

Original Article / 원저

희침 추출물이 B16F10 세포에서 Melanin 생성과 Tyrosinase 활성에 미치는 억제효과

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

Inhibitory Effects of Siegesbeckia Herba Extracts on the Melanin Production and Tyrosinase Activity in B16F10 cells

Ji-Soo Kim · Min-Young Jeong · Jong-Han Kim · Jeong-Hwa Choi · Soo-Yeon Park

Department of Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, College of Korean medicine, Dong-Shin University

Abstract

Objective : Siegesbeckia Herba can treat various skin disease by expelling wind and removing dampness and clearing away heat and toxic material effects. This study was designed to investigate effects of Siegesbeckia Herba Extracts(SHE) on skin elasticity and whitening using B16F10 cell lines.

Method : In this experiment, We observed effect of SHE on cell viability, inhibition of melanin synthesis and inhibitory effect on tyrosinase and elastase.

- Results** : 1. SHE treated group showed decreased cell viability rates significantly compared with non-treated group. More than SHE 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ and 1,000 $\mu\text{g/ml}$ of treated groups were lower levels of melanin synthesis respectively.
2. SHE significantly showed tyrosinase inhibitory activity *in vitro*, SHE increased tyrosinase inhibitory activity and elastase inhibitory activity in B16F10 cells, and tyrosinase inhibitory activity *in vitro*.
3. Tyrosinase inhibitory activity and elastase inhibitory activity in B16F10 cells, tyrosinase inhibitory activity *in vitro* were not accepted statistical significance compared with non-treated group.
4. SHE treated group showed increased SOD-like activity rates significantly compared with non-treated group. More than SHE 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ and 1,000 $\mu\text{g/ml}$ of treated groups were lower levels of melanin synthesis respectively.

© 2015 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Conclusion : These results suggest that SHE can inhibit melanin synthesis and tyrosinase inhibitory activity. So, We suggest that SHE can be maintained skin whitening.

Key words : Siegesbeckia Herba; Melanin; Tyrosinase; B16F10 cell; SOD-like activity

I. 서 론

피부는 인체의 가장 겉면에 존재하며 끊임없이 재생되고, 인체를 외부환경에서 보호하며, 내부 장기의 기능을 정상적으로 유지하게 한다¹⁾. 피부는 해부학적으로 외부와의 경계부에 위치하여 개체에 손상을 줄 수 있는 미생물, 화학물질 뿐만 아니라 열, 한랭, 자외선 및 기계적 자극과 같은 물리적 인자들에 항상 노출되어 있다. 이러한 여러 자극에 의해 착색, 탄력의 저하, 주름 형성 등 일반적으로 피부 노화라고 부르는 현상이 가속화 될 수 있다²⁾.

피부미용은 우리의 일상생활과 깊은 관계를 갖고 있고, 많은 사람들이 관심을 갖는 보편화된 분야라고 할 수 있으며, 과학이 더욱 발전함에 따라 미백, 노화 등의 의학적인 면이 피부미용의 목적에 더해지고 있다³⁾. 한의학에서도 미백 및 주름에 대한 단미제⁴⁻⁸⁾와 복합제제⁹⁻¹¹⁾에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

豨薟草(*Siegesbeckia Herba*)은 去風濕, 通經絡, 清熱解毒하는 효능이 있고¹²⁾, 선행연구로는 혈전형성억제 효과¹³⁾, 혈관이완 효과, 항산화 효과¹⁴⁾, 신생혈관 억제를 통한 항비만 효과¹⁵⁾, 식중독 유발세균 억제 효과¹⁶⁾, 퇴행성 관절염에서의 연골보호 효과¹⁷⁾ 등이 알려져 있으며, 특히 희침은 reactive oxygen radical이 유도하는 oxidative stress와 상관관계가 있다고 밝혀져 있어¹⁴⁾ 피부의 항노화에 효과가 있을 것으로 기대되지만 이에 대한 직접적인 연구는 접하지 못했다.

이에 저자는 피부미백과 탄력에 미치는 희침의 효과를 알아보고자 악성 흑색종 세포주의 세포 생존을

에 미치는 효과, melanin 생성 및 그에 관여하는 tyrosinase 억제 활성 효과 그리고 그에 관련된 Superoxide dismutase(SOD) 유사활성, elastase 억제 활성 효과 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 연구에 활용된 희침(*Siegesbeckia Herba*, SH)¹²⁾은 국화과에 속한 일년생 초본인 진득찰(*Siegesbeckia glabrescens* Makino), 털진득찰(*S. pubescens* Makino) 및 제주진득찰(*S. orientalis* L.)의 地上部 全草를 건조한 것으로 여름과 가을철에 꽃이 피기 전 및 꽃이 핀 시기에 채취하여 정선하고 九蒸九曝한 것을 동신대학교 부속 순천한방병원에서 구입한 후 동신대학교 본초학교실에서 검수를 받아 사용하였다.

2) 세포주

인간 유래 악성 흑색종(melanoma) 세포주인 B16F10 cell lines은 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

희침 100 g을 증류수 1,500 ml과 함께 100℃에서 2 시간 동안 물로 전탕한 다음 3,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하고 상층액을 얻은

Corresponding Author : Soo-Yeon Park,
Dong-shin University Oriental Medical Hospital, 331,
Isu-ro, Suncheon-si, Jeollanam-do, Korea
(Tel : 061-729-7122, E-mail : swallow92@hanmail.net)
• Recieved 2015/1/12 • Revised 2015/1/29 • Accepted 2015/2/5

후 동결건조기(삼원, 한국)를 이용하여 동결건조 분말 (Siegesbeckia Herba Extracts, SHE) 8.53 g을 얻었다. 연구에 사용하기 위한 SHE는 인산 완충액 (phosphate buffered saline, PBS)에 다시 녹여 0.22 μm 의 필터(Syringe filter, Whatman)로 걸러 멸균을 대신하였다.

