

백지 에탄올추출물의 미백효능 연구

김필순^{1*}

¹대구한의대 한방피부미용학과

Whitening Effects of *Angelica dahurica* Radix Ethanol Extract

Pil-Sun Kim^{1*}

¹Dept. of Herbal Skin Care, Daegu Haany University

요 약 본 논문은 백지 에탄올추출물의 미백효능을 조사하기 위하여 melan-a cell, 브라운 기니피그 및 HMB-45 염색을 사용하였다. melan-a 세포에 시료를 6.25, 12.5, 25, 50, $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처치하여 세포 성장율의 변화 관찰 및 멜라닌세포의 형태학적 변화를 관찰하였다. 또한 brown guinea pig (450~500 g) 등 부위에 1500 mJ/cm^2 광량의 ultraviolet B 조사로 유발시킨 인공색소반 (ϕ 2 mm)에 1일 2회, 주 5일, 매회 $30 \mu\text{l}$ 씩 총 5주간 시료를 도포하여 주 1회 육안적 변화를 관찰 하였고, 실험 5주째 되는 날 실험동물은 염산 케타민으로 마취 후 시료를 도포한 인공색소반 부위를 biopsy punch로 절취하여 HMB-45 염색으로 멜라닌소체 내 glycoprotein(gp100) 단백질의 조직학적 변화를 관찰 하였다. 세포성장률 측정에서 시료처리 6.25~50 $\mu\text{g/ml}$ 에서의 세포성장률은 높았고, 멜라닌세포의 형태학적 변화에서는 시료처리 농도가 증가할수록 멜라닌합성 및 수지상 돌기가 적게 관찰 되었다. 동물 실험 육안적 관찰에서 시료 도포군이 용매대조군에 비해 멜라닌 색소침착 정도가 현저하게 낮아졌고, gp100 단백질의 조직학적 관찰에서 시료 도포군은 gp100 단백질 발현 정도가 현저하게 줄어들었으며, 영상분석에서도 시료 도포군이 용매대조군에 비해 유의하게 ($p<0.001$) 감소하였는데 이러한 결과는 현미경 관찰 결과와 일치하였다. 이상의 결과를 종합하면 백지 에탄올추출물은 우수한 미백효과가 있는 것으로 판단된다.

Abstract To investigate whitening Effects of *Angelica dahurica* Radix Ethanol Extract (ADEE), we used melan-a cell line, brown guinea pig, and HMB-45. We treated with ADEE of 6.25, 12.5, 25, and 50 $\mu\text{g/ml}$ concentration in order to evaluate the effect of ADEE on cell viability and on morphological observation of melan-a cells. Also we were induced the artificial tanning spots by $1,500 \text{ mJ/cm}^2$ of ultraviolet B radiation on the backs of brown guinea pigs (approximately 450 ̴500g) and then the test agent of $30\mu\text{l}$ was applied on the spots twice a day, five days a week, for five weeks respectively. The visible whitening effect was evaluated once a week. At the end of the experiment, the animals were sacrificed under anesthetization. The artificial tanning spots were obtained by biopsy punch and stained with HMB-45 to observe the gp100 proteins which were melanosomes. Our results show that cell viability was not reduce at ADEE concentrations between 6.25 and 50 $\mu\text{g/ml}$, melanin synthesis and melanocyte dendricity were decreased in ADEE treated melan-a cells increasing ADEE concentration. In the gross observation, ADEE treated groups had lower pigmentation than the vehicle control groups. And in the histological observation, ADEE treated groups had lower melanocytes than the vehicle control groups. Also in the quantitative analysis of the gp100 proteins using image analysis software, ADEE treated groups had a significantly lower value ($p<0.001$) than the vehicle control group and this results agreed with the results of observation under microscope. From these results, we concluded that ADEE had positive whitening effect.

Key Words : *Angelica dahurica* Radix, Brown guinea-pigs, melan-a cells, whitening effect

*교신저자 : 김필순(yoanname@naver.com)

