

Original Article / 원저

## 구기자 추출물이 피부 미백 및 주름에 미치는 영향

최주호 · 최정화 · 박수연 · 김종한 · 정민영  
동신대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

### Effects of Lycii Fructus Extracts(LFE) on Skin whitening and Elasticity using Melanoma cells

*Ju-Ho Choi · Jeong-Hwa Choi · Soo-Yoen Park · Jong-Han Kim · Min-Yeong Jeong*

Dept. of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Dermatology, College of Korean Medicine, Dong-Shin University

#### Abstract

**Objective** : Lycii Fructus Extracts(LFE) can do Anti-hypertension activity, Antidepressant, Anti-diabetic activity. This study was designed to investigate effects of LFE on skin whitening and elasticity using melanoma cells.

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

**Results** : More than 250  $\mu\text{g/ml}$  of LFE treated group showed lowered proliferation rates significantly compared to non-treated group. More than 125  $\mu\text{g/ml}$  of LFE treated groups were lower levels of melanin synthesis respectively. LFE showed inhibitory effect on tyrosinase activities in vitro. And, LFE suppressed tyrosinase activities in B16F10 cells significantly. Finally, LFE suppressed elastase type I and IV activities in dose-dependent manner in vitro. And LFE also slightly suppressed elastase activities in vivo.

**Conclusion** : These results suggest that LFE 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 elasticity or whitening.

---

**Key words** ; Lycii Fructus Extracts(LFE); Skin whitening; Skin Elasticity; Melanoma cell

## I. 서 론

피부는 우리 몸을 보호하는 생물학적 피부(biologic skin)의 작용뿐만 아니라 미적인 기능과 감정 표현을 나타내는 사회적 피부(social skin)로도 매우 중요한 역할을 하고 있다. 따라서 최근 피부의 미백 및 주름에 대한 사회적인 관심이 다소 증가하고 있다.

피부색은 멜라닌, 혈관분포와 혈색소, 각질층의 두께 및 카로틴 등 여러 가지에 의해 좌우되며 이 중 멜라닌이 주된 역할을 한다. 피부의 미백에 대해서 검정하기 위해서는 멜라닌 형성 억제 여부를 밝히는 것이 필요하다<sup>1)</sup>.

또한, elastin은 collagen과 함께 진피조직을 형성하는 단백질로, 피부 탄력성은 진피조직의 두께로 결정이 된다. collagen이나 elastin의 형성억제나 파괴증가는 피부탄력성을 저하시켜 주름살의 원인이 되고 있다. 따라서 elastin을 분해하는 elastase의 활성을 억제함으로써, 주름생성을 억제할 수 있다<sup>2)</sup>.

枸杞子는 滋補肝腎 益精明目하는 효능이 있고, carotene, vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, nicotin acid, vitamin C등이 있으며<sup>3)</sup>, betaine,  $\beta$ -sitosterol 등의 기능성 성분이 다량 함유되어 있어<sup>4)</sup>, 혈압강화효과<sup>5)</sup>, 항우울효과<sup>6)</sup>, 혈당강하작용<sup>7)</sup> 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 특히 구기자 및 구기엽 추출물이 피부과색소 조절효과에 대한 보고가 있으며<sup>8)</sup>, 지질 조성 변화 및 collagen 합성 저하를 회복시킨다는 보고가 있었으며<sup>9)</sup>, 數種의 한약재의 콜라겐 생합성 효과에 대한 연구에서 구기자의 효과가 가장 우수하다고 보고하였다<sup>10)</sup>. 이러한 연구들을 바탕으로 구기자의 효과를 알아보려고 하였으며, 또한 기존 논문들의 에탄올 추출법이 아닌 물 추출법을 통해 연구를 진행하였다.

이에 악성흑색종 세포주인 B16F10 세포의 생존율에 미치는 영향, 멜라닌 색소 생성 저해, Tyrosinase

활성 저해능, 제 1형 및 4형 Elastase 억제에 미치는 영향을 연구함으로써 구기자가 피부 미백 및 주름에 미치는 영향을 알아보았다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에서 사용된 枸杞子(Lycii Fructus Extracts, LFE)으로는 가지과에 속한 蔓生灌木인 구기자나무(*Lycium chinense* Mill.) 또는 寧夏枸杞(*L. barbarum* L.)의 성숙한 과실을 건조한 것<sup>3)</sup>으로, 동신대학교 광주한방병원에서 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) $\beta$ -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 B16F10 세포주는 한국세포주은행 (KCLB, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 시료의 추출

