J Korean Soc Food Sci Nutr
42(4), 550~555(2013)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2013.42.4.550

한방 이화주의 미백 및 피부 주름 개선 효과

이상진* · 권이영* · 조성원 · 권희숙 · 신우창†
(주)국순당부설연구소

Effects of Ehwa Makgeolli Containing Oriental Herbs on Skin Whitening and Wrinkles

Sang-Jin Lee*, Yi-Young Kwon*, Sung-Won Cho, Hee-Suk Kwon, and Woo-Chang Shin†
Research Laboratories, Kooksoondang Brewery Co., Ltd., Gyeonggi 462-120, Korea

Abstract

Extrinsic skin aging is characterized by the loss of skin tone and resilience, irregular pigmentation, and deep wrinkles. The aim of this study was to investigate the effects of Ehwa Makgeolli containing oriental herbs (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch., *Lycium chinense* MILL., *Morus alba* L., and *Saururus chinensis* Baill) on skin whitening and wrinkling in human skin cells. We prepared Makgeolli extracts (HEE) with 70% ethanol. HEE significantly inhibited *in vitro* mushroom tyrosinase activity and reduced the cellular and secreted melanin content of mouse melanoma melanocytes (B16F1 cells). HEE down-regulated the protein expression of tyrosinase related protein (TRP)-1/-2, a key player in melanogenesis. Treatment with HEE in human keratinoctyes (HaCaT cells) inhibited the proteolytic activities of matrix metalloproteinase (MMP)-2/-9 in a dose-dependent manner and dramatically reduced the expression of MMP-2/-9. In addition, HEE attenuated lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide production in murine macrophages (RAW264.7 cells). These results indicate that HEE may be a great cosmeceutical ingredient for its whitening, anti-wrinkle, and anti-inflammatory effects.

Key words: anti-inflammation, anti-melanogenesis, anti-wrinkle, Ehwa Makgeolli, oriental herb

서 론

피부노화는 그 요인에 따라 내인적 노화(intrinsic aging)와 외인적 노화(extrinsic aging)로 구분할 수 있다. 내인적 노화는 피부의 구조와 생리적 기능이 나이를 먹으면서 쇠퇴하는 것이며, 외인적 노화는 태양광선 등 누적된 외부 스트레스에 의해 노화 현상이 나타나는 것이다. 특히 각종 오염물질과 자외선 노출 등 외인적 노화에 의해 피부가 얇아지며, 주름이 증가되고 탄력이 감소될 뿐만 아니라, 기미, 주근깨 및 검버섯이 증가하게 된다(1,2). 자외선에 피부가 노출되면 색소침착이 증가하는 이유는 피부 세포가 자외선 흡수에 의한 손상을 방어하기 위한 목적으로 멜라닌 색소 생성 유도와 밀접한 관계가 있다. 자외선에 의한 피부 노화가 진행되면 멜라닌 증식이 항시적으로 되고 그 결과 기미가 나타난다(3). 이런 노화들이 진행될수록 피부를 구성하는 물질인 collagen, elastin, hyaluronic acid 등 구조 단백질을 생성하는 능력이 감소하고 type-1 collagenase의 생합성이 증가하여 matrix metalloproteinases(MMPs)의 발현이 증가되면 진피 내 교원 섬유, 탄력섬유, fibronectin 및 laminin과 같은 기질 단백질 분해를 유도하여 피부탄력을 떨어뜨리고 피부 주름생성을 야기한다(4). 최근 연구에 의하면 elastase가 피부 탄력성 섬유의 3차원적 뒤틀림에 중요한 역할을 한다고 보고되었으며(5), 이러한 elastase의 활성 증가는 피부 탄력 섬유를 감소시켜 피부 주름 형성에 기여한다고 알려져 있다(6). 또한 누적되는 산화적 스트레스는 피부 노화를 더 촉진하게 된다(7). 피부 미백과 주름 개선 효과가 있는 다양한 소재 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 미백 물질의 경우 arbutin, ascorbic acid, kojic acid, hydroquinone 등이 사용되고 있으나 미백효과가 뛰어난 것으로 알려져 있음에도 불구하고 제품의 안전성에서 끊임없이 문제가 제기되고 있다(8,9). 또한 주름 개선으로 쓰이고 있는 물질로는 retinol, retinyl palmitate, adenosine, epigallocatechin gallate 등이 있다(10,11).

