

白芍藥이 피부 미백 및 주름에 미치는 영향

이종철 · 박수연 · 최정화 · 김종한
동신대학교 한의과대학 안이비인후피부과학 교실

Effects of *Paeoniae radix alba*(PRA) on Skin whitening and Elasticity using Melanoma cells

Jong-Cheol Lee · Soo-Yeon Park · Jeong-Hwa Choi · Jong-Han Kim

Objective : *Paeoniae radix alba*(PRA) can enrich the blood and regulate menstruation, astringe yin and arrest sweating, calm the liver and arrest pain. This study was designed to investigate effects of PRA on skin whitening and elasticity using melanoma cells.

Methods : In this experiment, effect of PRA on cell viability, inhibition of melanin synthesis and inhibitory effect on tyrosinase and elastase.

- Results** : 1. More than 1,000 $\mu\text{g/ml}$ of PRA treated group showed lowered proliferation rates significantly compared to non-treated control group.
2. All of treated groups were lower levels of melanin synthesis respectively.
 3. PRA did not show inhibitory effect on tyrosinase activities in vitro. But, PRA suppressed tyrosinase activities in B16F10 cells significantly.
 4. PRA suppressed elastase type 1 activities in dose-dependent manner in vitro. But, PRA slightly suppressed elastase type 4 activities in vitro, and PRA also slightly suppressed elastase activities in vivo.

Conclusion : These results suggest that PRA can inhibit melanin synthesis through inhibitory action on tyrosinase activity and inhibit elastase activity, and also suggest that these results can be used for the study on maintaining skin whitening or elasticity.

Key words : *Paeoniae radix alba*(PRA), Skin whitening, Skin Elasticity, Melanoma cell

교신저자 : 박수연, 전남 순천시 조례동 1722-9
동신대순천한방병원 7진료실
(Tel : 061-729-7122, E-mail : swallow92@hanmail.net)

· 접수 2011/12/30 · 수정 2012/2/7 · 채택 2012/2/14

I. 서 론

피부는 환경과 인체를 구분 짓는 경계이며, 바깥층의 표피, 안쪽층의 진피로 구성되어 있다. 이러한 피부는 인체를 보호하고, 체온을 조절하며, 감각을 느끼는 기능 뿐만 아니라 미적인 기능도 담당하고 있다¹⁾.

기미와 주근깨, 피부의 흑화 등의 피부 색소 침착은 주로 멜라닌 세포(melanocyte)에 의한 melanin 합성 증가에서 기인한다. 따라서 melanin 합성 억제제를 통해 미백 효과를 기대할 수 있다²⁾.

또한 피부의 진피 조직 속에는 collagen과 피부의 탄력성에 관련된 elastin이 그물망 구조를 형성하고 있는데, 이러한 elastin이 elastase에 의해 분해되어 피부가 처지고 주름이 생기게 된다. 그러므로 피부 노화의 주원인 중의 하나인 elastase의 활성을 저해시킴으로써 피부 노화를 억제할 수 있다³⁾.

白芍藥(*Paeoniae Radix Alba*, PRA)은 養血斂陰, 柔肝止痛, 平肝抑陽하는 효능이 있고⁴⁾, 선행 연구로는 항균효과⁵⁾, 간독성에 대한 보호효과⁶⁾, 항암효과⁷⁾, 면역기능 증진효과⁸⁾ 등이 알려져 있으며, 대표적인 성분으로는 paeoniflorin, paeonol, paeonin 등이 있다⁹⁾. 특히 인간의 피부 조직에서 자외선에 의한 DNA 파괴와 얼굴 부위의 주름 방지에 paeoniflorin이 유의한 효과를 발휘한다는 보고¹⁰⁾가 있고, PRA가 산화적 스트레스에 대하여 정상 세포를 보호 할 수 있는 것으로 알려져 있어¹¹⁾ 피부 노화 방지 등의 효과가 있을 것으로 기대되고 있으나 피부 미백 및 주름에 미치는 영향에 대한 직접적인 연구는 없는 실정이다.

이에 저자는 악성흑색종 세포주인 B16F10 세포의 생존율에 미치는 영향을 관찰하고, melanin 색소 생성 저해, Tyrosinase 활성 저해능, 제 1형 및 4형 Elastase 억제에 미치는 영향을 관찰함으로써 PRA가 피부 미백 및 주름에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용된 白芍藥(PRA)으로는 미나리아재비과에 속하는 다년생 초본인 *Paeonia latiflora* Pall.의 뿌리를 건조한 것으로, 동신대학교 순천 한방병원에서 구입한 후, 정선하여 사용하였다.

2) 시약 및 기기

실험에 사용된 4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT), Tris, N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide, Elastase 1, Elastase 4, Tyrosinase, L-DOPA 등의 시약은 Sigma 제품(Sigma Chemical Co., USA)을 사용하였으며, 측정 기기로는 Microplate Reader(Bio-rad, USA) 등을 사용하였다.

