

Original Article / 원저

용담화 에탄올 추출물의 항노화 작용 연구

최형욱¹⁾ · 리순화²⁾ · 김은주³⁾ · 김수경⁴⁾ · 이장천⁵⁾ · 임규상¹⁾

¹⁾원광대학교 한의학전문대학원, ²⁾건국대학교 교육대학원 미용교육학과,

³⁾오픈사이버대학 뷰티헬스디자인 학과, ⁴⁾수원여자대학교 미용예술과,

⁵⁾부산대학교 한의학 전문대학원

Study on the Anti-aging Activity of *Gentianae sino-ornata* Ethanol Extract

Hyung-Wook Choi¹⁾ · Shun-Hua Li²⁾ · Eun-Joo Kim³⁾ · Soo-Kyung Kim⁴⁾ · Jang-Cheon Lee⁵⁾ · Kyu-Sang Lim¹⁾

¹⁾Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

²⁾Department of Beauty Education, Graduate School of Education, Konkuk University

³⁾Department of Beauty Health Design, Open Cyber University

⁴⁾Department of Beauty and Art, Suwon Women's College

⁵⁾Professional Graduate School of Oriental Medicine, Pusan National University

Abstract

Objective : The goal of this study is to identify the effects of extract of *Gentianae sino-ornata* (GSO) on the anti-oxidative activity of skin.

For this purpose, several functions of GSO were analyzed in terms of skin-lightening activity and wrinkle improvement.

Methods : Cell viability was measured by neutral red (NR) assay, and GSO showed highly efficacy in DPPH radical scavenging activity. The level of tyrosinase and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) in media was analyzed by ELISA kit, and the expressions of p-JNK and p-ERK was measured by Western blot. To elucidate inhibitory effects of GSO on melanin synthesis, I determined the tyrosinase activity and melanin production in B16F10 cells.

Results : MMP-1 production in UVB-stimulated HDF cells was inhibited by GSO treatments, and also GSO inhibited protein expression levels of p-JNK and p-ERK. GSO significantly reduced tyrosinase activity and melanin synthesis in B16F10 cells.

Conclusions : From these results, GSO appears to be effective on skin elasticity increase, wrinkle improvement, whitening as anti-aging activity.

Key words : ERK; JNK; *Gentianae sino-ornata*; MMP-1; melanin; tyrosinase; α -MSH

© 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.

I. 서 론

피부 건강이 삶의 질(quality of life; QOL)의 핵심 개념으로 떠오르면서 건강하고 아름다운 피부에 대한 관심이 증가함에 따라 주름 개선, 여드름 치료 및 미백 관리가 가능한 천연물 연구가 활발하게 진행되고 있는 추세이다¹⁾.

피부 노화에 있어 collagen과 elastin은 피부의 탄력과 주름생성에 밀접하게 연관되어 있으며 collagen은 피부 진피층의 matrix를 이루는 구성 성분 중 가장 많은 부분이기 때문에 collagen의 생합성과 분해 조절은 피부 노화과정 중에서 핵심이 되고 있다²⁾. 또한 자외선 및 활성산소 등에 의해 유발되는 피부 진피층에 존재하는 matrix-metalloproteinases (MMPs)는 피부노화 특히 주름생성과 밀접한 관계가 있다. MMPs를 이루는 주요 성분으로는 collagenase, gelatinase, elastase 등이 있으며 피부의 탄력 감소 및 주름생성에 있어서 elastase의 활성 감소는 매우 중요하다³⁾. 피부 노화와 색소 병변의 주요 원인은 체내에서 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 대부분의 전자운반 과정 중 불안정하게 환원되거나 cytokine 등 다양한 작용의 자극에 의해 생성된다. 정상적인 경우에는 체내에 존재하는 항산화 시스템에 의해 활성산소종이 제거되지만 이 시스템의 작동이 원활하지 못하면 세포는 산화적 손상을 입게 된다. 따라서 이러한 활성 산소종에 의한 산화작용으로부터 생체를 보호할 수 있는 항산화제에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다⁴⁾.

피부색은 표피에 존재하는 색소 세포인 멜라닌 세포에서 생성하는 멜라닌 색소의 양, 분포, 혈류의 흐름에 영향을 받게 되며 피부에서 색소 침착의 정도를 나타내는 멜라닌 수치는 안면피부의 색소 침착 형태,

자외선에 대한 민감도 등을 파악하는데 주요한 평가 지표가 된다. 멜라닌의 합성이 과다하면 피부색의 변화 뿐 아니라 주근깨 및 기미, 색소 침착 등이 생기는데 이러한 색소침착병변들이 건강상 문제를 유발하는 경우도 있어 멜라닌 합성을 저해하기 위하여 다양한 물질들이 연구되고 있으며 효과적인 멜라닌 합성 저해 물질 개발은 멜라닌 세포 내에서 멜라닌 생성 억제, 멜라닌 세포 자극 물질 조절, 멜라닌 배설을 촉진시키는 것으로 크게 나뉘고 있다⁵⁾.