최근 천연물, 특히 한방 발효 추출물이 기능성 화장품의 주류를 이루고 있다. 수백년 동안 동양에서 사용되었던 한약재의 발효 추출물은 대부분 일정 수준 이상 효능이 인정된 소재이다(12,13). 우리나라 대표 쌀 발효주인 막걸리는 피부 생리활성 효능이 있는 것으로 산업적으로 실제 이용되고 있

*These author contributed equally to this work.
†Corresponding author. E-mail: wcshin@ksdb.co.kr
Phone: 82-31-739-5381, Fax: 82-31-739-5382

으나, 막걸리뿐만 아니라 한방 발효물을 함께 적용한 막걸리에 대한 체계적인 연구는 현재까지는 미비한 실정이다. 따라서 한방 발효 막걸리의 미백 및 주름 개선 활성에 대한 체계적인 연구를 통하여 새로운 기능성 화장품 소재 개발이 필요한 실정이다.

이화주는 수운잡방, 요록, 주찬 등 옛 주요문헌에도 자주 등장할 정도로 옛 선조들이 즐겨 마신 탁주로 고려시대부터 음용되었으며 서민층보다는 양반가에서 즐겨 마셨다고 전해지고 있다. 배꽃이 필 무렵부터 담근다고 해서 '이화주(梨花酒)'라는 이름이 붙은 이 술은 색이 희면서 주질은 숟가락으로 떠먹을 수 있을 정도로 걸쭉해서 마치 죽과 같은 독특한 특성을 지닌 고급막걸리다. 이화주는 쌀누룩에 떡으로 빚은 술이라 아미노산과 탄수화물 등 영양가가 높아 매우 순하고 단맛이 있어서 옛날에는 아기들에게 젖 대신 먹였다고도 전해진다.

이화주를 빚을 때 사용하는 쌀누룩(이화누룩)에 대한 피부 기능활성을 평가한 결과, 다른 전통누룩 및 일본식 코지에 비해 우수한 피부 미백 효과와 피부 광노화를 억제하는 활성을 확인하였다(14). 고려시대부터 전해져 온 이화주의 발효 과정에 피부 미백 효과가 우수한 4가지 약재인 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)(15), 구기자(*Lycium chinense* MILL.)(16), 상백피(*Morus alba* L.)(17)와 삼백초(*Saururus chinensis* Baill)(18)를 첨가하여 피부 미백 활성이 증가된 한방이화주(한방막걸리)를 개발하였으며, 용매 추출을 통해 한방이화주 추출물을 제조하여 본 연구에 사용하였고 피부 세포에서 한방이화주의 피부 미백과 주름 개선 활성에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 제조

한방이화주는 생쌀을 분쇄하여 이화누룩(구형의 전통 쌀누룩)과 물을 혼합한 후 20~25°C에서 약 10일간 발효한 후 다시 분쇄한 생쌀, 이화곡과 물 그리고 4가지 약재(감초, 구기자, 상백피 그리고 삼백초)를 혼합하여 25°C에서 25~30일간 발효하였다. 알코올 발효가 종료되면 술지게미를 분리하여 한방 이화주를 완성하였다.

본 연구에 사용된 시료는 70% 에탄올에 한방이화주를 24시간 동안 저온에서 교반하여 1차 추출하였다. 추출 후 에탄올을 모두 제거하고, 한방 이화주 고형분에 70% 에탄올을 재 첨가하여 2차 추출을 진행하였다. 한방이화주 에탄올 추출물(HEE)을 수득하고, 감압농축기를 이용하여 에탄올을 제거한 후 동결건조 하였다.

시약

Fetal bovine serum(FBS), Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium(DMEM), RPMI 1640 medium, penicillin, streptomycin, trypsin-EDTA는 Gibco-BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), mushroom tyrosinase(1,000 units), L-tyrosine, α-melanocyte stimulating hormone(α-MSH), N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. MMP-2, MMP-9, anti-mouse horseradish peroxidase(HRP) conjugated secondary antibody와 anti-rabbit HRP conjugated secondary antibody는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)에서, tyrosine related protein(TRP)-1, TRP-2는 Abcam(Cambridge, UK)에서 구매하였다.

세포 및 배양방법

Mouse melanoma melanocyte(B16F1 cells), human fibroblast(HS68 cells), human keratinocyte(HaCaT cells)는 경희대학교 김대옥 교수가 제공해주셨으며, murine macrophage(RAW264.7 cells)는 성균관대학교 조재열 교수가 제공해 준 세포를 사용하였다. B16F1, HS68, HaCaT 세포는 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, RAW264.7 세포는 RPMI 1640 배지에 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin을 첨가하였다. 모든 세포주는 37°C, 5% CO_2를 유지하며 배양하였다.