접수일 11년 07월 21일

수정일 11년 08월 29일

게재확정일 11년 09월 08일

1. 서론

최근 평균수명의 연장과 레저 활동의 증가로 인한 자외선 노출 증가와 환경오염에 의한 오존층의 파괴 및 이에 따른 자외선의 절대량 증가로 자외선에 의해 야기되는 피부변화가 증가되고 있는 추세이다[1]. 이러한 환경에서 자외선으로 인한 피부의 손상과 광노화에 의해 야기되는 피부색소침착이 심해지고 있는 가운데 피부착색에 대한 관심이 날로 높아지고 있다. 피부는 외부환경으로부터 신체를 보호하기 위한 생화학적이고 물리적인 기능을 수행하는 조직중의 하나로 표피, 진피, 피하지방층으로 구성되어 있다[2]. 그 중 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌은 인간의 피부색을 결정짓는데 가장 중요한 역할을 하며, 멜라닌세포 내 멜라노솜에서 합성된다. 멜라닌 과립을 포함하고 있는 멜라노솜은 멜라닌세포의 수지상 돌기 끝부분으로 이동하여 각질세포의 세포질 내로 전달되며, 멜라닌은 각질세포의 핵 주위에 축적하게 된다[3]. 이렇게 축적된 멜라닌은 각질 속에 포함된 채 떨어져 나가는 것을 28일 주기로 반복하고 있다[4]. 멜라닌세포의 수는 인종이나 성별에 따라 차이가 없으며, 인종에 따른 피부색은 각질세포 속에 들어 있는 멜라닌소체의 분포, 수 및 크기와 밀접한 관계가 있으며, 피부 색소침착 정도는 유전, 멜라닌 세포 자극호르몬(α -melanocyte stimulating hormone) 및 자외선과 같은 환경적 요인에 의하여 결정되고[5] 멜라닌세포 내 tyrosinase 활성은 인종에 따라 다르며, 흑인의 피부 멜라닌 내 tyrosinase 활성도가 높다[6]. 표피에 분포하는 멜라닌은 자외선을 흡수하고 차단 보호하는 광보호 작용을 하지만[7], 과도한 색소침착은 기미와 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하는 등 미용적인 면에서도 부정적인 기능을 나타내고 있다. Eumelanin의 합성은 L-tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase 에 의해 DOPA(L-3,4-dihydroxy phenylalanine)로 수산화, DOPA에서 DOPAquinone으로 산화된 후, 계속적으로 leucochrome, DOPA-chrom, DHI(5,6-dihydroxyindole)로 전환되어 tyrosinase의 작용에 의해 멜라닌이 합성되는 경로와 DOPAchrom에서 TRP2 작용에 의해 DHICA 로 전환된 다음, TRP1에 의해 5,6-dihydroxyindole carboxylic acid로 산화된 후 멜라닌 중합에 의해 eumelanin이 합성되는 경로가 있다[8,9]. 현재 미백제 원료로 사용되고 있는 hydroquinone의 미백 기전은 tyrosinase 활성 부위에 있는 구리와 상호작용을 통해 효소활성을 감소시키며 tyrosinase에 의해 DNA와 RNA합성이 저해되어 미백효과를 나타내는 것으로 알려져 있지만[10], DNA와 RNA 합성 모두에 영향을 줌으로서 멜라닌세포의 변성과 손상을 일으키며, 또한 유전자 변이를 일으킬 정도의 강한 세포 독성이 있는 것으로 보고되어 있다[11].

누룩곰팡이의 이차 대사산물인 kojic acid 또한 tyrosinase의 활성에 필요한 구리 이온(Cu^{2+})을 킬레이트 시켜 멜라닌 생성을 저해하는 우수한 미백효능을 나타내지만, 사용 중의 변색, 물질 자체의 불안정성, 피부암 유발 같은 문제점이 있다는 보고가 있다[12]. 이에 따라 최근에는 인체에 무해하고 안정성이 높은 천연 미백 물질을 개발하고자 각종 천연물로부터 미백 효능이 있는 성분을 탐색, 추출하는 연구에 대한 관심이 더욱 고조되고 있으며, 특히 생약이나 한약재 같은 천연물이 새로운 신약 후보 물질을 얻을 수 있는 좋은 재료로 고려되고 있는 가운데 이러한 물질을 이용하여 미백 작용기전 및 미백 효능에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[13,14].

백지(*Angelicae Dahuricae Radix*)는 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 구릿대의 뿌리에서 얻어진 생약으로 다량의 당과 무기질을 함유하고 있으며[15], 약 0.07%의 정유 성분을 함유하는 것으로 밝혀졌다[16]. 백지에 대한 생리활성 연구로는 항혈전 효과[17], 항균 작용[18], 콜라겐 생성촉진효과[19], 항산화 효과[20] 등이 보고되고 있다. 이와 같이 백지의 생리활성에 대한 연구가 다양하게 이루어져 있으나 백지 에탄올추출물의 미백효능에 대한 연구는 아직까지 미흡한 실정이다.

Brown guinea pig는 표피에 인간과 유사한 수의 멜라닌세포와 멜라닌소체를 가지고 있어 자외선과 화학제품에 반응을 잘 하기 때문에 많은 연구자들이 피부 색소침착의 병증을 연구하기 위해 사용하고 있다[21-23].

본 연구는 백지 에탄올추출물을 사용하여 세포독성 및 멜라닌세포 형태학적 관찰을 통해 멜라닌합성 억제 정도를 분석하고 brown guinea pig를 이용한 동물 실험에서 백지 에탄올추출물의 미백효과를 검증하여 화장품 천연물 소재로서의 활용 가능성을 검토 하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 시료

한국식물 추출물은행에서 분양 받은 백지 에탄올추출물(PBC-161A)을 용매(propyleneglycol: ethanol: water (5:3:2))에 농도별로 용해시켜 사용하였다.

