



Original Article / 원저

당귀와 구기자 에탄올 추출물의 피부 미백작용

황성연^{1,2}·이정탁¹·김영욱¹·김홍준^{1*}

¹우석대학교 한의과대학 방제학교실, ²한국전통의학연구소

Skin Whitening Effects of Extracts from Angelicae Gigantis Radix and Lycii fructus Ethanol Extracts

Sung Yeoun Hwang^{1,2} · Jeong Tak Lee¹ · Yeong Uk Kim¹ · Hong Jun Kim^{1*}

¹Department of Korean Medical Prescription, Woosuk University,

²Korea Bio Medical Science Institute

ABSTRACT

Objective : The purpose of this study was to investigate the synergistic effect of Angelicae gigantis Radix (AG) and Lycii fructus (LF) ethanol extracts on skin-whitening effects.

Method : LFAG extracts were prepared by extracting with 80% ethanol. The efficacy of LFAG was judged by measurement of cell viability, tyrosinase activity, melanin production, tyrosinase and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) expression in B16F10 murine melanoma cells by lipopolysaccharides (LPS) treatment .

Results : Each extract (LF or AG) inhibited the tyrosinase activity in a dose-dependent manner. The co-treatment of LFAG extracts (25 µg/mL LF plus 25 µg/mL AG) markedly suppressed the LPS-induced cellular tyrosine activity, melanin production, tyrosinase and MMP-1 expression in B16F10 murine melanoma cells. These suppressive effects were synergistically increased by their combination.

Conclusions : With these observations, we suggest that the extracts from *Lycii fructus* and *Angelica gigantis Radix* could be potent natural materials for whitening skin.

Key word : Lycii fructus, Angelicae gigantis Radix, Tyrosinase, Melanin, Skin whitening, UVB protection

I. 서 론

생체의 외피계(integumentary system)인 피부(skin)는 외부환경으로부터 내부의 환경에 대한 항상성(homeostasis)을 유지하는데 매우 중요한 역할을 하는데, 자외선이나 환경오염원 등 외부 자극이 가해지면, 자체 방어기전으로 표피(epidermis)의 기저층(basal layer)에 존재하는 멜라닌세포(melanocytes)로부터 멜라닌(melanin)을 생성한다¹⁾. 멜라닌의 생성 기전은 멜라닌세포 내 소기관인 멜라노솜(melanosome)에서 tyrosinase에 의해서 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenyl-alanine (DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPA quinone으로 산화하는 DOPA oxidase활성에 의해 이루어진다²⁾. 멜라닌은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이다. 멜라닌은 여러 가지 외적인 요인에 의해 생성이 증가되어 다량의 멜라닌이 각질형성세포에 전달되고 피부 표피층에 축적되어 과색소침착 현상이 나타나게 된다. 이와 같이 멜라닌의 과잉 생산은 인체에 기미, 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하며 피부암의 유발에도 관여하는 것으로 알려져 있다³⁾.

특히 피부가 자외선 (ultraviolet, UV)에 강하게 노출되면, 홍반(erythema), 부종(edema), 화상(sunburn), 비후(hyperplasia), 염증(inflammation), DNA 손상, 광노화(photo-aging)을 비롯한 다양한 멜라닌색소가 형성된다. 특히 UVB에 심하게 노출되면, 피부과색소 침착은 물론 피부노화와

피부암을 초래할 수 있다⁴⁾. 최근 이러한 UVB 노출에 대한 피부손상을 줄이기 위해서 UV 차단제 뿐만 아니라 멜라닌 색소의 생성을 억제하는 물질에 대하여 관심이 증가되고 있다.

