pISSN 1226-2587
J. Soc. Cosmet. Sci. Korea eISSN 2288-9507
Vol. 41, No. 1, March 2015, 73-83 http://dx.doi.org/10.15230/SCSK.2015.41.1.73

미백, 보습 및 탈모방지에 대한 황칠나무(*Dendropanax modifera* Lev.)에서 분리한 1-tetradecanol, β-sitosterol의 효과

이 선 영 · 최 은 진 · 배 동 혁 · 이 동 욱 · 김 선 오†

(재)전남생물산업진흥원 천연자원연구원

(2015년 2월 10일 접수, 2015년 2월 27일 수정, 2015년 3월 13일 채택)

Effects of 1-tetradecanol and β-sitosterol Isolated from *Dendropanax morbifera* Lev. on Skin Whitening, Moisturizing and Preventing Hair Loss

Sun Young Lee, Eun-Jin Choi, Dong-Hyuck Bae, Dong-Wook Lee, and Sunoh Kim†

Jeonnam Bioindustry Foundation, Jeonnam Institute of Natural Resources Research (JINR), Jeollanamdo 529-851, Korea
(Received February 10, 2015; Revised February 27, 2015; Accepted March 13, 2015)

요 약: 황칠나무(*Dendropanax mobifera* Lev.)는 두릅나무과에 속하는 난대성 수종으로 대한민국 남쪽지방에 주로 분포하며 전통적인 민간요법 약재로 사용되어 왔으나 지금까지 피부에서의 효능이 잘 알려지지 않았다. 우리는 본 연구에서 황칠나무 잎의 열수추출물과 *n*−hexane 분획물에서 1−tetradecanol과 β−sitosterol 성분을 분리정제하여 다양한 피부개선효과와 탈모방지효과를 검증하였다. 1−tetradecanol의 타이로시나아제 활성 저해 효과는 열수추출물과 *n*−hexane분획물 보다 높은 저해 활성이 나타났다. 그리고 B16F10 세포를 이용한 멜라닌 양을 측정한 결과 1−tetradecanol은 세포독성 없이 농도 의존적으로 멜라닌 양이 감소됨을 확인하였다. 실험동물을 이용한 경표피수분손실량(TEWL)에서도 1−tetradecanol에서 수분 손실이 가장 낮게 나타났다. β−sitosterol의 탈모 방지에 대한 효과는 HR−1 hairless mice의 성장 주기별 특성을 이용하여 관찰하였다. 그 결과 β−sitosterol을 처리한 마우스의 탈모는 지연되었고 모발의 밀도도 가장 높게 나타났다. 그러므로 황칠 *n*−hexane분획물에서 분리한 1−tetradecanol과 β−sitosterol이 미백과 보습 용도의 화장품 기능성 원료 및 탈모 개선에 가능성이 있는 화장품소재로서 상업적 발전의 가능성을 보여주고 있다.

Abstract: *Dendropanax morbifera* Leveille (Araliaceae) is an endemic species growing in the south-western part of South Korea and has been used in folk medicine. However, the effects of *Dendropanax morbifera* Lev. on skin biology remain to be elucidated. In this study, we isolated 1-tetradecanol and β-sitosterol from the *n*-hexane fraction of *Dendropanax mobifera* Lev. and To investigate the whitening effect of the fraction, we tested the inhibition of tyrosinase activity of 1-tetradecanol. The results show that the inhibitory effect of the 1-tetradecanol was higher than water extract and *n*-hexane fraction. And 1-tetradecanol significantly reduced melanin contents of B16F10 cells compared to more than water extract and *n*-haxane fraction dose-dependantly without cell cytotoxicitiy (below 100 μg/mL). We also investigated the skin moisturizing effect using HR-1 hairless mice. The transepidermal water loss (TEWL) in the 1-tetradecanol treated group was significantly smaller than that in the other groups. To investigate the effect of the preventing hair loss by β-sitosterol, we observed HR-1 hairless mice through periodic growth feature. The results suggest that hair loss of mice by β-sitosterol was delayed and it's hair density showed the highest. These data provide evidence that

† 주 저자 (e-mail: sunoh@korea.ac.kr)
call: 061)860-2600

Dendropanax morbifera Lev. may be a potent candidate for the improvement of both skin whitening, moisturizing and alopecia from the point of cosmetic industry view.

Keywords: *Dendropanax morbifera Leveille, 1-tetradecanol, β-sitosterol, whitening effect, moisturizing effect, hair loss*

1. 서 론

현대사회에서 외모는 여성뿐만 아니라 남성들에게도 매우 중요한 개인적이고 사회적인 경쟁력이라는 인식이 강해지고 있으며, 특히 고령화 사회로 접어 들어감에 따라 노화에 대한 여러 증상들인 주름과 탈모 등에 관한 연구들의 중요성이 증가하고 있다.

피부의 노화는 자외선, 활성산소종(reactive oxigen species, ROS) 및 건조함이 가장 큰 원인으로 알려져 있다. 자외선으로 인한 광산화적 손상은 피부의 탄력섬유를 파괴시키고, 활성산소는 콜라겐을 산화시켜 노화를 촉진하며, 수분이 부족한 건조피부는 피부의 생리기능을 감소시켜 쉽게 주름이 증가하여 피부노화를 가속화시킨다. 멜라닌 색소는 자외선으로부터 피부를 보호하기 위해 자체 방어기전으로 만들어지는 것으로 자외선 등의 자극으로 피부의 기저층에 있는 멜라노사이트(melanocyte)가 활성화되어 타이로시나아제(tyrosinase)라는 효소 작용으로 만들어진 후 피부 표면으로 올라와서 각질이 되어 떨어져 나가는데, 국소적으로 과도하게 합성이 되거나 진피에 머무르게 되면 기미 및 색소 침착의 원인이 된다[1]. 이에 따라 최근 화장품 업계 및 연구기관에서는 기존의 미백 소재들의 단점들을 극복하고 안전성이 확보된 천연물을 이용한 원료 개발이 활발하게 이루어지고 있다. 하지만 천연물 소재의 단점인 유효용량 이상에서의 변색 및 침전 등 제형적인 안정성 문제와 고용량에서만 효과가 나타난다는 여러 단점들이 극복해야 할 과제로 남아있다.