세포 독성 확인

HEE의 세포 독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 먼저 세포를 96-well plate에 2×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에서 18시간 배양하였다. 이후 FBS-free DMEM 배지를 이용하여 HEE를 처리하여 24시간 동안 배양하고 100 μL의 MTT 용액을 첨가하였다. 4시간 후 배지를 제거하고 100 μL DMSO 용액을 가하여 microplate reader(Gen5, Bio-Tak Instruments, Inc., St. Charles, IL, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

In vitro tyrosinase 저해 활성 평가

Tyrosinase 저해활성 측정은 No 등(19)의 방법을 변형하여 측정하였다. 반응구는 0.1 M phosphate buffer(pH 6.5)와 1 mM L-tyrosine을 녹인 기질액 40 mL, 시료용액 10 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase 20 mL를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조군은 시료 대신 완충용액을 넣은 것으로 하였으며 양성 대조군으로 kojic acid를 사용하였다. Tyrosinase 저해활성(%)은 아래 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{저해 활성}(\%)=\left(1-\frac{\text{시료처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right)\times100$$

멜라닌 생성 억제능 평가

B16F1 cells를 5×10^5 cells/mL로 6-well plate에 분주하

고 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. HEE을 α-MSH 40 ng/mL가 포함된 DMEM 배지에 첨가하여 48시간 배양하였다. 배지를 모두 제거하고 trypsin을 처리하여 세포를 회수한 후 회수한 세포에 1 N NaOH(10% DMSO 포함)를 첨가하여 60°C에서 30분 방치하여 멜라닌을 녹였다. 이 용액을 microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 멜라닌 함량을 구하였다.

Elastase 저해 활성 평가

Elastase는 Pro-Prep(Intron, Seongnam, Korea)을 이용하여 HS68 cells에서 단백질을 분리하여 사용하였다. 50 mM tris-HCl(pH 8.0)과 elastase를 처리하고 일정 농도의 시료 용액을 가하여 혼합한 후, 37°C에서 5분간 배양하였다. 여기에 250 mM 기질 용액(N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide in 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.0))을 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

Zymography

HaCaT cells를 60 mm cell culture dish에 1×10^6 cells/mL로 분주하여 24시간 배양하였다. 배지를 제거한 후 농도별로 시료를 처리하였다. 48시간이 지난 다음 배지를 수거하여 3,000 rpm에서 30분 동안 원심분리를 수행하였다. Bradford법을 이용하여 단백질의 양을 정량하여 10% SDS-PAGE(1 mg/mL gelatin 함유)에서 전기영동 수행 후, 0.1% triton-X로 30분씩 2번 세척한 다음 developing buffer를 넣어 30°C에서 18시간 동안 반응시키고 coomassie blue로 염색을 하여 관찰하였다.

LPS를 이용한 피부 염증 반응 저해 활성 평가

RAW264.7 cells을 48-well plate에 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 18시간 배양하였다. 이후 각 well은 PBS를 이용하여 세척 후 FBS-free RPMI 1640 배지를 이용하여 HEE를 1 μg/mL LPS(lipopolysaccharide)와 함께 처리하여 24시간 배양 후 nitric oxide(NO) 생성량을 측정하였다. Nitrite의 양은 HEE를 처리한 세포 배양액 100 mL와 동량의 Griess reagent를 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot analysis

세포를 1×10^6 cells/mL가 되도록 60 mm cell culture dish에 분주하여 24시간 배양 후 HEE를 처리하고 24시간을 반응시켰다. 세포를 회수하여 lysis buffer를 첨가하여 얻은 단백질을 bradford법을 이용하여 정량하였다. 단백질 20 mg을 10% SDS-PAGE에 전기영동을 수행하고 gel의 단백질을 polyvinylidene fluoride(PVDF) membrane(Millipore, Billerica, MA, USA)으로 이동시킨 후 5% non-fat milk으로 상온에서 1시간 동안 blocking 하고 primary antibody(MMP-2, MMP-9, TRP-1, TRP-2)를 가하여 4°C에서 overnight 시켰다. 마지막으로 PVDF membrane을 0.1% TBST로 세척하고 secondary antibody conjugated HRP를 희석하여 상온에서 1시간 동안 교반하고 enhanced chemiluminescence detection kit(Amersham Bioscience, Pittsburg, PA, USA)를 사용하여 단백질을 확인하였다.