용담초(*Gentiana scabra* Bunge)는 다년생 초본으로 용담의 꽃을 용담화(*Gentiana sino-ornata*)라고 한다. 한방에서 사용되는 뿌리의 성미는 고한으로 간담의 실화를 사하고 청열, 조습, 하초의 습열을 제거하는 효능이 있어 두통, 협통, 습진, 피부 및 음낭 소양, 황달, 만성 위장 질환에 사용하고⁶⁾, 대장간균, 백선균, 피부 진균에 대하여 억제 작용이 있는 것으로 알려져 있다⁷⁾. 중약대사전에는 西藏(티베트)지방에서 쓰이는 용담초는 용담과 식물인 *Gentianopsis paludosa* (Hunro) Ma.의 소근을 앞에서 밝힌 효능과 같이 사용한다고 되어 있어⁸⁾ 피부와 관련이 깊을 것으로 사료되는 용담화를 中國에서 구입하여 연구에 사용하였다. 본 연구에서는 B16/F10 세포, HDF 세포를 이용하여 용담화 추출물이 멜라닌 및 콜라겐 생성에 미치는 영향을 조사하였으며 항노화 작용으로서 용담화의 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 약재

본 연구에서 실험에 사용된 용담화 (*Gentiana sino-ornata*)는 中國의 西藏拉萨市藏源中药材公司에서 구입하여 사용하였다.

Corresponding author : Kyusang Lim, PhD. Professor, School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan Blvd 460, Iksan city, Chonbuk, 570-749, South Korea.
(Tel : 82-63-850-6916, E-mail : kslim@wku.ac.kr)

• Received 2015/4/2 • Revised 2015/5/8 • Accepted 2015/5/15

2) 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, phosphate buffered saline solution (PBS), ascorbic acid, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), butylated hydroxy toluene (BHT), α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), 1-3, 4-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), arbutin, theophylline, trypan blue, formaldehyde, L-Tyrosine, Tween 20, Blocking buffer (BSA), p-Nirophenylphosphate (pNPP), anti-tyrosinase mouse antibody, anti-mouse IgG antibody는 (Santa Cruz사, USA), Western blotting detection reagent는 (Thermo사, USA), anti-p-JNK, anti-p-ERK, anti-MMP-1 primary antibody는 (Cell signaling Tech사, Ma, USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

3) 사용기기

원심분리기는 (Hanil사, Korea), clean bench는 (동의과학사, Korea), CO₂ incubator는 (Samyo사, Japan), microplate reader는 (Synergy-HT사, USA), 감압농축기는 (Eyela사, Japan), ultraviolet transilluminator는 (Htech사, Korea), 자동현상기는 (QX-130II사, Konica) 제품을 사용하였다.

4) 세포주

실험에 사용된 세포주인 HDF (Human dermal fibroblasts), B16/F10 mouse melanoma는 한국 세포주 은행 (Korea)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 시료 추출

용담화는 각 시료 중량에 10배의 95% 에탄올을 가하여 상온에서 72시간 방치하고 그 추출액을 9,000rpm으로 15분간 원심 분리하여 얻은 상층액을

여과지 (Whatman No. 2)로 여과한 후 필터링한 다음 감압농축하여 3일 동결 건조한 후 그 분말을 본 실험에 사용하였다.

2) 세포 배양

분양받은 B16/F10 mouse melanoma 세포, HDF 세포는 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

3) 세포 생존율 측정

실험에서 사용된 시료의 세포 독성을 나타내는 농도 범위는 neutral red (NR) assay를 이용하여 확인하였다⁹⁾. B16/F10, HDF 세포를 96 well plate에 well 당 3×10⁴ 세포로 분주하여 24시간 동안 전 배양하였다. 세포가 well plate에 충분히 부착된 것을 확인한 후 무혈청 배지를 이용하여 용담화를 농도별로 첨가하고 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양한 세포는 배양액을 NR solution이 1% 포함된 무혈청 배지로 교환하여 3시간 배양한 다음 현미경으로 NR의 결정화 유무를 확인하였다. Formaldehyde 용액 10%가 첨가된 phosphate buffered saline (PBS)을 각 well에 100 μ l로 20분 처리하여 세포를 고정하였다. NR desorb solution (1% glacial acetic acid, 49% ethanol, 50% distilled water)을 각 well에 100 μ l 분주하여 세포내의 NR을 추출하고 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시료첨가군 흡광도}}{\text{시료무첨가군 흡광도}} \times 100$$

4) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능 측정

DPPH 라디칼은 매우 안정한 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)이며, 이 라디칼을 소거하는 정