2.2 시약 및 기기

HQ(Hydroquinone), DMSO(dimethyl sulfoxide), arbutin은 ACROS 사(USA)의 제품을, Propylene glycol은 (주)동양제철화학(한국)의 제품을, 염산 케타민은 유한양행(한국)의 제품을 사용하였고, 그 외 일반시약들은 특급품을 사

용하였다. 실험기기 중 자외선 조사장치는 UVB sunlamp (UVM-225D, Mineralight Lamp UVP, USA)를, 자외선 측정장치는 UV-radiometer(HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하였으며, 세포주 관찰은 inverted microscope (CKX41, Olympus, Japan), 조직표본관찰은 fluorescence microscope(Axio imager, Carl Zeiss, Germany)를, 영상분석은 i-solution(IMT i-solution ver. 8.0, Canada)을 사용하였다. 고주영[24] 등은 이러한 시약 및 기기를 사용하여 2% 삼톤 에탄올추출물을 brown guinea pig 피부에 8주간 도포한 결과 확연한 미백 효과가 있음을 보고한바 있다.

2.3 세포주 실험

2.3.1 세포주 및 세포배양

C57BL/6 mice에서 유래한 immortalized cell line인 melan-a 세포를 Dr. Bennett(Cancer Research Center, London, England)으로부터 분양 받아 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% PS(penicillin/streptomycin), 200 nM TPA(12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate)가 함유된 RPMI-1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다.

2.3.2 MTT assay

Melan-a 세포를 10% FBS, 1% P/S, 200 nM TPA가 함유된 RPMI-1640 배지에서 37°C, 10% CO₂ incubator에서 72시간 동안 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. melan-a 세포를 96-well plate에 적정 세포수(0.5×10^4 cells/well)로 분주하고 37°C, 10% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음 백지 에탄올추출물을 농도별(6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml)로 희석시켜 200 µl씩 넣은 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. MTT가 0.5 mg/ml 함유된 배지를 200 µl씩 넣은 후 37°C, 10% CO₂ incubator에서 3시간 배양하였다. Plate를 1000 rpm에서 10분간 원심 분리 하여 cell이 바닥에 가라앉게 한 다음 배지를 버리고 DMSO를 200 µl씩 넣고 plate shaker에서 15분간 cell을 녹여낸 다음 ELISA reader로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2.3.3 세포의 형태 관찰

세포의 형태 변화를 관찰하기 위해 백지 에탄올추출물을 6.25, 12.5, 25, 50 µg/ml의 농도로 첨가하여 37°C, 10% CO₂ incubator에서 72시간 배양된 melan-a 세포를 새 배지로 교환 후 도립현미경으로 관찰하였다.

2.4 동물 실험

2.4.1 실험동물 및 처치

약 450~550 g의 brown guinea pig 3마리를 OYC (Oriental Yeast Co. Ltd, Japan)로부터 분양받아 사육실에서 1주일 적응 시킨 후, 실험 전 기간 동안 사료와 물은 자유로이 공급하였고, 사육실온도 22±2°C, 습도50±5%, 조명주기 12시간씩 밤낮을 유지하였다. 실험동물은 실험 5주째 되는 날 염산 케타민으로 마취한 후 시료를 도포한 인공색소반 부위를 직경 12 mm의 biopsy punch로 절취하여 10%의 중성 포르말린 용액에 12시간 실온에서 고정된 후 조직학적 관찰에 사용하였다.

2.4.2 인공색소반 제작 및 시료도포

자외선(UVB)에 의한 인공색소반의 제작은 Choi 등 [22]의 방법으로 수행하였다. Brown guinea pig의 등 부위를 hair clipper로 털을 깎고 깨끗이 면도한 후 염산 케타민 (100 mg/kg)으로 마취한 다음, 동물의 등에 조사부위(φ 12 mm)를 원형으로 뚫은 가죽으로 제작한 천을 덮고 302 nm를 방출하는 sunlamp를 이용하여 자외선을 조사하였다. 자외선은 주 1회, 1회 500 mJ/cm² 씩, 3주간 연속으로 하여 총 1,500 mJ/cm² 조사하였다. UVB 조사에 의해 형성된 인공색소반에 미백 물질을 도포하는 시점은 색소침착 안정화를 위해 마지막 자외선을 조사한 10일 후부터 실험군은 1%, 2% 백지 에탄올추출물을, 양성대조군은 2% 하이드로퀴논을 1일 2회, 주 5일, 매회 30 µl micro pipette를 이용하여 5주간 도포하였다. (1%: 0.53 mg/cm²/일, 2%: 1.06mg/cm²/일). 대조군은 생리식염수를, 용매 대조군은 용매를 도포 하였다.