피부 노화의 또 다른 요인으로 지나친 수분 손실에 의한 피부건조는 피부 장벽 기능의 약화를 초래하여 외부 자극에 민감하게 되고 주름이 생기는 등 피부 조기노화의 원인이 된다. 따라서 피부에 수분을 공급하고 수분 증발을 막아주는 역할이 피부 건강에 중요하게 작용한다.

피부 이외의 미(美)의 외적요소 중의 중요한 부분은 머리카락이다. 최근 유전적 요인과 스트레스의 증가, 남성호르몬의 과다분비, 서구화된 식생활 패턴으로 인한 영양장애, 혈액순환 및 내분비 장애, 노화 등으로 모발의 생성보다 탈락이 많은 비정상적인 상태 즉, 탈모로 고통받는 현대인이 급증하는 추세이다[2]. 이로 인해 탈모를 극복하기 위한 모발에 관련된 산업이 주목받고 있고 탈모방지 및 발모촉진과 관련된 여러 가지 요인들에 대한 기전을 밝히는 연구가 활발히 진행되고 있지만 효능이 우수하고 안전한 탈모방지제의 개발은 미진한 실정이다. 탈모방지와 발모 효능연구에 이용되는 실험적 방법으로는 실험동물을 이용한 *in vivo* 평가와 모낭세포 및 조직배양을 이용한 *in vitro* 평가 등이 주로 이용되고 있다[3].

두릅나무과에 속하는 황칠나무(*Dendropanax mordifera* Lev.)는 난대성 상록활엽교목으로 우리나라 남쪽 지방 해안지역 및 도서 지역에 분포하는 전라남도 특산 수종이다[4]. 황칠나무에서 분비되는 황칠은 오래 전부터 가구의 도료로 사용되어 왔고 최근 연구결과에 따르면 황칠나무 추출물은 항산화작용[5], 면역력 증진[6], 신경안정[7], 항당뇨[8], 그리고 항암작용[9] 등이 있는 것으로 보고되고 있다. 또한 항산화 활성을 토대로 황칠나무 잎을 이용한 미백 기능에 대한 연구[10]가 되고 있지만 다양한 피부손상 개선에 대한 고찰이 이루어지지 않고 있으며, 특히 황칠나무 추출물에서 피부개선 활성을 나타내는 주요한 성분연구가 진행되고 있지 않아서 황칠나무 추출물을 미용향장산업에 활용하는 데는 많은 추가적인 연구가 필요한 실정이다.

본 연구에서는 황칠나무 추출물의 미백기능성과 피부보습효과를 통한 피부개선 및 탈모방지 효능을 확인하고자 황칠나무 잎 열수추출물과 *n*-hexane 분획물, 그리고 분획물에서 분리 정제한 1-tetradecanol의 미백효능에 대해 타이로시나아제 활성 억제효능 측정 및 세포수준에서 멜라닌 생합성 저해효능 평가, 그리고 실험동물을 이용한 보습활성 평가를 통해 그 효과를 검증하고자 하였다. 또한 HR-1 hairless 마우스의 성장주기별 특징을 이용하여 β-sitosterol의 탈모 방지 효과에 대해서 규명하고자 하였다.

2. 실험 방법

2.1. 시약 및 기기

본 실험에서 사용한 황칠나무 잎은 전라남도 장흥군(2014년 3월)에서 재배되고 있는 것을 구입하여 사용하였다. 황칠나무 잎은 세절 후 열풍건조기에서 건조 후 사용하였다. 황칠나무 건조 잎의 추출과정 및 용매분획에 사용된 용매들은 시판 특급 시약을 사용하였다. 증류수는 Milli-Q (Millipore Co., Milford, MA, USA) 장치를 통과시킨 것을 사용하였다. 미백 실험에는 mouse melanoma (B16F10)를 한국세포주은행(KTCC, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 세포배양을 위한 배지는 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), phosphate buffered saline (PBS), 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS), penicillin & streptomycin, 0.5% trypsin-EDTA는 Gibco에서 구입하여 사용하였다. 3-(4,5-dinethythiazol-2-yl)-2,5-diphenytetrazolium bromide (MTT), tyrosianse, melanocyte stimulating hormone (α-MSH), dimethyl sulfoxide (DMSO) 코직산(kojic acid), 알부틴(arbutin)은 Sigma에서 구입하였고, L-tyrosine는 Junsei chemical Co. Ltd.로부터 구입하였다. 실험에 사용한 기기는 microplate reader (Molecular Devices, USA), tewameter (Corage+Kh- hazaka electronic GmbH, Germany), digital microscope (SCALAR, Japan), 원심분리기, 항온기, 현미경, CO_2 incubator를 사용하였다.

2.2. 시료 추출, 분획 및 분리정제

2.2.1. 황칠나무 잎 열수추출물 및 n-hexane 분획물

황칠나무 건조 잎 1.0 kg을 100 ℃에서 4 h 동안 열수 추출을 하였다. 추출된 시료를 감압 흡입 여과기를 이용하여 여액만 취하였으며, 여과하여 얻어진 여액은 40 ℃ 수욕상에서 진공회전농축기로 농축하여 황칠나무 잎 열수추출물을 얻었다. 농축된 열수추출물 20.0 g을 물에 현탁하여 *n*-hexane을 가한 다음 잘 흔들고 방치하여 수용액층과 *n*-hexane 층을 얻었고 용매 분획물을 감압 농축하여 최종 *n*-hexane 분획물을 얻었다.