도로써 항산화 작용을 평가할 수 있고 추출물의 라디칼 소거활성은 Blois의 방법으로 측정하였다¹⁰⁾. 용담화 에탄올 추출물을 10~50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 용해시킨 후 96 well plate에 0.2mM로 용해시킨 DPPH 용액 180 μl 와 시료액 20 μl 씩 첨가하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 517nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준물질은 ascorbic acid를 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거활성(%) = 100 -

$$\left[\left(\frac{\text{시료첨가군 흡광도}}{\text{시료무첨가군 흡광도}} \right) \times 100 \right]$$

5) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

용담화 추출물이 tyrosinase 생성에 미치는 영향을 확인하고자 ELISA 방법을 이용하였다. 먼저 B16/F10 세포를 96 well plate에 2×10^3 /well로 부착하였다. 세포 부착을 확인한 후 멜라닌 생성을 촉진하기 위하여 혈청 5%와 α -MSH 10 μM 이 포함된 배지로 교환 후, 시료를 각 농도별로 처리하였다. 그 다음날 배양 상층액을 제거한 후 washing buffer (Tween 20 in PBS)로 3번 세척하였다. Blocking buffer (0.1% BSA in PBS) 100 μl 로 처리한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 배양시킨 다음 상층액을 제거하고 washing buffer (Tween 20 in PBS)로 3번 세척하였다. 1:1000으로 희석한 일차항체 (anti-tyrosinase mouse antibody in 0.1% BSA/well) 50 μl 로 처리한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 배양시킨 다음 상층액을 제거한 후 washing buffer (Tween 20 in PBS)로 3번 세척하였다. 1:4000으로 희석한 이차항체 (anti-mouse IgG antibody in 0.1% BSA/well) 50 μl 로 처리한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 배양시킨 다음 상층액을 제거한 후 washing buffer (Tween 20 in PBS)로 5번 세척하였다. 1mg/ml의 농도로 녹인 para-nitrophenylphosphate (pNPP) 100 μl 를 각 well당 처리한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 암실에서 1시간 배양시킨 다음 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

용담화 추출물이 HDF세포에서 MMP-1 생성에 미치는 영향도 일차항체 (anti-MMP-1 mouse antibody)와 이차항체 (anti-mouse IgG antibody)를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 측정하였다.

6) Western blot 분석

용담화 추출물이 MMP-1 발현과 관련이 있는 kinase들의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Western blot 방법을 이용하여 단백질 발현양을 측정하였다. UVB 조사 후 용담화 추출물을 농도별로 처리하고 세포를 수거하여 PBS로 세척 후 RIPA buffer (50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, proteaseinhibitor cocktail (Roche, Switzerland))로 30분간 용해시킨 후 12,000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 원심 분리하여 상등 액을 회수하였다. 회수된 상등 액은 SDS sample buffer (60 mM Tris (pH 6.8), 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 25% glycerol, 2% SDS, 0.1% bromo-phenol blue)를 첨가하고 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 denaturation 시킨 후 단백질을 SDS-PAGE로 분자량별로 분리하였다. 분리된 단백질은 100 V의 조건에서 1시간 동안 nitrocellulose membrane (Whatman, UK)으로 전이시키고 0.1% BSA 용액으로 blocking 시킨 후 membrane을 anti-p-JNK, anti-p-ERK primary antibody 용액에 담가 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간 반응시켰다. TBS/T (10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20)로 5분씩 3회 세척하였다. 세척된 membrane을 화학적 형광을 낼 수 있는 horse radish peroxidase (HRP)가 결합되어 있는 anti-mouse IgG antibody 용액에 담가 상온에서 2시간 처리 후 다시 TBS/T로 5분씩 3회 세척하였다. 이차항체가 처리된 membrane은 super signal west pico solution (Pierce, USA)을 처리하고 암실에서 실험용 필름 (Konica, Japan)으로 덮어 필름에 감광을 유도한 후 자동현상기 (QX-130II, Konica)를 이용하여 현상하였다. 현상된 필름 상에 있는 단백질

band는 densitometer program인 Image J (NIH, USA)를 이용하여 band 크기의 변화를 측정하였다.

7) Melanin 생성 억제능 측정

B16/F10 melanoma 세포를 이용하여 용담화의 멜라닌 생성 억제능을 측정하였다¹¹⁾. 96 well plate에 B16/F10 세포를 2×10^3 /well로 분주하고, 세포가 바닥에 부착할 수 있도록 24시간 동안 전 배양하였다. 세포 부착 확인 후 melanin 생성을 촉진하기 위하여 혈청 5%와 α -MSH 10nm이 포함된 배지로 교환 후, 시료를 각 농도별로 처리하였다. 양성 대조군 arbutin을 배양용 배지에 용해하여 사용하였으며, 분비된 멜라닌의 양은 405nm에서 측정하였고 멜라닌 생성량을 α -MSH 무처리군과 비교하여 백분율로 표시하였다.