세척되고 세절된 상태로 구입된 LFE 100 g을 증류수 1,500 ml과 함께 전기약탕기(대웅, 한국)로 100℃에서 3 시간 동안 전탕하여 물 추출을 시행하였다. 전탕한 추출물을 부직포로 거른 다음 동결건조기(삼원,

교신저자 : 최정화, 광주광역시 남구 월산동 377-12  
동신대광주한방병원 안이비인후과피부과교실  
(Tel : 062-350-7217, E-mail : juho-mail@hanmail.net)  
• 접수 : 2014/1/13 • 수정 : 2014/2/2 • 채택 : 2014/2/9

한국)를 이용하여 동결건조 분말을 얻었다. 최종적으로 얻어진 건조분말은 38.31 g이었다. 이렇게 하여 얻어진 분말은 실험에 사용하기 위하여 인산 완충액 (PBS, phosphate buffered saline)에 다시 녹여 진 후, 2,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하고, 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액은 와트만 지로 거른 다음 최종 적으로 0.22  $\mu\text{m}$  크기의 필터 (Syringe filter, Whatman)로 걸러 멸균을 대신 하였다. 이렇게 하여 얻어진 검액은 소량씩 나누어 -20 $^{\circ}\text{C}$ 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%  $\text{CO}_2$  환경에서 배양하였다.

## 3) 세포 증식율에 미치는 영향 측정

LFE가 세포 증식율에 미치는 영향 측정은 MTT assay<sup>11)</sup>를 통해 확인하였다. 간략히 정리하면, 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cell/ml의 농도로 분주하여 배양기에서 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 를 유지하며 24 시간 동안 pre-incubation시킨 후 62.5~1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 약물을 처리하여 24 시간 배양하였다. 그 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 를 처리하여 MTT가 생존 세포의 효소작용에 의해 환원되도록 2~4 시간을 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan결정을 DMSO 를 첨가하여 녹인 후 Microplate Reader (Bio-rad, USA)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 4) Melanin 생합성 저해를 측정

Melanin 생성량 측정은 Hosei 등<sup>12)</sup>의 방법을 변형

하여 사용하였다. 간략히 정리하면, B16F10세포를 배양하여 24 well plate에 각 well당 세포를  $5 \times 10^4$  cell/well로 분주한 후, 부착 및 안정화를 위하여 24 시간을 배양하였다. 배양이 끝난 후, LFE를 처리하고 다시 24~48 시간 배양하였다. 배양한 후 각 well를 PBS로 세척하고, 1 N NaOH 용액 1 ml을 첨가하고 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3 시간 동안 용해하였으며, Microplate Reader (Bio-rad, USA)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 5) 시험관 내 Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법<sup>13)</sup>에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 500  $\mu\text{l}$ 에 10 mM L-DOPA 200  $\mu\text{l}$  및 시료 용액 100  $\mu\text{l}$ 의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/ml) 200  $\mu\text{l}$ 을 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2 분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPAchrome 475 nm파장에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무 첨가구의 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  $1 \times 10^5$  cell/well로 분주한 후, 부착 및 안정화를 위해 24 시간 방치한 후, LFE를 처리하고 24 시간 배양하였다. 24 시간의 배양이 끝난 후, 세포를 1% Triton X-100 을 함유한 10 mM PBS 100  $\mu\text{l}$ 에 현탁시켰다. 현탁된 세포를 vortexing 한 후 1000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 활성측정 효소액으로 사용하였다. Tyrosinase 저해활성 측정을 위하여 96 well plate에 효소액 100  $\mu\text{l}$ 를 넣고 기질인 L-DOPA (2 mg/ml) 200  $\mu\text{l}$ 를 첨가한 후, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 동안 반응을 진행시킨 뒤, Microplate Reader (Bio-rad, USA)를 이용하

여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase의 활성도는 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 계산하였다<sup>14)</sup>.