2.4.3 육안적 관찰

색소침착 확인을 위한 육안적 관찰은 실험기간 동안 매주 1회, 5주 동안 실험동물의 피부착색 상태를 용매대조군 도포부위와 시료군 도포부위를 비교하여 상대적인 미백 효과를 관찰하였고, 피부표면 상태는 디지털카메라로 촬영하였다.

2.4.4 HMB-45 염색

4 µm 두께의 박절편을 coating slide에 부착 탈파라핀 함수 후 benchmark XT automated immunostainer(Ventana Medical Systems, USA)를 사용하여 염색하였다. 자동화 과정은 reaction buffer로 3분간 세척하고 후 3% H₂O₂에 3분간 담그어 peroxidase의 활성을 억제시킨 후 일차항체 HMB-45를 1:100으로 희석하여 반응시키고 reaction buffer로 세척한 다음 biotin에 20분 반응 후 streptavidin에 25분 반응 시켰다. DAB(diamino-benzidine)에 발색 후

대조염색, 봉입한 다음 광학현미경으로 관찰하였고, 영상 분석 소프트웨어를 이용하여 멜라닌소체 내 gp100 단백질 발현정도를 수치화하여 분석하였다.

2.5 자료 분석

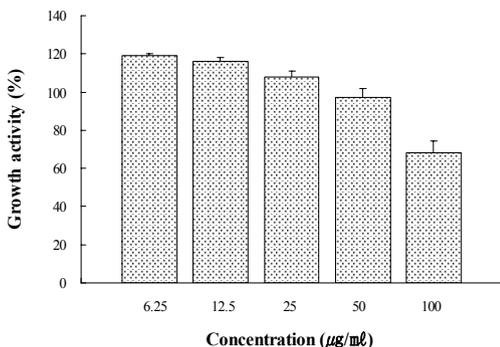
SPSS(v 15.0) 통계프로그램을 이용하여 일원배치 분산 분석(one-way ANOVA)으로 동질성을 분석하였고, 각 군 간의 비교는 Duncan's multiple range test로 사후분석을 실시하였다. 통계학적인 유의성 검증은 $\alpha=0.001$ 이하에서 실시하였다.

3. 연구결과 및 고찰

3.1 세포주 실험

3.1.1 세포독성(MTT assay)

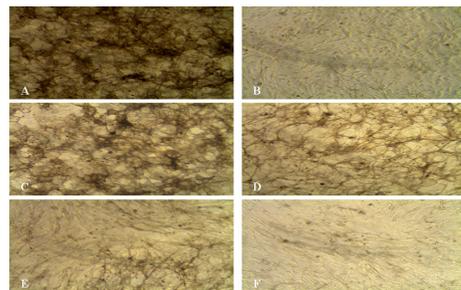
Melan-a 세포에 대한 백지 에탄올추출물의 세포독성 확인 및 실험에 사용할 시료의 농도 범위 결정을 위해 MTT assay를 실시하였다. MTT assay법은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 시약이 세포내로 흡수된 후 미토콘드리아(mitochondrion)의 succinate dehydrogenase에 의해 formazan을 형성하는데 이 물질의 세포내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하는 것으로서 세포생장율을 측정하는 대표적인 방법이다. 세포 성장율에 미치는 백지 에탄올추출물의 영향을 측정한 결과, 측정농도 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 세포성장률이 68%로 나타나 melan-a 세포에 대한 백지 에탄올추출물의 최대허용농도는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 확인되었다[Fig. 1].



[그림 1] 백지 에탄올추출물 처리 농도에 따른 세포 성장율 [Fig. 1] Growth activities of melan-a cells treated with various concentrations of *Angelica dahurica* Radix ethanol extract. Values are mean \pm SD of 3 replicates.

3.1.2 세포의 형태 관찰

Melan-a 세포에 백지 에탄올추출물을 농도별로 처리하고 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다. 멜라닌세포는 신경능에서 유래한 수지상세포로서 표피 기저층에 존재하며 한 개의 멜라닌세포와 약 20-40개의 각질형성세포로 이루어진 표피 멜라닌 단위(epidermal melanin unit)를 형성한다. 수지상 돌기는 각질세포와의 연결을 위해 멜라닌세포의 세포막이 확장되는 형태이며, 멜라닌세포 내에 있는 멜라노솜은 이 수지상 돌기를 통하여 각질세포로 이동하게 된다[25,26]. Nakazawa et al[27]은 *in vitro* 에서 멜라닌세포의 형태는 배양된 멜라닌세포의 과증식 때문에 수지상 돌기 수의 증가와 함께 수지상돌기 길이가 몸체 길이의 두 배 이상으로 나타난다는 보고를 하였다. 본 연구에서도 melan-a 세포의 형태 변화를 도립현미경으로 관찰한 결과, 시료를 처리하지 않은 정상군의 세포에서는 수지상돌기 발달과 함께 많은 양의 멜라닌 침전물이 관찰되어 선행연구와 비슷한 양상을 나타내었다. 대조군에 비해 시료 처리 농도 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 세포 모양과 수에 있어서 큰 변화가 없는 반면, 양성대조군으로 사용한 arbutin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군과 백지 에탄올추출물은 시료처리 농도가 증가할수록 정상군에 비해 세포의 밀도는 감소하였고 합성된 멜라닌과 수지상 돌기가 현저하게 줄어든 것을 관찰할 수 있었다[Fig. 2].