8) Mushroom-tyrosinase를 이용한 tyrosinase 저해능 측정

L-DOPA를 기질로 사용하여 tyrosinase 저해능을 측정하였다. L-DOPA를 기질로 사용할 때 반응이 신속하게 일어나므로 효소의 양을 줄여서 실험하였다. 효소액은 mushroom tyrosinase (5.8mg solid; 4276 units/mg solid, Sigma) 1mg/20ml의 0.1M phosphate buffer (pH 6.0)에 녹여 사용하였다. 기질 농도로 L-DOPA는 1mg/ml을 sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.0)로 완전히 녹이고, L-DOPA 1mg/ml을 100 μ l, 각각의 시료 50 μ l, tyrosinase 50 μ l를 96 well plate에 순서대로 분주한 후 37 $^{\circ}$ C에서 3 min 반응시킨 후 475nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 arbutin을 sodium phosphatebuffer (0.1 M, pH 6.0)로 단계적으로 희석하여 100, 200, 300 μ g/ml 농도로 실험군과 동일하게 첨가하였다.

9) 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였으며, 분석 수치는 Mean \pm S.D로 표시하였고SPSS (Statistical Package for the Social Science) WIN 17.0 프로그램을 이용하였

으며 통계분석은 ANOVA Test에 의해 분석하였다. 통계적 유의성은 *p<0.01, **(##)p<0.001로 표기하여 유의성의 차이가 있는 것으로 판단하였다.

III. 실험 결과

1. Neutral Red (NR)에 의한 세포 생존율 측정

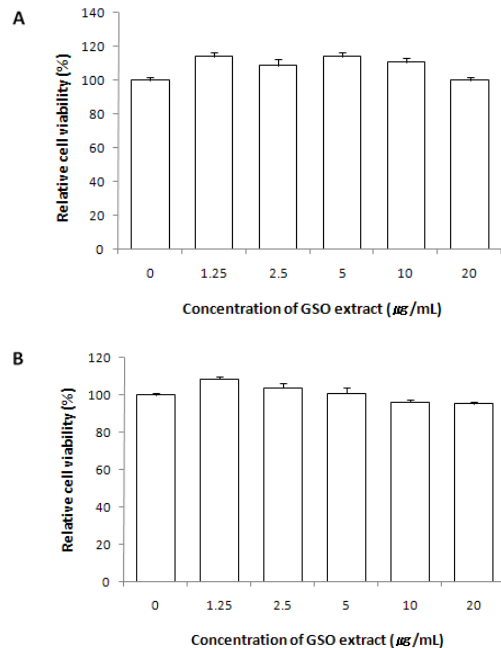


Fig. 1. Effect of Gentianae sino-ornata extract on cell viability.

HDF cells (A) and B16/F10 cells (B) were plated at 3×10^4 cells/well and incubated in media containing from 1.25 to 20 μ g/ml for 48 hours. Cell viabilities were measured by NR assay as described in materials and methods. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D.

HDF 세포와 B16/F10 세포에 용담화 에탄올 추출물의 세포독성을 보기 위해 NR assay를 통해 세포 생존율을 조사 하였다. 각 세포에 용담화 추출물을 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μ g/ml로 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 후 NR assay를 수행하였다. 실험 결과 용담화의 모든 농도에서 세포생존율이 HDF 세포

는 95% (Fig. 1A), B16/F10 세포는 100% (Fig. 1B) 이상으로 나타나 세포 독성이 없는 것으로 확인 할 수 있었다.

2. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능 측정

항산화제는 보라빛의 DPPH 라디칼 (DPPH-)을 무색(DPPH-H)의 형태로 전환시키는데 본 실험에서 DPPH를 이용한 free- radical 소거 활성을 측정한 결과 10 μ g/ml의 용담초 추출물을 처리 하였을 때는 크게 변화가 보이지 않았으나 50 μ g/ml 농도에서는 55%의 높은 DPPH radical 소거능을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 따라서 본 실험에서는 고농도 용담초 추출물을 처리하였을 경우 DPPH radical 소거능이 높게 나오는 것을 확인 할 수 있었다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거활성(\%)} = 100 - \left[\left(\frac{\text{시료첨가군 흡광도}}{\text{시료무첨가군 흡광도}} \right) \times 100 \right]$$

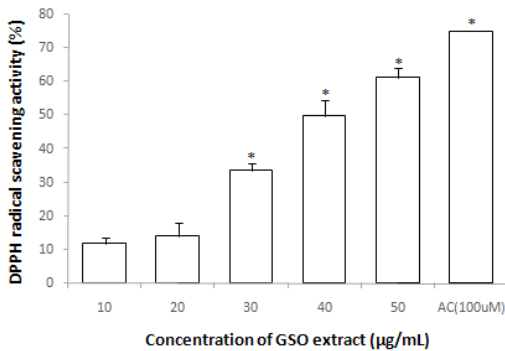


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of *Gentianae sino-ornata* extract.