통계학적 분석

모든 실험은 3회 반복실험을 실시하였으며 각 시료들의 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었고 각 실험결과의 통계적 유의성 검토는 시료가 포함되지 않은 대조구와 비교하여 Student's *t*-test에 의하여 판정하였으며 p값이 0.05 미만일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

한방이화주 에탄올 추출물의 피부 미백 효과

Tyrosinase는 tyrosine을 3,4-dihyroxyphenylalanine (DOPA)로 변환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPAquinone으로 전환하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있어 멜라닌 합성 반응에서 가장 중요한 역할을 하고 있다(20). 기질인 L-tyrosine과 효소인 mushroom tyrosinase에 의해 생성되는 멜라닌의 흡광도 측정을 통해 HEE의 tyrosinase 저해 활성을 알아본 결과는 Fig. 1과 같다. 실험결과 HEE는 농도 의존적으로 tyrosinase 저해 활성을 나타내었으며 IC_{50} 값은 40.6 mg/mL로 확인되었다. 양성 대조군인 kojic acid의 IC_{50} 값은 18.0 mg/mL이다. 한방이화주에 첨가된 4 종류의 약재(감초, 구기자, 상백피 및 삼백초)가 첨가되지 않은 순수한 이화주 에탄올 추출물은 농도에 상관없이 tyrosinase 저해 활성이 없는 것으로 확인되었다.

Melanin은 tyrosine이 tyrosinase에 의해 DOPA로 전환되는 과정을 시작으로 DOPAquinone, DOPAchrome의 과정을 거쳐 melanin으로 합성된다(21). 멜라닌 생성 세포인 멜라노사이트를 이용하여 HEE가 멜라닌 형성에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 살펴보았다. 마우스 유래 멜라노사이트(murine melanoma melanocyte, B16F1 cells)에 α-MSH

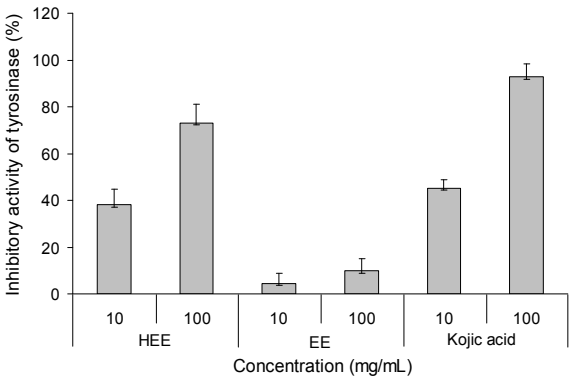

Fig. 1. Inhibitory effect of HEE extracts against tyrosinase activity. Measurement of tyrosinase activity was performed using *L*-tyrosine as the substrate. Kojic acid was used as a positive control. Values indicate means±SD of n=3 determination.

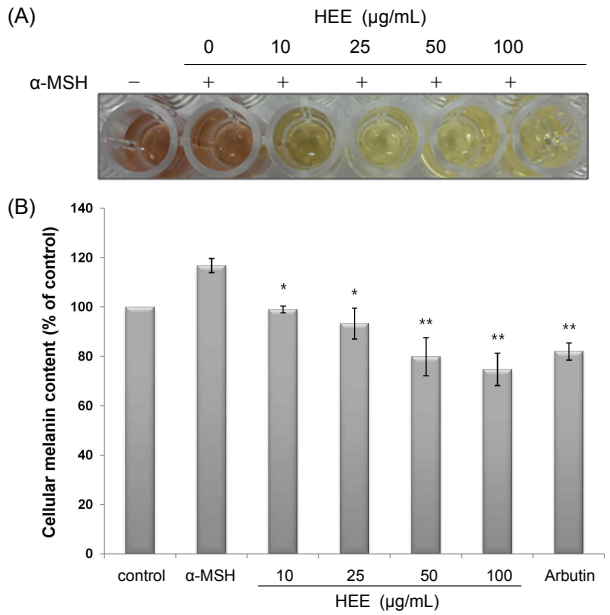

Fig. 2. Inhibitory effect of HEE extracts on melanin biosynthesis. Melanin contents were determined in B16F1 cells treated with 100 μg/mL of HEE or α-MSH for 48 h. Arbutin was used as a positive control. Values represent mean±SD (n=3). Data represent mean±SD of three independent observations performed in triplicate. $^{*}p<0.05$ and $^{**}p<0.01$ compared to α-MSH.

와 HEE를 동시에 처리한 후 세포 내 멜라닌 양을 측정하였으며 대조구로 arbutin을 사용하였다. 멜라노사이트가 배지로 분비하는 멜라닌의 함량을 측정한 결과, 농도 의존적으로 melanin 분비를 저해하였다(Fig. 2A). 농도 50 μg/mL인 HEE에서 20.2%, 100 μg/mL에서 25.3%의 melanin 합성을 억제하였으며, 양성 대조구인 arbutin(100 μg/mL, 18.0%)보다 다소 높은 저해 활성을 확인하였다(Fig. 2B). 이 연구 결과 HEE가 tyrosinase을 통한 melanin 생합성에 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다.