3) 세포주

인간 유래 악성흑색종(melanoma) 세포주인 B16 F10 세포주는 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 추출

세척되고 세절된 상태로 구입된 PRA 100 g을 증류수 1,500 ml과 함께 전기약탕기(대웅, 한국)로 100℃에서 3시간 동안 전탕하여 물추출을 시행하였다. 전탕한 추출물을 부직포로 거른 다음 동결건조기(삼원, 한국)를 이용하여 동결건조 분말을 얻었다. 최종적으로 얻어진 건조분말은 15.9 g이었다. 이렇게 하여 얻어진 분말은 실험에 사용하기 위하여 인산 완충액(PBS, phosphate buffered saline)

에 다시 녹여진 후, 2,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 찌꺼기를 제거하고, 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액은 와트만 지로 거른 다음 최종적으로 0.22 μm 크기의 필터(Syringe filter, Whatman)로 걸러 멸균을 대신하였다. 이렇게 하여 얻어진 검액은 소량씩 나누어 -20°C 에 보관하였다가 사용 직전 해동하여 사용하였다.

2) 세포 배양

악성흑색종 세포주인 B16F10의 생육 배지로는 RPMI 1640(Sigma, R4130) 배지를 사용하였고, 배지에는 10% fetal bovine serum(Gibco LOT, NO. 1006842, FBS)와 penicillin-streptomycin (100 units/ml, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)을 첨가하였다. 실험기간 동안 세포주는 5% CO_2 환경에서 배양하였다.

3) B16F10 세포 증식율에 미치는 영향 측정

PRA가 B16F10 세포 증식율에 미치는 영향 측정은 MTT assay¹²⁾를 통해 확인하였다. 간략히 정리하면, 96 well plate에 3×10^4 cell/ml의 농도로 분주하여 배양기에서 37°C , 5% CO_2 를 유지하며 24시간 동안 pre-incubation시킨 후 25 ~ 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 약물을 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT)를 처리하여 MTT가 생존 세포의 효소작용에 의해 환원되도록 4시간을 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan 결정을 DMSO를 첨가하여 녹인 후 Microplate Reader(Bio-rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 광도를 측정하였다.

4) Melanin 생합성 저해를 측정

melanin 생성량 측정은 Hoshi 등¹³⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 간략히 정리하면, B16F10 세포를 배양하여 24 well plate에 각 well당 세포를 5×10^6 cell/well로 분주 한 후, 부착 및 안정화

를 위하여 4시간을 배양하였다. 배양이 끝난 후, PRA를 처리하고 다시 48시간 배양하였다. 48시간 배양한 후 각 well를 PBS로 세척하고, 1 N NaOH 용액 1 ml을 첨가하고 60°C 에서 3시간 동안 용해하였으며, Microplate Reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 시험관 내 Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등¹⁴⁾의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 500 μl 에 10 mM L-DOPA 200 μl 및 시료용액 100 μl 의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110 U/ml) 200 μl 를 첨가하여 37°C 에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPochrome은 475 nm 파장에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{무 첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

6) B16F10 세포에서 Tyrosinase 유사 활성 측정

24 well plate에 B16F10 세포를 5×10^6 cell/well로 분주한 후, 부착 및 안정화를 위해 4시간 방치한 후, PRA를 처리하고 48시간 배양하였다. 48시간의 배양이 끝난 후, 세포를 1% Triton X-100을 함유한 10 mM PBS 100 μl 에 현탁시켰다. 현탁된 세포를 vortexing 한 후 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 활성측정 효소액으로 사용하였다. Tyrosinase 저해활성 측정을 위하여 96 well plate에 효소액 100 μl 를 넣고 기질인 L-DOPA(2mg/ml) 200 μl 를 첨가한 후, 37°C 에서 1시간 동안 반응을 진행시킨 뒤, Microplate Reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase의 활성도는 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 계산하였다¹⁵⁾.

7) 시험관 내 Elastase 저해 활성 측정

elastin 분해효소(Elastase) 저해 활성은 James 등¹⁶⁾의 방법으로 측정하였다. 간단히 소개하자면, 먼저 0.2 M의 Tris-HCl(Sigma, USA) buffer를 pH 8.0으로 적정하여 만든 후, 600 μ l tube에 옮긴 후, 3.3 mM로 희석한 Succ-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide 180 μ l을 첨가하고, 거기에 농도별로 희석된 PRA 추출물 300 μ l를 넣어준 후, 1 μ g/ml로 희석된 Porcine pancreatic elastase 제 1형과 4형을 각각 60 μ l씩 넣어주고, 실온에 10분간 방치한 후, p-nitroanilide의 생성량을 Microplate Reader를 이용하여 410 nm 파장에서 측정하였다. Elastase 저해 활성은 다음 식에 따라 계산되며, IC₅₀은 Elastase의 활성을 50% 저해하는데 요구되는 시료의 농도(μ g/ml)로 표시하였다.