2) 세포 배양

B16F10 세포의 생육 배지로는 RPMI 1640(Sigma, R4130)을 이용하였고, 배지에는 10% fetal bovine serum(Gibco LOT, NO. 1006842, FBS)와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)을 첨가하였으며, 실험기간 동안 세포주는 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

3) 세포 생존율 측정

SHE가 B16F10 세포에 미치는 증식율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) assay¹⁸⁾를 통해 측정하였다. 즉, B16F10 세포를 배양하여 96 well plate에 각 well당 5×10^4 cell/ml의 농도로 분주하고, 5% CO₂ incubator에서 37°C를 유지하면서 24 시간 동안 pre-incubation시킨 후 SHE를 각 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 다음 24 시간 배양하였다. 그 후 MTT 시약을 처리한 다음 MTT 시약이 생존 세포의 효소작용에 의해 환원되도록 2~4 시간을 배양한 다음 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan 결정을 DMSO를 넣어 녹인 후 Microplate Reader(Bio-rad, USA)를 이용하여 475 nm에서 측정하였다.

4) Melanin 생성 억제율 측정

SHE가 melanin 생성에 미치는 영향은 Hosei 등¹⁹⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, B16F10 세포를 배양하여 24 well plate에 각 well당 5×10^4 cell/well의 농도로 분주하고, 부착 및 안정화를 위하여 24 시

간을 배양하였다. 배양이 끝난 다음 α -MSH(α -melanocyte stimulating hormone) 100 nM과 SHE를 각 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리한 다음 5% CO₂ incubator에서 37°C를 유지하면서 24~48 시간 배양하였다. 배양한 후 각 well를 PBS로 세척한 다음 1 N NaOH 용액 1 ml을 첨가하고 60°C에서 3 시간 동안 용해시킨 후 Microplate Reader(Bio-rad, USA)를 이용하여 475 nm에서 측정하였다.

5) 비세포의 tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 억제 효과는 dopachrome 방법²⁰⁾을 이용하여 측정하였다. 0.2M potassium phosphate buffer(pH 6.5) 2.3 ml와 2 mM L-tyrosine 용액 0.4 ml을 가한 후 감쪽지 극성 용매별 분획물 15 mg을 DMSO 2 ml에 녹인 후 SHE 최종농도가 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 0.2 ml를 가하고, mushroom tyrosinase(110 unit/ml) 0.1 ml를 첨가하여 37°C 수욕상에서 20 분간 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해 비율은 다음과 같이 계산하였다.

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

여기서 A는 효소만 첨가된 반응용액, B는 효소와 시료가 모두 첨가된 반응 용액, C는 시료만 첨가된 반응 용액, D는 효소와 시료가 모두 첨가되지 않은 반응 용액의 475 nm에서의 흡광도 값이다.

6) 세포 내 tyrosinase 저해 활성 측정

B16F10 세포를 배양하여 24 well plate에 각 well당 1×10^5 cell/well의 농도로 분주한 후, 부착 및 안정화를 위해 24 시간 방치한 다음 SHE를 각 농도별 (62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 후 5% CO₂ incubator에서 37°C를 유지하면서 24 시간 배양하였다. 24 시간 배양 후, 세포를 1% Triton X-100을 함유한 10 mM PBS 100 μl 에 현탁시켰다. 현탁된

세포를 vortexing한 후 1000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 상층액을 활성 측정 효소액으로 이용하였다. Tyrosinase 저해 활성을 측정하기 위하여 96 well plate에 효소액 100 μ l를 넣고, 기질인 L-DOPA (2 mg/ml) 200 μ l를 첨가한 후, 5% CO₂ incubator에서 37 $^{\circ}$ C를 유지하면서 1 시간 동안 반응을 진행시킨 다음 Microplate Reader (Bio-rad, USA)를 이용하여 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase의 활성 저해율은 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 계산하였다²¹⁾.

7) 비세포의 elastase 저해 활성 측정

Elastase 저해 효과는 Lyu 등의 방법²²⁾을 이용하여 측정하였다. 0.05 M Tris-Hcl buffer(pH 8.0) 2.3 ml와 0.2 mM N-succinyl-Ala-p-nitroanilide 기질 용액 0.4 ml을 가한 후 감쪽지 극성 용매별 분획물 15 mg을 DMSO 2 ml에 녹인 후 SHE 최종농도가 0, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μ g/ml가 되도록 0.2 ml를 가하고 기질의 활성화를 위해 25 $^{\circ}$ C 수욕상에서 20 분간 배양시켰다. 반응액에 porcine pancreatic elastase(0.5 unit/ml) 0.1 ml를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C 수욕상에서 20 분간 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해 비율은 다음과 같이 계산하였다.

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

여기서 A는 효소만 첨가된 반응용액, B는 효소와 시료가 모두 첨가된 반응 용액, C는 시료만 첨가된 반응 용액, D는 효소와 시료가 모두 첨가되지 않은 반응 용액의 475 nm에서의 흡광도 값이다.