2.2.2. n-Hexane 분획물로부터 단일성분 화합물의 분리

황칠나무 건조 잎 1.3 kg을 100% 메탄올을 이용하여 60 ℃에서 3 h 동안 용매 추출을 하였다. 추출물은 감압 농축하여 동결건조 하여 얻은 96.0 g의 power를 멸균 증류수 1 L를 이용하여 녹이고 *n*-hexane을 가한 다음 잘 흔들고 방치하여 수용액층과 *n*-hexane 층을 얻었고 용매 분획물을 감압 농축하여 최종 *n*-hexane 분획물 35.2 g을 얻었다. *n*-Hexane 분획물 35.2 g에서 18 g을 이용하여 open column chromatography를 실시하였다. Open column에 사용되어진 resin은 silica gel이며 용매조건은 hexane aceton을 사용하여 진행하였다. Open column 결과 모두 7개의 fraction을 얻었고 그중에 5번째 fraction (1.7223 g)을 이용하여 open column을 진행하여 최종적으로 9개의 sub-fraction을 얻었다. 그중 major spot이 있는 4번째 분획을(30 mg) acetone을 사용하여 침전시켜 1-tetradecanol을 얻었고(Figure 1A), 6번째 fraction (98.6 mg)을 이용하여 open column을 진행하여 얻어진 sub-fraction에서 β-sitosterol (10 mg)을 얻었다(Figure 1B).

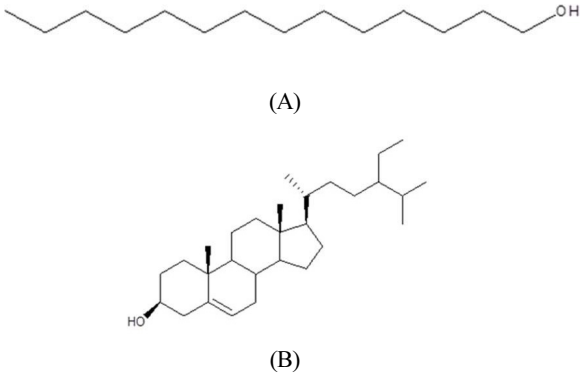


Figure1. The structures of [A] 1-tetradecanol and [B] β-sitosterol.

2.3. 미백효과 평가

2.3.1. Tyrosinase 저해 활성 측정

피부 미백효과를 확인하기 위하여 멜라닌 합성에 필요한 타이로시나아제(tyrosinase) 활성을 측정하였다. 96 well plate에 pH 6.8의 0.1 M PBS 220 μL에 각 시료 20 μL를 첨가한 후 enzyme solution (tyrosinase 2,000 U/mL) 20 μL와 기질액(0.03% tyrosine) 40 μL를 첨가하였다. 37 ℃에서 15 min 반응시키고 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 타이로시나아제 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무

첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었고 다음과 같이 계산하였다.

Tyrosinase inhibition rate (%)=(100-(A-A')/(B-B'))×100

A : 시료 반응 후의 흡광도
B : 공시료 반응 후의 흡광도
A' : 시료와 완충액의 흡광도
B' : 공시료와 완충액의 흡광도

2.3.2. 세포주 및 세포배양

한국세포주 은행으로부터 분양받은 mouse melanoma (B16F10)세포를 phenol red free-DMEM에 10% FBS와 1% antibiotic antimycotic (100 U/mL penicillin and 50 μg/mL streptomycin)을 첨가하여 37 ℃, 5% CO_2 조건의 incubator에서 세포가 70 ~ 80% 합류(confluency)가 되도록 배양하였다. 배지는 일주일에 두 번씩 갈아주고, 합류에 도달한 세포는 trypsin-EDTA를 사용하여 trypsinization한 후 계대 배양하여 유지하였다.

2.3.3. 세포독성 평가

Mouse melanoma (B16F10)세포에 대한 황칠나무 잎 열수추출물, *n*-hexane분획물 및 1-tetradecanol의 유효농도를 결정하기 위해 Mosmann[11]의 방법을 변형하여 세포독성측정(MTT assay)을 진행하였다. 96 well plate에 세포를 1 × 10^4 cells/well로 분주하고 24 h 배양이 지난 뒤 각 시료가 농도별로 첨가된 배지로 교환하고 48 h 배양하였다. 배양이 끝난 후 MTT 용액(5 mg/mL)을 10 μL 첨가하고 4 h 후 상등액을 제거하고, 생존 세포에서 생성된 MTT-formazan 결정체를 용해시키기 위해 50 μL의 DMSO를 첨가한 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

세포생존율(%) = 시료첨가군의 흡광도/대조군의 흡광도 × 100

2.3.4. 멜라닌 합성 억제 측정

B16F10 mouse melanoma세포를 6-well plate에 5 × 10^4 cells/mL 이 되도록 준비한 후 37 ℃ incubator에서 배양하였다. 24 h 후 멜라닌 생합성 유도물질인 50 nM α-MSH가 있는 배지 조건에 시료를 농도별로 처리하고 72 h 동안 37 ℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 양성대조군으로 알부틴을 사용하였다. 배양된 세포의 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 수확된 세포에 0.2 mM PMSF와 1% triton X-100을 함유한 67 mM PBS (pH 6.8) 500 μL를 처리하고 초음파로 분쇄하여 이 상태로 1 h 동안 ice에 두었다. 4 ℃ 원심분리기에서 15,000 rpm으로 20 min 원심분리하여 분리된 침전물에 10% DMSO를 함유한 1N NaOH 용액을 첨가하고 65 ℃ 항온 수조에서 3 h 동안 멜라닌을 용해시킨 후 microplate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 측정값은 상층액의 단백질양으로 보정하고 α-MSH만 처리한 대조군과 비교하여 상대적인 멜라닌 함량을 측정하였고 그 계산식은 다음과 같다.

Melanin synthesis inhibition rate (%) = (100-(A-A')/(B-B')) × 100

A : 시료 반응 후의 흡광도
B : 공시료 반응 후의 흡광도
A' : 시료와 완충액의 흡광도
B' : 공시료와 완충액의 흡광도

2.4. 보습효능 평가

2.4.1. 실험동물 및 사육 관리

실험동물은 평균 체중 18 ~ 20 g의 HR-1 hairless 마우스(6주령, 수컷/암컷)를 (주)샘타코바이오코리아로부터 구입하여 사용하였으며 실험동물 입수 후 검역과 일주일간의 순화 기간을 거치도록 하였다. 실험동물의 사육환경은 온도 23 ± 2 ℃, 습도 55 ± 10%, 환기횟수 10 ~ 15회/h, 그리고 12 h light/dark cycle을 유지하는 사육환경으로 설정된 동물 사육실에서 자유스럽게 사료와 음용수를 급여할 수 있는 환경에서 사육하였다.

