

백지, 세신, 백강잠 및 면간방이 피부미백에 미치는 영향

전상훈[†] · 임미혜^{††}

대전대학교 보건스포츠대학원 미용의학과
(2011년 4월 10일 접수 ; 2011년 4월 23일 채택)

The effect of Baeckji, Seasin, Baeckgangjam and Myunkanbang on skin-whitening

Sang-Hun Jeon[†] · Mi-Hye Lim^{††}

*Department of Beauty & Medicine, Graduate School of Public Health and Sports,
(Received April 10, 2011 ; Accepted April 23, 2011)*

Abstract : To develop new natural substances for whitening agent, Baeckji(*Angelica dahurica*:BK), Seasin(*Asarum sieboldii*:SS), Baecjgangjam(*Bombycis corpus*:BGJ) and Mynkanbang(MKB) were selected and extracted by hot water and 70% EtOH, respectively. Hydrothermal and ethanolic extracts of BK, SS, BGJ and MKB were evaluated for anti-oxidative effect, tyrosinase activity, melanogenesis of B16 melanoma cells and changes in level of tyrosinase expression by using Western blotting. All hydrothermal and ethanolic extracts showed scavenging activities of free radicals against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) but no inhibitory effect on tyrosinase activity. Ethanolic extracts of BK, SS, and BGJ and especially highly, those of MKB inhibited production of melanin in B16 melanoma cells and were able to reduce the level of tyrosinase expression in B16 melanoma cells. These results suggest that ethanolic extracts of BK, SS, BGJ and MKB can be an effective whitening agent from natural plant.

Keywords : melanin, tyrosinase, Myunganbang, Baeckji, Seasin, Baeckgangjam,

1. 서론

동서고금을 통하여 희고 깨끗한 피부는 아름다움의 상징이었으며 현대에 와서도 이러한 피부색이 미(美)를 가늠하는 기준이 됨은 변함이 없다. 그러나 현대에는 각종 산업의 발달로 환경오염이 날로 심각해짐에 따라 지구 온난화로

인한 오존층의 파괴로 자외선의 강도가 커져 신체의 면역체계가 파괴되어 저항력이 약화되고 얼굴이나 피부 등에 병리적 현상들이 유발되고 있다. 무엇보다 색소침착 및 색소성 질환으로 인한 피부색의 변화가 심해지고 있는 가운데 피부의 색소침착에 주원인 요소인 자외선이 피부노화의 원인으로 알려지면서 미백에 대한 개념이 피부노화까지 포함하는 포괄적인 개념으로 인식되고 있다. 따라서 자외선에 의한 색소침착 및 피부의 노화 등의 문제점을 해결

[†]주저자(E-mail:jeonsh0110@hanmail.net)

^{††}교신저자(E-mail:beauty1@dju..kr)

하고자 미백효과가 뛰어난 미백용 화장품과 의약품 개발에 대하여 많은 관심이 집중되고 있다[1].

현재 화장품 시장에서 사용되고 있는 미백물질로는 arbutin, ascorbic acid, kojic acid 등이 사용되고 있으나 이들은 미백효과가 뛰어나 널리 사용되고 있음에도 불구하고 제품의 안전성이 낮다는 문제를 여전히 내포하고 있어 화학적 물질이 아닌 부작용이 적고 안전성 있는 생약성분이나 천연물질에서 미백소재를 찾기 위한 시도가 이루어지고 있다[2]. 특히 한의학 분야에서 이미 사용되고 있는 처방 가운데 마황 및 마풍고의 미백효과에 관한 연구[3] 와 사백산(瀉白散)의 미백효과 검증에 관한 연구[4] 및 연령보고단 가감방이 피부 미용에 미치는 영향[5] 등을 포함하여 소청룡탕, 육미지황탕, 가감서시옥용산, 연령고본단, 승마갈근탕, 보중익기탕 등이 피부 미백에 미치는 영향이 활발하게 연구되어 왔다. 그러나 이러한 처방은 대부분 내복처방 위주의 것이었으며 색소침착은 피부 질환임을 고려해볼 때 앞으로 동의보감에서 기미나 주근깨를 의미하는 풍자, 분자, 작란반 등과 같은 얼굴에 발생하는 각종 피부질환에 소개하는 서시옥용산, 옥용산, 홍옥산, 옥용고 등의 외용방 연구는 미백 시장에 새로운 소재를 제시할 수 있는 분야라고 사료된다. 국내의 경우 서시옥용산이 *in vitro*에서 tyrosinase활성억제에 의하여 멜라닌생성이 감소되어 미백효과가 있다고 보고한 연구를 제외하고는 기미를 위한 외용방에 관한 연구가 부진한 실정이다[6].