$$\text{Elastase inhibition(\%)} = [1 - \{(B - C)/(A - D)\}] \times 100$$

- A: 시료 대신 증류수를 넣고 효소를 첨가하여 반응한 후의 흡광도
- B: 효소를 첨가하여 반응한 후의 시료의 흡광도
- C: 효소 대신 증류수를 첨가하여 반응한 후의 시료의 흡광도
- D: 시료와 효소 대신 각각 증류수를 첨가해 반응한 후의 흡광도

8) B16F10 세포에서 Elastase 유사 활성 측정

B16F10 세포내 Tyrosinase 유사활성 측정과 동일하게 24 well plate에 B16F10 세포를 1×10^4 cell/well로 분주한 후, 부착 및 안정화를 위해 4시간 방치한 후, PRA를 처리하고 48시간 배양하였으며, 이후 Tyrosinase 유사활성 측정에서 언급한 것과 같이 단백질을 분리하여 활성측정 효소액으로 사용하였다. Elastase 유사활성은 in vitro에서의 유사활성 측정 방법과 동일하게 진행하였다.

3. 통계 처리

실험 자료에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 SigmaPlot 11.0 for windows program을 사용하

여 실시하였으며, Student's t-test를 이용하여 P값이 0.05 미만 일 때 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

III. 성 적

1. B16F10 세포 증식율에 미치는 영향

B16F10 세포에 농도별로 PRA를 투여하고 24시간 후, 세포 증식율을 측정한 결과, 1,000 μ g/ml 이상에서 유의한 세포증식율 감소가 나타났다(Fig. 1).

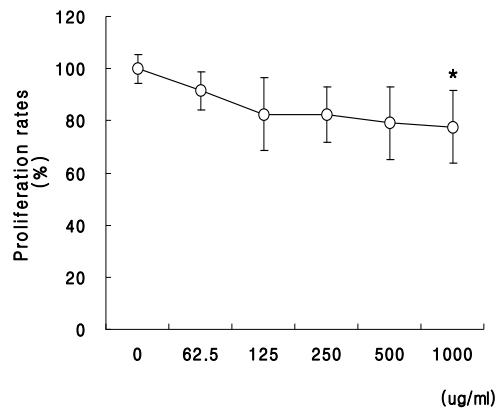


Fig. 1. Effects of PRA on proliferation rates in melanoma cells

B16F10 cells were attached 96 well plate, and added PRA as indicated concentrations respectively. After 48 hrs incubation, production levels of melanin were measured using MTT methods. Result are presented as mean \pm SD. *P < 0.05 vs. non-treated Control(n=6).

2. Melanin 생성량에 미치는 영향

B16F10 세포에 PRA를 처리하고 melanin 생성량에 미치는 영향을 관찰한 결과, 62.5, 250, 1,000 μ g/ml군에서 나타난 melanin 색소량은 모든 군에서 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 2).

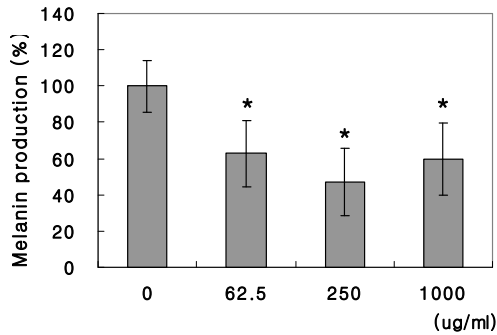


Fig. 2. Inhibitory effects of PRA on melanin production in melanoma cells

B16F10 cells were added PRA as indicated concentrations respectively. After 48 hrs incubation, proliferation rates were measured using colorimetric methods. Result are presented as mean±SD. *P<0.05 vs. non-treated Control(n=6).

3. 시험관 내 Tyrosinase 저해활성에 미치는 영향

시험관 내에서 Tyrosinase 저해 활성을 관찰한 결과, 1,000 ug/ml 농도에서 15.0±2.3%의 저해율을 보였으며, The half maximal(50%) inhibitory concentration(IC₅₀)은 구할 수가 없었다(Fig. 3).

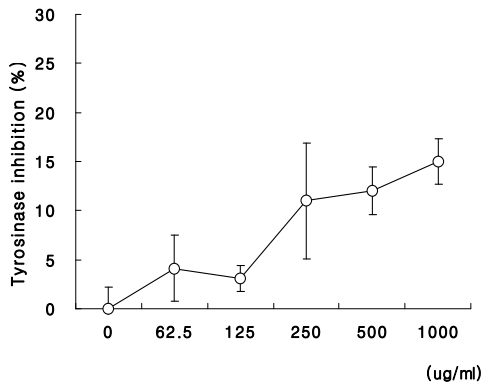


Fig. 3. Inhibitory effects of PRA on tyrosinase activities in vitro

Inhibitory effects on tyrosinase activities were measured using colorimetric methods. Values are represented as percentage of inhibitory rates. Result are presented as mean±SD(n=6).