국내에서 자생하는 참당귀 (*Angelica gigas Nakai*)는 한방에서 혈액을 보충시켜주는 보혈 효과가 있다하여 빈혈이나 부인병 등에 대한 보혈제로 처방된다⁵⁾. 약리학적 측면에서 당귀의 효능을 나타내는 주성분은 coumarin 유도체인 decursin이라는 물질이며, 이 외에 decursinol, umbelliferon, β -sitosterol 등이 함유되어 있다. Coumarin 유도체는 과거 지혈 시 사용된 항응고제로 급성심근경색에 사용한 것으로 알려져 있다^{6,7)}. 최근에 당귀는 혈류 개선 효과가 있어 혈액 순환을 도와 노화방지, 주름 개선 및 조직재생에 효과가 있는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 또한 한방에서 사용하는 구기자나무(*Lycium chinense* Miller) 유래 물질은 지골피(뿌리), 구기엽(잎), 및 구기자(열매, *Lycii fructus*) 등이 있다. 그 중에서 열매인 구기자는 滋養, 强壯, 補血, 止渴, 補精氣 등에 효능이 있는 것으로 기술되어 있으며, 『本草綱目』에는 구기자를 복용하면 근골을 단단하게 하며 몸이 가벼워져 늙지 않고 더위와 추위를 타지 않으며 독성이 없고 염증, 갈증을 수반하는 당뇨병이나 신경이 마비되는 질병에 좋다고 기록되어 있다⁹⁾. 구기자에는 arotenoid, cholin, meliscic acid, zeaxanthin, physalien, betaine, β -sitosterol, vetaine과 rutin 등이 함유되어 있어 항암효과, 면역증진, 간 기능 개선효과, 혈중 콜레스테롤 저하 등의 효능이 있다고 알려져 있으며⁹⁻¹¹⁾, 최근에는 피부의 과색소 침착을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다¹²⁾. 그러나 당귀와 구기자의 혼합 추출물질에 대한 미백 및 자외선 차단효과에 대

*교신저자 : 김홍준, 전북 완주군 삼례읍 후정리 우석대학교 한의과대학 205호

· Tel : 063-290-1131

· E-mail : kimboncho@woosuuk.ac.kr

· 접수 2013/05/30 · 수정 2013/06/07 · 채택 2013/06/11

해서는 알려진바 없다.

따라서 본 연구는 당귀와 구기자 추출물을 대상으로 멜라닌 생성 억제효과를 비교한 후 Melanoma (B16F10)을 lipopolysaccharide (LPS)로 자극한 다음 유의한 억제효과가 있는 각각의 추출물의 농도를 선택하여 동시에 처리하여 멜라닌 생성 억제에 대한 효과를 알아본 결과 매우 흥미 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

Lipopolysaccharide (LPS), penicillin/streptomycin, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)는 Sigma-Rdrich사 (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS)는 Invitrogen사 (Carlsbad, CA, USA)로부터 구입하였고, Anti-microphthalmia-associated transcription factor (MITF), anti-tyrosinase primary antibody와 mouse-anti-goat, rabbit-anti-mouse 등 secondary antibody는 Santacruz (Santacruz, CA, USA)에서 구입하였다. 그 외 각종 시약은 특급을 사용하였다.

2) 추출물의 준비

당귀 (*Angelicae gigantis Radix*)와 구기자 (*Lycii fructus*)는 광명당제약(울산, 대한민국)으로부터 구입하였고, 약재는 우석대학교 한의과대학 방제학교실에서 형태학적으로 동정하였고, 표본(2011-AGLF)는 우석대학교 방제학교실에 보관 중에 있다. 약물의 제조는 잘 건조된 200g 씩 정량하여 한약추출기(대웅약탕기, SK-1600)에 주입하였고, 4,000 mL 증류수를 첨가하여 100°C에서 2시간 30분 동안 가열 추출하였다. 추출용액은 3,000 rpm에서 20분간 원심 후 0.45 μm membrane filter를 활용하여 여과한 다음

-70°C에서 동결 건조하여 35.1g 얼어 실험에 사용 하였다.