8) 세포 내 elastase 저해 활성 측정

B16F10 세포를 배양하여 24 well plate에 각 well 당 1×10^5 cell/well의 농도로 분주한 후, 부착 및 안정화를 위해 24 시간 방치한 다음 SHE를 각 농도별 (62.5 μ g/ml, 250 μ g/ml, 1,000 μ g/ml)로 처리한 후 5% CO₂ incubator에서 37 $^{\circ}$ C를 유지하면서 24 시간 배양하였다. 24 시간 배양 후, 세포를 1% Triton X-100

을 함유한 10 mM PBS 100 μ l에 현탁시켰다. 현탁된 세포를 vortexing한 후 1,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 상층액을 활성 측정 효소액으로 이용하였다. 0.2 M의 Tris-Hcl(Sigma, USA) buffer를 pH 8.0로 만든 후, 600 μ l을 tube에 옮긴 다음 3.3 mM로 희석한 N-Succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide 180 μ l을 첨가하였다. 이 후 활성 측정 효소액 40 μ l를 넣어주고, 실온에 10 분간 방치하였다. 이후 p-nitroanilide의 생성량을 Microplate Reader(Bio-rad, USA)를 이용하여 475 nm에서 측정하였다²³⁾ Elastase의 활성 저해율은 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 계산하였다.

9) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SHE의 SOD 유사활성은 Marklund와 Marklund의 방법²⁴⁾에 따라 활성 산소종을 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성으로 나타내었다. 각 희석 추출물의 농도(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 μ g/ml)를 DMSO에 녹여 농도별로 희석하여, 10 μ l씩 96 well plate에 첨가한 후, Tris-HCl Buffer(50 mM Tris aminomethane, 10 mM EDTA, pH 8.0) 150 μ l과 7.2 mM pyrogallol 10 μ l을 첨가하여, 실온에서 10 분간 반응시키고, 1N HCl 50 μ l을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 ELIZA reader를 사용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 추출물 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{SODA(\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A: 추출물 첨가군의 흡광도, B: 추출물 무첨가군의 흡광도

3. 통계처리

수집된 데이터의 통계처리 방법으로는 SPSS 12 (SPSS, U.S.A.)를 활용하였다. 군이 3개 이상인 것은 ANOVA로 통계적으로 유의한 경우 사후검정은 Tukey 방법을 시행하였고, 2개의 군간의 비교는

independent sample t-test를 사용하였으며, p-value 가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 인정하였다.

III. 성적

1. 세포 생존율에 미치는 효과

SHE가 B16F10 세포의 생존율에 미치는 효과를 알아보기 위하여 SHE를 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 다음 24 시간 배양하였다.

B16F10 세포의 생존율을 측정된 결과, SHE를 처리하지 않은 증식율을 100.00 \pm 0.79%로 환산하였을 때, SHE를 처리한 각 농도에서 생존율을 억제하는 경향을 보였고, 그 중에서도 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ 과 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 처리군에서 각각 89.34 \pm 3.09%, 85.46 \pm 2.90% 그리고 81.49 \pm 2.50%로 SHE를 처리하지 않은 무첨가군의 증식율보다 유의성 (p < 0.05) 있게 감소하였다(Fig. 1).

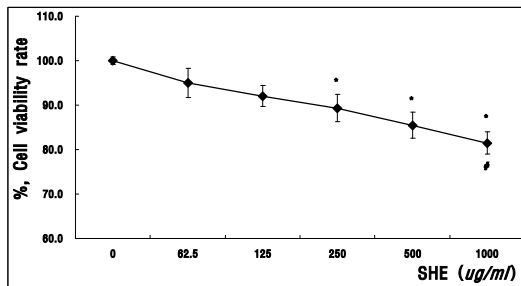


Fig. 1. Effects of SHE on cell viability in B16F10 cells. SHE was Siegesbeckia Herba Extracts freeze dried powder, B16F10 cells were attached 96 well plate, and added SHE as indicated concentrations respectively. After 24 hrs incubation, production levels of melanin were measured using MIT methods. Result are presented as mean \pm SD.
* p < 0.05 vs. non-treated group(0 $\mu\text{g/ml}$) (n=8).
p < 0.05 vs. treated group(62.5 $\mu\text{g/ml}$) (n=8).

2. Melanin 생성에 미치는 억제 효과

SHE가 B16F10 세포를 이용한 melanin 생성에 미치는 억제 효과를 알아보기 위하여 B16F10 세포에

SHE를 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 다음 24 시간 배양하였다.

SHE를 처리하지 않았을 때의 melanin 생성량을 100.00 \pm 4.93%로 환산하였을 때, SHE를 처리한 각 농도에서 melanin 생성을 억제하는 경향을 보였고, 그 중에서도 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ 과 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 처리군에서 각각 79.57 \pm 2.16%(p < 0.01), 76.26 \pm 2.76%(p < 0.001) 그리고 72.73 \pm 1.82% (p < 0.001)로 SHE를 처리하지 않은 무첨가군의 melanin 생성을 보다 유의성 있게 억제되었다(Fig. 2).

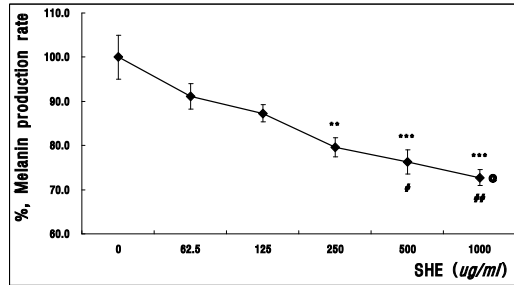


Fig. 2. Inhibitory effects of SHE on α -MSH induced melanin production in B16F10 cells.