4. B16F10 세포에서 Tyrosinase 활성에 미치는 영향

B16F10 세포에 농도별로 PRA를 처리하고 Tyrosinase 활성에 미치는 영향을 관찰한 결과, 62.5 ug/ml, 250 ug/ml, 1,000 ug/ml의 PRA를 처리한 군에서 저해율이 각각 9.6±2.8%, 32.0±7.2%, 82.2±7.0%로 나타났으며 IC₅₀은 518.5 ug/ml로 계산되었다(Fig. 4).

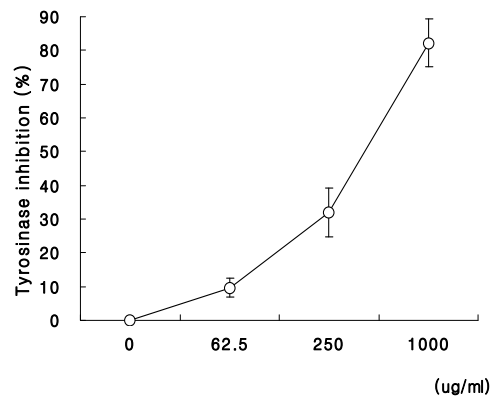


Fig. 4. Inhibitory effects of PRA on tyrosinase activities in melanoma cells

B16F10 cells were incubated with PRA for 48 hr in indicated concentrations. Inhibitory effects on tyrosinase activities were measured using colorimetric methods. Values are represented as percentage of inhibitory rates. Result are presented as mean±SD(n=6).

5. 시험관 내 Elastase 저해 활성에 미치는 영향

PRA 추출물의 Elastase 저해 활성을 관찰한 결과, PRA 추출물의 제 1형 Elastase에 대한 저해능은 62.5 ug/ml, 125 ug/ml, 250 ug/ml, 500 ug/ml, 1,000 ug/ml에서 각각 7.4±3.5%, 16.0±9.4%, 41.5±16.1%, 69.1±17.2%, 86.2±20.1%로 나타났고, IC₅₀은 480.5 ug/ml로 계산되었다(Fig. 5A).

제 4형 Elastase에 대한 저해능은 각각 4.6±2.4%, 18.0±3.9%, 27.5±9.3%, 34.1±12.3%, 53.4±6.5%로 나타 제 1형에 비해 약한 효과를 보

였으며 IC₅₀은 910.7 $\mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다(Fig. 5B).

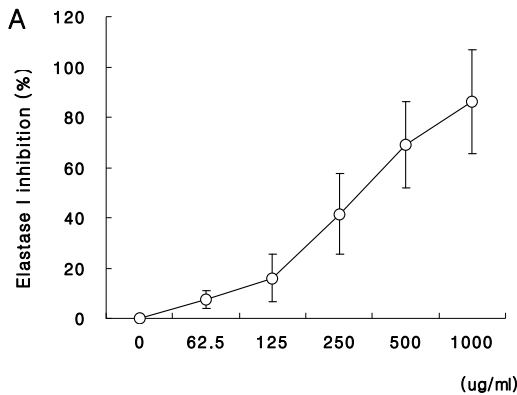


Fig. 5A. Inhibitory effects of PRA on type I elastase activity in vitro

PRA was added into elastase I in indicated concentrations. Inhibition rates of elastase I by PRA were measured as production of p-nitroanilide using micro-plate reader at 405 nm wavelength. Optical densities were calculated indicated formular as described in materials and methods. Values are represented as mean \pm SD(n=6).

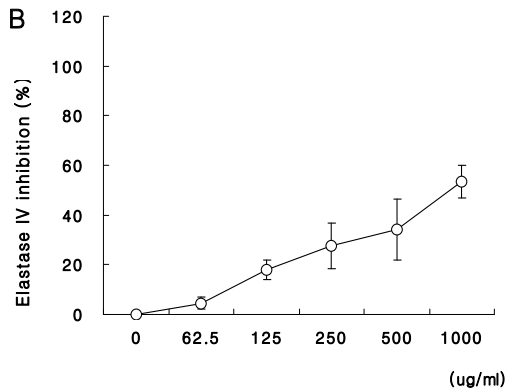


Fig. 5B. Inhibitory effects of PRA on type IV elastase activity in vitro

PRA was added into elastase IV in indicated concentrations. Inhibition rates of elastase IV by PRA were measured as production of p-nitroanilide using micro-plate reader at 405 nm wavelength. Optical densities were calculated indicated formular as described in materials and methods. Values are represented as mean \pm SD(n=6).

6. B16F10 세포 내 Elastase 유사 활성에 미치는 영향

PRA의 B16F10 세포 내에서 Elastase의 기질을 첨가하고 저해 활성을 관찰한 결과, PRA 추출물의 Elastase에 대한 저해능은 62.5 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 $9.5\pm 2.9\%$, $23.8\pm 9.6\%$, $52.3\pm 10.5\%$ 로 나타났고, IC₅₀은 939.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다(Fig. 6).