### 7) 시험관 내 Elastase 저해 활성 측정

엘라스틴 분해효소(Elastase) 저해 활성은 James 등의 방법<sup>15)</sup>으로 측정하였다. 간단히 소개 하자면, 먼저 0.2 M의 Tris-HCl (Sigma, USA) buffer를 pH 8.0으로 적정하여 만든 후, 600  $\mu$ l을 tube에 옮긴 후, 3.3 mM로 희석한 N-Succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide 180  $\mu$ l을 첨가하고, 거기에 농도별로 희석된 LFE 추출물 300  $\mu$ l를 넣어준 후, 1  $\mu$ g/ml로 희석된 Porcine pancreatic elastase 제 1형과 4형에 각각 40  $\mu$ l와 60  $\mu$ l를 넣어주고, 실온에 10 분간 방치한 후, p-nitroanilide의 생성량을 Microplate Reader를 이용하여 475 nm 파장에서 측정하였다. Elastase 저해 활성은 다음 식에 따라 계산되며, IC<sub>50</sub>은 Elastase의 기질을 50% 저해하는데 요구되는 시료의 농도 ( $\mu$ 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

세포내 Tyrosinase 유사활성 측정과 동일하게 24 well plate에 B16F10 세포를  $1 \times 10^5$  cell/well로 분주한 후, 부착 및 안정화를 위해 24 시간 방치한 후, LFE를 처리하고 24 시간 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 사용하여 실시하였으며, Student-t-test를 이용하여 P값이 0.05 미만 일 때 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

## III. 성 적

### 1. B16F10 세포의 증식율에 미치는 영향

LFE를 처리하지 않았을 때의 증식율을  $100.00 \pm 3.92\%$ 라 하였을 때, LFE를 처리한 250, 500, 1000  $\mu$ g/ml의 농도에서 각각  $86.17 \pm 5.06\%$ ,  $85.87 \pm 4.92\%$ ,  $86.54 \pm 4.77\%$ 로 LFE를 처리하지 않았을 때보다 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있게 감소하였다(Fig. 1).

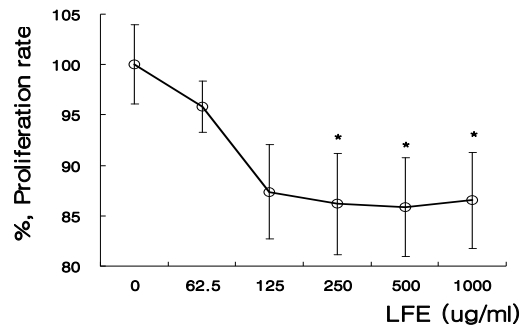


Fig. 1. Effects of LFE on proliferation rates in melanoma cells.

LFE was Lycii Fructus extracts, B16F10 cells were attached 96 well plate, and added LFE as indicated concentrations respectively. After 24 hrs incubation, production levels of melanin were measured using MIT methods. Result are presented as mean  $\pm$  SD. \* ;  $p < 0.05$  vs. non-treated group(0) (n=8).

### 2. Melanin 생성 억제에 미치는 영향

LFE를 처리하지 않았을 때의 melanin 생성량을  $100.00 \pm 2.09\%$ 로 환산하였을 때, LFE를 처리한 125, 250, 500, 1000  $\mu$ g/ml의 농도에서 melanin 생성량은

각각  $92.84 \pm 4.44$ ,  $89.85 \pm 3.56\%$ ,  $89.61 \pm 4.32\%$ ,  $88.51 \pm 3.68\%$ 로 LFE를 처리하지 않았을 때보다 melanin 생성량이 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있게 감소하였다 (Fig. 2).

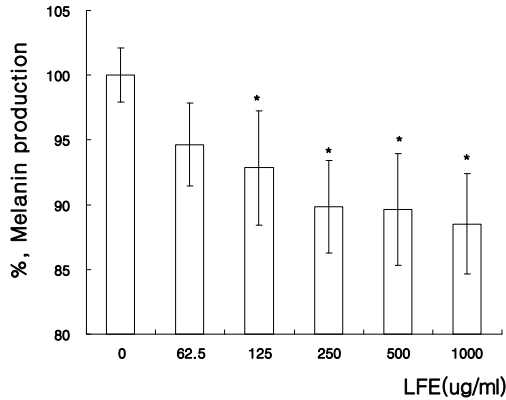


Fig. 2. Inhibitory effects of LFE on melanin production in melanoma cells.

LFE was Lycii Fructus extracts, B16F10 cells were added LFE as indicated concentrations respectively. After 24 hrs incubation, proliferation rates were measured using colorimetric methods. Result are presented as mean ± SD. \* ;  $p < 0.05$  vs. non-treated group(0) (n=4).