SHE was Siegesbeckia Herba Extracts freeze dried powder, B16F10 cells were added SHE as indicated concentrations respectively. After 24 hrs incubation, proliferation rates were measured using colorimetric methods. Result are presented as mean \pm SD.
** ; p < 0.01, *** ; p < 0.001 vs. non-treated group(0 $\mu\text{g/ml}$) (n=4).
; p < 0.05, ## ; p < 0.01 vs. treated group(62.5 $\mu\text{g/ml}$) (n=4).
@ ; p < 0.05 vs. treated group(125 $\mu\text{g/ml}$) (n=4).

3. 비세포의 tyrosinase 저해 활성

SHE가 tyrosinase 저해 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 SHE를 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하였다.

SHE를 처리하지 않았을 때의 tyrosinase 저해 활성을 100.00 \pm 2.62%라 하였을 때, 비세포에서의 tyrosinase 저해 활성율은 SHE 투여 농도에 의존하여 각각 증가하였다. 그 중에서도 500 $\mu\text{g/ml}$ 과 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 처리군에서 각각 120.45 \pm 5.72%(p < 0.05)와 125.00 \pm 2.27%(p < 0.01)로 SHE를 처리하지 않은

무침가군의 tyrosinase 저해 활성율보다 유의성 있게 증가하였다(Fig. 3).

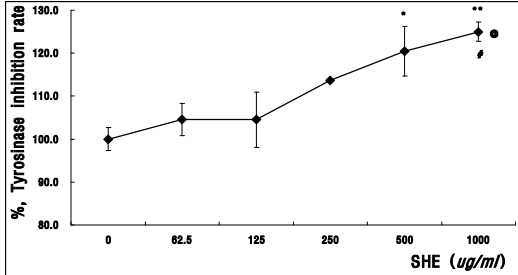


Fig. 3. Tyrosinase inhibitory activity of SHE *in vitro*.

SHE was Siegesbeckia Herba Extracts freeze dried powder, 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 ug/ml) (n=4).

; p<0,05 vs. treated group(62.5 ug/ml) (n=4).

@ ; p<0,05 vs. treated group(125 ug/ml) (n=4).

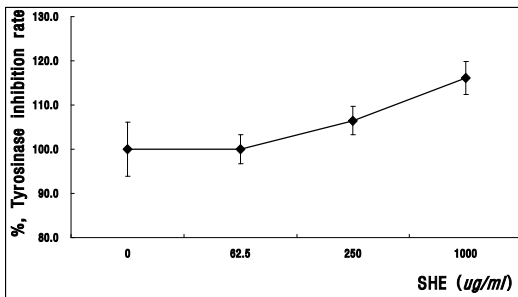


Fig. 4. Tyrosinase inhibitory activity of SHE in B16F10 cells.

SHE was Siegesbeckia Herba Extracts freeze dried powder, B16F10 cells were incubated with SHE 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.

4. 세포 내 tyrosinase 저해 활성

SHE가 tyrosinase 저해 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 B16F10 세포에 SHE를 농도별(0, 62.5, 250, 1,000 ug/ml)로 처리하였다

SHE를 처리하지 않았을 때의 tyrosinase의 저해

활성율을 100.00±6.18%라 하였을 때, SHE를 처리한 처리군의 tyrosinase 저해 활성율은 SHE 투여 농도에 의존하여 각각 증가하였다(Fig. 4).

5. 비세포의 elastase 저해 활성

SHE가 elastase 저해 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 SHE를 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 ug/ml)로 처리하였다.

SHE 추출물을 처리하지 않았을 때의 elastase 저해 활성율을 100.00±4.23%라 하였을 때, SHE를 처리한 처리군의 elastase 저해 활성율은 SHE 투여 농도에 의존하여 각각 증가하였다(Fig. 5).

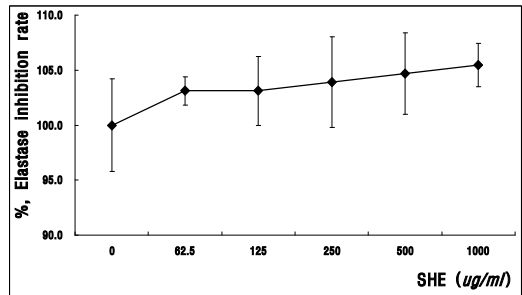


Fig. 5. Elastase inhibitory activity of SHE *in vitro*.

SHE was Siegesbeckia Herba Extracts freeze dried powder, SHE was added into elastase in indicated concentrations. Inhibition rates of elastase by SHE were measured as production of p-nitroanilide using Microplate Reader at 475 nm wavelength. Optical densities were calculated indicated formula as described in materials and methods.

Result are presented as mean±SD.

6. 세포 내 elastase 저해 활성

SHE가 elastase 저해 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 B16F10 세포에 SHE를 농도별(0, 62.5, 250, 1,000 ug/ml)로 처리하였다.

SHE 추출물을 처리하지 않았을 때의 elastase 저해 활성율을 100.00±2.97%라 하였을 때, SHE를 처리한 처리군의 elastase 저해 활성율은 SHE 투여 농도에 의존하여 각각 증가하였다 (Fig. 6).

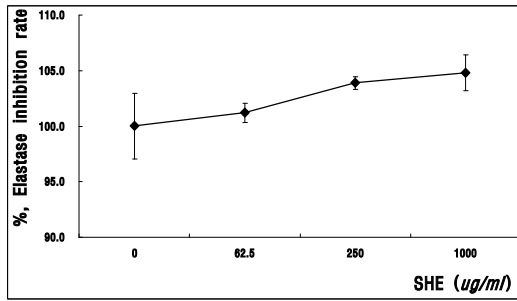


Fig. 6. Elastase inhibitory activity of SHE in B16F10 cells.