따라서 본 연구에서는 간명의곡<簡明醫彙>에서 최초 수록되었으며 얼굴의 기미를 의미하는 면간(面黥)에 효과가 뛰어나 문헌에 자주 언급되는 외용처방 중 하나인 면간방(面黥方)의 미백 효과를 확인하여 새로운 천연물을 발굴하고자 면간방을 구성하고 있는 본초인 백강잠(*Angelica dahuria*), 백지(*Asarum sieboldii*) 및 세신(*Asarum sieboldii*) 각각의 추출을 시도하였으며 각각 추출된 성분의 tyrosinase 발현억제능, tyrosinase 활성도 및 항산화력 등을 확인하는 실험을 통하여 이들 추출물이 미백에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 이러한 외용방인 면간방 구성 본초들의 미백효과 확인을 통하여 천연물 위주의 한약재 개발 산업을 위한 기초자료를 제공하고 색소침착치료의 다변

화를 꾀할 수 있을 것으로 기대된다.

2. 실험

2.1. 실험재료

면간방의 구성약재인 세신, 백지, 백강잠은 서울 경동약령시장 소재의 D 한약방으로부터 국내산인 것이 확인된 약재를 구입하여 사용하였다.

2.2. 시료추출

2.2.1. 열수추출

세신, 백지 및 백강잠과 이들이 각각 1:1:1로 각각 구성된 면간방을 열수로 추출하기 위하여 각 시료가 10%(w/v)되게 증류수를 첨가하여 70℃에서 3시간 동안 교반하면서 수용성 물질을 추출하였으며 3회 반복으로 환류 추출하였다.

2.2.2. EtOH추출

세신, 백지 및 백강잠과 면간방 시료를 에탄올로 추출하기 위하여 시료의 농도가 10%(w/v)되도록 70% EtOH를 부은 다음 상온에서 24시간 교반하였으며 이를 3회 반복 시행하여 추출하였다.

2.3. 세포 및 배양

실험에 사용한 세포는 mouse melanoma cell(B16F10)을 선택하였으며 배양액은 10% FBS(Gibco, US), 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin (Gibco, US) 등을 첨가한 DMEM 배양액(Gibco, US: 이후 DMEM 배양액이라 칭함)을 사용하였고, 37℃ 및 90% 습도가 유지되는 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2.4. 항산화능(Antioxidant activity)

시료추출물에 대한 항산화능을 확인하기 위하여 Blois(1958) 방법을 이용하였다[7]. 산화반응액은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, Sigma Chemical Co., US) 2mg에 EtOH을 첨가하여 15ml이 되도록 제조하였다. 각각의 농도의 시료추출물 100 μ l와 제조된 DPPH solution 100 μ l를 섞어 실온에서 30분간 암 상태에서 방치하였으며 plate reader를 이용하여 517nm의 파

장에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험결과는 3회 반복 실험한 결과의 평균치로 하였으며 측정된 흡광도는 (시료를 첨가하지 않은대조군의 흡광도-시료를 첨가한 반응구의 흡광도)/시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도 $\times 100$ 으로 계산하여 백분율로 표기하였고 대조군으로는 비타민 C를 사용하였다.

2.5. 세포독성(Cytotoxic activity)

시료추출물의 세포에 대한 독성은 Mosmann(1983)의 방법을 변형하여 사용하였다[8]. 배양된 B16F10 세포는 96 well plate에서 well당 1×10^4 cells/100 μ l로 이식하여 37 $^{\circ}$ C, 90%습도, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 동안 배양한 다음 시료추출물을 농도별로 처리하여 다시 24시간 배양하였다. 시료추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 48시간 배양된 배양액에 각 well당 0.5mg/ μ l의 MTT(Sigma Chemical Co., US) 첨가 후 37 $^{\circ}$ C, 암상태에서 3시간 동안 incubation시킨 후 배양액을 제거하고 바닥에 붙어있는 crystal에 100 μ l의 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma Chemical Co., US)로 용해시킨 다음 plate reader인 Spectra MAX(Molecular Devices, US)를 이용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. Tyrosinase activity