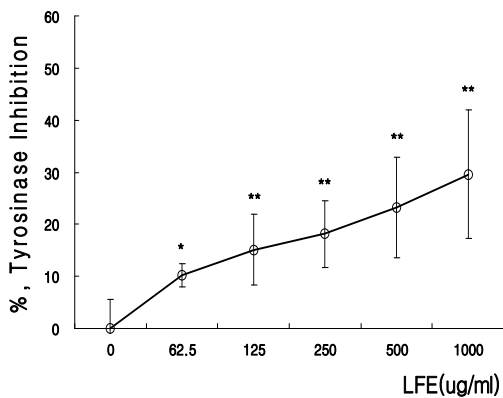


Fig. 3. Inhibitory effects of LFE on tyrosinase activities in vitro.

LFE was Lycii Fructus extracts, Inhibitory effects on tyrosinase activities were measured using colorimetric methods. Values are represented as percentage of inhibitory rates. Result are presented as mean ± SD. \* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$  vs. non-treated group(0) (n=4).

### 3. 시험관 내 Tyrosinase 활성 저해에 미치는 영향

LFE를 처리하지 않았을 때의 tyrosinase 활성 저해율을  $0.00 \pm 5.50\%$ 라 하였을 때, LFE 1000  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는  $29.61 \pm 12.35\%$ 의 활성 저해율을 나타내 LFE를 처리하지 않았을 때보다는 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있게 증가하였으나 The half maximal (50%) inhibitory concentration ( $IC_{50}$ )은 구할 수 없었다(Fig. 3).

### 4. B16F10 세포에서 Tyrosinase 활성 저해에 미치는 영향

LFE를 처리하지 않았을 때의 Tyrosinase의 활성 저해율을  $0.00 \pm 4.41\%$ 라 하였을 때, LFE 처리 농도별 Tyrosinase의 활성 저해율은 각각  $11.49 \pm 3.40\%$ ,  $14.94 \pm 3.40\%$ ,  $56.32 \pm 4.10\%$ 로 유의성 있게 증가하였다.  $IC_{50}$ 은  $456.52 \mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다(Fig. 4).

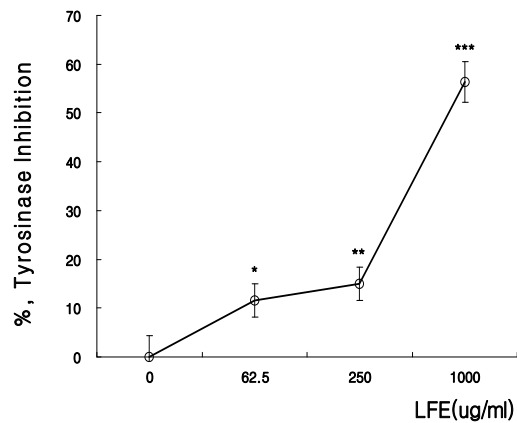


Fig. 4. Inhibitory effects of LFE on tyrosinase activities in melanoma cells.

LFE was Lycii Fructus extracts, B16F10 cells were incubated with LFE for 24 hrs 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. \* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$ , \*\*\* ;  $p < 0.001$  vs. non-treated group(0) (n=4).

### 5. 시험관 내 Elastase 활성 저해에 미치는 영향

LFE 추출물을 처리하지 않았을 때의 제 I형 Elastase 저해율을  $0.00 \pm 19.88\%$ 라 하였을 때, 250  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였을 때의 저해율은 각각  $29.35 \pm 11.23\%$ ,  $54.35 \pm 19.28\%$ ,  $61.96 \pm 9.05\%$ 로 LFE를 처리하지 않았을 때보다 유의성 있게 증가하였다.  $\text{IC}_{50}$ 은 399.79  $\mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다(Fig. 5A).

LFE 추출물을 처리하지 않았을 때의 제 IV형 Elastase 저해율을  $0.00 \pm 9.66\%$ 라 하였을 때, 250  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , 1,000  $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였을 때의 저해율도 각각  $20.33 \pm 8.12\%$ ,  $34.10 \pm 12.32\%$ ,  $63.28 \pm 9.20\%$ 로 LFE를 처리하지 않았을 때보다 유의성 있게 증가하였다.  $\text{IC}_{50}$ 은 771.99  $\mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다(Fig. 5B).

### 6. B16F10 세포 내 Elastase 활성 저해에 미치는 영향

LFE를 처리하지 않았을 때의 Elastase의 활성 저해율을  $0.00 \pm 8.87\%$ 라 하였을 때, LFE 처리 농도별 Elastase 활성 저해율은 각각  $14.33 \pm 5.40\%$ ,  $29.33 \pm 9.20\%$ ,  $50.50 \pm 8.80\%$ 로 유의성 있게 증가하였다.  $\text{IC}_{50}$ 은 983.05  $\mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다(Fig. 6).