SHE was Siegesbeckia Herba Extracts freeze dried powder, B16F10 cells were incubated with SHE 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±SD.

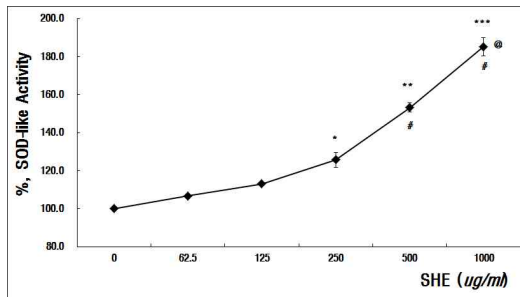


Fig. 7. Superoxide dismutase-like activity of SHE in *in vitro*

SHE was Siegesbeckia Herba Extracts freeze dried powder, SHE was added into SOD-like activity in indicated concentrations. SOD-like activity rates by SHE were measured as production of p-nitroanilide using Microplate Reader at 475 nm wavelength. Optical densities were calculated indicated formular as described in materials and methods.

Result are presented as mean±SD.

Result are presented as mean±SD.

* ; p<0.05, ** ; p<0.01, *** ; p<0.001 vs. non-treated group(0 ug/ml) (n=8).

; p<0.05 vs. treated group(62.5 ug/ml) (n=8).

@ ; p<0.05 vs. treated group(125 ug/ml) (n=8).

7. SOD 유사활성

SHE가 SOD 유사 활성화에 미치는 저해 효과를 알아보기 위하여 SHE를 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 ug/ml)로 처리하였다.

SHE 추출물을 처리하지 않았을 때의 SOD 유사활성율을 100.00±1.16%라 하였을 때, SHE를 처리한 처리군의 SOD 유사활성율은 SHE 투여 농도에 의존하여 각각 증가하였고, 그 중에서도 250 ug/ml, 500 ug/ml과 1,000 ug/ml를 처리한 처리군에서 각각 125.62±3.94%(p<0.05), 153.13±2.42%(p<0.01) 그리고 185.12±4.71%(p<0.001)로 SHE를 처리하지 않은 무첨가군의 SOD 유사활성도보다 유의성 있게 증가하였다(Fig. 7).

IV. 고찰

피부는 인체를 보호하고, 체온을 조절하며, 감각을 느끼는 기능 뿐만 아니라 미적인 기능도 담당하고 있으며²⁵⁾, 바깥쪽으로부터 표피, 진피, 및 피하지방층의 독특한 3개의 층으로 구성되어 있다²⁶⁾.

표피는 각질형성 세포와 수상돌기세포로 이루어져 있고 후자는 다시 멜라닌세포(melanocyte), 랑게르한스세포(Langerhans cell), 메켈세포(Meckel cell), 중간세포(intermediate)로 구성된다. 멜라닌 세포의 멜라닌 소체(melanosome)는 tyrosinase를 포함하고 있어서 tyrosine에서 melanin을 합성한다. 멜라닌 소체의 수, 크기, 멜라닌화의 정도, 멜라닌 소체의 분포, 분해에 의해 피부색이 결정 된다²⁷⁾. 따라서 피부의 미백 효과를 확인하기 위해서는 tyrosine에서 melanin으로의 합성 억제 여부를 확인할 필요가 있다.

또한 피부 진피의 결합조직에는 collagen fiber와 elastic fiber가 존재하여 피부에 장력과 탄력성을 제공해 준다. 노화가 진행되면 collagen fiber가 파괴되고 elastic fiber의 스프링 구조가 느슨해져 쉽게 처지고 주름이 생긴다²⁷⁾. 따라서 노화를 방지하기 위해서는 elastic fiber 구조를 느슨하게 만드는 elastase의 활성 억제 여부를 확인할 필요가 있다.

본 연구에 사용된 희침(SH)은性は寒하고味는苦하다.肝과腎으로 들어가며祛風濕,通經絡,利關節,

清熱解毒의 효능이 있다. 희침은 生用하면 風痒을 없애므로 痺痛의 濕熱로 인한 證과 風疹, 濕痒 등에 적용하고, 熟用하면 性이 溫하여 風濕을 去하는 가운데 肝腎을 補하여 筋骨을 강하게 하는 효능이 있다¹²⁾.

《唐本草》에 의하면 '통증을 완화시키며 지혈하고 새살이 돌아나게 하며 여러 가지 악성 종기를 제거하고 부종을 제거하는데 짓뭇어 붙인다. 달인 물에 담그거나 산제를 붙이면 모두 좋다.'라고 하였고 《本草拾遺》《開寶本草》에 의하면 거미, 벌, 개 등에 물린 상처에 외용약으로 사용한다고 하였으므로 예전부터 피부질환에 외용약으로 활용하였음을 알 수 있다²⁸⁾.

희침에서 분리되는 대표적인 성분으로는 darutin-bitter가 있으며 그 외에도 alkaloid, kirenol 및 각종 ester들이 함유되어 있다. 최근의 연구에 의하면 혈압을 降下하고 食物中에 脂質類의 흡수를 저지하므로 고혈압과 관상동맥경화로 인한 심장질환을 치료한다고 하였고¹²⁾, 항산화작용을 통해 reactive oxygen radical에 의한 혈관내피세포 손상에 대하여 혈관보호의 특성을 나타내었다¹⁴⁾. 또한 신생혈관억제 작용을 통한 항비만 효과¹⁵⁾, 퇴행성관절염 예방 효과¹⁶⁾, 식중독 유발세균의 생육억제효과¹⁷⁾가 확인된 연구 결과도 있었다.