[그림 2] 백지 에탄올추출물을 처리한 melan-a cells에서 세포 형태 관찰

[Fig. 2] Morphological change of melan-a cells treated with *Angelica dahurica* Radix ethanol extract. $\times 200$. A: control, B: arbutin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, C: ADEE 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, D: ADEE 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, E: ADEE 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, F: ADEE 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3.2 동물 실험

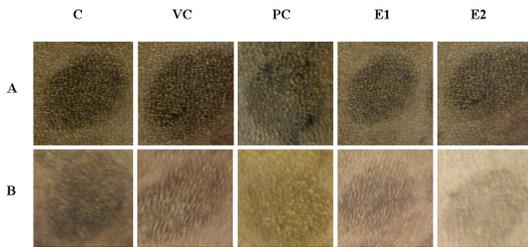
3.2.1 멜라닌 색소침착 육안적 비교

백지 에탄올추출물이 세포수준에서 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 확인되었으나 동물 시험에서의 미백효능에 대한 연구는 아직 확인된 바가 없어 본 실험에서는 백지 에탄올추출물을 도포 전과 도포 5주 후의 brown

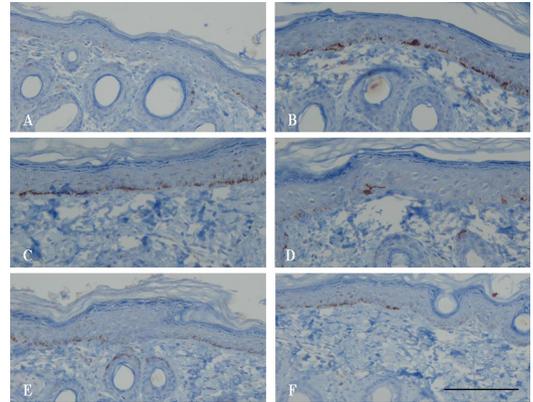
guinea pig 피부 멜라닌 색소침착 변화 정도 및 백지 에탄올추출물의 미백 효과를 FDA 공인 제품인 hydroquinone 과 비교 관찰하기 위하여 육안적 관찰을 하였다.

Brown guinea pig는 사람과 같이 표피에 멜라닌세포가 있기 때문에 자외선에 의해 색소침착이 일어난다. 인체와 동물의 피부에 자외선을 조사하였을 때 각질형성세포로부터 분비되는cytokine이 멜라닌세포에 직접 또는 간접적으로 작용하여 멜라닌세포와 멜라닌 색소침착을 증가시킨다는 보고가 있다[23,28].

자외선에 의해 생성된 색소침착 부위의 색소타입은 tyrosinase, TRP1, TRP2, peroxidase의 전사 및 활성 조절, ii) 멜라노솜의 각질형성세포로의 이동 및 각질형성세포에서의 분배 조절, iii) 멜라닌과 멜라노솜의 분해와 색소화 된 각질형성세포의 턴오버 조절에 의해 일어난다[10]. 본 연구에서 UVB 조사로 유발된 brown guinea pig의 등 부위의 인공색소반에 백지 에탄올추출물을 1일 2회, 주 5일, 5주간 도포하여 육안으로 비교한 결과, 실험 기간 중 모든 실험군에서 실험물질 도포로 인한 이상 징후는 관찰되지 않았으며, 양성대조군과 2% 실험군은 시료도포 3주부터 멜라닌 색소침착 부위가 밝아지기 시작하여 색소침착 정도가 부분적으로 없어지는 현상을 관찰할 수 있었다. 실험 5주에는 용매대조군에 비해 양성대조군과 2% 실험군의 색소침착 부위에서 선명한 탈색효과를 나타내었고, 1% 실험군의 색소침착 부위 또한 밝아져 백지 에탄올추출물의 미백효과를 확인하였다[Fig. 3]. 이와 같은 결과는 백지 에탄올추출물이 멜라닌세포 수지상돌기에 의해 각질세포에 전달된 멜라노솜을 분해시키고 색소화 된 각질형성세포의 턴오버 주기를 촉진, 멜라닌 색소타입을 유도하여 미백효과를 나타낸 것으로 사료된다.