Tyrosinase의 활성도 측정을 위하여 Yagi(1987) 등의 방법을 이용하였다[9]. 30mM PBS(phosphate-buffered saline, PH 7.2)에 40U/ml의 mushroom tyrosinase(Sigma Chemical, USA)를 녹인 기질액에 3mM L-DOPA(Sigma Chemical Co., US)와 시료추출물을 각각의 농도가 되도록 처리하였다. 반응액을 섞어 37 $^{\circ}$ C heatblock에서 2분간 반응시킨 후 생성된 DOPAquinone양을 측정하기 위하여 475nm에서 spectrophotometer (Amersham, UK)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase의 활성도는 $100 - \{(\text{시료를 첨가하지 않은 반응구의 흡광도} - \text{시료를 첨가한 반응구의 흡광도}) / \text{시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도} \times 100\}$ 로 계산하여 백분율로 표기하였다.

2.7. 멜라닌 생성량

시료추출물이 멜라닌 생성량을 측정하기 위하여 Hosoi(1985) 등의 방법을 이용하였다[10].

60mm culture dish에 B16F10 세포주를 1.5×10^5 개 접종한 다음 24시간 배양 후 시료추출물을 처리하였으며 시료 처리 후 24시간 배양하여 세포를 수확하고 2회 PBS로 세척하였다. 수확된 세포는 1% Triton X-100(Sigma Chemical Co, USA)로 30분 동안 용해시켰으며 이를 시험관에 옮겨 12000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 얻어진 상층액은 단백질정량실험에 사용하였고 pellet층에는 250 μ l의 1N NaOH용액을 가하여 100 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 용해하였으며 이를 멜라닌 용액으로 사용하였다. 용해된 멜라닌의 양은 spectrophotometer(Amersham, UK)를 이용하여 405nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며 양성대조군으로는 α -MSH(Sigma Chemical Co, USA)를 사용하였고 음성대조군으로는 Arbutin(Bioland, Korea)을 사용하여 비교하였다. 멜라닌 정량은 합성멜라닌(Sigma chemical Co, US)을 사용하여 표준곡선을 작성한 다음 이로부터 생성된 멜라닌양을 측정하였으며 멜라닌생성량은 시료처리군의 멜라닌 생성량/무처리군의 멜라닌생성량으로 상대값을 환산하여 비교하였다.

2.8. Tyrosinase 발현량

60mm culture dish에 B16F10 mouse melanoma 세포주를 1×10^5 개 접종한 후 시료추출물을 처리하였으며 시료 처리 24시간 처리 후 수확하였다. 수확한 세포는 PBS로 2회 세척하고 RIPA lysis buffer(Table 1-2)로 용해하였으며 용해 후 각각의 단백질 시료를 Bradford (Bio-rad, US)법을 통해 정량하였다. 정량된 시료를 각각 5 \times sample buffer(Table 1-2)에 30 μ g 씩 희석하여 100 $^{\circ}$ C에서 5분 변성 후 10% SDS gel에 전기영동한 후 nitrocellulose membrane을 1시간 방치하였으며 anti-tyrosinase goat IgG(SantaCruz, US)를 1:1000으로 희석하여 3시간 반응시킨 후 1X TBS/T로 5분씩 3회 세척하였다. 세척 후 mouse antirabbit 항체(Cell signaling, EK)로 2시간 반응시킨 후 반응 후 1X TBS/T로 5분씩 3회 세척하였다. 신호검출은 ECL시약(Pierce, US)을 이용하였으며, film에 감광시켜 신호의 강도를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 항산화능

항산화력을 측정하는 방법 중 가장 간단하며 대량으로 측정이 가능한 것으로 알려진 DPPH radical 소거활성법을 이용하여 열수추출과 70%EtOH 추출조건에서의 시료추출물의 전자공여능의 측정된 결과 열수추출의 경우 백지, 세신, 백강잠 및 면감방의 열수추출물 모두 농도의존적으로 항산화능이 증가하였으며 면감방의 경우 50,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지 계속 증가하였던 반면 단독 추출물의 경우 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 이상에서는 항산화능이 약간 감소하는 것으로 나타났고 이들 중 백강잠 단독 추출물의 항산화능이 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 가장 높게 나타났다. 그러나 VitC에 비해서는 이들 추출물의 항산화능은 상대적으로 낮은 것으로 보였다 (Fig.1, 2, 3 & 4).