2.4.2. 실험물질 처리 및 경피수분손실량 측정

각 시료를 실험동물의 등에 도포 후 2 h, 4 h, 6 h, 8 h 간격으로 TEWL을 측정하였다. 시험군의 분리 및 처리한 시료에 관한 내용은 Table 1과 같다. 표피피부기능측정시스템인 Tewameter에 TM300 probe를 연결

Table 1. The Information of Each Experimental Group for TEWL in an HR-1 Hairless Mouse

Group	Test samples	Sex	Number
Control	40% propylene glycol	Male/Female	5/5
Water extract	1% water extract in 40% propylene glycol	Male/Female	5/5
n-Haxane fraction	1% *n*-hexane fraction in 40% propylene glycol	Male/Female	5/5
1-tetradecaol	0.5% 1-tetradecaol in 40% propylene glycol	Male/Female	5/5

Table 2. The Information of Each Experimental Group for Preventing Hair Loss in an HR-1 Hairless Mouse

Group	Test samples	Sex	Number
Control	40% propylene glycol	Male/Female	5/5
Water extract	1% water extract in 40% propylene glycol	Male/Female	5/5
n-Haxane fraction	1% *n*-hexane fraction in 40% propylene glycol	Male/Female	5/5
β-sitosterol	0.5% β-sitosterol in 40% propylene glycol	Male/Female	5/5

하여 센서를 표피면(mm^2)에 접지 후 10번 반복치의 평균값을 기준으로 채택하여 TEWL을 측정하였다. 측정 장소는 실내온도 20 ~ 22 ℃, 습도 40 ~ 60%가 유지하는 조건에서 유발 부위를 측정 후 개체의 수치로 산출하였다. 피부표면에서 공기 중으로 수분이 확산하는 것에 의하여 증기압을 구하여 표피로부터 TEWL을 산정하였다[12].

2.5. Hairless 생쥐 특성을 이용한 탈모효과 측정

2.5.1. 실험동물 및 사육 관리

평균 체중 25 ~ 35 g 내외의 임신이 확인된 암컷 HR-1 hairless 마우스를 (주)샘타코바이오코리아로부터 구입하여 사용하였으며 동물 입수 후 검역과 순화기간을 거치도록 하였다. 실험동물의 사육환경은 온도 23 ± 2 ℃, 습도 55 ± 10%, 환기횟수 10 ~ 15회/h, 그리고 12 h light/dark cycle을 유지하는 사육환경으로 설정된 동물 사육실에서 사료와 음용수를 자유스럽게 음용수를 급여할 수 있는 환경에서 사육하였다. 임신한 쥐가 출산을 한 후 태어난 쥐의 체모가 모두 자랄 때까지 자유스럽게 모유수유를 할 수 있도록 어미 쥐와 같은 케이지에서 사육하였고 체모가 모두 자란 후에는 개체별로 암, 수 분리하여 사육하였다.

2.5.2. 성장 주기별 탈모부위 관찰

생후 13일의 모낭 발육 및 발모가 완료된 HR-1 hairless 마우스를 이용하여 탈모가 완료되는 생후 22일째까지 총 9일 동안 하루에 1회 시험물질을 실험동물의 등 및 전신에 도포 하여 탈모상태를 비교 관찰하였다. 시험군의 분리 및 처리한 시료에 관한 내용은 Table 2와 같다. 시료의 흡수 및 물리적 탈모를 방지하기 위해 모유수유 이후에는 개체별로 격리 사육하였다.

2.5.3. Hair density 측정

생후 18일째에 실험동물의 6번 흉추 부위에 digital microscope를 이용하여 1 mm^2를 100배율로 촬영하여 각 개체별로 모발수를 비교 측정하였다.

2.6. 자료 분석 및 통계처리

모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였고,

통계적 유의성은 Student's *t*-test로 하였으며 p 값이 0.01 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 미백효과

3.1.1. Tyrosinase 활성 저해 효과

멜라닌(melanin)을 형성하는 연속적인 효소적 산화 반응에서 타이로신(L-tyrosine)이 타이로시나아제에 의해 L-3.4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA)로 전환되고 다시 타이로시나아제에 의해 dopaquinone으로 전환되어 최종적으로 멜라닌이 형성된다. 타이로시나아제는 L-tyrosine을 L-DOPA로 변화하는 hydroxylase의 활성과 L-DOPA를 dopaquinone으로 변환하는 dopa oxidase의 활성을 모두 가지고 있는 두 가지 단계의 반응을 촉진하는 key enzyme으로 작용한다[13-17]. 그러므로 타이로시나아제 활성 억제제는 피부 내에서 멜라닌 합성을 효과적으로 저해할 수 있어 피부 미백 기능성 소재 개발에 있어서 유용한 1차 평가방법으로 인정되고 있다.

타이로시나아제 저해활성을 측정한 결과, 양성대조군인 코직산(kojic acid) 100, 300, 1,000 μg/mL의 농도에서 각각 35.8, 66.2, 35.8, 66.2, 88.4%의 저해활성이 나타난데 반해 같은 농도의 황칠나무 잎 열수 추출물에서는 각각 5.4, 14.8, 22.1%, *n*-hexane 분획물에서는 각각 9.8, 22.4, 34.5%의 결과로 양성대조군인 코직산에 비해 효과는 낮았지만 모두 농도 의존적으로 타이로시나아제 활성 억제 효과가 나타났고 열수추출물보다 *n*-hexane 분획물에서 활성이 더 높게 나타났다(Figure 2A). 또한 *n*-hexane 분획물에서 분리정제한 단일물질인 1-tetradecanol의 경우 100, 300 1,000 μM에서 각각 26.1, 48.1, 74.6%의 높은 타이로시나아제 저해 효과가 나타났다고, 코직산과 유사한 효과가 나타났다(Figure 2B). 본 실험에서 사용한 황칠나무 잎 열수 수출물과 *n*-hexane 분획물의 효과는 양성대조군인 코직산보다 효과는 우수하지 못하였지만, 코직산은 효능이 좋은 반면 발암성 물질로 밝혀져 기능성 화장품 배합시 안전성 문제로 현재 화장료로 사용하지 못하고 있다[18]. 따라서 코직산의 단점을 극복하고 안전성과 효과가 좋은 황칠나무 잎에 존재하는 단일성분인 1-tetradecanol이 안전하고 효과가 높은 미백 소재로서 그 가능성을 제시하여 주는 연구결과이다.