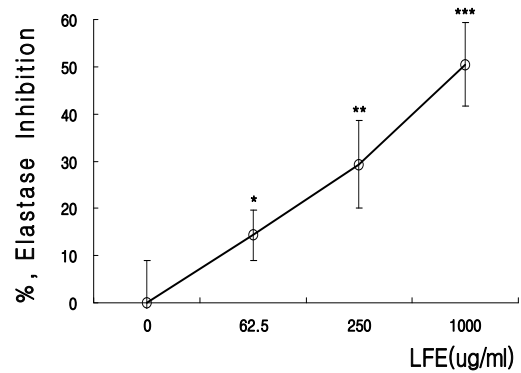
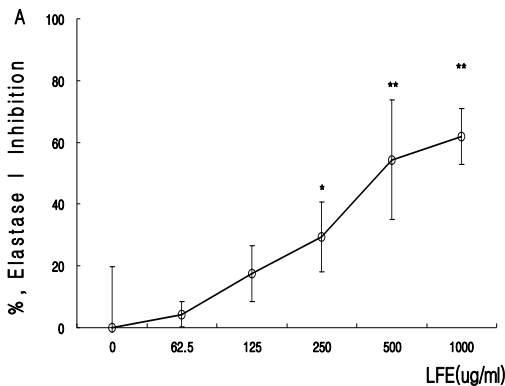


Fig. 6. Inhibitory Effects of LFE on elastase activity in melanoma cells.

LFE was Lycii Fructus extracts, B16F10 cells were incubated with LFE for 24 hrs 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. \* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$ , \*\*\* ;  $p < 0.001$  vs. non-treated group(0) (n=4).

Fig. 5. Inhibitory Effects of LFE on type I and IV elastase activity in vitro.

LFE was Lycii Fructus extracts, LFE was added into elastase I and IV in indicated concentrations, Inhibition rates of elastase I and IV by LFE were measured as production of p-nitroanilide using micro-plate reader at 475 nm wavelength. Optical densities were calculated indicated formula as described in materials and methods. Result are presented as mean  $\pm$  SD. \* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$ , \*\*\* ;  $p < 0.001$  vs. non-treated group(0) (n=4).

## IV. 고찰

피부는 우리 몸에서 체온을 조절하고, 감염으로부터 보호하며, 감각기능을 담당하고, 염분을 배출하며, 수분을 조절하는 기능 등을 담당하여 우리 몸을 보호하는 생물학적 피부(biologic skin)로서 중요한 역할을

하고 있다. 최근에는 이러한 작용뿐만 아니라, 감정 표현을 나타내는 사회적 피부(social skin)로서의 역할이 중요해 지고 있다<sup>1)</sup>. 경제 및 사회 수준이 발달할수록 외모에 대한 관심이 증가하면서 미용에 대한 관심이 증가되고 있는 실정이며, 미용을 통해 인체의 건강과 아름다움을 표현하기 위해 젊고 탄력적인 피부를 가꾸려는 여성들의 증가로 화장품 업계에서는 기능성 화장품, 특히 미백 및 주름개선기능을 가진 화장품에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>16)</sup>.

이에 한의학계에서도 다양한 한약재의 피부 및 주름에 대한 연구가 이루어지고 있어 五倍子<sup>17)</sup>, 石斛, 石榴<sup>18)</sup>, 蘆薈, 紫花地丁<sup>19)</sup>, 白芍藥<sup>20)</sup>이 피부 미백 및 주름에 효과가 있음을 보고하였고, 복합추출물에 대한 연구에는 加味歸脾湯<sup>21)</sup>, 加味防風通聖散<sup>22)</sup>, 六味地黃湯加減方<sup>23)</sup>, 美白散<sup>24)</sup>이 미백효과가 있음을 보고하였다.

본 연구에 사용된 枸杞子(LFE)는 補益藥類에 속하며, 性は 平하고 味는 甘하다. 肝과 腎으로 들어가며 滋補肝腎 益精明目의 효능이 있다. 枸杞子는 寒性도 아니고 熱性도 아니어서 陰虛, 陽虛에 모두 응용할 수 있으며, 緩和潤下劑로서 補益補精滋潤하는 약물이다<sup>3)</sup>.