DPPH radical scavenging activity was measured as described in materials and methods. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. *p<0.01 compared with ascorbic acid.

3. Matrix metalloproteinase (MMP-1) 발현 억제능

MMP-1은 세포외 기질을 분해시키는 단백질이며, 과도하게 활성화되면 MMP의 생성을 억제하는 tissue inhibitor of MMPs (TIMP)가 발현되어 서로 상호작용에 의해 조절되고 있다¹²⁾. 이러한 MMPs의 발현과 활성이 증가하게 되면 collagen 분해를 촉진시켜 피부 노화를 일으키는 중요한 원인이 된다. 본 실험에서는 용담화 추출물이 MMP-1의 생성 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 용담화 추출물을 HDF세포에 24 시간 동안 처리한 후 배양 상층액을 취하여 ELISA 방법으로 MMP-1 함량을 측정하였다. UVB 25 mJ/cm²를 조사한 HDF 세포에 용담화 추출물을 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μ g/ml을 처리한 결과, 용담화 추출물 5 μ g/ml 까지 농도 의존적으로 MMP-1 발현을 억제하였다 (Fig. 3).

용담화 추출물이 MMP-1의 발현을 억제할 수 있는 것은 MMP-1 발현에 관련된 kinase들의 활성을 억제 하기 때문이라고 사료되어 이에 관련된 kinase 중 JNK와 ERK의 활성화 변화를 Western blot 분석으

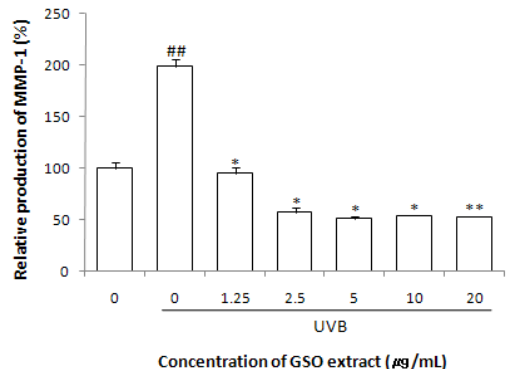


Fig. 3. Effect of *Gentianae sino-ornata* extract on MMP-1 production in UVB-irradiated HDF cells.

HDF cells were pretreated with GSO followed by UVB irradiation (25mJ/cm²). MMP-1 production was measured by ELISA assay as described in materials and methods. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. ##p<0.001 compared with control, and *p<0.01, **p<0.001 compared with the UVB-irradiated group.

로 조사하였다. 실험 결과, UVB 조사는 p-JNK와 p-ERK의 발현을 증가시켰고 용담화 추출물 5, 20 μ g/ml의 농도에서 이들의 발현 양은 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 UVB가 조사된 HDF 세포에서 용담화 추출물은 JNK와 ERK의 인산화를 억제하여 MMP-1 발현을 억제하는 것으로 사료된다(Fig. 4).

본 실험에서 나타나듯이 용담화 추출물은 자외선과 급성 피부장벽 손상에 의해 유발되는 피부 조직과 세포내 손상을 완화 혹은 개선할 수 있을 것으로 사료된다.

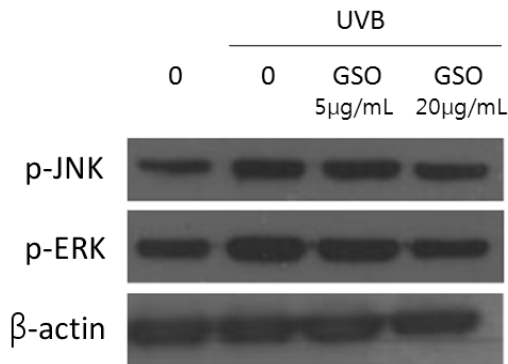


Fig. 4. Effect of *Gentianae sino-ornata* extract on protein expression levels of p-JNK and p-ERK in UVB-irradiated HDF cells.

HDF cells were pretreated with 5, 20 μ g/ml of GSO extract followed by UVB irradiation(25mJ/cm). Cells were lysed and cellular proteins were then separated by SDS-PAGE, followed by Western blot analysis using antibodies against phospho-JNK (p-JNK) or phospho-ERK (p-ERK), Actin was used as an internal control.