이러한 선행 연구들을 봤을 때, SH는 피부와 관련된 연구가 진행된 적은 없지만 free radical을 소거하는 항산화 능력이 있으며, 風濕을 제거하고 염증과 搔痒症 등에 사용이 가능하며 九蒸九曝했을 때 조식을 강화하는 효능도 있으므로 피부의 노화 작용에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 기대하고 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 B16F10 세포를 이용하여 SHE가 세포 생존율에 미치는 효과, melanin 생성 억제 효과, melanin 생성에 관련된 tyrosinase 저해 활성 효과와 그에 관련된 기전으로 SOD 유사활성 효과를 관찰하여 피부 미백의 효과를 가지는지, 피부탄력 및 주름살 제거에 관여하는 elastin을 억제하는 elastase의 저해 활성 효과를 가져올 수 있는지를 관찰하였다.

본 연구에서 SHE가 B16F10 세포의 생존율에 미치

는 효과를 측정된 결과, SHE 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ 과 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였을 때의 세포 생존율이 각각 SHE를 처리하지 않았을 때보다 최고 20% 정도 유의성 있게 감소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

사람의 피부색은 hemoglobin, carotene, melanin 등에 의해서 결정되며, 이중 melanin이 가장 중요한 인자이다²⁹⁾. Melanogenesis는 dark macromolecular pigments의 일종인 melanin을 형성하는 전체적인 과정을 말하며, tyrosinase가 tyrosine을 dopaquinone으로 산화시키면서 그 반응이 시작된다³⁰⁾. 만약 미백 효과를 위해 melanin의 합성을 억제하려고 한다면 tyrosine을 산화시키는 tyrosinase의 합성을 저해하거나 그 활성을 억제시키면 된다³¹⁾.

본 연구 결과 melanin 생성 억제에 미치는 효과를 측정된 결과에서도 SHE 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ 과 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였을 때 SHE를 처리하지 않았을 때보다 최고 30% 가까이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2). SHE에 의한 B16F10 세포의 생존율이 20% 가량 감소하였고, melanin 생성도 같은 농도에서 30%가량 억제된 것으로 나타나는 것으로 보아 저자는 SHE가 단순히 세포의 개체 수 감소로 인한 melanin 억제뿐만 아니라 melanin 생성에 관여하는 것으로 해석했다.

Tyrosinase는 melanin 합성의 속도결정단계인 초기 반응에 작용하는 효소로서, tyrosine을 3,4-dihydroxyphenyl alanine (DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPA quinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 지닌다³²⁾. 지금까지 알려진 tyrosinase 저해제로는 hydroquinone, resorcinol, 4-hydroxy-anisole, ascorbic acid와 그 유도체 kojic acid, arbutin, glucosamine, α -viniferin, feulic acid 등이 있다^{33,34)}.

Melanin 생성 저해가 tyrosinase와 관련이 있는지 알아보기 위하여 SHE가 비세포의 tyrosinase 억제 활성에 미치는 효과를 측정된 결과 투여 농도에 의존하여 억제 활성이 증가하였다. 특히 SHE 500 $\mu\text{g/ml}$ 과

1,000 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였을 때의 tyrosinase의 억제 활성이 SHE를 처리하지 않았을 때보다 유의성 있게 증가하였고(Fig. 3), B16F10 세포에 SHE를 처리하였을 때도 처리 농도에 따라 tyrosinase의 억제 활성이 증가하였다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 SHE가 직접적인 tyrosinase 억제 활성작용을 할 수도 있으며, 세포 내에서도 특정 또는 여러 개의 intracellular signalling pathway를 억제하거나 가속화 작용을 하는 것으로 해석하였다. 지금까지 알려진 대표적인 Tyrosinase inhibitor로는 Vitamin C, Quercetin 등의 항산화제들이 있다³⁵⁾. 이들 항산화제들도 세포 내에서 뿐만 아니라 시험관 내에서도 직접적인 Tyrosinase의 억제 활성을 가진다. 따라서 SHE도 비슷한 기전을 통하여 tyrosinase의 활성을 억제 시킬 가능성이 있다고 생각된다.

Elastase는 elastin을 분해하는 효소³⁶⁾로 피부 주름 억제, 피부 탄력 유지에 중요한 요소인 콜라겐을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이기도 하다³⁷⁾. 최근 연구에서는 섬유아세포에서 유래한 Elastase가 피부 탄성섬유의 3차원적 뒤틀림에 중요한 역할을 한다고 보고 되고 있으며, 이러한 Elastase의 활성 증가는 피부의 탄력섬유를 감소시킴으로써 피부 주름 형성에 기여한다고 알려져 있다³⁸⁾. 이러한 이유 때문에 Elastase 활성 검증을 통한 피부 미백 및 주름 개선 효능에 관련된 연구가 이루어지고 있다³⁹⁾.

SHE가 elastase 저해 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 비세포와 B16F10 세포 내에서 elastase에 대한 저해 활성을 측정한 결과, SHE 처리 농도에 의존하여 증가하는 경향을 나타내었지만(Fig. 5,6) SHE를 처리하지 않았을 때보다 약간 증가하였을 뿐 유의성은 인정되지 않았다. 그리하여 SHE가 피부탄력 및 주름개선에는 관여하지 않는 것으로 생각된다.