3) 세포배양

설치류 유래 B16F10(melanoma) 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. 세포의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 습기가 충분하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하였다. B16F10 세포(5×10⁴ cells/mL)는 24 well culture flask에 접종하고 약 80% confluency에 도달하였을 때 각 추출물을 여러 가지 농도(25-200 μg/mL)별로 전 처리하고 2 시간 동안 방치한 후 LPS (1 μg/mL)을 처리한 후 48시간에 멜라닌 생성과 관련된 효소 활성 및 분자를 측정하였다.

4) 추출물의 tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 활성 측정은 Yagi 등¹²⁾의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 0.2 mL을 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정 하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가량과 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

5) 세포생존율 조사

세포 생존율 측정은 Carmichael 등¹³⁾의 방법에 따라 측정하였다. B16F10 세포(5×10⁴ cells/well)을 96 well culture plate에 접종하고 약 80% confluency에 도달하였을 때 각 추출물을 여러 가지 농도(25-200 μg/mL)별로 전 처리하고 2시간 동안 방치한 후 LPS (30 μg/mL)을 처리한 다음 24시간에 MTT assay에 의해 세포 생존율을 조사하였다. 요약하면, 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 20 μL을 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 150 μL를 가하여 실온에서 30분

간

반응 시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

6) Cellular tyrosinase 저해활성 측정

Melanoma 세포를 각각의 조건에서 48시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척하였다. 각 dish에 lysis buffer (67 mM sodium phosphate buffer, 1% triton X-100, 0.1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride)를 100 μ L 첨가한 후 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고, 세포를 수집하여 ultrasonication 한 후 1시간 동안 방치한 후 13,200 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 효소용액으로 사용하였다. 효소액은 67 mM phosphate buffer (pH 6.8) 에 녹인 8.0 mM의 L-DOPA 120 μ L와 시료용액 40 μ L을 96-well plate에 넣은 후, 67 mM phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 효소용액 40 μ L을 첨가하여 37°C에서 30분간 배양한 후, 생성된 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정하였다.

7) 멜라닌 생합성 저해를 측정

B16F10 세포로부터의 멜라닌 생합성 측정은 Hosoi 등¹⁴⁾의 방법에 따라 측정하였다. DMEM 배지로 배양된 B16F10 세포를 100 mm culture dish에 1×10^6 cell/dish 가 되게 분주하고 24시간 배양 후 시료를 농도별로 조절하여 2mL 첨가하고, 48시간 후에 인산완충액(pH 7.4)으로 세척하였다. 그 후 0.25M trypsin-EDTA 용액으로 세포를 탈착한 후 수확한 세포를 1×10^6 세포 당 1 mL의 5% trichloroacetic acid (TCA)로 처리하고, 2,500 rpm으로 2회 원심분리한 후 분리된 멜라닌을 인산완충액으로 세척한 뒤 ether:ethanol (1:3) 1 mL 를 가하여 2회 원심분리 한 후 ether 1 mL로 세척 건조시켰다. 건조된 멜라닌에 1 N NaOH를 1 mL 가하여 80°C에서 1 시간 반응시킨 후 분광 광도계 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 생합성 저해는 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

8) Western blot

Melanoma의 멜라닌 합성 관련 분자인 tyrosinase과 저해분자인 MITF 활성을 알아보기 위하여 B16F10 세포 부유액(5×10^4 cells/mL)을 100 mm culture dish에 각 well 에 가한 후 약 80% confluency에 도달되었을 때 각 추출물을 2시간동안 처리한 후 LPS(1 μ g/mL)을 처리하고 48시간 배양 후 세포상층액을 제거한 후 PBS로 2번 세척해주었다. Lysis buffer 100 μ L 로 용해해서 4°C 냉장상태에서 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리 하여 상층액을 얻고 Bradford assay로 정량하여 20 μ L의 단백질을 10%의 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacryamide에 전기영동한 후 transfer cell (Bio Rad, Hercules, CA)을 활용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer [5% skim milk in tris-buffered saline & tween 20 (TBST)]로 옮겨 10분 간격으로 3회 세척하였다. 그 후 MITF (Santacruz, 1:1000)과 tyrosinase (Santacruz, 1:1000) 및 β -actin (Santacruz 1:1000) 1차 항체를 희석하여 4°C에서 12시간 방치한 다음 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고 mouse anti-rabbit IgG horse radish peroxidase (HRP), bovine anti-goat IgG HRP의 각각의 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 분자 발현에 대한 실험은 enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England) 용액으로 반응시키고, LAS 4000 chemiluminescence detection system (Fuji, Tokyo, Japan)을 이용하여 밴드를 확인하여 density를 측정하였다.