또한 HEE의 TRP-1과 TRP-2의 발현에 미치는 영향을 western blot analysis로 분석한 결과 HEE는 TRP-1과 TRP-2를 농도 의존적으로 저해하였다(Fig. 3). 특히 대조군과 비교하였을 때 HEE 25 μg/mL 이상 농도에서 TRP-1과 TRP-2의 강력한 저해 활성을 가지고 있는 것을 확인하였다. TRP-1은 멜라닌 합성에 관여하는 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid(DHICA)가 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화되고, 최종적으로 중합 반응을 진행시키는 melanin 합성 DHICA oxidase이며 TRP-2는 tyrosinase 관여 합성 반응에서 생성된 DOPAchrome을 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid로 변환, indole 골격을 형성시키는 데 관여한다(22). HEE이 TRP-1과 TRP-2의 발현을 억제하는 것은 melanin 합성과 melanin의 indole 골격을 형성하는 과정을 모두 저해하는 활성이 있는 것으로 유추된다. HEE는 TRP-1과 TRP-2를 저해하여 멜라닌의 생합성을 저해하며 피부 미백에 우수한 효능이 있는 다양한 유효

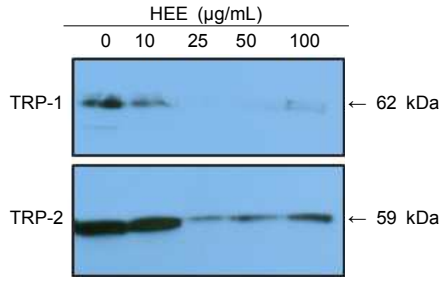

Fig. 3. Inhibitory effect of HEE extracts on TRP-1 and TRP-2 expression. B16F1 cells (1×10^6 cells/mL) were treated with HEE or α-MSH for 24 hr. After immunoblotting, the expression levels of TRP-1 and TRP-2 were identified by their antibodies.

성분에 의한 활성이라 사료된다.

한방이화주 에탄올 추출물의 주름 개선 효과

Elastase는 진피 내 피부탄력을 유지하는데 중요한 단백질인 elastin을 분해하는 효소이며, 콜라겐을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다(23). 따라서 elastase를 저해하는 활성을 가지고 있다는 것은 피부 주름 개선 활성이 있는 것으로 볼 수 있다. HEE가 피부 각질층의 elastin을 분해하여 피부의 탄력성을 소실시켜 피부의 노화를 일으키는 elastase 저해활성을 측정하였다(Fig. 4). HEE의 농도 증가에 따라 elastase 저해활성이 증가하였다.

MMPs는 세포외 기질과 기저막의 분해에 관여하는 여러 효소의 family로 구조와 기능적 특성에 따라 interstitial collagenase, stromelysin, gelatinase, membrane-type MMP 등 네 개의 subfamily로 나누어진다(24). 피부의 keratinocyte, fibroblast를 포함한 대다수의 많은 세포들이 MMPs를 분비한다(25). 먼저 HEE가 keratinocyte가 분비하는 MMP-2와 MMP-9에 미치는 영향을 zymography로 평가하였다. HEE는 MMP-2와 MMP-9의 효소적 활성을 농도 의존적으로 저해하였으며(Fig. 5A), western blot analysis를 통해 세포 내 단백질 발현에 미치는 영향을 평가한 결과, HEE는

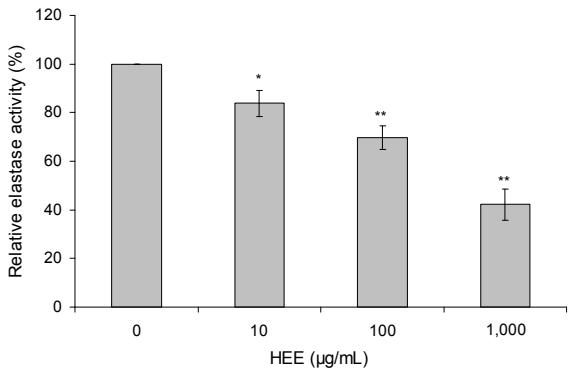

Fig. 4. Inhibitory effect of HEE extracts on elastase activity. Elastase activity was measured using STANA as a substrate in cell extracts from control and from UVB-exposed cells as described in the Materials and Methods. Data represent mean±SD of three independent observations performed in triplicate. $^{*}p<0.05$ and $^{**}p<0.01$ compared to control group.