[그림 3] 백지 에탄올추출물을 5주간 도포한 브라운 기니픽 피부에서 멜라닌 색소침착 육안적 관찰
[Fig. 3] Gross observation of depigmenting effect in brown guinea pigs treated with *Angelica dahuricae* Radix ethanol extract for 5 weeks. A: before treatment B: after 5-week treatment, C: UVB irradiation group, VC: vehicle treatment group, PC: 2% HQ treatment group, E1: 1% ADEE treatment group, E2: 2% ADEE treatment group.



[그림 4] HMB-45 염색을 한 브라운 기니픽 피부에서 멜라닌세포 생성률에 대한 조직학적 관찰
[Fig. 4] Histological observation on the production rate of melanocyte in brown guinea-pig skin. HMB-45 immunohistochemical stain, ×200, scale bar 50µm. A: non-treated group, B: UVB irradiation group, C: vehicle treatment group, D: 2% HQ treatment group, E: 1% ADEE treatment group, F: 2% ADEE treatment group.

3.2.2 멜라닌세포 생성 조직학적 관찰

멜라노솜은 멜라닌세포에서만 볼 수 있는 세포내 구조이며, 멜라닌의 생성 중간 산물들이 큰 반응성을 가지고 있어 그 독성으로부터 세포를 보호하기 위하여 멜라노솜내에서만 멜라닌합성이 일어나는 것으로 보고되고 있다 [29]. 이에 본 연구는 HMB-45 염색으로 멜라노솜에 존재하는 gp100의 발현 정도와 분포 형태를 분석하여 멜라닌세포 생성의 변화를 간접적으로 관찰하였다. HMB-45 염색은 S-100 염색과 함께 멜라닌세포 및 멜라노솜에 대한 연구에 민감한 지표로 널리 사용되고 있다. S-100에 대한 항체는 민감도가 높지만 특이성은 낮고, 반면 HMB-45는 특이성이 높은 것으로 보고되고 있다[30]. S-100은 멜라닌세포와 랑거한스세포 등에 반응하며, HMB-45는 멜라노솜에 특이한 당단백질인 gp100에 반응하여 활동성의 멜라닌세포에 반응을 보인다[23,31]. 멜라닌세포 생성 변화를 간접적으로 관찰한 결과, 정상군에 비해 대조군 및 용매대조군에서 gp100 단백질은 증가현상이 주로 기저층에 집결되어 나타난 반면, 양성대조군과 1%, 2%의 실험군은 대조군과 용매대조군에 비해 gp100 발현 양상이 현저하게 줄어들었음을 확인하였다[Fig. 4]. 멜라노솜에서 발견되는 gp100 단백질의 발현 정도를 측정면적 대비 단백질의 발현면적비(%)로 수치화 한 결과, 정상군(2.2%)에 비해 대조군 및 용매대조군은 각각 12.2%, 9.1%로 유의하게(p<0.001) 높은 수치를 나타낸 반면, 양성대조군과 1%, 2%의 실험군은 용매대조군에 비해 각각 2.7%, 6.9%, 5.6%로 유의하

[표 1] 백지 에탄올추출물을 5주간 도포한 브라운 기니픽 피부에서의 gp100 단백질 발을 비교
 [Table 1] The comparison on the expression rate of gp100 protein in the skin epidermis of brown guinea-pig

Area	Normal		Control		Experimental	
	N	C	VC	PC	E1	E2
Total (μm^2)	6426.4 \pm 370.1	6561.9 \pm 392.5	6651.8 \pm 336.9	6456.5 \pm 317.2	6796.4 \pm 391.3	6637.9 \pm 323.9
gp100 protein (μm^2)	104.3 \pm 12.2	1139.64 \pm 167.6	806.0 \pm 112.65	168.7 \pm 23.9	465.6 \pm 58.5	269.4 \pm 46.6
% of gp100 protein	2.2 \pm 1.0 ^a	13.0 \pm 1.5 ^d	10.1 \pm 1.2 ^c	2.7 \pm 1.0 ^a	6.9 \pm 1.1 ^b	5.6 \pm 1.0 ^b

Values are mean \pm SD of 6 samples. Values with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.001) by ANOVA and Duncan's multiple range test. N: non-treated group, C: UVB irradiation group, VC: vehicle treatment group, PC: 2% HQ treatment group, E1: 1% ADEE treatment group, E2: 2% ADEE treatment group.

계(p<0.001) 감소하여 현미경 관찰의 결과와 일치하였다 [Table 1]. 이러한 결과는 본 연구자[32]가 UVB 조사로 유발된 brown guinea pig의 등 부위의 인공색소반에 백지 열수추출물 2%를 1일 2회, 주 5일, 8주간 도포 후 S-100 염색으로 멜라닌세포 생성 변화를 관찰한 결과, 실험군은 4.6%로 용매대조군(10.2%)에 비해 유의하게(p<0.05) 감소하였다고 보고한 연구와 비슷한 결과가 나타났으며, 이는 백지 에탄올추출물이 멜라닌세포 생성을 억제하는데 기인한 것으로 해석된다.