9) 통계처리

모든 실험값은 평균 \pm 표준오차(mean \pm SE)로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리했으며, 유의성 관계는 $P < 0.05$ 로 정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 당귀와 구기자 추출물의 Tyrosinase 저해 활성

먼저 당귀와 구기자 에탄올 추출물의 미백효과를 알아보기 위하여 멜라닌 합성을 직접적으로 유도하는 것으로 잘 알려진 tyrosinase의 활성²⁾을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 구기자와 당귀 추출물의 tyrosinase 저해활성은 농도에 의존적으로 점차 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 특히 1,000 µg/mL 농도에서 당귀와 구기자 추출물은 각각 55.1±2.3%와 47.2±2.4% 나타났으며, tyrosinase 저해활성을 통해 미백효과를 나타내는 것으로 잘 알려진 비타민 C의 경우 72.5±5.0% 나타났다. 당귀와 구기자 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해 활성은 양성대조군인 비타민 C에 낮았지만, 전 연구자들^{7,15)}의 결과와 유사하게 그 활성이 나타나 미백작용이 있을 가능성이 높았다.

2. 당귀와 구기자 추출물의 세포생존율에 미치는 영향

멜라닌 세포를 LPS로 자극하면, 염증반응을 매개하는 nitric oxide (NO)¹⁶⁾ 뿐만 아니라 멜라닌 형성을 촉진¹⁷⁾하는 것으로 알려졌다. 이 과정에서 LPS에 의한 세포독성이 발생할 수 있는데, 본 연구는 당귀와 구기자 추출물이 LPS가 유도하는 세포독성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 LPS(30 µg/ml)의 농도에서 80.1±2.6%로 약물이 처리되지 않은 대조군에 비해서 세포생존율이 낮게 나타났지만, 당귀와 구기자 추출물 처리군에서는 농도에 의존적으로 세포

생존율이 증가되었다. 특히 25 µg/mL과 50 µg/mL 처리군에서는 약물이 처리되지 않은 대조군과 비슷한 세포생존율을 보여 본 연구에 사용된 당귀와 구기자 추출물은 세포독성이 없었고, 세포생존율을 증가시키는 것으로 조사되었다.

3. 멜라닌세포에서 tyrosinase 활성에 미치는 당귀와 구기자 추출물의 영향

멜라닌세포에서 멜라닌의 합성하는 중요한 기전은 tyrosinase가 tyrosine을 기질로 하여 DOPA를 DOPA quinone으로 전환시키는 DOPA oxidase로서 멜라닌 합성의 처음 두 단계 반응을 촉매하면서 이루어 진다¹⁸⁾. 일반적으로 멜라닌을 UV⁴⁾로 자극하면 멜라닌세포가 활성화되어 멜라닌 합성이 촉진될 뿐만 아니라 최근에는 LPS¹⁷⁾로 자극될 때도 멜라닌합성이 촉진되는 것으로 알려졌다. 따라서 본 연구는 당귀와 구기자 추출물을 동시에 처리 하였을 때 멜라닌세포 내 tyrosinase 활성이 효과적으로 억제되는지 확인하기 위해서 LPS (30 µg/mL)을 처리하기 전 당귀추출물(50 µg/mL)과 구기자 추출물(50µg/mL)을 2시간동안 각각 처리하였다. 또한 본 논문에서는 보여주지 않았지만, tyrosinase 활성이 미약한 농도인 당귀 추출물(25µg/mL)과 구기자 추출물(25µg/mL)을 동시에 처리하고 2시간 동안 방치한 후 LPS로 자극하여 48시간 세포를 배양하고 세포질 내 tyrosinase 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 약물이 처리되지 않은 대