또한 EtOH 추출물의 경우에도 모든 추출물의 항산화능이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났으며 특히 열수 추출물에서는 백강잠이 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 가장 높은 항산화능을 보였던 반면 EtOH추출물에서는 동일 농도의 세신 및 면감방이 가장 높은 항산화능을 보였으며 이때 항산화능은 표준 물질인 VitC보다도 다소 높은 항산화능을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 한편 열수추출물과 EtOH 추출물의 항산화능을 비교해볼 때 백지, 세신 및 면감방의 경우 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 EtOH 추출물의 항산화능이 열수추출물의 항산화능보다 매우 높은 것을 알 수 있었다(Fig.1, 2, 3 & 4).

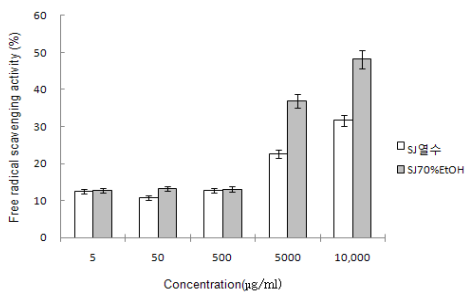


Fig.1. Free radical scavenging activities of H₂O and 70% EtOH extracts of Baekji(BJ)

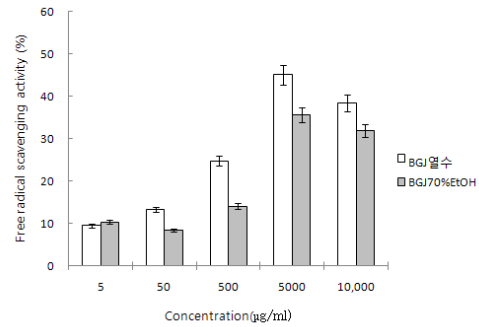


Fig.2. Free radical scavenging activities of H₂O and 70% EtOH extracts of Baekgangjam(BGJ)

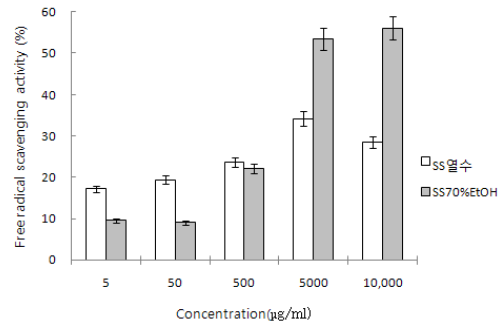


Fig.3. Free radical scavenging activities of H₂O and 70% EtOH extracts of Saesin(SS)

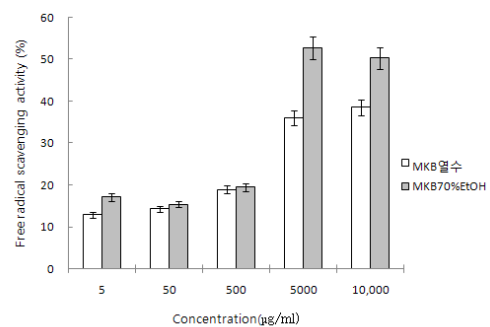


Fig.4. Free radical scavenging activities of H₂O and 70% EtOH extracts of Myunkanbang(MKB)

3.2. 세포독성

MTT assay는 시료추출물에 대한 세포의 독성을 알아보기 위한 실험으로서 살아있는 세포의 미토콘드리아에 반응하는 MTT용액을 이용하여 흡광도를 측정하는 검사법이며 흡광도는 살아있는 세포의 농도를 의미한다. 대조군으로는 시료처치를 하지 않은 군으로 하였다. 백지, 백강잠, 세신 및 면간방의 열수추출물은 모든 농도에서 80% 이상의 높은 세포생존율을 보였으며(Fig. 5) 이에 따라 이러한 열수 추출물은 세포에 대하여 어느 정도 안전한 것을 확인할 수 있었다.

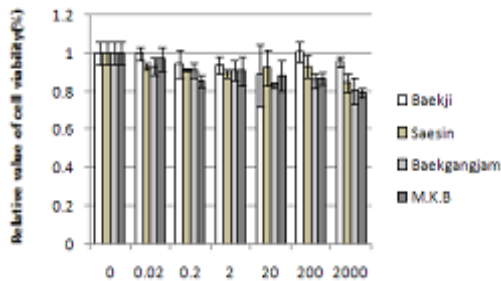


Fig. 5. Cell viability of B16F10 melanoma cells against H₂O-extracts of BJ(BaeckJi), SS(SeaSin), BKI(BaeckGangJam) and MKB(MyunKanBang) by MTT assay