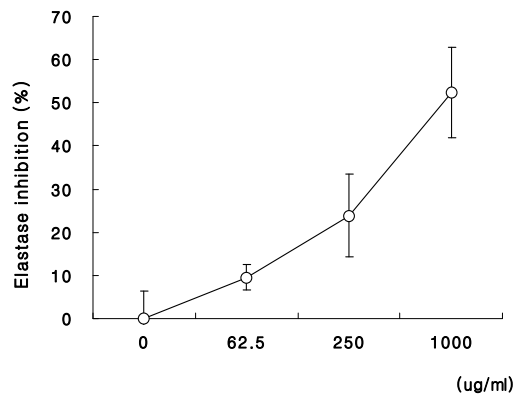


Fig. 6. Inhibitory effects of PRA on elastase activity in melanoma cells

B16F10 cells were incubated with PRA for 48 hr in indicated concentrations. Inhibitory effects on elastase activities were measured using colorimetric methods. Values are represented as percentage of inhibitory rates. Result are presented as mean \pm SD(n=6).

IV. 고 찰

문명과 경제의 발달로 인하여 생활 수준이 향상되고 소득 수준이 높아지면서 여성들의 사회 진출이 증가하고 있는 추세에 부응하여 개인의 미적 이미지 창출에 대한 관심도 증가하고 있다. 여성의 미적 욕구 표출의 대표적인 상품인 화장품 역시 사회 변화에 따라 많은 발전을 거듭해 오면서 보습과 보호의 단순한 개념을 넘어 미백, 피부 탄력 유지 등을 포함한 효능과 효과를 중시하는 경향이

두드러지고 있다¹⁷⁾.

막대한 경제적 가치를 가지고 있는 기능성 화장품의 개발에는 생리활성을 가지는 원료물질의 개발이 선결과제이며, 검토하여야 할 기능성으로는 미백, 항염증, 주름 개선, 항노화, 항산화 효과 등이 있으며¹⁸⁾, 이러한 효과를 보유한 물질을 한약재 소재 등 다양한 식물자원에서 찾으려는 연구가 시도되고 있으며, 최근 피부 흑화의 생물학적 현상에 대한 mechanism이 상세히 규명됨에 따라 여러 자원으로부터 이러한 미백제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁹⁾.

이에 한의학계에서도 다양한 한약재의 피부 미백 및 주름에 미치는 영향에 대한 연구가 이루어지고 있어 김 등²⁰⁾은 蘆薈, 紫花地丁이, 박 등²¹⁾은 五倍子가, 황 등²²⁾은 石斛, 石榴가 피부 미백 및 주름에 효과가 있음을 보고하였고, 한약복합제에 대한 연구로 이 등²³⁾은 加味防風通聖散이, 박²⁴⁾은 加味歸脾湯이, 김 등²⁵⁾은 美白散이, 김 등²⁶⁾은 六味地黃湯加減方이 미백 효과가 있음을 보고하였다. 본 연구에 사용된 PRA(대한약전 규정상으로는 芍藥, 고전문헌 및 교과서 상으로는 芍藥)는 補血藥類에 속하며, 性은 微寒하고 味는 苦酸하다. 肝과 脾로 들어가며 養血柔肝, 緩中止痛, 斂陰收汗의 효능이 있다. PRA는 주로 血分으로 들어가 補血작용을 지님과 동시에 肝陽의 항진을 억제하며, 각종 통증에 대한 鎮痛 작용이 있다^{4,9)}.

PRA에서 분리되는 대표적인 성분으로는 paeoniflorin, paeonol, paeonin 등을 들 수 있으며 이 외에도 안식향산, 정유, 지방유, 수지, 탄닌 등이 함유되어 있다⁹⁾. 특히 paeoniflorin에 대하여서는 수많은 연구가 활발하게 진행되고 있는데²⁷⁾, 대표적으로 인간의 피부 조직에서 자외선에 의한 DNA 파괴와 얼굴 부위의 주름 방지에 paeoniflorin이 유의한 효과를 발휘한다는 보고¹⁰⁾를 들 수 있다. 또한, PRA 자체가 산화적 스트레스에 대하여 정상 세포를 보호 할 수 있는 것이 알려져 있으며,

주요한 항산화 작용을 가지는 물질로서 gallic acid와 catechin이 알려져 있다¹¹⁾.

이러한 선행 지식을 바탕으로 본 저자는 PRA가 피부 미백 및 주름에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보기 위하여 완충액 내에서 직접적인 작용과 세포 내에서의 작용 두 가지 측면에서 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 PRA가 악성흑색종 세포에 대하여 피부 탄력 유지와 관련 있는 Elastase 저해 활성을 가지는지, 또한, Melanin 생합성 저해를 통하여 피부 미백효과를 발휘할 수 있는지를 살펴보기 위하여 악성흑색종 세포인 B16F10 세포에 PRA를 처리하고 생존율과 생육 양상을 관찰하고, Melanin 생성량과 Tyrosinase 저해 활성, Elastase에 미치는 영향을 관찰하였다.

본 연구의 결과에서 PRA는 B16F10 세포에 대하여 유효 농도 범위에서 특별한 세포 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1). B16F10 세포 증식에 대한 결과를 살펴보면, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 투여 군에서만 유의한 수준의 세포 증식을 감소가 관찰되었다.