4. Melanin 생성 억제 효과

멜라닌은 외부 환경으로부터 피부세포를 보호해 주는 역할을 하지만 자외선 노출 및 피부노화로 인해 생리기능이 떨어지게 되면 멜라닌이 국소적으로 과도하게 합성되거나 피부표면에 침착되어 기미, 주근깨 및 다양한 색소 침착을 형성하고 심하게는 피부암을 유발하는 것으로 알려져 있다¹³⁾. 본 실험에서는 용담

화 추출물이 melanin생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 시료를 B16/F10 세포에 농도별로 처리하여 melanin 생성 억제능 실험을 하였다. B16/F10 세포에 멜라닌세포 자극호르몬 (α -Melanocyte Stimulating Hormone, α -MSH) 10nm을 처리하여 melanin생성을 유도하고 동시에 용담화 추출물 1.25, 2.5, 5, 10, 20 μ g/ml의 농도로 처리한 후 melanin 생성량을 비교하였다. 실험 결과 α -MSH 단독 처리 한 경우 melanin 함량이 대조군에 비하여 뚜렷하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며, 용담화 추출물을 20 μ g/ml의 농도로 처리한 경우 melanin 생성이 각각 56% 억제되었다(Fig. 5). 이상의 결과 용담화 추출물은 미백 활성 성분 원료로 사용할 가능성이 충분하다고 사료 된다.

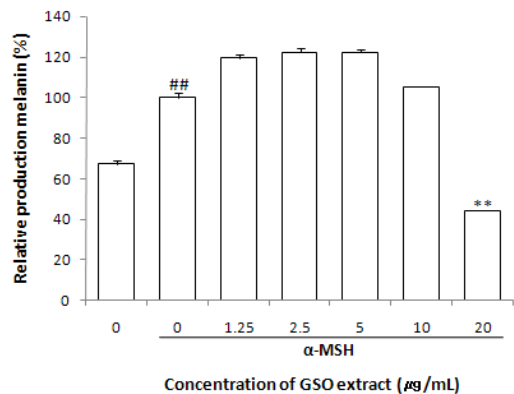


Fig. 5. Effect of *Gentianae sino-ornata* extract on melanin production in B16/F10 cells stimulated with α -MSH.

Effect on melanin production was tested with various doses of *Gentianae scabrae* extract and α -MSH. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. ##p<0,001 compared with control, and **p<0,001 compared with α -MSH treated group.

5. Tyrosinase 발현능 측정

1) 용담화 추출물의 mushroom tyrosinase 저해효과

용담화 추출물이 melanin 생성의 중요 효소인

tyrosinase에 미치는 영향을 조사하기 위하여 mushroom tyrosinase를 이용하여 효소 활성에 미치는 영향을 알아보았다. 알부틴은 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군 GSO 1 $\mu\text{g/ml}$ 에 비해 6.4% 효소 활성 억제를 보였으나, 용담화 추출물은 같은 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 15.3%의 효소 활성 억제 효과를 보여 알부틴 보다 우수한 tyrosinase 효소 억제 효과를 보였다(Fig. 6). 그러나 실제로 세포실험이 진행된 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 9.6%의 낮은 저해 효과를 보여 실제로 용담화 추출물의 melanin 생성 억제가 tyrosinase 효소의 저해 때문이라고 보기에는 어려움이 있다.

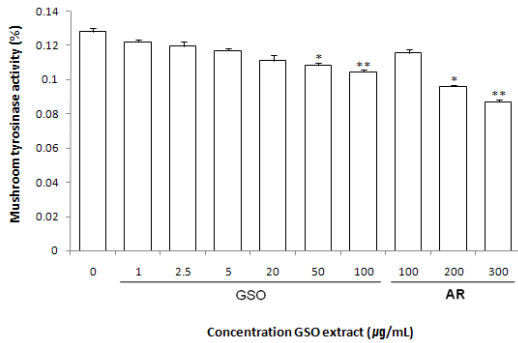


Fig. 6. Effect of *Gentianae sino-ornata* extract on mushroom tyrosinase activity.

Effect on mushroom tyrosinase activity was tested with various doses of GSO extract and compared with arbutin(AR). The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ compared with control.

2) 용담화 추출물의 tyrosinase 발현 억제효과

B16F10 세포에서 용담화 추출물의 melanin 생성 억제 기전을 설명하기 위하여 ELISA 방법으로 용담화 추출물이 tyrosinase 발현 억제 효과에 미치는 영향을 조사 한 결과 용담화 추출물 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 tyrosinase의 발현을 10.9% 억제하였고, 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 24.2%를 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 7). 따라서 용담화 추출물은 B16/F10 세포에서 tyrosinase의 발현을 억제하여 melanin 생성을

억제하는 것으로 보인다.