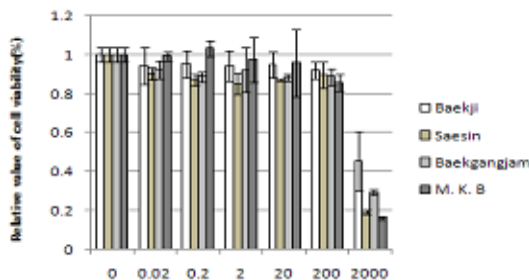


Fig. 6. Cell viability of B16F10 melanoma cells against EtOH-extracts of BJ(BaeckJi), SS(SeaSin), BKI(BaeckGangJam) and MKB(MyunKanBang) by MTT assay

반면 70% EtOH 추출의 경우 200μg/ml농도까지는 모든 농도에서 80% 높은 세포생존율을 보였지만 2000μg/ml농도에서는 모든 시료추출물에 대하여 현저하게 낮은 세포생존율을 보였으며, 특히 면간방에서는 16%로 세포생존율이 가장 적은 것으로 확인되었다(Fig. 6). 이러한 실험을 통하여 멜라닌 생성량 측정실험에서 melanoma cell에 처치할 추출물의 농도는 200 μg/ml으로 정하였다.

3.3. Tyrosinase 활성 억제

시료 추출물이 멜라닌생성에 중요한 역할을 하는 효소인 tyrosinase의 활성도를 어느 정도 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 tyrosinase에 의해 DOPA에서 전환되는 DOPA quinone의 양을 흡광도를 측정하여 tyrosinase의 활성억제를 확인하였다. 열수추출의 경우 각각의 농도에서 백지를 제외한 시료추출물이 100%이상의 tyrosinase 활성을 보였다(Fig. 7).

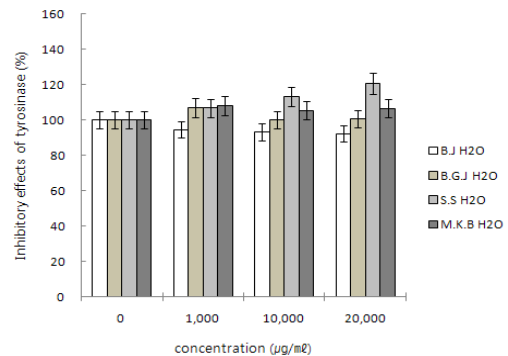


Fig. 7. Effect of H₂O-extract of BJ(BaeckJi), SS(SeaSin), BKI(BaeckGangJam) and MKB(MyunKanBang) on tyrosinase activity, respectively

또한 70% EtOH추출의 경우에서도 모든 농도에서 모든 시료추출물이 100%이상의 tyrosinase활성을 보였다(Fig. 8).

이와 같은 결과로부터 백지, 백강잠, 세신 및 면간방은 열수추출이나 70% EtOH추출과 같은 추출 방법에 관계없이 tyrosinase활성을 직접적으로 억제하지 않는 것을 확인하였다.

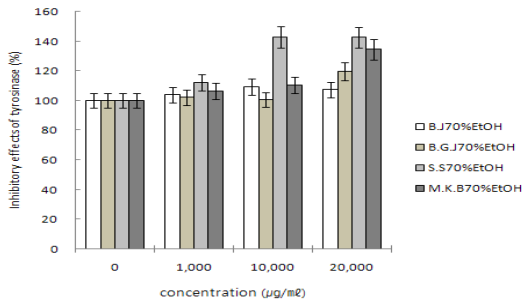


Fig. 8. Effect of 70% EtOH-extract of BJ(BaeckJi), SS(SeaSin), BKI(BaeckGangJam) and MKB(MyunKanBang) on tyrosinase activity, respectively

3.4. 멜라닌 생성 억제

열수와 70% EtOH추출조건에서의 면간방 및 구성약재의 추출물(200µg/mg)이 멜라닌 생성을 억제하는지 확인하기 위하여 B16F10 세포에서 멜라닌생성량을 조사하였으며, 그 결과는 다음과 같다. 열수추출조건에서 양성대조군인 α-MSH로 유도한 경우는 2.21, 음성대조군인 arbutin을 처리한 경우는 1.07 이었으며 α-MSH로 유도한 B16F10 세포에 백지를 처리한 경우는 1.54, 세신은 2.06, 백강잠은 2.08, 면간방의 경우 1.93으로 나타났다(Fig. 9). 이상의 결과에서 열수추출물의 경우 세신 백강잠은 멜라닌 합성 억제효과가 미미하며 상대적으로 백지는 멜라닌 생성세포의 멜라닌 생성 억제효과가 있는 것으로 확인되었다.

