다.

4. 결 론

영경귀 열매 조추출물인 silymarin과 그로부터 분리한

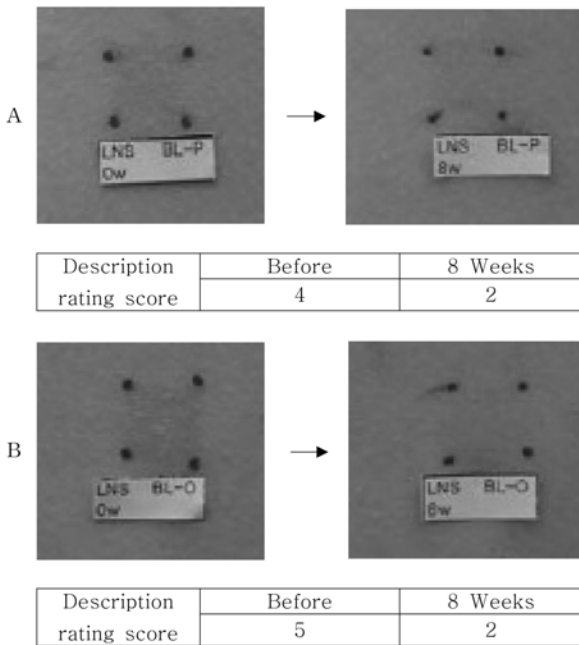


Figure 6. Visual assessment of (A) the placebo group and (B) the test group by dermatologist (double blind test) after the use of the formulation containing silymarin (2 %) for 8 weeks. Description rating score: 0: none, 1: none/mild pigmented, 2: mild pigmented, 3: mild/moderate pigmented, 4: moderate pigmented, 5: moderate/severe pigmented, 6: severe pigmented, 7: very severe pigmented.

유효 성분인 silybin, isosilybin의 멜라닌 생성 억제 효과 및 피부 미백 임상 효과를 규명하였다. Silymarin은 Mel-Ab melanocyte에서 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 억제하였고 IC₅₀ 값은 28.2 µg/mL이었으며, cell-based tyrosinase 활성 및 tyrosinase 단백질의 발현을 저해하였다. Silymarin으로부터 분리한 silybin, isosilybin도 각각 42.25 µM 및 16.32 µM의 IC₅₀ 값을 나타내며 멜라닌의 생성을 억제하였으며 tyrosinase 단백질의 발현을 감소시켰다. 또한 임상실험을 통하여 silymarin 함유 화장품이 대조 화장품에 비해 통계적으로 유의한 피부 미백 효과를 나타냄을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 보건복지가족부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것입니다(과제고유번호 : A050432).

참고 문헌

1. J. P. Ortonne and J. J. Nordlund, The pigimentary system: physiology and pathophysiology, eds. J. J. Norlund, R. E. Boissy, V. J. Hearing, R. A. King and J. P. Ortonne, 489, Oxford University Press, New York (1998).
2. V. J. Hearing and M. Jimenez, Analysis of mammalian pigmentation at the molecular level, *Pigment Cell Res.*, **2**, 75 (1989).
3. K. T. Lee, K. S. Lee, J. H. Jeong, B. K. Jo, M. Y. Heo, and H. P. Kim, Inhibitory effects of *Ramulus mori* extracts on melanogenesis, *J. Cosmet. Sci.*, **54**, 133 (2003).
4. T. Yokota, H. Nishio, Y. Kubota, and M. Mizoguchi, The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation, *Pigment Cell Res.*, **11**, 355 (1998).
5. S. H. Park, D. S. Kim, W. G. Kim, I. J. Ryoo, D. H. Lee, C. H. Huh, S. W. Youn, I. D. Yoo, and K. C. Park, Terrein: a new melanogenesis inhibitor and its mechanism, *Cell Mol. Life Sci.*, **61**, 2878 (2004).
6. K. Sato, H. Takahashi, R. Iraha, and M. Toriyama, Down-regulation of tyrosinase expression by acetylsalicylic acid in murine B16 melanoma, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 33 (2008).
7. N. Skottova and V. Krecman, Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug, *Physiol. Res.*, **47**, 1 (1998).
8. A. Pietrangelo, F. Borella, G. Casalgrandi, G. Montosi, D. Ceccarelli, D. Gallesi, F. Giovannini, A. Gasparetto, and A. Masini, Antioxidant activity of silybin *in vivo* during long-term iron overload in rats, *Gastroenterology*, **109**, 1941 (1995).
9. M. Gu, S. Dhanalakshmi, R. P. Singh, C. Agarwal, and R. Agarwal, Silibinin protects against photocarcinogenesis via modulation of cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases, and Akt signaling, *Cancer Res.*, **64**, 6349 (2004).
10. R. P. Singh and R. Agarwal, Flavonoid antioxidant silymarin and skin cancer, *Antioxid. Redox Signal.*, **4**, 655 (2002).
11. S. Kitajima, Identification of functional components

- of silymarin for prevention of skin aging and gene expression profiling in skin-equivalent models treated with silybin, *Fragrance J.*, **35**, 27 (2007).
12. S. J. Choo, I. J. Ryoo, Y. H. Kim, G. H. Xu, W. G. Kim, K. H. Kim, S. J. Moon, E. D. Son, K. H. Bae, and I. D. Yoo, Silymarin inhibits melanin synthesis in melanocyte cells, *J. Pharm. Pharmacol.*, **61**, 663 (2009).
 13. T. P. Dooley, R. C. Gadwood, K. Kilgore, and L. M. Thomasco, Development of an *in vitro* primary screen for skin depigmentation and antimelanoma agents, *Skin Pharmacol.*, **7**, 188 (1994).
 14. T. Tsuboi, H. Kondoh, J., Hiratsuka, and Y. Mishima, Enhanced melanogenesis induced by tyrosinase gene-transfer increases boron-uptake and killing effect of boron neutron capture therapy for amelanotic melanoma, *Pigment Cell Res.*, **11**, 275 (1998).
 15. R. Busca, C. Bertolotto, J. P. Ortonne, and R. Ballotti, Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70(S6)-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation, *J. Biol. Chem.*, **271**, 31824 (1996).
 16. D. Lee and Y. Liu, Molecular structure and stereochemistry of silybin A, silybin B, isosilybin A and isosilybin B, isolated from *Silybum marianum* (milk thistle), *J. Nat. Prod.*, **66**, 1171 (2003).