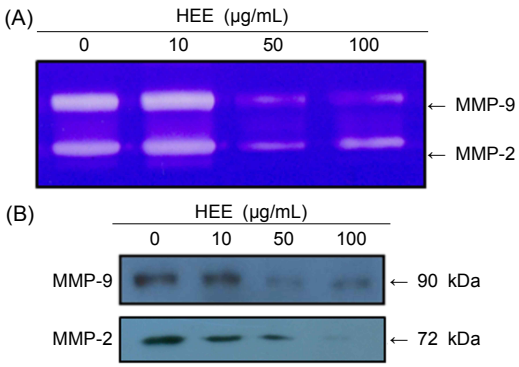

Fig. 5. Inhibitory effect of HEE extracts on MMP-2 and MMP-9 expression. (A) HaCaT cells were treated with HEE for 24 h, followed by exposure to 20 mJ/cm^{2}of UV for 30 min prior to harvest of cell media. Gelatin zymography was performed for determination of gelatinolytic activities of HEE. (B) HaCaT cells (1×10^6 cells/mL) were stimulated with HEE, followed by exposure to UV for 30 min. After immunoblotting, the expression levels of MMP-2 and MMP-9 were identified by their antibodies.

MMP-2와 MMP-9의 단백질 발현을 농도 의존적으로 저해하였다(Fig. 5B). MMPs의 활성이 증가되면 피부 내 collagen과 같은 구성 단백질을 붕괴시킨다. MMP는 진피층의 extracellular matrix(ECM) 붕괴에 영향을 미쳐 노화에 중요한 역할을 한다고 보고되었다(26). HEE는 노화가 진행되면서 피부 탄력을 유지하는 구성단백질 파괴에 관여하는 elastase와 MMPs의 효소 활성과 발현을 저해하는 것을 확인하였다. 이는 HEE이 피부 탄력을 유지하여 노화에 따른 주름 생성을 억제할 수 있는 가능성이 높을 것으로 사료된다.

한방이화주 에탄올 추출물의 피부 염증 반응 저해 효과

MTT assay는 살아 있는 세포에서 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질은 MTT tetrazolium이 청자색을 띄는 비수용성 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법(27)으로 HEE의 RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보았다. 세포독성 실험 결과, LPS 처리하지 않은 조건 하에서 HEE는 최대 100 μg/mL 농도까지 RAW264.7 cells에 세포 독성이 없는 것으로 나타났다(data not shown). 특히 LPS 처리에 따른 세포생존율을 측정한 경우 HEE는 80% 이상의 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 6A).

NO는 효소와 결합된 또는 결합되지 않은 lipid alkoxyl, peroxyl radical intermediate와 매우 빨리 반응하여 질화 중간산물을 생성한다. NO는 고농도에서 반응성 산화물질로 전환되어 세포에 병적인 손상을 유발한다(28). LPS는 세균 내독소로 대식세포에 처리하면 염증성 cytokines 및 NO와 같은 염증반응의 매개물질을 생성하여 병리학적 반응이 일어나게 된다(29). 본 연구는 HEE 처리가 RAW264.7 세포의 NO 생성에 어떠한 영향을 미치는지를 평가하고자 수행하였다. RAW264.7 세포에 LPS(1 μg/mL) 단독처리 또는 LPS와 HEE 5, 10, 50, 100 μg/mL의 농도로 동시에 처리한 후, HEE