한편 70% EtOH로 추출된 시료들의 경우 α-MSH로 유도한 세포는 4.26, arbutin을 처리한 세포는 1.12 이었으며 α-MSH로 유도한 B16F10 세포에 백지를 처리한 경우는 2.74, 세신은 3.07, 백강잠은 3.16, 면간방은 2.30으로 나타났다(Fig. 10). 따라서 EtOH 추출된 시료들의 경우 백지, 백강잠, 세신 및 면간방 모두 멜라닌 생성 세포에 대한 멜라닌 생성억제 효과가 있는 것으로 나타났으며 특히 열수추출물의 경우에서와 같이 백지 추출물이 가장 강한 억제효과를 보였으며 면간방도 높은 억제효과가 있는 것으로 보였다.

미백 물질이 tyrosinase 활성억제력을 효과적으로 나타내기 위해서는 세포막과 멜라노솜막을 통과해야 하는데, 세포 내에서 불활성화 되어 작용이 미미한 경우가 있는 바 Mishima Y

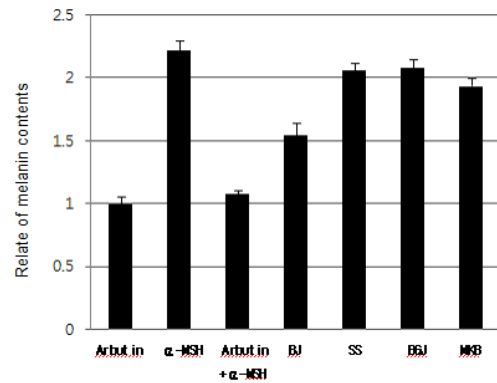


Fig. 9. Effect of H₂O-extracts of BJ(BaeckJi), SS(SeaSin), BKI(BaeckGangJam) and MKB(MyunKanBang) on production of melanin in B16F10 melanoma cells, respectively

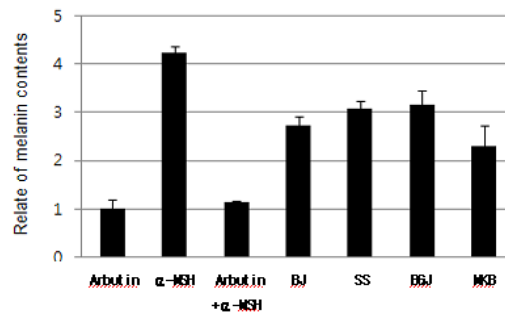


Fig. 10. Effect of 70% EtOH-extracts of BJ(BaeckJi), SS(SeaSin), BKJ(BaeckGangJam) and MKB(MyunKanBang) on production of melanin in B16F10 melanoma cell, respectively

(1988) 등이 미백억제제인 kojic acid의 경우 세포에서는 melanosome까지 들어가지 못하여 그 효과가 미비하였다는 보고[11]에 따라 본 실험에서 사용되는 추출물들이 또 다른 기작에서 미백 활성을 나타내는지 확인해 보고자 멜라닌 세포가 생산하는 멜라닌의 양을 측정해 보았다. 그 결과 백지, 백강잠, 세신 및 면간방 등은 멜라닌 생성 세포에 대하여 EtOH로 추출된 분획이 멜라닌 생성 억제효과를 나타낼 수 있음을 확인할 수 있었으며 이는 지구자 추출물이 mushroom tyrosinase활성은 억제하지 못하였

지만 B16F10 세포의 멜라닌 합성을 억제하였다는 보고와도 부합되는 결과였다[12].

3.5. Tyrosinase 단백질 발현 억제 효과

면간방 및 구성약재의 추출시료가 멜라닌 생성에 관련된 단백질 중 주요효소인 tyrosinase의 발현량과 연관성이 있는지 파악하고자 anti-tyrosinase를 이용하여 western blot을 시행하였다. 이 때 loading되는 세포 단백질이 동량 비교됨을 확인하고자 melanoma cell의 수지상돌기를 구성하고 있는 주요 골격단백질로 알려진 β -actin의 항체를 이용하여 loading된 세포단백질의 β -actin 발현량을 비교하였다.

α -MSH(200nM)에 의해 멜라닌생성이 유도된 세포에 백지, 세신, 백강잠 및 면간방의 열수추출물(200 μ g/ml)을 각각 처리한 melanoma 세포에서 tyrosinase 발현이 약간 억제된 것으로 보였으나 음성대조군인 arbutin과 비교해 볼 때 발현 억제율이 미약한 것으로 나타났다(Fig. 11).