SHE가 미백 및 피부노화 개선에 관여하는지 추가로 확인하기 위해 기존의 연구 중에서 희침이 reactive oxygen radical이 유도하는 oxidative stress와 상관관계가 있다⁴⁾는 결과에 착안해 항산화 효능

을 알아보았다. 생체에서 생성되는 유해활성산소는 세포나 조직에 손상을 가해 전반적인 노화와 밀접한 관련을 가진다⁴⁰⁾. 그러나 생체는 Superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-px), CoQ10 같은 항산화효소계와 tocopherol, ascorbic acid, propyl gallate, selenium, chlorophyll, Vitamin C, Quercetin 등과 같은 비효소적 항산화계가 존재하여 활성산소를 생체로부터 소거한다⁴¹⁻⁴³⁾.

Tyrosinase는 자연계에 널리 분포하는 효소로 polyphenol oxidase이며, 생체내에서 주요한 산화 촉매 효소라고 볼 수 있는데 이 산화과정을 촉매하는 기능 때문에 melanin을 합성하는데 매우 중요한 역할을 하게 된다⁴⁴⁾. 그러므로 산화적 스트레스는 Melanin을 합성하는 단계에서 산화 효소인 tyrosinase 활성에도 영향을 줄 수 있으므로 항산화효소의 활성을 통해 tyrosinase의 활성 억제를 연관지어 생각해 볼 수 있다.

이에 따라 SHE의 SOD 유사활성을 측정한 결과 투여농도에 의존하여 유사활성도가 유의성 있게 증가하였다(Fig. 7). 이는 SHE가 피부탄력 등에는 관여하지 않지만 SOD 활성을 통해 tyrosinase의 활성을 억제하고, 이로써 Melanin의 생성이 억제되어 미백효과가 있는 것으로 생각되었다.

이상의 연구 결과, SHE는 비세포 뿐 아니라 세포 내에서도 tyrosinase의 활성을 저해함으로써 Melanin 생성을 억제하는 것으로 미백효과가 있음이 확인되었다. 이에 저지는 향후 희침에 관한 다양하고 심도 깊은 연구를 통해 희침의 피부 미백에 대한 활용 방안을 다방면으로 확인해 보고, 임상에서도 이를 적용해서 활용하면 좋은 성과가 있으리라 생각한다.

V. 결론

희침 추출물(Siegesbeckia Herba Extracts, SHE)

이 B16F10 세포의 생존율, Melanin 생성 억제, tyrosinase의 저해 활성, elastase 활성 억제에 미치는 효과와 SOD 유사활성에 미치는 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 회침 추출물(SHE) 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ 과 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때, B16F10 세포의 생존율은 유의성 있게 억제되었다.
2. 회침 추출물(SHE) 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ 과 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때, melanin 생성은 유의성 있게 억제되었다.
3. 회침 추출물(SHE) 500 $\mu\text{g/ml}$ 과 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때, 비세포의 tyrosinase 억제 활성은 유의성 있게 증가하였고, 세포 내에서도 증가하였다.
4. 회침 추출물(SHE)을 처리하였을 때, 비세포와 세포 내 elastase 억제 활성은 증가하였지만 유의성은 없었다.
5. 회침 추출물(SHE) 500 $\mu\text{g/ml}$ 과 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때, 비세포의 SOD 유사활성도는 유의성 있게 증가하였다.

References

1. Jeong JY. Medical skin care. Seoul:MDworld, 2010:27-9.
2. KDA Textbook editing board, Dermatology 5th edition, Seoul:Ryo Moon Gak, 2008:64, 623-9
3. LG Household & HealthCare Lab, ESTHETIC, Daejeon:LG Household & HealthCare, 2001: 33-42,105-61,235-41.
4. Lee JC, Park SY, Choi JH, Kim JH. Effects of Paeoniae radix alba(PRA) on Skin whitening and Elasticity using Melanoma cells, J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2012;25(1):1-11.
5. Choi JH, Choi JH, Park SY, Kim JH, Jeong MY. Effects of Lycii Fructus Extracts(LFE) on Skin whitening and Elasticity using Melanoma cells, J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2014;27(1):58-67.
6. 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, J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2010;23(3): 11-32.
7. Park JM, Kim KJ. The Anti-wrinkle Effects and Whitening Effect of Galla Rhois, J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2010;23(1):135-48.
8. Kim CH, Jung HA, Roh SS, Hong SH. Effects of Aloe and Viola herba Extracts on the Anti-oxidant, Anti-inflammatory, Anti-wrinkle and Whitening, J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2010;23(1):23-43.
9. Kim JK, Yu DR. The Effects of Yukmiji-hwangtang-gagambang on Melanin Synthesis and Expression, The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology, 2009;22(3):66-82.
10. Park HS. Effects of Ga-miguibitang on Skin whitening and Elasticity using Melanoma, J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2004;17(2):48-58.
11. Lee SE. Effects of Ga-mibangpungtongsung-san on Skin whitening and Elasticity using Melanoma, J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2004;17(1):94-103.
12. The committee for Editing Textbook, Bon cho hak, Seoul:Yeong lim sa, 2011:321-2.
13. Soh KS. An Experimental Study On the Effect