LFE에서 분리되는 대표적인 성분으로는 betaine, rutin, kukoanine A,  $\beta$ -sitosterol 등이 있으며 이외에도 무기질, 비타민 등이 골고루 분포해있다. LFE 성분 중의 phytoestrogen이 estrogen 유사효과를 나타내어 estrogen 감소로 생기는 지질 조성 변화 및 collagen 합성 저하를 회복시킨다는 보고가 있으며<sup>9)</sup>, LFE 자체가 항산화 효과가 있어서 정상 세포를 보호할 수 있다는 보고가 있어<sup>25)</sup> LFE가 피부의 주름 방지 및 탄력 유지에 효과가 있을 것으로 기대하고 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 악성흑색종 세포인 B16F10세포에 LFE를 처리하여 생존율을 관찰하고, 멜라닌 생성량과 Tyrosinase 저해 활성, Elastase에 미치는 영향을 관찰하여, 피부 미백 효과 및 탄력 유지 작용이 있는지를 알아보았다.

B16F10세포에 대하여 LFE는 250  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도를 처리하였을 때 유의한 세포 증식 억제 효과를 나타내었다(Fig. 1).

Melanin은 동물, 식물 및 미생물에 널리 존재하는 melanocyte에서 형성되는 페놀류의 고분자 물질로 피부와 머리카락의 색을 결정하는 중요한 인자이다. 인체에서 melanin은 자외선에 의한 세포손상을 막아주며 독성 약물의 흡수 등 여러 중요한 작용을 수행한다. Melanin은 표피 기저층과 기저층 하의 모낭 등에서 주로 관찰되는 melanocyte로부터 합성되며, keratinocyte로 운반되어 표피 멜라닌 단위를 형성하며, 멜라닌의 생합성은 아미노산의 일종인 tyrosin으로부터 시작한다<sup>26)</sup>. 본 연구 결과, LFE는 125  $\mu\text{g/ml}$  이상을 처리하였을 때 melanin 합성을 유의성 있게 저해하였고(Fig. 2), 특히 LFE 125  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때는 B16F10의 세포 증식율에서 세포 독성을 나타내지 않으면서도 효과적인 melanin의 생성을 억제하였다. 이와 같은 결과는 LFE가 피부의 미백작용이 있음을 제시하는 결과라 생각된다.

Tyrosinase는 melanin 합성의 속도결정단계인 초기반응에 작용하는 효소로서, tyrosin을 3,4-dihydroxyphenyl alanine (DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPA quinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 지닌다<sup>27)</sup>. 지금까지 알려진 tyrosinase 저해제로는 hydroquinone, resorcinol, 4-hydroxy-anisole, ascorbic acid와 그 유도체 kojic acid, arbutin, glucosamine,  $\alpha$ -viniferin, ferulic acid 등이 있다<sup>28,29)</sup>. 본 연구에서는 Melanin 생성에 관여하는 기전으로 Tyrosinase 활성에 미치는 영향을 관찰하였는데, 그 결과 LFE는 시험관 내에서 유의한 Tyrosinase 활성 저해 효과를 보였지만  $\text{IC}_{50}$ 은 구할 수가 없었고(Fig. 3), B16F10 세포 내에서도 유의한 수준의 Tyrosinase 활성 억제 효과를 나타내었다(Fig. 4). 이러한 결과는 LFE가 직접적인 Tyrosinase 억제 활성작용을 할 수도 있으며, 세포 내에서 특정 또는 여러 개

의 intracellular signalling pathway를 억제하거나 가속화 작용을 하는 것으로 해석 될 수 있다. 지금까지 알려진 대표적인 Tyrosinase inhibitor로는 Vitamin C, Quercetin 등의 항산화제들이 있다<sup>30)</sup>. 이들 항산화제들은 세포 내에서 뿐만 아니라 시험관 내에서도 직접적인 Tyrosinase의 억제 활성을 가지기 때문에 LFE의 Tyrosinase 활성 억제 기전은 이들과 다른 기전을 통하여 Tyrosinase의 활성을 억제할 것으로 생각된다.

Elastase는 진피 내 피부탄력을 유지하는 기질 단백질인 elastine, fibroectin을 포함한 다양한 단백질을 분해하며, collagen을 분해할 수 있는 비특이적 가수 분해 효소이다. 또한 피부의 주름 및 탄력성 소실 등을 유발하므로 Elastase 활성 검증은 피부의 주름을 개선 하는 효과 평가에 대단히 중요하다고 보고 있다<sup>31)</sup>. 이러한 이유 때문에 최근 Elastase 활성 검증을 통한 피부 주름 개선 효능에 대한 연구가 다수 이루어지고 있다<sup>32)</sup>.