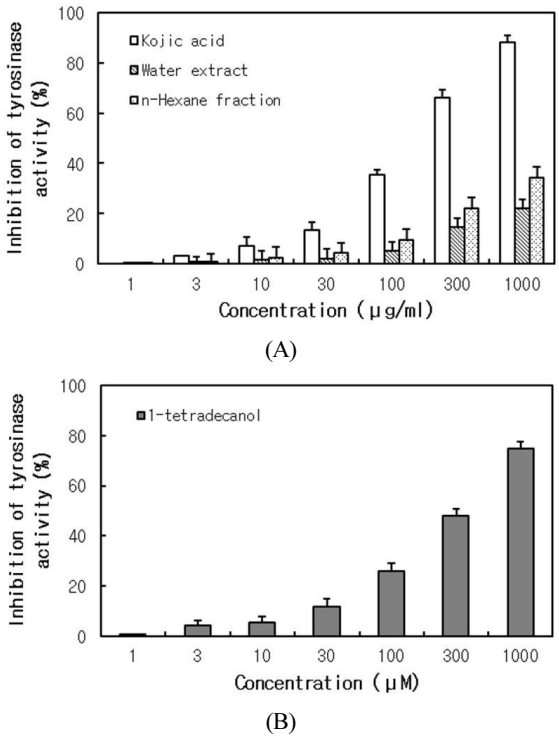


Figure 2. Tyrosinase inhibitory activity of water extract, *n*-haxane fraction [A] and 1-tetradecanol [B] isolated from *Dendropanax morbifera* Lev. The data was expressed as mean values (±S.D.) of the three independent expriments.

3.1.2. 황칠나무 잎 추출물들의 세포독성

황칠나무 잎 열수추출물, *n*-hexane분획물과 1-tetradecanol이 일차적으로 세포 생존에 미치는 영향과 실험 농도를 결정하기 위해 B16F10 마우스 멜라노마 세포에서 시료를 농도별로 처리하고 MTT assay를 통해 세포 독성을 관찰하였다. Figure 3에서 보는 바와 같이 황칠나무 잎 열수추출물과 *n*-hexane분획물은 고농도인 1,000 μg/mL를 제외하고 80 % 이상의 생존력을 보였다. 따라서 300 μg/mL 이하의 농도 범위에서 시료의 독성이 미미한 것으로 판단하였고, 양성대조군으로 사용한 알부틴(100 μg/mL)의 세포독성 수준과 유사한 시료의 농도를 바탕으로 이후 실험에서 모든 시료를 1, 3, 10, 30, 100 μg/mL의 농도로 실험을 실시하였다.

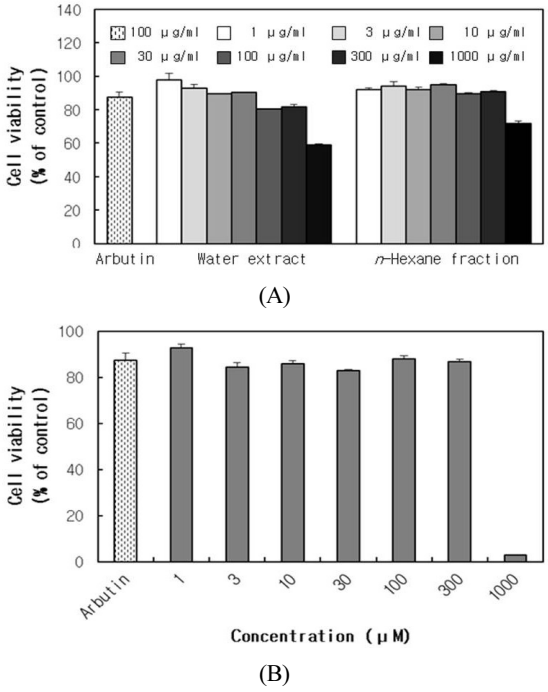


Figure 3. Effect of water extract, *n*-hexane fraction [A] and 1-tetradecanol [B] isolated from *Dendropanax morbifera* Lev. on cell viability of B16F10 melanoma cells. The data was expressed as mean values (±S.D.) of the three independent expriments.

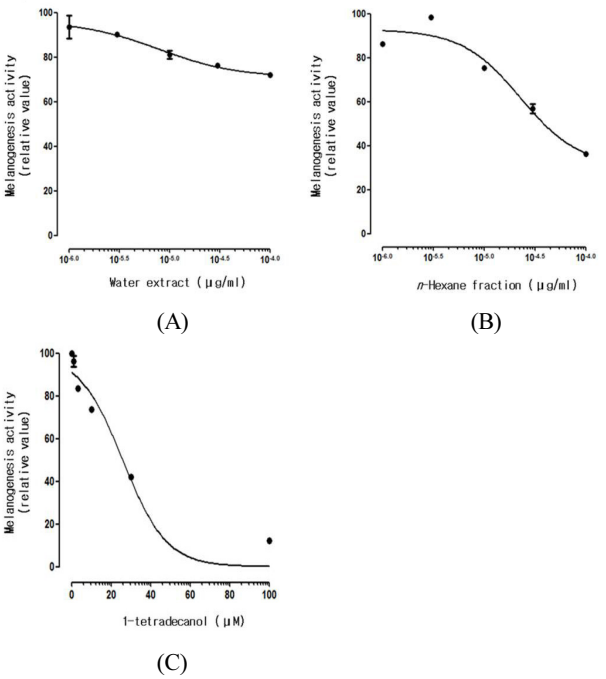


Figure 4. Relative melanin content (%) of samples on B16F10 by melanogenesis inhibition assay. Water extract [A], *n*-hexane fraction [B], 1-tetradecanol [C]. The data was expressed as mean values (±S.D.) of the three independent expriments. *$p < 0.01$ compared with α-MSH treated cells. Arbutin was used as a reference material (data not shown).