사람의 피부색은 hemoglobin, carotene, melanin 등에 의해 결정되며, 이중 melanin이 가장 중요한 인자이다. melanin은 페놀류의 생체 고분자 물질로 동물계, 식물계, 미생물계에 널리 존재하며, 특히 인간을 포함한 동물의 외피, 털 등에 주로 존재하는 검은 혹은 갈색 색소와 단백질의 복합체이다²⁸⁾. melanin은 표피 기저층과 기저층 하의 모낭 등에서 주로 관찰되는 melanocyte로부터 합성되며, keratinocyte로 운반되어 표피멜라닌 단위를 형성한다²⁹⁾. 멜라닌소체는 정상적인 melanin을 합성하는데 필요한 특이적인 효소들을 함유하고 있으며, 이 효소들 중 가장 잘 알려진 것으로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1(TRP-1)과 tyrosinase related protein-2(TRP-2)등을 들 수 있다³⁰⁾. melanin의 생합성은 아미노산의 일종인 tyrosin으로부터 시작하며, tyrosin이 분자 내에 2개의 히드록시기

를 갖는 아미노산의 일종인 DOPA를 거쳐 quinone이 되고, 이 quinone이 indole-5,6-dihydroquinone 으로 변화하게 된다. melanin은 최종 합성물인 indole-5, 6-dihydroquinone의 중합체이다³¹⁾.

본 연구의 결과에서 PRA는 유의한 수준으로 melanin 합성을 저해하였다(Fig. 2). 이러한 결과는 PRA의 피부 미백 기능 증명에 중요한 단서가 될 것으로 생각된다. 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 및 250 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서는 세포 증식율에 특별한 영향을 미치지 않은 상태에서 효과적인 melanin 생성 억제 작용을 발휘하였다. 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 투여군을 살펴보면, 세포 증식율의 감소와 증식 밀도 감소는 궁극적으로 세포 개체수의 감소를 가져와 상대적으로 melanin의 총량이 감소한 것처럼 보일 수 있다. 본 연구에서 세포 증식율이 대략 80% 정도까지 감소한데 비하여 melanin 생성량은 60% 정도까지 감소하였다. 이는 세포 증식율 감소 기전 이외에 melanin 합성을 저해하는 또 다른 기전이 존재함을 암시한다. 이러한 결과들을 바탕으로, melanin 합성에 관여하는 Tyrosinase 활성에 미치는 영향을 관찰하였다.

Tyrosinase는 melanin 합성의 속도결정단계인 초기반응에 작용하는 효소로서, tyrosin을 3,4-dihydroxyphenyl alanine(DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPA quinone 으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 지닌다³²⁾. TRP-1은 5,6-dihydroxyindole-2- carboxylic acid (DHICA)를 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid 로 산화하고, TRP-2는 DOPA chrome을 DHICA 로 이성화하는 효소이다³³⁾. 지금까지 알려진 tyrosinase 저해제로는 hydroquinone, resorcinol, 4-hydroxy-anisole, ascorbic acid 과 그 유도체 kojic acid, arbutin, glucosamine, α -viniferin, ferulic acid 등이 있다^{34,35)}.

본 연구의 결과에서 PRA는 시험관 내에서 특별한 Tyrosinase 활성 저해 효과를 보이지 않았지만

(Fig. 3), 악성 흑색종 세포 내에서는 주목할 만한 수준의 Tyrosinase 억제 활성을 보였다(Fig. 4). 이러한 결과는 PRA가 직접적인 Tyrosinase 억제 활성을 보이는 것이 아니라, 세포 내에 작동되는 특정 또는 여러 개의 intracellular signalling pathway를 억제하거나 가속화 함으로써 발생하는 2차적인 결과라고 해석될 수 있다. 지금까지 알려진 대표적인 Tyrosinase inhibitor로는 Vitamin C, Quercetin 등의 항산화제들이 있다³⁶⁾. 이들 항산화제들은 세포 내에서 뿐만 아니라 시험관 내에서도 직접적인 Tyrosinase의 억제 활성을 가진다. 따라서 PRA는 이러한 Tyrosinase inhibitor들과는 다른 기전을 통하여 Tyrosinase의 활성을 억제할 것으로 생각된다. 추후 melanin 생성과정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 microphthalmia-associated transcription factor(MITF), cAMP response element (CRE) 등³⁷⁾과 같은 인자들에 대해 PRA가 어떤 영향을 미치는지에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Elastase는 피부탄력성 섬유(elastin)을 분해하는 효소로, elastin은 진피 내에서 피부 탄력을 유지하는데 매우 중요한 역할을 하는 단백질의 일종이다³⁸⁾. 또한, Elastase는 피부 주름 억제, 피부 탄력 유지에 또 하나의 중요한 요소인 콜라겐을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이기도 하다³⁹⁾. 최근 연구를 통하여 섬유아세포에서 유래한 Elastase가 피부 탄력성 섬유의 3차원적 뒤틀림에 중요한 역할을 하며, Elastase의 활성 증가는 피부 탄력섬유를 감소시켜 피부 주름 형성에 기여한다는 사실이 알려져 있다⁴⁰⁾. 이러한 이유 때문에 Elastase 활성 검증을 통한 피부 미백 및 주름 개선 효능에 관련된 연구가 활발하게 이루어지고 있다⁴¹⁾.