본 연구에서는 몇 가지 Elastase 중 가장 중요한 제 I형과 제 IV형 Elastase에 대하여 LFE의 활성 억제 효과를 관찰한 결과, LFE는 Elastase type I과 IV 모두에서 유의한 저해율을 나타내었고(Fig. 5), B16F10 세포 내에서도 Elastase 활성 저해 효과를 검증한 결과 유의한 결과를 나타내었다(Fig. 6). 이는 LFE가 elastase inhibitor로서 작용할 가능성이 있기에 다른 항산화제들과의 비교연구가 필요할 것으로 생각되며, 후속 연구를 통하여 이를 규명하여야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과, LFE는 Melanin 색소의 생성을 억제하였고, 세포 내에서 효과적으로 Tyrosinase의 활성을 억제하였다. Elastase에 대해서는 제 I형과 IV형 모두 직접적으로 활성을 유의하게 억제하였고, 세포 내에서도 유의하게 억제하여 임상상 LFE가 피부 미백이나 피부 탄력유지에 효과가 있을 것으로 생각된다. 따라서 추후 피부 미백 및 탄력 유지에 대한 연구에 본 연구 결과가 활용 될 수 있을 것으로 생각한다.

## V. 결 론

枸杞子 추출물(LFE)의 피부 미백 및 탄력 유지 효과를 관찰하기 위하여 악성흑색종 세포인 B16F10에 처리하고 증식을 및 Melanin 생성량, Tyrosinase 저해 효과와 Elastase 저해 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LFE가 세포 증식에 미치는 영향은 250  $\mu\text{g/ml}$  이상의 고농도를 처리하였을 때 B16F10 세포의 증식이 유의성 있게 억제되었다.
2. LFE가 Melanin 생성에 미치는 영향은 125  $\mu\text{g/ml}$  이상의 고농도로 처리하였을 때 Melanin의 생성이 유의성 있게 억제되었다.
3. LFE의 Tyrosinase 활성에 미치는 저해율은 시험관 내에서 유의성있게 나타났지만  $\text{IC}_{50}$ 은 구할 수가 없었고, B16F10의 세포 내에서도 유의성 있게 나타났으며,  $\text{IC}_{50}$ 은 456.52  $\mu\text{g/ml}$ 으로 계산되었다.
4. LFE가 Elastase 활성에 미치는 저해율은 시험관 내에서 Elastase type I 및 IV에서 250  $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 유의성 있게 나타났으며,  $\text{IC}_{50}$ 은 각각 399.79  $\mu\text{g/ml}$ 과 771.99  $\mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다.
5. LFE가 Elastase 활성에 미치는 저해율은 B16F10의 세포 내에서 유의성 있게 나타났으며,  $\text{IC}_{50}$ 은 983.05  $\mu\text{g/ml}$ 로 계산되었다.

## 참 고 문 헌

1. Korean Dermatological Association, Text of Dermatology. Seoul:Yeo moon gak, 2001:8-9, 402-12.
2. Lee SY, An JH, Cho HY. Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from Crataegus pinnatifida bunge in fibroblast cell line HS68 cells, J Kor Soc Argic Chem