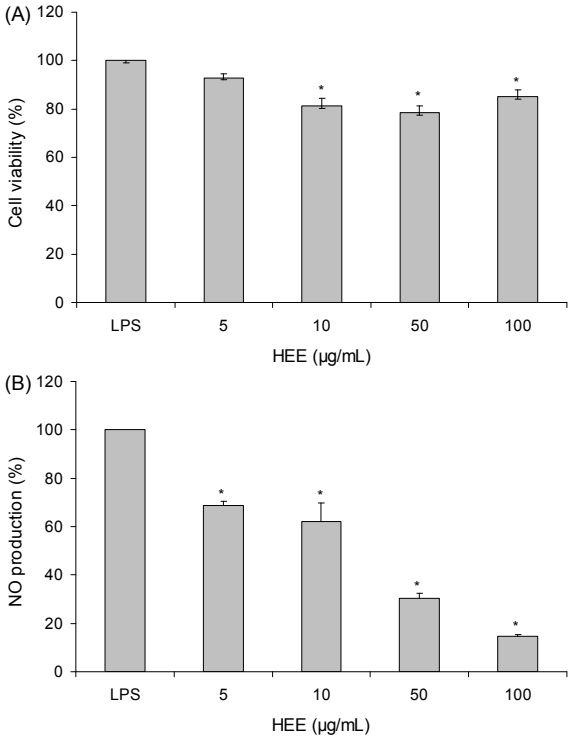

Fig. 6. Inhibitory effect of HEE extracts on NO production. (A) Cell viability was determined by MTT assay. Value represent mean±SD (n=3). Data represent mean±SD of three independent observations performed in triplicate. $^*p<0.05$ compared to LPS alone. (B) The production level of NO was determined from culture supernatants of RAW264.7 cells treated with HEE or LPS (1 μg/mL) for 24 hr. Data represent mean±SD of three independent observations performed in triplicate. $^*p<0.01$ compared to LPS alone.

에 의한 NO 생성 저해 효과를 관찰하였다. 그 결과 HEE는 유의적 수준에서 농도 의존적인 경향으로 NO 생성을 저해하는 것으로 관찰하였다(Fig. 6B). LPS에 의해 유도된 염증반응을 50% 저해하는데 요하는 HEE의 농도인 IC_{50}는 24.9 μg/mL이며, 이는 NO의 저해제로 알려진 aminoguanidine의 100 μM 효과와 동등한 수준이다(30). 이는 HEE이 피부 염증 반응 억제로 피부 진정 효과를 나타낼 가능성을 시사한다.

요 약

본 연구에서는 한방이화주의 피부 생리기능 활성을 알아보기 위해 70% EtOH 추출물의 피부 미백, 주름 개선 및 항염증 효과를 조사하였다. HEE은 tyrosinase 활성 억제 및 tyrosine을 기질로 melanin이 형성되는 pathway에 관여하는 주요한 인자인 TRP-1과 TRP-2를 저해하는 작용 기전을 통해 피부 색소침착의 주요 원인 물질인 melanin 생합성을 농도 의존적으로 저해하는 것을 확인하였다. HEE은 피부 진피 내 피부 탄력을 유지하는 elastin을 분해하는 효소인 elastase의 활성을 저해하였고, 피부의 keratinocyte가 생성 분비하는 MMP-2와 MMP-9의 단백질 발현과 proteolytic

활성을 억제하여 노화에 따른 피부 주름 생성 억제할 수 있는 가능성을 확인하였다. 또한 세포 독성 없이 LPS에 의해 유도된 염증 반응을 50% 저해하는 HEE의 농도(IC_{50})는 24.9 μg/mL이며, 50 μg/mL 농도로 처리하였을 때 염증 반응 저해 효과가 70%로 높은 효과를 가지는 것을 확인하였다. 이상의 결과를 종합하면 HEE의 피부 미백, 주름 개선 및 항염증에 우수한 효과를 나타내고 있으므로 기능성 화장품의 주요한 소재로 이용 가치가 높을 것으로 사료된다.