대표적인 Elastase inhibitor로는 sivelestat sodium, elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease(elafin) 등이 있다^{42,43)}.

본 연구에서는 몇 가지 Elastase 중 가장 중요한

제 1형과 제 4형 Elastase에 대하여 PRA의 활성 억제효과를 관찰하였다. 본 연구의 결과에서 PRA는 Elastase type 1에 대하여 주목할 만한 억제 효과를 나타냈으나(Fig. 5A), Elastase type 4에 대하여서는 비교적 경미한 효과를 나타냈다(Fig. 5B). 직접적인 Elastase 억제 효과 연구 결과에 부가하여 B16F10 세포 내에서 Elastase 유사활성 효과를 검증한 결과 역시 IC₅₀이 거의 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에 가까워 매우 경미한 Elastase 억제 활성이 있는 것으로 분석되었다(Fig. 6). 이는 PRA가 Elastase inhibitor로서 작용할 가능성을 확인하기 위한 기초 자료로 활용될 수 있고, 이를 규명하기 위한 후속 연구가 필요할 것으로 보인다.

이상의 결과를 정리하면, PRA는 Melanin 색소 생성을 억제하였고, 직접적으로 Tyrosinase의 활성을 억제하지 못한 반면, 세포 내에서는 효과적으로 Tyrosinase의 활성을 억제하였다. Elastase에 대하여서는 제 1형에 대하여 직접적으로 억제작용을 하였고, 제 4형 및 세포 내에서는 경미한 억제 효과를 나타냈다.

이러한 결과로부터 PRA가 세포 내에서 알려지지 않은 어떤 기전을 통해 Tyrosinase와 Elastase 활성 억제 효과를 가짐을 알 수 있다. 따라서 추후 피부 미백 및 주름에 관한 연구에 본 연구결과가 활용될 수 있으며, 피부 미백과 항주름 효과를 가지는 기능성 화장품의 개발에 PRA가 원료 물질로서 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

白芍藥의 피부 미백 및 주름에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 악성흑색종 세포인 B16F10에 처리하고 세포 증식을 및 Melanin 생성량, Tyrosinase와 Elastase 저해 효과 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도이상에서 유의한 수준으로 세포 증식을 억제하였다.
2. 모든 투여군에서 Melanin 생성을 유의한 수준으로 억제하였다.
3. 시험관 내에서 Tyrosinase 활성 저해율은 미미하였다.
4. 세포 내에서 Tyrosinase 활성을 유의한 수준으로 감소시켰으며, IC₅₀은 518.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다.
5. 시험관 내에서 Elastase type 1의 활성을 농도 의존적으로 저해하였으며, IC₅₀은 480.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다.
6. 시험관 내에서 Elastase type 4의 활성을 농도 의존적으로 저해하였으나, 그 활성은 미미하였고, IC₅₀은 910.7 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다.
7. 세포 내에서 Elastase 유사 억제 활성을 농도 의존적으로 저해하였으나, 그 활성은 미미하였고, IC₅₀은 939.5 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다.

참 고 문 헌

1. 전국한의과대학 피부외과학 교재편찬위원회. 한의피부외과학. 부산:선우. 2007:37-57.
2. 대한피부과학회. 피부과학. 서울:여문각. 2001:8-9, 402-12.
3. Jung JH. Photoaging. Photodermatol. Photoimmunol Photomed. 2003;19:109-21.
4. 한의과대학 본초학 편찬위원회. 본초학. 서울:영림사. 2010:635-6.
5. 최해연. 백작약 추출물의 항균효과 및 설기떡의 품질특성에 미치는 영향. 한국식품조리과학회지. 2009;25(4):435-44.
6. 김인덕 외 7인. LPS로 유도된 급성 간독성에 대한 백작약 추출물의 보호 효과. 한국식품위생안전성학회지. 2008;23(3):222-6.