4. 요약 및 결론

본 연구는 백지 에탄올추출물의 미백효능을 알아보기 위해 세포수준에서 melan-a 세포를 사용하여 세포독성 및 멜라닌세포 형태학적 변화를 관찰한 시험과 brown guinea pig의 등 부위에 1500 mJ/cm² 광량의 UVB 조사로 유발시킨 인공색소반(ϕ 12 mm)에 1일 2회, 주 5일, 매회 30 μ l씩 총 5주간 시료를 도포하여 미백효과를 평가한 동물 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

세포독성을 알아보기 위해 수행한 MTT assay 에서 백지 에탄올추출물은 측정 농도 100 μ g/ml에서 세포생존율이 68%로 나타나 melan-a 세포에 대한 최대허용농도는 50 μ g/ml인 것으로 확인되었다. 백지 에탄올추출물을 농도별로 처리한 melan-a 세포 형태학적 변화를 관찰한 결과, arbutin 25 μ g/ml 처리군과 백지 에탄올추출물 처리군은 대조군에 비해 농도가 증가할수록 수치상돌기 및 멜라닌합성 양상이 확연하게 감소하였음을 확인하였다.

1%, 2%의 백지 에탄올추출물 도포군, 2%의 하이드로퀴논 도포군, 용매대조군과 대조군 간에 미백 효과를 육안으로 비교한 결과, 양성대조군과 2% 실험군은 시료도포 3주부터 멜라닌 색소침착 부위의 색소침착 정도가 부분적으

로 떨어지는 양상이 나타났으며, 실험 5주에는 용매대조군에 비해 양성대조군과 2% 실험군의 색소침착 부위에서 선명한 탈색효과를 나타내었고, 1% 실험군의 색소침착 부위 역시 현저하게 밝아졌다. gp100 단백질 발현정도를 통하여 멜라닌세포 생성정도와 분포형태를 간접적으로 관찰한 결과, 대조군과 용매대조군은 정상군에 비해 멜라닌세포 생성정도가 증가하였으며 이러한 현상은 주로 기저층에 밀착되어 나타났고, gp100 단백질 발현면적을 수치화하여 객관적으로 비교 분석한 결과에서도 정상군에 비해 대조군과 용매대조군은 gp100 단백질 발현면적이 유의하게(p<0.001) 높은 것을 확인하였고 양성대조군과 1%, 2%의 실험군은 대조군과 용매대조군에 비해 유의하게(p<0.001) 낮은 수치를 나타내었다.

이상의 결과를 종합하면 백지 에탄올추출물을 melan-a 세포에 처리한 시험에서 세포독성은 보이지 않으면서 멜라닌합성 억제효과를 나타냈다. Brown guinea pig을 이용한 동물 실험에서는 백지 에탄올추출물 1%, 2% 모두 멜라닌색소 침착 부위에서 선명한 탈색효과를 나타내었으며, 멜라닌세포 증식 또한 감소되어 현저한 미백효과가 확인되어 미백 화장품 천연소재로 실용 가능성이 있을 것으로 판단된다.

References

[1] Y. Matsumura, and H. N. Ananthaswamy, "Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin", Toxicology and Applied Pharmacology, Vol. 195, pp. 298-308, 2004.
 [2] G. P. He, et al., "In vivo measurement and mapping of skin redox stress induced by ultra violet light exposure", Free Radical Biology & Medicine, Vol. 36, no. 5, pp. 665-672, 2004.