3.1.3. 세포 내 멜라닌 합성 억제 효과

타이로시나아제 활성 저해 효과가 있는 황칠나무 잎 열수추출물, *n*-hexane 분획물, 1-tetradecanol이 미백 개선 성분으로 검증하기 위해 B16F10 마우스 멜라노마 세포를 이용하여 멜라닌 합성 억제 효과를 측정하였다. 멜라닌 생합성 유도물질인 50 nM α-MSH가 첨가된 배지 조건에 추출물의 농도를 최대 100 μg/mL으로 각 농도별로 처리하고 3일 동안 배양한 후 세포를 수집하여 생성된 멜라닌 양(%)을 측정하였다(Figure 4). 황칠나무 잎 열수추출물 100 μg/mL에서 72.33 ± 0.14%, *n*-hexane 분획물 100 μg/mL 농도에서 36.28 ± 0.71%로 멜라닌 생성 함량이 *n*-hexane 분획물을 처리했을 때 더 낮아졌고 단일 물질인 1-tetradecanol 100 μM 농도에서는 12.16 ± 1.29%로 멜라닌 생성량이 현저히 낮아졌다. 게다가 양성대조군인 알부틴(51.45 ± 0.75%) 보다 높은 멜라닌 생성 억제 효과가 나타났다. 결과적으로 *n*-hexane 분획물에서 분리한 단일물질인 1-tetradecanol은 멜라닌 생성을 촉진시키는 α-MSH에 의해 유도된 세포 내 타이로시나제 활성을 저해하여 세포 내 멜라닌 합성을 저해하는 데 효과가 매우 크다는 것을 알 수 있었고 미백 기능성에 대한 탁월한 효과를 기대할 수 있다.

3.2. 피부 보습 효과

피부의 수분 증발 억제를 통한 보습 효과를 알아보기 위해 TEWL을 측정하였다(Figure 5). 해당 실험 전, 실험농도에서의 1-tetradecanol과 *n*-hexane 분획물의 알레르기 및 피부독성을 확인한 결과 무처리 대조군과 동일하게 아무런 이상 증상은 확인할 수 없었다(data not shown). 각 처리군당 시간별로 경표피수분손실량을 비교해 보았을때 무처리 대조군(control) 보다 황칠나무 잎 열수추출물의 시간당 수분 손실량이 상대적으로 낮아졌음을 관찰할 수 있었고 *n*-hexane 분획물에서는 황칠나무 잎 열수추출물보다 더 낮은 손실량을 나타내었다. 더욱이 단일물질인 1-tetradecanol의 경우

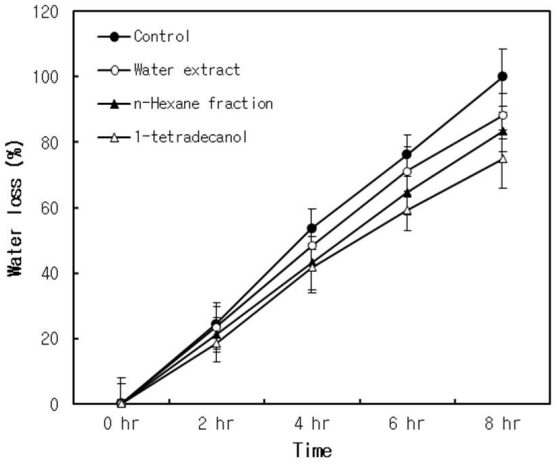


Figure 5. TEWL by tewameter (TM300) measurement. The measurement was carried out at normal room condition with HR-1 hiarless mouse.

엔 시간당 경표피수분 손실량이 가장 낮은 것으로 확인되었다. 이로서 황칠나무 추출물은 피부의 수분 증발을 지연시켜 보습효과를 갖는데 특히 *n*-hexane 분획물의 1-tetradecanol 성분이 가장 탁월한 보습효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

3.3 탈모 동물모델에서 모발 성장 효과

3.3.1. 성장 주기별 모발 성장

HR-1 hiarless 마우스는 출생 후 7일째부터 체모가 나기 시작하여 13일째에 온몸을 덮고 17일째부터 머리와 가슴 부위에서부터 탈모가 시작되 21일째 이후로 접어들면서부터 탈모가 완료되어 몸의 체모가 다 빠지게 되는 특징을 가지고 있다[19]. 이와 같은 HR-1 hiarless 마우스의 특성을 이용하여 모낭의 발육 및 발모가 완료된 생후 13일부터 탈모가 완료되는 생후 22일까지의 탈모시기에 일어나는 변화에 대한 황칠나무 잎 열수추출물, *n*-hexane 분획물, 그리고 *n*-hexane 분획물에서 분리된 β-sitosterol에 대한 탈모 억제 효과가 있는지 알아보았다. 해당 실험 전, 실험농도에서의 β-sitosterol과 *n*-hexane 분획물의 알레르기 및 피부독성을 확인한 결과 무처리 대조군과 동일하게 아무런 이상 증상은 확인할 수 없었다(data not shown).