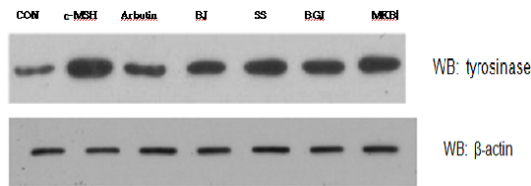


Fig. 11. Effect of H₂O-extracts of BJ(BaekJi), S.S(SeaSin), B.K.J(BaekGangJam) and M.K.B(MyunKanBang) on tyrosinase expression in B16F10 melanoma cells(CON represents a control group.)

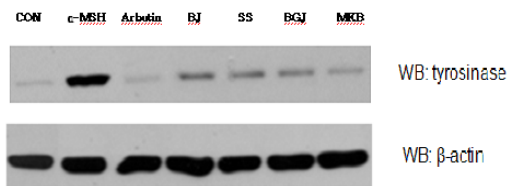


Fig 12. Effect of 70% EtOH-extracts of BJ, SS, BGJ and M.K.B on tyrosinase expression in B16F10 melanoma cells(CON represents a control group.)

한편 α -MSH(200nM)에 의해 멜라닌생성이 유도된 세포에 EtOH로 추출된 백지, 세신, 백

강잠 및 면간방의 추출물(200 μ g/ml)을 처리한 melanoma 세포에서는 모든 추출물이 tyrosinase발현을 현저하게 감소시키는 것을 확인하였다(Fig. 12).

특히 면간방의 경우 단백질발현 억제효과가 가장 뛰어난 것으로 확인되어 어느 정도 농도의존적인 효과가 있는지 확인하고자 면간방의 농도별 tyrosinase 발현율을 확인해 본 결과 2 μ g/ml, 20 μ g/ml 및 200 μ g/ml에서 점차 tyrosinase 발현 억제율이 높아지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 13). 이와 같은 결과는 오가피 추출물에서도 보고되었던 바 오가피 추출물이 tyrosinase의 활성을 직접적으로 억제하지는 못했지만 tyrosinase의 발현을 억제함으로써 최종적으로 멜라닌의 생산이 감소되었다고는 내용과도 부합되는 결과였다[13].

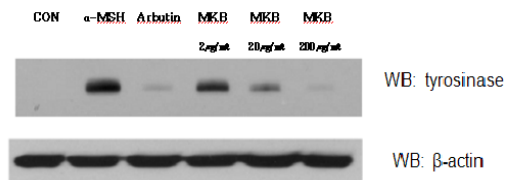


Fig. 13. Effect of serial diluents of M.K.B extracted by 70%-EtOH on tyrosinase expression in B16F10 melanoma cells(CON represents a control group.)

이상의 실험 결과에서 백지, 세신, 백강잠 및 면간방의 추출물은 추출 방법에 관계없이 tyrosinase의 활성을 억제하지 못했으나 항산화능과 tyrosinase발현억제작용에 의한 최종 멜라닌의 생성량이 감소된 것으로 나타나 미백효과가 있는 것으로 확인되었다.

특히 전체적인 실험 결과를 볼 때 열수추출법으로 추출한 시료는 효과가 없었는데, 이는 면간방의 구성약제들 중에 세신과 백지에서 미량의 정유성분을 포함하고 있으므로 H₂O로 추출한 경우 유효성분이나 활성물질이 충분히 추출되지 못하였기 때문이라 판단된다.

또한 tyrosinase 단백질 발현 측정에서 70% EtOH로 추출한 모든 시료들이 단백질 발현 억제효과를 보였는데 이것은 tyrosinase가 전사, 번역, 번역 후 단계를 거치는 과정 중에서 억제되었기 때문으로 판단되며, 이 부분에 대한 연구가 더 이루어져야 한다고 생각된다.