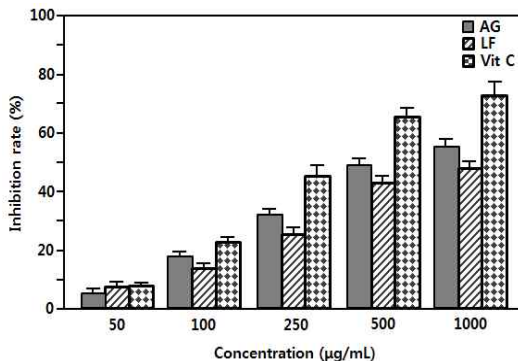


Fig. 1. Inhibitory effects of *Angelicae gigantis* (AG) and *Lycii fructus* (LF) extract on tyrosinase. Vitamin C (L-ascorbic acid) was used with reference compound.

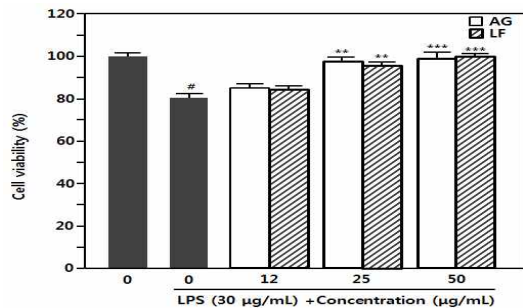


Fig. 2. Cell viability of *Angelicae gigantis* (AG) and *Lycii fructus* (LF) extract on LPS-treated B16F10 cells. Cells are treated without or with the indicated AG extract or LPS plus LF extract for 2 h and then without or with LPS (30 µg/mL) for 48 h. Values are shown as mean±SD of three independent experiments. **p*< 0.01 and ***p*< 0.001 vs. LPS alone.

조군의 세포내 tyrosinase 활성을 100%로 하였을 때 LPS로 자극한 멜라닌세포는 그 활성이 165.1±8.9%로 매우 증가하였지만, 당귀와 구기자 추출물을 처리한 실험군에서는 각각 134.8±5.7%와 139.8±4.9%로 나타나 유의하게 tyrosinase 활성이 억제되었다($p<0.01$). 더욱이 당귀와 구기자 추출물을 동시에 처리한 실험군은 105±8.7%로 현저히 tyrosinase 활성이 억제되는 상승효과가 있었다($p<0.001$). 이와 같이 멜라닌세포에서 멜라닌 합성에 중요하게 관여하는 tyrosinase 활성을 효과적으로 억제하기 위해서는 당귀와 구기자 추출물을 각각 처리하는 것보다 동시에 처리하는 것이 더욱 효과적임을 알 수 있었다.

4. 멜라닌세포에서 멜라닌 합성에 미치는 당귀와 구기자 추출물의 영향

인간의 피부가 UV에 노출될 때 멜라닌세포가 활성화되어 멜라닌 색소의 합성을 촉진하는데, 이러한 현상은 피부가 UV로부터 보호하기 위한 하나의 기전으로 알려지고 있다¹⁹⁾. 그러나 과도한 멜라닌이 피부에 축적되면, 기미, 주근깨, 검버섯 등의 부분적인 과색소침착증(hyperpigmentation)을 일으키는 역할을 하고 있다^{19,20)}. 이러한 현상은 멜라닌이 표피 기저층에서 멜라닌세포의 수직 상돌기를 통하여 주위의 각질세포(keratinocytes)로 전달되고, 피부의 각질층으로 상승 이동되기 때문