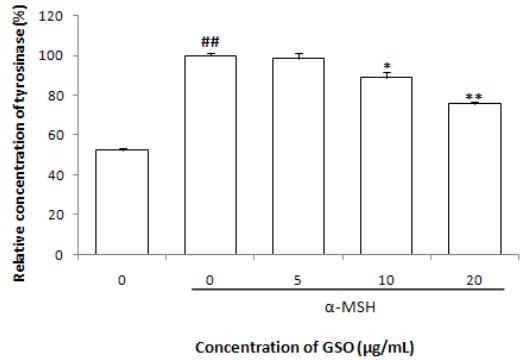


Fig. 7. Effect of *Gentianae sino-ornata* extract on tyrosinase expression in B16F10 cells stimulated with α -MSH.

Effect on tyrosinase expression was tested with various doses of GSO extract and compared with α -MSH in B16F10 cells. The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D. ## $p < 0.001$ compared with control, and * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ compared with α -MSH treated group.

IV. 고 찰

최근 생명공학의 발전과 생활수준의 향상으로 젊고 탄력적인 피부를 유지하고자 하는 미에 대한 욕구가 강해져 의학적 기술을 포함한 다양한 기능성 화장품 및 미용 식품의 시장 규모가 확대되고 있다. 특히, 안전성이 입증되었고 풍부한 임상 경험을 가지고 있는 한약재 연구는 동서양의 의학적 지식이 더해져 신약 개발을 주도하고 있다¹⁴⁾.

피부 노화와 색소 병변의 주요 원인이 지속적인 자외선 노출로 생성된 과잉 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의한 산화적 스트레스로 밝혀짐에 따라 피부노화를 지연시키고 억제하기 위해서는 생체 내 뿐만 아니라 피부에서의 과잉 활성 산소종을 억제하고 활성산소를 효과적으로 제거할 수 있는 항산화 방어시스템이 필요하다¹⁵⁾.

한의학에서는 인체를 소우주라 하는데, 피모는 피부, 한선, 호모 등 조직을 포괄하며 체표에 해당한다.

《素問:五臟生成篇》에서 “肺之合皮也, 其榮毛也, 其主心也”라고 하였고 《靈樞:本臟篇 20》에서는“衛氣所以溫分肉, 充皮膚, 肥腠理, 可開闔也”라 하여 피부는 위기 및 폐의 선발 작용에 의해 기능을 발휘한다. 이와 같이 피부는 폐와 심등 체내 여러 장기와 연관되어 있기 때문에, 肺主氣, 心主血의 관점에서 피부의 기혈 순환을 고려해야 한다고 하였다¹⁶⁾.

피부의 결합조직은 collagen과 elastin에 의해 이루어지며 노화로 인해 피부가 약해지거나 반복적인 자외선의 노출은 어두운 피부톤과 피부에 metalloproteinases (MMPS)를 증가시키고 MMPs는 피부의 collagen을 분해하며 이런 현상의 반복으로 인해 피부 주름이 가속화 된다²⁾. 이러한 피부 조직 내 변화는 외부 물질의 피부 흡수 및 수분 증발을 조절하는 정상적인 피부 장벽 기능에 손상을 입히고, 피부 두께를 증가시키며 진피층의 구조를 손상시켜 궁극적으로 주름을 유발시키게 된다¹⁷⁾.

MMP-1은 세포의 기질을 분해시키는 중요한 단백질이며, 과도하게 활성화되면 MMP의 활성을 억제하는 tissue inhibitor of MMPs (TIMP)가 발현되어 서로 상호작용에 의해 조절된다¹⁸⁾. 이러한 MMPs의 발현과 활성이 증가하게 되면 collagen 분해를 촉진시켜 피부노화를 일으키는 중요한 원인이 된다¹⁹⁾.

피부세포의 결합조직을 구성하는 성분인 collagen은 섬유아세포(fibroblast)에서 생성되는 주요 기질 단백질로 진피층의 약 90%를 차지하고 있다²⁰⁾. Collagen은 결합조직의 탄력을 나타내며 진피를 구성하고 피부의 주름과 보습기능을 갖고 있는데 트립신과 같은 단백질 분해효소의 작용을 받지 않고 collagenase에 의해 분해된다²¹⁾. Collagen 분해에 따른 감소는 피부 탄력을 유지하는 결합조직이 파괴되어 주름과 탄력저하, 피부 처짐의 원인으로 나타나며 collagen의 주된 기능으로는 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포 접착의 지탱, 세포분화와 분화의 유도 등이 알려져 있다. 이러한 collagen은 연령 및 자외선 조사에 의한 광노화에

의해 감소하며, 이는 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다²²⁾. 따라서 collagenase는 세포외 기질 단백질을 분해하는 효소로 피부의 주름 생성 등에 직접적인 영향을 미친다²³⁾.