모낭의 발육 및 발모가 완료된 HR-1 hiarless 마우스에 실험물질을 도포 후 1, 5, 7, 9일째에 탈모 상태를

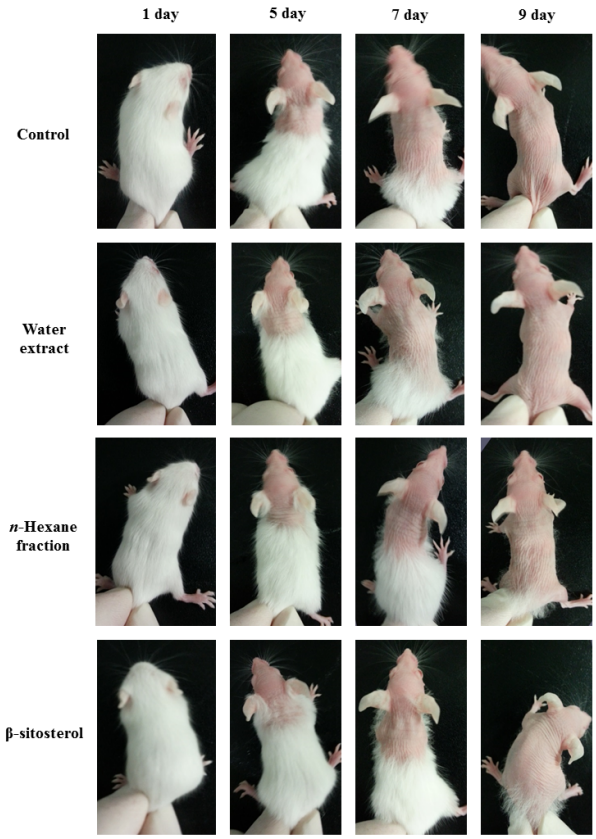
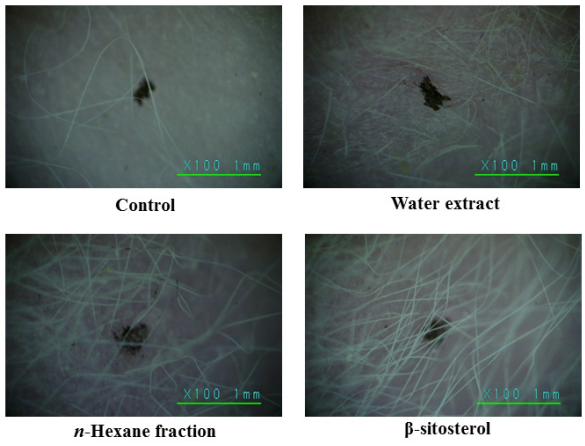
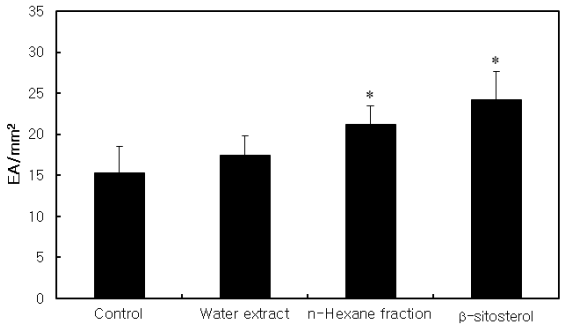


Figure 6. Effect of water extract, *n*-hexane fraction, and 1-sitosterol isolated from *Dendropanax morbifera* Lev. on preventing hair loss in an hairless mice.

관찰하였다. 그 결과 시료 처리 후 5일째 머리와 가슴 부위의 털이 빠진 것을 관찰할 수 있었고 특히 β-sitosterol을 도포한 경우 다른 군과 비교하였을 때 탈모의 진행이 억제된 것을 확인할 수 있었다. 시료 처리 7일째 무처리 대조군(control)인 40% propylene glycol을 처리한 정상대조군의 경우 뒷다리 앞까지 탈모가 진행된데 반해 황칠나무 잎 열수 추출물을 비롯하여 *n*-hexane 분획물, β-sitosterol을 도포한 군은 탈모의 진행이 늦은 것을 관찰할 수 있었다. HR-1 hairless 마우스의 탈모가 완료되는 시점인 시료 처리 후 9일째에 무처리 대조군과 황칠나무 잎 열수추출물을 도포한 군에서는 탈모가 정상적으로 완전히 이루어졌음을 확인할 수 있었지만 *n*-hexane 분획물과 β-sitosterol을 도포한 군에서는 아직 뒷다리 뒷부분에 체모가 남아 있어 탈모가 지연되고 있음을 확인할 수 있었다(Figure 6).



(A)



(B)

Figure 7. Analysis of optical density. The optical density of dorsal hair of the mice was measured by using digital microscope after 5 days. The results are expressed mean ± S.D. (n=10/group). * $p < 0.01$ compared with control.

3.3.2. 모발 밀도 측정 결과

머리와 등 부위의 탈모가 나타난 후인 생후 18일째(시료 도포 6일째)의 HR-1 hairless 마우스의 6번 흉추 부위를 관찰한 결과 무처리 대조군(control)에 남아있는 체모의 수와 대비하여 *n*-hexane 분획물과 β-sitosterol을 도포한 군의 모발의 수가 paired *t*-test를 통해 95% 신뢰구간에서 $p < 0.01$로 유의성 여부를 확인한 결과 통계학적으로 유의성 있게 체모가 존재하고 있어 탈모방지효과를 확인할 수 있었다(Figure 7A, 7B).

4. 결 론

본 연구에서는 황칠나무 잎에서 분리한 1-tetradecanol과 β-sitosterol에 대한 미백활성과 보습활성을 통한 피부개선효과 및 탈모방지 효능 및 효과를 입증해 보였다. 연구에 사용된 시료는 황칠나무 잎 열수추출물과 *n*-hexane 분획물 그리고 *n*-hexane 분획물에서 분리정제한 단일물질인 1-tetradecanol과 β-sitosterol을 이용하였다. 타이로시나아제 저해 활성 측정에서 주목할 점은 *n*-hexane 분획물에서 분리된 단일물질인 1-tetradecanol의 경우 양성대조군으로 사용된 코직산과 동일농도에서 유사한 수준의 높은 저해 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 미백 활성을 검증하기 위해 mouse melanoma (B16F10)세포를 이용한 시험에서는 각 추출물들이 농도 의존적으로 멜라닌 생합성을 감소시켰으며 특히 동일 농도(100 μg/mL)에서 양성대조군인 알부틴보다 1-tetradecanol의 효과가 더 높게 나타나는 것을 확인하였다. 또한 실험동물 표피를 이용한 피부보습효과에 대한 실험에서도 무처리 대조군 보다 각각의 추출물들의 시간당 경피수분 손실량이 낮았는데 열수추출물보다 *n*-hexane 분획물이 낮은 경피수분손실량을 나타내었고 1-tetradecanol의 경우 가장 낮은 경피수분손실량을 나타내었다. 이로서 황칠나무에서 분리된 1-tetradecaol은 멜라닌 생성을 촉진시키는 α-MSH에 의해 유도된 세포내 타이로시나제 활성을 저해하여 세포내 멜라닌 합성을 저해하는데 효과가 있어 미백 기능성에 대한 탁월한 효과가 기대될 뿐만 아니라 피부의 수분 손실을 지연시켜 보습효과를 갖는데 우수한 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 탈모 방지 효과에 대해서는 황칠나무 열수추출물, *n*-hexane 분획물, 그리고 *n*-hexane 분획물로부터 얻은 β-sitosterol에 대한 알아보았다. β-sitosterol은 대표적인 식물스테롤로서 전립선 비대증의 치료에 중요한 역할을 하며 혈중 콜레스테롤 수준을 감소시키며 고혈압에 효과가 있다고 알려져 있는 물질이다[20]. 발모가 완료된 HR-1 hiarless 마우스에 시험물질을 도포 후 탈모가 완료되는 시점까지 관찰한 결과 시료처리 9일째 탈모가 완료된 무처리 정상대조군과 열수추출물과는 달리 *n*-hexane 분획물과 β-sitosterol을 도포한 군에서는 탈모가 지연되어 체모가 유의적으로 남아 있음을 확인할 수 있었다. 또한 시료 도포 6일째의 모발 밀도를 관찰하였을 때 역시 무처리 정상대조군(15.35 ± 3.11)에 비해 β-sitosterol (24.27 ± 3.45)의 체모 밀도가 더 촘촘하게 나타남을 확인할 수 있었다. 이러한 육안적 분석을 통해 관찰한 결과 β-sitosterol