- [3] S. H. Jung, et al., "Inhibitory Effects of fucoidan on Melanin Synthesis and Tyrosinase Activity", Journal of Life Science, Vol. 19, no. 1, pp. 75-80, 2009.
- [4] K. H. Jang, and S. S. Roh, "Depigmentation activity of many herb", Research Institute of Korean Medicine, vol. 13, no. 2, pp. 289-302, 2004.
- [5] E. K. Sung, et al, "The investigation of the melanocytes in a cultured skin equivalent model", Korean Journal of Anatomy, Vol. 33, no. 1, pp. 89-97, 2000.
- [6] B. B. Fuller, et al., "Regulation of catalytic activity of preexisting tyrosinase in Black and Caucasian human melanocyte cell cultures", Experimental Cell Research, Vol. 262, pp.197-208, 2001.
- [7] N. Agar, and A. R. Young, "Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage?", Mutation Research, Vol. 571, no. 1, pp. 121-132, 2005.
- [8] K. Wakamatsu, et al., "Usefulness of 4-amino-3-hydroxy-phenylalanine as a specific marker of pheomelanin", Pigment Cell Research, Vol. 15, pp. 225-23, 200.
- [9] A. Slominski, et al., "Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation". Physiological Reviews, Vol. 84, no. 4, pp. 1155-1228, 2004.
- [10] S. Briganti, et al., "Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation", Pigment Cell Research, Vol. 16, no. 2, pp. 101-11, 2003.
- [11] K. Maeda, and M. Hatato, "Involvement of photooxidation of melanogenic precursors in prolonged pigmentation induced by ultraviolet A", Journal of Investigative Dermatology, Vol. 122, pp. 503-509, 2004.
- [12] J. Cabanes, et al., Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a show binding inhibitor of cathecilase activity of tyrosinase", Journal of Pharmacology, Vol. 46, no. 12, pp. 982-985, 1994.
- [13] T. Aburjai, and F. M. Natsheh, Plants used in cosmetics", Phytotherapy Research, Vol. 17, no. 9, pp. 987-1000, 2003.
- [14] H. Y. Lee, "Study for effect of natural product extracts on skin malanogenesis inhibition", Ph.D. diss., Kangwon National University, 2009.
- [15] E. Y. Joo, and W. J. Kang, "Analysis on the components of the *Angelica dahurica* root", Korean Journal of Food Preservation, Vol. 12, no. 5, pp. 476-481, 2005.
- [16] H. S. Kim, and H. J. Chi, "Studies on essential oils of plants of *Angelica genus* in Korea (III)", Korean Journal of Pharmacognosy, Vol. 21, no. 2, pp. 121-125, 1990.
- [17] C. M. Kim, et al., "Antithrombotic effect of the BuOH soluble fraction of *Angelica dahurica* root", Korean Journal of Pharmacognosy, Vol. 26, no. 1, pp. 74-77, 1995.
- [18] D. Lechne, et al., "The anti-staphylococcal activity of *Angelica dahurica*", Phytochemistry, Vol. 65, no. 3, pp. 331-335, 2004.
- [19] M. H. Jin, et al., "Promoting synthesis of collagen from root", Korean Journal of Pharmacognosy, Vol. 35, no. 4, pp. 315-319, 2004.
- [20] Y. S. Lee, et al., "Antioxidative activity and physiological function of the roots", Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition, Vol. 36, no. 1, pp. 20-26, 2007.
- [21] J. L. Bolognia, et al., "Hairless pigmented guinea pigs: a new model for the study of mammalian pigmentation", Pigment Cell Research, Vol. 3, pp. 150-156, 1990.
- [22] H. J. Choi, et al. "Deoxydopophylotoxin reduces skin pigmentation of brown guineapigs", Planta Medic, Vol. 70, pp. 378-380, 2004.
- [23] M. Tobiiishi, et al., "Pigmentation in intrinsically aged skin of A1 guinea pigs", Pigment Cell Research, Vol. 17, no. 6, pp. 651-65, 2004.
- [24] J. T. Ko, et al., "Effect of *Scirpi rhizoma* Ethanol Extract on Skin Whitening in an Animal Model of Brown Guinea Pigs", Journal of Korean Society of Environmental Health and Toxicology, Vol. 24, no. 3, pp. 219-229, 2009.
- [25] D. W. Provance, et al., "Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution", Proceedings of National Academy of Sciences USA, Vol. 93, no. 25, pp. 14554-14558, 1996.
- [26] K. H. Son, "A study on the evaluation of depigmenting efficacy in the skin and the search for depigmenting agents from natural products", Ph.D. diss., Kangwon National University, 2007.
- [27] K. Nakazawa, et al., "Modulation of normal human melanocyte dendricity by growth promoting agents", Pigment Cell Research, Vol. 6, no. 6, pp. 406-416, 1993.
- [28] B. A. Gilchrest, et al., "Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation", Journal of Photochemistry and Photobiology, Vol. 63, no. 1, pp. 1-10, 1996.
- [29] M. Seiji, et al., "Subcellular localization of melanin biosynthersi", The New York Academy of Sciences, Vol. 100, pp. 497-533, 1963.
- [30] M. V. Sheffield, et al., "Comparison of five antibodies

as markers in the diagnosis of melanoma in cytologic preparations", American Journal of Clinical Pathology, Vol. 118, no. 6, pp. 930-936, 2002.

- [31] B. R. Smoller, et al., "HMB-45 recognizes stimulated melanocytes", Journal of Cutaneous Pathology, Vol. 16, pp. 49-53, 1989.
- [32] P. S. Kim, and Y. C. Kim, "The Whitening Effect of *Angelicae dahuricae* Radix Water Extract in Brown Guinea Pigs", Korean Journal of Environmental Health Science, Vol. 35, no. 5. pp. 417-425, 2009.

김 필 순(Pil-Sun Kim)

[정회원]



- 2006년 8월 : 경북대학교 경영대학원 (경영학석사)
- 2010년 2월 : 계명대학교 대학원 공중보건학과 (보건학박사)
- 2006년 8월 ~ 2008년 8월 : 경일대학교 코디네이션학과 전임교수
- 2010년 3월 ~ 현재 : 대구한의대학교 한방피부미용학과 외래교수

<관심분야>

미용보건, 뷰티패션, 건강