이다²¹⁾. 따라서 본 연구는 당귀와 구기자 추출물을 동시에 처리 하였을 때 멜라닌세포 내 멜라닌 합성이 억제되는지 확인하기 위해서 LPS (30 µg/mL)을 처리하기 전 당귀추출물(50 µg/mL)과 구기자 추출물(50µg/mL)을 2시간동안 각각 처리 하였다. 또한 당귀 추출물(25µg/mL)와 구기자 추출물(25µg/mL)을 동시에 처리하고 2시간 동안 방치한 후 LPS로 자극하여 48시간 세포를 배양하고 멜라닌 함량을 측정하였다. 그 결과 Fig. 4과 같이 약물이 처리되지 않은 대조군의 멜라닌량을 100%로 하였을 때 LPS로 자극한 대조군은 그 량이 175.0±9.9%로 매우 증가하였지만, 당귀와 구기자 추출물을 처리한 실험군에서는 각각 145.8±5.4%와 137.8±7.5%로 나타나 유의하게 멜라닌 생성량이 억제되었다($p<0.01$). 더욱이 당귀와 구기자 추출물을 동시에 처리한 실험군은 105.3±7.5%로 현저히 멜라닌 생성이 억제되는 상승효과가 있었다($p<0.001$). 이와 같이 멜라닌세포에서 당귀와 구기자 추출물을 동시에 처리할 경우 tyrosinase 활성을 효과적으로 억제한 바와 같이 멜라닌 합성도 현저히 억제되는 결과를 얻었다.

5. Tyrosinase과 MITE 분자 발현 억제에 미치는 당귀와 구기자 추출물의 효과

마지막으로 본 연구는 당귀와 구기자 추출물의

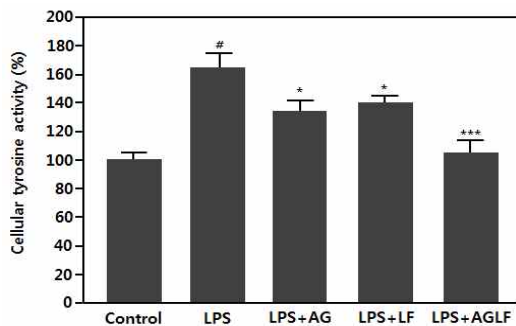


Fig. 3. Inhibitory synergic effect by co-treatment of *Angelica gigantis* (AG) and *Lycii fructus* (LF) extract on LPS-induced tyrosinase activity in B16F10 cells. Cells are treated without or with AG (50µg/mL), LF (50µg/mL) or AGLF (25 µg/mL AG plus 25 µg/mL LF) for 2 h and then without or with LPS (30 µg/mL) for 48 h, Values are shown as mean±SD of three independent experiments. # $p<0.001$ vs non-treated control. ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ vs. LPS alone.

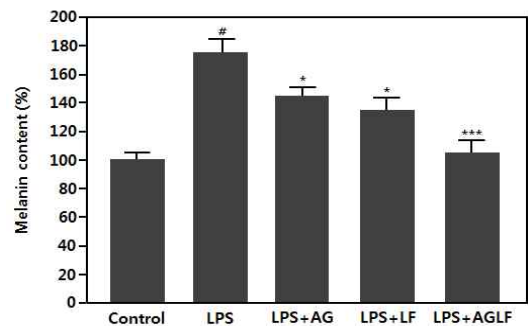


Fig. 4. Inhibitory synergic effect by co-treatment of *Angelica gigantis* (AG) and *Lycii fructus* (LF) extract on LPS-induced melanin synthesis in B16F10 cells. Cells are treated without or with AG (50µg/mL), LF (50µg/mL) or AGLF (25 µg/mL AG plus 25 µg/mL LF) for 2 h and then without or with LPS (30 µg/mL) for 48 h, Values are shown as mean±SD of three independent experiments. # $p<0.001$ vs non-treated control. ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ vs. LPS alone.