문 헌

1. Gilchrest BA. 1990. Skin aging and photoaging. *Dermatol Nurs* 2: 79-82.
2. Kang KS, Kim ID, Kwon RH, Heo YY, Oh SH, Kim MA, Jung HJ, Kang HY, Ha BJ. 2007. The evaluation of anti-wrinkle effects in oriental herb extract. *J Life Sci* 17: 1147-1151.
3. Wang KH, Lin RD, Hsu FL, Huang YH, Chang HC, Huang CY, Lee MH. 2006. Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *J Ethnopharmacol* 106: 353-359.
4. Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. 2002. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci* 973: 31-43.
5. Philips N, Keller T, Hendrix C, Hamilton S, Arena R, Tuason M, Gonzalez S. 2007. Regulation of the extracellular matrix remodeling by lutein in dermal fibroblasts, melanoma cells, and ultraviolet radiation exposed fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 299: 373-379.
6. Tsukahara K, Nakagawa H, Moriwaki S, Takema Y, Fujimura T, Imokawa G. 2006. Inhibition of ultraviolet-B-induced wrinkle formation by an elastase-inhibiting herbal extract: implication for the mechanism underlying elastase-associated wrinkles. *Int J Dermatol* 45: 460-468.
7. Emerit I. 1992. Free radicals and aging of the skin. In *Free Radicals and Aging*. Emerit I, Chance B, eds. Experientia Supplementum, Birkhäuser Basel, Basel, Switzerland. Vol 62, p 328-341.
8. Takizawa T, Mitsumori K, Tamura T, Nasu M, Ueda M, Imai T, Hirose M. 2003. Hepatocellular tumor induction in heterozygous p53-deficient CBA mice by a 26-week dietary administration of kojic acid. *Toxicol Sci* 73: 287-293.
9. Solano F, Briganti S, Picardo M, Ghanem G. 2006. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res* 19: 550-571.
10. Kim BY, Kim TG, Kang WY, Baek H, Cheon HY, Kim D. 2010. Functional cosmetic effect of porcine placenta. *Korean Chem Eng Res* 48: 327-331.
11. Maeda K, Fukada M. 1991. *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem* 42: 361-368.
12. Yang HJ, Ahn YJ, Kim JH, Park SN. 2008. Antioxidative activity and component analysis of *Quercus glauca* leaf extracts. *J Soc Cosmet Sci* 34: 189-200.
13. Hong ES, Ahn GW, Jo BK. 2008. The study on the potential anti-aging properties of *Prunella vulgaris* extracts *in vitro* and *in vivo*. *J Soc Cosmet Sci* 34: 129-135.
14. Lee SJ, Cho SW, Kwon YY, Kwon HS, Shin WC. 2012. Inhibitory effects of ethanol extracts from nuruk on oxidative stress, melanogenesis, and photo-aging. *Mycobiology* 40: 117-123.
15. Nerya O, Vaya J, Musa R, Izrael S, Ben-Arie R, Tamir S. 2003. Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *J Agric Food Chem* 51: 1201-1207.
16. Kim DH, Lee SY, Kim NK, Youn BK, Jung DS, Choi EY, Hong SR, Yoon JY, Kang MH, Lee JY. 2011. Moderating effects of skin hyperpigmentation from *Lycii fructus* and *Lycii folium* extracts. *J Appl Biol Chem* 54: 270-278.
17. Nattapong S, Omboon L. 2008. A new source of whitening agent from a Thai mulberry plant and its betulinic acid quantitation. *Nat Prod Res* 22: 727-734.
18. Seo CS, Lee WH, Chung HW, Chang EJ, Lee SH, Jahng Y, Hwang BY, Son JK, Han SB, Kim Y. 2009. Manassantin A and B from *Saururus chinensis* inhibiting cellular melanin production. *Phytother Res* 23: 1531-1536.
19. No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, Chung HY. 1991. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci* 65: PL241-246.
20. Yoon JH, Shim JS, Cho Y, Baek NI, Lee CW, Kim HS, Hwang JK. 2007. Depigmentation of melanocytes by isopanduratin A and 4-hydroxypanduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* R_{oxb}. *Biol Pharm Bull* 30: 2141-2145.
21. Jung HW, Choi JY, Lee JG, Choi EH, Oh JS, Kim DC, Kim JA, Park SH, Son JK, Lee SH. 2007. Isolation of melanogenesis inhibitors from Cinnamomi Cortex. *Kor J Pharmacogn* 38: 382-386.
22. Tsukamoto K, Jackson IJ, Urabe K, Montague PM, Hearing VJ. 1992. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *EMBO J* 11: 519-526.
23. Marotta F, Kumari A, Yadav H, Polimeni A, Soresi V, Lorenzetti A, Naito Y, Jain S. 2012. Biomarine extracts significantly protect from ultraviolet A-induced skin photoaging: an ex vivo study. *Rejuvenation Res* 15: 157-160.
24. Loo WT, Chen JP, Chow LW, Chou JW. 2007. Effects of Shugansanjie Tang on matrix metalloproteinases 1, 3 and 9 and telomerase reverse transcriptase expression in human breast cells *in vitro*. *Biomed Pharmacother* 61: 601-605.
25. Fisher GJ, Choi HC, Bata-Csorgo Z, Shao Y, Datta S, Wang ZQ, Kang S, Voorhees JJ. 2001. Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 117: 219-226.
26. Nagase H, Visse R, Murphy G. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69: 562-573.
27. Seo EJ, Hong ES, Choi MH, Kim KS, Lee SJ. 2012. The antioxidant and skin whitening effect of *Artemisia iwayomogi* extracts. *Korean J Food Sci Technol* 44: 89-93.
28. Bickers DR, Athar M. 2006. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *J Invest Dermatol* 126: 2565-2575.
29. Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E. 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4: 471-479.
30. Lee SJ, Kim JH, Jung YW, Park S, Shin WC, Park CS, Hong SY, Kim GW. 2011. Composition of organic acids and physiological functionality of commercial *Makgeolli*. *Korean J Food Sci Technol* 43: 206-212.

(2012년 12월 12일 접수; 2013년 1월 16일 채택)