- Biotechno, 2003;46(1):60-5.
3. The committee for Editing Textbook, Bon cho hak, Soeul:Yeong lim sa, 2004:657-8.
  4. No TH, Composition and effectiveness of Gugija, Cheong-yang Gugija Experiment Station, Chungnam Agricultural Technology Research Institute of Korea, 1999:7-14.
  5. Lee JS, Park YC, Park SW, Lee SS, An YK, Lee JS. Physiological Functionality of Products and an In Vivo Examination on Anti-hypertension Effects. Korean J Food & Nutr, 2008;21(2):115-20.
  6. Lee DK, Gwak DG, Park SD. Antidepressant effect of Licium chinese Mill, and its influence on indoleamine and its metabolite of depression model rats. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription, 2003;11(2): 185-96.
  7. Sin JS, Kim KS, Jeong GH, Jeong CS, Ko KH, Park JH. Antidiabetic Activity of Lycii Fructs. Kor J Pharmacogn, 1997;28(3):138-42.
  8. Kim DH, Lee SY, Kim NG, Yun BG, Jung DS, Choi EY, et al. Moderating Effects of Skin Hyperpigmentation from Lycii fructus and Lycii folium Extracts. J appl Biol Chem, 2011;54(4):270-8.
  9. Kim MH. Effect of Lycii fructus Extracts on Serum Lipids and Bone Collagen Contents in Ovariectomized Rats. Korean J Oriental Physiology & Pathology, 2007;21(1):111-6.
  10. Yoon JE, Kim NK, Hwang CY, Jo EH, Park MC. Experiment study about the effect of several herbs on collagen synthesis. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, 2010;23(3): 34-41.
  11. Mari M, Seiji K, Kenji F, Airo T, Toshimasa N. 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.
  12. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Retinoic Acid. Cancer Res, 1985;45 (4):1474-8.
  13. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. Planta Medica, 1986;3981:517-9.
  14. Jergil B, Lindbladh C, Rorsman H, Rosengren E. Dopa oxidation and tyrosine oxygenation by human melanoma tyrosinase. Acta Derm Venereol, 1983;63(6):468-75.
  15. James AEK, Timothy DW, Gorden L. Inhibition of human leukocyte and porcine pancreatic elastase by homologues of bovine pancreatic tyrosinase inhibitors. Bio-chemistry, 1996;35:9090-6.
  16. Do EJ, Lee JS, Park HJ, Ha DI, Kim YC, Kim MR. The Efficacy of Ampule Containing Herbal Extract for Improving Skin Wrinkles in Women. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription, 2009;17(2):111-21.
  17. Park JM, Kim KJ. The Anti-wrinkle Effects and Whitening Effects of Galla Rhois. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, 2010;23(1): 135-48.
  18. Hwang-bo M, Roh SS, Seo HS. Effects of Dendrobii herba and Punica granatum Extract on the Anti-oxidant, Anti-inflammatory, Anti-wrinkle and Whitening. The Journal of

- Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2010;23(3):11-32.
19. Kim CH, Jung HA, Roh SS, Hong SH. Effects of Aloe and Viola herba Extract on the Anti-oxidant, Anti-inflammatory, Anti-wrinkle and Whitening. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2010;23(1):23-43.
  20. Lee JC, Park SY, Kim JH. Effects of Paeoniae radix alba(PRA) on Skin whitening and Elasticity using Melanoma. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2012;25(1):1-11.
  21. Park HS. Effects of Ga-miguibitang on Skin whitening and Elasticity using Melanoma. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2004;17(2):48-58.
  22. Lee SE. Effects of Ga-mibangpungtongsung-san on Skin whitening and Elasticity using Melanoma. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2004;17(1):94-103.
  23. Kim JK, Yu DR. The Effect of Yukmijihwangtang-gagambang (YMG) on Melanin Synthesis and Gene Expression. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2009; 22(3):66-82.
  24. Kim SM, Yu DR. The Effect of Mibaeksan (MB) on Melanin Synthesis and Gene Expression. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2009;22(4):1-8.
  25. Yun CG, Jeon TA, Oh MJ, Lee GH, Jeong JH. Effect of the ethanol of Lycium chinese on the oxygen free radical and alcohol metabolizing enzymes activities in rats. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2000;29:268-73.
  26. Lee JH, Shin DY, Choi YH, Jeong KT, Kang BW, Jeong ST, et al. Effect of Aqueous Extract from Asiasari Radix on  $\alpha$ -melanocyte Stimulating Hormone Induced Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2008;22(3):649-53.
  27. Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Saka C, Kondoh S, Nishiyama S, et al. 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.
  28. Ikeda T, Tsutsumi T. Function and skin depigmental activity of crude drugs. Fragrance J. 1990;6:56.
  29. Qui F, Komatsu KL, Satio KI, Kawasaki K, Yao K, Kano Y. Pharmacological properties of traditional medicines. XXII. Pharmacokinetic study of mulberroside A and its metabolites in rat. Biol Pharm Bull. 1996;19(11):1463-7.
  30. 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.
  31. Jo EA, Jo EH, Choi SJ, Park KH, Kim SY, Jeong YJ, et al. Screening of Anti-wrinkle Resource from Herbal Medicinal Extracts and Stability Test of Its Cosmetic Products. Korean J Medicinal Crop Sci. 2011;19(2):126-35.
  32. Jeong HR, Jo YN, Jeong JH, Jing DE, Song BG, Heo HJ. Whitening and Anti-wrinkle Effects of Apple Extracts. The Korean Society of Food Preservation. 2011;18(4):597-603.