동시 처리가 LPS로 자극된 멜라닌세포에서 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성과 관련된 분자 발현을 알아보 고자 상기에서 기술한 바와 같은 방법으로 멜라닌 세포를 처리하고 tyrosinase와 MITE 단백질 발현 을 조사하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 당귀와 구 기자 추출물을 각각 처리한 실험군은 LPS를 처리 한 대조군보다 tyrosinase와 MITE 단백질 발현이 억제되었다. 더욱이 당귀와 구기자 추출물을 동시 처리한 실험군은 이들 단백질 발현이 현저히 억제 되었다.

MITE는 tyrosinase 분자 활성을 촉진하는 전사 인자로 잘 알려졌다²²⁾. 멜라닌세포에 LPS로 자극 하면, MITE분자 발현이 촉진되어 tyrosinase의 활성을 유도하여 멜라닌 합성을 촉진하며, 이 과정 에 관여하는 신호전달분자는 mitogen-activated protein kinase (MAPK)으로 알려져 있는데, 그 중에서도 p38 MAPK가 중요한 것으로 알려졌다¹⁷⁾. 따라서 본 연구에서 얻은 당귀와 구기자 추출물의 효과적인 미백작용에 대한 기전을 상세히 규명하기 위해서는 p38 MAPK는 물론 관련된 일련의 MAPKs 을 더 조사해야 될 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하면, 당귀와 구기자 추출물 은 미백작용과 관련된 tyrosinase 활성과 멜라닌 합 성을 억제시키는 효과가 있었다. 더욱이 당귀와 구 기자 추출물을 동시에 멜라닌세포에 처리할 경우 tyrosinase와 MITE 단백질 발현을 효과적으로 억 제함으로써 tyrosinase의 활성과 멜라닌 합성을 현

저히 억제하는 작용이 있음을 확인하였다. 따라서 당귀와 구기자 추출물을 각각 사용하는 것보다 이 들을 동시에 사용하는 것이 미백작용을 나타내는 데 우수한 효과가 있을 것이라 사료된다.

V. 결 론

본 연구의 목적은 당귀와 구기자 추출물을 동시 에 처리할 경우 미백작용이 상승되는지 확인하고자 하였다. 먼저 당귀와 구기자는 80% 에탄올로 추출 하여 건조한 후 약물자체의 tyrosinase 활성을 조사 한 결과 비타민 C보다는 그 활성 억제가 낮았지만 효과가 있었다. 멜라닌세포주인 B16F10 세포에서 당귀와 구기자 추출물은 미백작용과 관련된 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성을 억제시키는 효과가 있었다. 더욱이 당귀와 구기자 추출물을 동시에 멜라닌세 포에 처리할 경우 tyrosinase와 MITE 단백질 발현 을 효과적으로 억제함으로써 tyrosinase의 활성과 멜라닌 합성을 현저히 억제하는 작용이 있음을 확 인하였다. 따라서 당귀와 구기자 추출물을 각각 사 용하는 것보다 이들을 동시에 사용하는 것이 미백 작용을 나타내는데 우수한 효과가 있을 것으로 보 이며 향후 이를 이용하여 한의학적인 미백치료제 품을 만들 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2013년도 우석대학교 교내학술연 구비 지원을 받았음을 밝힙니다.

참 고 문 헌

- Gilchrest BA. Skin aging and photoaging. J Am Acad Dermatol. 1989;21:610-3.
- Alvaro SF, Jose Neptuno RL, Francisco GC. Tyrosinase a comprehensive review of its mechanism. Biochim Biophys Acta. 1995;1247: 1-11.