7. 박혜란 외 4인. 백작약 조다당분획에 의한 대식세포 활성화를 통한 암세포 증식 억제. 한국식품영양학회지. 2003;32(1):149-54.
8. 박혜란 외 4인. 백작약 조다당분획에 의한 B 세포 증식의 특성. 대한면역학회. 2001;1(2):126-34.
9. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 외. 중약대사전. 서울:정담. 1998:1678-85.
10. Lee S 외 7인. Partially purified paeoniflorin exerts protective effects on UV-induced DNA damage and reduces facial wrinkles in human skin. J Cosmet Sci. 2006;57(1):57-64.
11. 정일윤 외 5인. 백작약 열수추출물의 산화적 스트레스 억제효과 및 유효성분 동정. 한국식품영양학회지. 2003;32(5):739-44.
12. Mari M 외 4인. Evaluation of the estrogenic activities of some pesticides and their combinations using MfT/Se cell proliferation assay. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2006;209(5):413-21.
13. Hosei J 외 3인. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D₃ and Retinoic Acid. Cancer Res. 1985;45(4):1474-8.
14. Yagi A 외 2인. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. Planta Medica. 1986;3981:517-9.
15. Jergil B 외 3인. Dopa oxidation and tyrosine oxygenation by human melanoma tyrosinase. Acta Derm Venereol. 1983;63(6):468-75.
16. James, A.E.K 외 2인. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic tyrosinase inhibitors. Bio-chemistry. 1996;35:9090-6.
17. 정명아 외 2인. 노화 및 주름개선 화장품 선호브랜드의 성분현황과 만족도 -피부관리 화장품을 중심으로. 한국디자인문화학회지. 2011;17(1):561-73.
18. 조영제. Phellodendron amurense의 미백물질을 이용한 화장품 특성. 한국응용생명화학회지. 2011;54(2):108-13.
19. Kligman D. Cosmeceuticals. Dermatol. Clin. 2000;18:609-15.
20. 김창훈 외 3인. 蘆薈(알로에), 紫花地丁의 항산화, 항염증, 주름, 미백에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2010;23(1):23-43.
21. 박진미, 김경준. 오배자의 항 주름 효과 및 미백 효과에 미치는 실험적 연구. 한방안이비인후피부과학회지. 2010;23(1):135-48.
22. 황보민 외 2인. 石斛, 石榴의 항산화, 항염증, 주름, 미백에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2010;23(3):11-32.
23. 이승은 외 2인. 가미방풍통성산의 미백효과에 관한 연구. 대한안이비인후피부과학회지. 2004;17(1):94-103.
24. 박호순 외 2인. 가미귀비탕의 미백효과에 관한 연구. 대한안이비인후피부과학회지. 2004;17(2):48-58.
25. 김수민, 유동열. 美白散이 멜라닌 생성 및 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2009;22(4):1-8.
26. 김진경, 유동열. 六味地黃湯加減方이 멜라닌 생성 및 유전자 발현에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2009;22(3):66-82.
27. Zhu Y 외 2인. Advanced achievements about neuroprotective mechanisms of paeoniflorin. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2010;35(11):1490-3.
28. 조영호. 파래 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과. 생약학회지. 2008;39(3):174-8.

29. Marmol V. del. and Beermann F. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation, *FEBS Lett.* 1996;381:165-8.
30. Chakraborty A, K. 외 3인. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human, *Pigment Cell Res.* 1998;11:206-12.
31. 강환구 외 4인. 멜라닌 분해능을 지닌 미백용 기능성 화장품원료의 개발. *한국생물공학회지.* 2007;22(1):7-15.
32. Kameyama K 외 7인. Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase related protein1 (TRP1), DOPAchrome tautomerase(TRP2) and a melanogenic inhibitor, *J Invest Dermatol.* 1993;100(2):126-31.
33. Funasaka Y 외 4인. The depigmenting effect of alpha tocopheryl ferulate on human melanoma cells. *Br. J. Dermatol.* 1999;141(1):20-9.
34. Ikeda T, Tsutsumi T. Function and skin depigment activity of crude drugs, *Fragrance J.* 1990;6:56.
35. Qui F 외 5인. Pharmacological properties of traditional medicines, XXII. Pharmacokinetic study of mulberroside A and its metabolites in rat. *Biol. Pharm. Bull.* 1996;19(11): 1463-7.
36. Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future, *Cell Mol Life Sci.* 2005;62 (15):1707-23.
37. Schallreuter KU 외 3인. Regulation of melanogenesis--controversies and new concepts, *Exp Dermatol.* 2008;17(5):395-404.
38. Song JS 외 4인. Neutrophil Elastase Causes MUC5AC Mucin Synthesis Via EGF Receptor, ERK and NF-kB Pathways in A549 Cells. *The Korean Journal of Internal Medicine.* 2005;20(4):275-83.
39. 부희정 외 5인. 감태(Ecklonia cava)에서 분리한 Phlorotannin 성분의 Elastase 저해활성 및 Hyaluronidase 저해활성. *생약학회지.* 2006; 37(2):92-6.
40. Tsukahara K 외 5인. Inhibition of ultraviolet-B-induced wrinkle formation by an elastase-inhibiting herbal extract: implication for the mechanism underlying elastase-associated wrinkles. *Int J Dermatol.* 2006; 45(4):460-8.
41. 정희록 외 5인. 사과 추출물의 미백 및 주름 개선 효과. *한국식품저장유통학회지.* 2011;18 (4):597-603.
42. Iwata K 외 8인. Effect of neutrophil elastase inhibitor(sivelestat sodium) in the treatment of acute lung injury(ALI) and acute respiratory distress syndrome(ARDS): a systematic review and meta-analysis. *Intern Med.* 2010;49(22):2423-32.
43. Sallenave JM. The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteinases in inflammatory lung disease. *Respir Res.* 2000;1(2):87-92.