- of Herbal *Segesbeckia* on the Intravascular Coagulation Induced by Endotoxin Rats. The Journal of Oriental Preventive Medicine, 1998;2(1):165-73.
14. Shin HM. Effects of *Siegesbeckia Glabrescens* on the Vascular Relaxion and Antioxidantive Status. The Journal of Korean Oriental Med, 2000;21(1):77-83.
 15. Shin JH, Cha GY, Kim HJ, Hwang JH, Han KH, Seo HJ, Shin TS, Oh SJ, Kim JD. Examination of Anti-Obesity Effect of Regional Special Natural Products of *Anthrisci radix*, *Psoraleae semen*, *Siegesbeckiae herba* and *Corni fructus*. KSBB Journal 2009;24:549-55
 16. Hur SW. The Efficacy of *Siegesbeckia pubescens* Herbal Acupuncture on Cartilage Protection In Vitro and Collagenase-induced Arthritis. Journal of Kyung Hee Univ. 2008
 17. Kang CH. Growth inhibitory activities of *Siegesbeckiae glabrescens* against foodborne pathogens. Journal of Inha Univ. 2009.
 18. Mari M, Seiji K, Kenji F, Airo T, Toshimasa N. Evaluation of the estrogenic activities of some pesticides and their combinations using MtT/Se cell proliferation assay. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2006;209(5):413-21.
 19. 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, 1985;45(4):1474-8.
 20. Hearing Jr.V.J. Mammalian monophenol monooxygenase(Tyrosinase) : Purification, properties and reaction catalyzed. Methods Enzymol, 1987;142:154-65.
 21. Jergil, B., Lindblad, C., Rorsman, H., Rosengren, E. Dopa oxidation and tyrosine oxygenation by human melanoma tyrosinase. Acta Derm Venereol. 1983;63(6):468-75.
 22. Lyu, S.Y., Moon, Y.S., Kwon, Y.J., Joo, H.J. and Park, W.B. Inhibition of porcine pancreatic elastase(PPE) by Korean mistletoe (*Viscum album* var. *Coloratum*) fractions. Nat. Prod. Sci. 2003;9:278-85.
 23. Cannell, R.J.P., Kellan, S.J., Owsianski, A.M., Walker, J.M. : Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. Planta Medica 1988;54:10-4.
 24. Marklund, S., Marklund, G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, Eur. J. Biol. Chem, 1974;47:468-74
 25. The committee for Editing Textbook, Oriental Medicine Dermatology. Busan:Seunwoo, 2007:37-57.
 26. KDA Textbook editing board. Dermatology 5th edition, Seoul:Ryo Moon Gak, 2008:11.
 27. Kang WH. Atlas Skin Disease. Seoul:HanMi, 2006:3-10.
 28. KangSoJin Language institute. The encyclopedia oriental herbal medicine. Seoul:JeongDam, 2004:6660-5
 29. Joh YH. Inhibitory Effect of *Enteromorpha linza* on the Melanogenesis in B16 Melanoma Cells. Korean Journal of Pharmacognosy, 2008;39(3):174-8.
 30. Chang T.S. An updated review of tyrosinase inhibitors, Int. J. Mol. Sci, 1983;10:2440.
 31. Gupta, A.K., Gover, M.D., Nouri, K., Taylor,

- S. The treatment of melasma ; a review of clinical trials, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2006;55(6):1048-65.
32. Kameyama K, Pigment production in murine melanoma cells is regulated protein, DOPAchrome tautomerase(TRP2) and a melanogenic inhibitor, *J Invest Dermatol.*, 1993;141(1):20-9
33. Ikeda T, Tsutsumi T. Function and skin depigmental activity of crude drugs, *Fragrance J.* 1990;6:56.
34. Qui F. Pharmacological properties of traditional medicines, XXII. Pharmacokinetic study of mulberroside A and its metabolites in rat, *Biol. Pharm. Bull.*, 1996;19(11):1463-7.
35. 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
36. Song, J.S., Cho, K.S., Yoon, H.K., Moon, H.S., Park, S.H. Neutrophil Elastase Causes MUC5AC Mucin Synthesis Via EGF Receptor, ERK and NF- κ B Pathways in A549 Cells, *The Korean Journal of Internal Medicine* 2005; 20(4):275-83.
37. Boo HJ, Ham YM, Kim JM, Lee SJ, Hyeon JW, Lee NH. Elastase and Hyaluronidase Inhibition Activities of Phlorotannins Isolated from *Ecklonia cava*, *Korean Journal of Pharmacognosy.* 2006;37(2):92-6.
38. K. Tsukahara, H. Nakagawa, S. Moriwaki, Y. Takema, T. Fujimura, and G. Imokawa. Inhibition of ultraviolet-B-induced wrinkle formation by an elastase-inhibiting herbal underlying elastase-associated wrinkles, *Int. J. Dermatol.* 2006;45:460
39. Jeong HR, Joe YN, Jeong HJ, Jin DE, Song BK, Heo HJ. Whitening and Anti-wrinkle Effects of Apple Extracts, *Korean Journal of food preservation.* 2011;18(4):597-603.
40. Coyle, J.T. and Puttfarcken P. Oxidative stress glutamate, and neurodegenerative disorders, *Science.* 1993;262:689
41. Mc Crod J.M. and Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte, *J Biol. Chem.* 1969;244:6049
42. Lee SJ, Park GY, Kim GY. Effects of Dietary Vitamin E and Selenium on Hematopoiesis and Antioxidative Detoxification Mechanism in Lead Poisoned Rats, *The Journal of Korean Society of Food and Nutrition.* 1993;22:651.
43. Park HJ. The Effect of Coenzyme Q10 Supplement on Antioxidant, Energy Metabolism Substrates, Fatigue Materials and Cardiorespiratory Function, *JeonNam Univ.* 2009.
44. Hearing V.J and Jimenez M. Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigment, *Int J. Biochem.* 1987;19(12):1131.