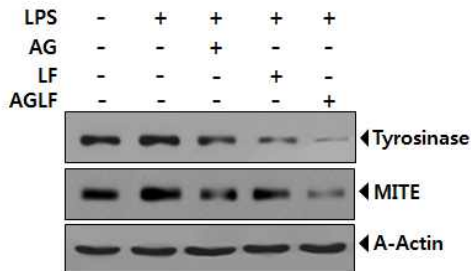


Fig. 5. Inhibitory synergic effect by co-treatment of *Angelicae gigantis* (AG) and *Lycii fructus* (LF) extract on LPS-induced tyrosinase and MITE expression in B16F10 cells. Cells are treated without or with AG (50 μ g/mL), LF (50 μ g/mL) or AGLF (25 μ g/mL AG plus 25 μ g/mL LF) for 2 h and then without or with LPS (30 μ g/mL) for 48 h. Tyrosinase and MITE expression were determined by Western blotting.

3. Kim EC, Ahn SY, Hong ES, Li GH, Kim EK, Row KH Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect. *J Korean Ind Eng Chem.* 2005;16:348-53.
4. Svobodova A, Psotova J, Walterova D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2003;147: 137-45.
5. Ahn KS, Sim WS, Kim HM, Han SB, Kim IH. Immunostimulating components from the root of *Angelica gigas* Nakai. *Korean J Pharmacogn.* 1996;27:254-61.
6. Wessler S, Kleiger RE, Cornfield J, Teitelbaum SL. Coumarin therapy in acute myocardialinfarction. A Hobson's choice. *Arch Intern Med.* 1974; 134:774-9.
7. Ristola P, Pyorala K. Determinants of the reponse to coumarin anticoagulants in patients with acute myocardial infarction. *Acta Med Scand.* 1972;192:183-8.
8. Kim CH, Kwon MC, Han JG, Na CS, Kwak HG, Choi GP, Park UY, Lee HY. Skin-Whitening and UV-Protective Effects of *Angelica gigas* Nakai Extracts on Ultra High Pressure Extraction Process. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 2008;16:255-60.
9. Park BH, Cho HS, Kim DH. Anti-oxidative effects of solvent extracts of *Lycii fructus* powder(LFP) and *Maejakgwa* made with LFP. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2005;34:1314-9.
10. Park YJ, Kim MH, Bae SJ. Enhancement of anticarcinogenic effect by combination of *Lycii fructus* with vitamin C. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 1992;31:143-8.
11. Lee HC, Lee BC, Kim SD, Lee KS, Paik SW, Lee SS, Kim SM. Change in composition of *Gugija* (*Lycii fructus*) species according to harvest time. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 2008;16:306-12.
12. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica.* 1986;3981:517-9.
13. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987; 47:936-42.
14. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 1986;45:1474-8.
15. Kim DH, Lee SY, Kim NK, Youn BK, Jung DS, Choi EY, Hong SR, Yoon JY, Kang MH, Lee JY. Moderating Effects of Skin Hyperpigmentation from *Lycii fructus* and *Lycii folium* Extracts. *J Appl Biol Chem.* 2011;54:270-8.
16. Tsatmali M, Graham A, Szatkowski D, Ancans J, Manning P, McNeil CJ, Graham AM, Thody AJ. Alpha-melanocyte-stimulating hormone modulates nitric oxide production in melanocytes. *J Invest Dermatol.* 2000;114:520-6.
17. Ahn JH, Jin SH, Kang HY. LPS induces melanogenesis through p38 MAPK activation in human melanocytes. *Arch Dermatol Res.* 2008; 300:325-9.
18. Kwak JH, Seo UK, Han YH. Inhibitory effect of mugwort extracts on tyrosinase activity. *Korean J Biotechnol Bioeng.* 2002;16:220-3.
19. Mishima Y, Hatta S, Ohyama Y, Inazu M. Induction of melanogenesis suppression: Cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res.* 1988;1:367-74.
20. Choi BW, Lee BH, Kang KJ, Lee ES, Lee NH. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Korean J Pharmacogn.* 1998;29:237-42.
21. Yamamura T, Onishi J, Nishiyama T. Antimelanogenic activity of hydrocoumarins in cultured normal human melanocytes by stimulating intracellular glutathione synthesis. *Arch Dermatol Res.* 2002;294:349-54.