앞으로 백지, 세신, 백강잠 및 면간방은 차후 미백기능 소재로 연구, 개발할 수 있는 여지가 충분한 생약자원이라 판단되며 더 나아가 미백 화장품 및 의약품의 신소재로 활용될 수 있을 것으로 기대한다. 아울러 지금까지의 한약제나 천연자원추출물에 대한 미백관련 연구에는 내복위주의 약제나 처방이 주를 이루었던 바 치료의 효율을 제고하고 치료법의 다양화를 위해서는 외용으로 쓰일 수 있는 약제에 대한 연구와 내복용 약제를 외용으로 이용할 수 있는 방법을 찾아 낼 수 있는 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

4. 결 론

백지, 백강잠, 세신 및 면간방의 추출방식에 따른 추출물의 미백효과를 검증하기 위하여 본 연구에서는 각기 다른 두 가지 방식으로 얻은 추출물을 이용하여 항산화 능력, 멜라닌 합성능, tyrosinase 활성 억제, tyrosinase 발현 억제, 세포독성의 측정과 비교를 통해 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1. 항산화 실험에서 백지, 백강잠, 세신 그리고 면간방의 70% EtOH와 열수 추출물 모두 항산화 능력이 있음을 확인하였고, 특히 백지, 세신, 면간방의 경우 70% EtOH 추출조건에서, 백강잠의 경우 열수 추출 조건에서 항산화 효과가 더 높았다.
2. 세포독성실험 결과 70% EtOH과 열수로 추출한 경우 0.02-200 μ g/ml에서 백지, 세신, 백강잠 그리고 면간방의 추출물에서 독성이 없는 것으로 확인하였다. 그러나 2000 μ g/ml에서는 70% EtOH의 경우 단일 약제와 면간방 추출물 모두에서 비교적 강한 세포독성을 확인하였다.
3. Tyrosinase activity 측정 결과 70% EtOH 및 열수 추출 조건에서 백지, 세신, 백강잠, 면간방 모두 tyrosinase를 직접적으로 억제하지 않는 것으로 확인되었다.
4. 멜라닌 합성능 측정 결과 70% EtOH 추출 조건에서 백지, 세신, 백강잠, 면간방 모두 멜라닌 합성능을 저해하였으며 이 중에서 특히 면간방이 가장 효과적인 것으로 확인되었다. 열수추출 조건에서는 70% EtOH 추출 조건 경우와는 달리 백지를 제외한 추출물에서는 멜라닌 합성저해능력이 미미한 것으로 확인되었다.
5. Tyrosinase 단백질 발현 정도를 western blot 기법을 통하여 측정한 결과 70% EtOH 추출 조건에서 백지, 세신, 백강잠 그리고 면간방 모두 tyrosinase 단백질 발현량을 감소시키는 것으로 나타났으며 이 중에서 특히 면간방이 가장 효과적인 것으로 확인되었다. 열수추출 조건에서는 70% EtOH 추출조건과는 달리 단일약제와 면간방 모두 tyrosinase 단백질 발현을 감소시키지 못한 것으로 확인 되었다.

이상에서 백지, 백강잠, 세신 및 면간방의 추출물이 항산화능과 tyrosinase 발현 억제를 통하여 미백 효과가 있는 것을 알 수 있었으며 추후 이들 기작에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 이승은, 가미방풍통성산의 미백효과에 관한 연구, 경희대학교대학원 석사학위논문 (2004)
2. 주영승, 김기연, 장성환, 미용동의보감, 서울, 정보사, 23-24 (2004).
3. 이상희, 마황 및 마풍고의 미백효과에 관한 연구, 경희대학교대학원석사학위논문 (2001).
4. 김성각, 사백산의 미백효과 검정에 관한 연구, 경희대학교대학원석사학위논문 (2000).
5. 박용인, 연령고본단가감방이 피부미용에 미치는 영향, 상지대학교대학원박사학위논문 (2006).
6. 손동석, 가감서시옥용산의 미백효과에 관한 연구, 경희대학교대학원석사학위논문 (2002)
7. M.S. Blois, Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1204(1958)
8. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. J Immunol Methods, 65, 55-63(1983)
9. A. Yagi, T. Kanbara, N. Morinobu,

- Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. *Planta Med*, 53, 517-519(1987)
10. J. Hosoi, E. Abe, T. Suda, Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res*, 45, 1474-1478 (1985)
 11. Y. Mishima, S. Hatta, Y. Ohyama, M. Inazu, Induction of melanogenesis suppression. *Cellular Pharmacology and mode of differential action. Pigment Cell Res*, 1, 367-374 (1988).
 12. 김준호, 지구자추출물의 멜라닌합성억제기전 연구, 원광대학교 대학원 석사학위논문 (2008).
 13. 오현주, 오가피에탄올추출물이 B16F10 melanoma cells에서 α -MSH로 유도한 멜라닌 생성과정에 미치는 영향, 경희대학교 대학원 박사학위논문 (2009).