의 탈모에 방지 효과를 가늠할 수 있었고, 추후 관련 인자에 대한 조직학적 검사 수행 등을 통하여 탈모 방지제 및 억제제로서 적용 가능성을 판단할 수 있는 구체적 연구와 관련기작을 탐색하고자 한다.

Acknowlegment

본 연구는 산업통상자원부에서 지원하는 지역연고산업육성사업의 전남 황칠 명품 · 명소 브랜드화 육성사업의 일환으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

Reference

1. H. Z. Hill, W. Li, P. Xin, and D. L. Mitchell, Melanin: a two edged sword?, *Pigment Cell Res*., **10**, 158 (1997).
2. H. M. Choi, S. J. Hwang, J. S. Lee, and M. R. Kim, Effects of hair tonic and food including korean medicinal herbs on hair growth in an alopecia model of C57BL/6 Mice, *Kor. J. Herbology*, **26**(1), 119 (2011).
3. H. Uno, Quantitative models for the study of hair growth *in vivo*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **642**, 107 (1991).
4. B. S. Jeong, J. S. Jo, B. S. Pyeo, and B. Hwang, Studies on the distribution of *Dendropanax morbifera* and component analysis of the golden lacquer, *Korean J. Biotechnol. Bioeng*., **10**, 393 (1995).
5. T. K. Hyun, M. Kim, H. Lee, Y. Kim, E. Kim, and J. Kim, Evaluation of anti-oxident and anti-cancer propertied of *Dendropanax morbifera* Leveille, *Food Chem*., **141**(3), 1947 (2013).
6. S. H. Lee, H. S. Lee, Y. S. Park, B. Hwang, J. H. Kim, and H. Y. Lee, Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev., *Korean J. Medicinal Crop Sci*., **10**(2), 109 (2002).
7. S. S. Lim, Y. S. Lee, H. M. Kim, Y. Ahn, K. H. Shin, and S Lee, GC/MS analysis of volatile constituents from broad-leaved indeciduous trees, *Korean J. Plant Res*., **21**(4), 237 (2008).
8. H. Moon, Antidiabetic effects of dendropanoxide from leaves of *Dendropanax mobifera* Leveille in normal and streptozotocin-induced diabetic rats, *Human and Experimental Toxicology*, **30**(8), 870 (2010).
9. H. Y. Ryu, Ph. D. Dissertation, Dong-A Univ., Busan, Korea (2012).
10. J. M. Mo and S. J. Oh, Tyrosinase Inhibitory Acticity and Melanin Productory Activity of the Methanol Extract and Fractions from *Dendropanax morbifera* Lev., *Kor. J. Aesthet. Cosmetol*., **11**(2), 275 (2013).
11. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods*, **65**, 55 (1983).
12. C. I. Wei, T. S. Huang, S. Y. Fernando, K. T. Chung, Mutagenicity studies of kojic acid, *Toxicol. Lett.*, **59**(1), 213 (1991).
13. A. Korner and J. Pawelek, Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin, *Science*, **217**, 1163 (1982).
14. I. Jackson, D. M. Chambers, K. Tsukamoto, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, and V. Hearing, A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse *slaty* locus, *EMBO. J.*, **11**, 527 (1992) .
15. C. Jinenez, F. Solano, T. Kobayashi, K. Urabe, V. J. Hearing, L. A. Jose, and J. C. Garcia, A new enzymatic function in the melanogenesis pathway, *J. Biol. Chem.*, **269**, 17993 (1994).
16. T. Kobayashi, K. Urabe, A. Winder, C. Jimenz, G. Imokawa, T. Brewington, F. Solano, J. C. Garcia, and V. J. Hearing, Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis, *EMBO. J*., **13**, 5818 (1994).
17. K. Tsukamoto, I. J. Jackson, K. Urabe, P. M. Montague, and V. J. Hearing, A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPA chrome tautomerase, *EMBO. J*., **11**, 519 (1992).

18. J. M. Suk, S. Y. Park, M. R. Choi, S. Y. An, B. J. Kim, O. J. Park, and S. W. Jung, The characteristics of skin water content, sebum content, and trans-epidermal water loss from trial subjects, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, 39(3) (2013).
19. M. Lee, C. Oh, J. Kwon, C. Song, and C. Lee, The Studies on the Factors Related to Normal Hair Growth During Postnatal Growth Periods in C57BL/6N, Hairless and Alopecia Areata Mice Model, *Korean J. Phys. Anthropol*., **18**(1), 13 (2005).
20. Y. H. Choi, Master's Thesis Dissertation, Hanbat National Univ., Daejeon, Korea (2003).