본 실험에서 MMP-1 활성 변화에 미치는 영향을 조사한 결과 HDF세포에 용담화 추출물을 첨가하면 이들의 활성이 감소 하였고, HDF세포에 UVB를 조사하면 p-JNK와 p-ERK의 발현양이 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 UVB가 조사된 HDF 세포에서 용담화 추출물은 JNK와 ERK의 활성화를 억제하여 MMP-1 발현을 억제하는 것으로 생각된다.

Melanin의 합성은 tyrosinase가 melanin 생성 첫 단계를 일으키는 효소로, tyrosin이 DOPA를 거쳐 DOPAquinone으로 전환되고, DOPAquinone으로부터 자동산화반응과 효소반응으로 DOPA chrome을 거쳐 흑갈색의 공중합체인 melanin이 생성되게 된다^{24,25)}. Melanin은 표피의 기저층에 존재하는 melanocyte내의 melanosome이라는 소포체에서 먼저 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1)과 dopachrome tautomerase (DCT)등의 효소에 의해 melanin이 생성된다²⁶⁾. 멜라닌은 인체의 피부에 존재하며 자외선에 대한 보호기능을 수행한다. 그러나 과도한 멜라닌 생성은 색소 침착을 유발하여 인체에 기미, 주근깨, 오타모반, 검버섯, 반점 등을 형성하고, 피부노화를 촉진하며 피부암의 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다²⁷⁾.

따라서 본 실험에서 용담화 에탄올 추출물이 melanin 생성의 중요 효소인 tyrosinase에 미치는 영향을 조사한 결과, 용담화 추출물 10 μ g/ml 농도에서 대조군에 비해 tyrosinase 발현을 10.9% 억제하였고, 20 μ g/ml 농도에서는 24.2%를 억제하였으며, 이는 mushroom tyrosinase 저해 효과를 관찰한 결과에서도 같은 경향으로 나타났다.

이상의 연구 결과 용담화 에탄올 추출물은 멜라닌 및 콜라겐 생성에 높은 효능으로 피부 노화를 예방하며 자외선과 급성 피부장벽 손상에 의해 유발되는 피

부 조직과 세포내 손상을 완화 혹은 개선할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 용담화 에탄올 추출물의 멜라닌 및 콜라겐 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16/F10 세포, HDF 세포들을 활용하여 세포독성과 멜라닌 생성 억제, MMP-1 발현 변화를 실험하였고, Western blot 분석으로 p-ERK, p-JNK 단백질 발현 양을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 용담화 추출물은 20 μ g/ml 농도에서 HDF 세포와 B16/F10 세포의 생존율이 95% 이상 나타나 세포 독성이 없는 것을 확인하였다.
2. 용담화 에탄올 추출물은 HDF 세포에서 MMP-1 생성을 억제하였으며 JNK와 ERK의 인산화를 억제하였다.
3. 용담화 에탄올 추출물은 B16/F10 세포의 melanin 생성과 tyrosinase 발현을 유의하게 감소시켰다.

이상의 연구 결과 용담화 에탄올 추출물은 멜라닌 및 콜라겐 생성에 효능이 있어 자외선과 급성 피부장벽 손상에 의해 유발될 수 있는 피부 조직과 세포내 손상을 완화 혹은 예방하므로써 항노화작용을 할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2015학년도 원광대학교 교내연구비 지원에 의해 수행됨

References

1. Jeun JA, Lee SJ. Application of Nurigenomics in the Beauty Foods Research, Food Sci Ind. 2007;40(4):27-30.
2. Pyo YH, Son JH, Choe TB. The Effect of Celosia cristata L. ethanol Extract on Anti-oxidant & Anti-aging Activity. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 2008;23(5):431-8.
3. Yang HJ, Won BR, Lim YJ, Yoon SK, Ji DH et al. Antioxidative Activity, Component Analysis, and Anti-elastase Effect of Aspalathus linearis Extract. J. Soc. Cosmet. Scientists Korea. 2007;33(4):251-62.
4. Oh SJ. Aging of Human Body. Tamkudang, Seoul, Korea, 2005;204-5.
5. Slominski A, Desmond J, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. Journals of the American Physiological Society. 2004;84(4):1155-228.
6. Lee JG, Kim EW, Lee JH. Effect of Gentianae Radix on Neurogenesis and Apoptosis in Hippocampus of Ethanol-induced Newborn Rats. J Oriental Neuropsychiatry. 2010;21(2): 29-44.
7. Park JH. An illustrated book of medicinal plants. Shinil company. Seoul, 2000; 306-8.
8. Kim CM, Shin MK, Ann DG, Lee CS. Great dictionary of Chinese Herb, Jhungdam company. Seoul, 1998;7:3178.
9. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicol Lett. 1984;24(2-3):119-24.
10. Blois MS. Anti oxidant deter minations by the

- use of stable free radical, *Nature*, 1958;18: 1199-20.
11. Lim HW, Yoon MY, Cha SB, Kim KW, Park YK, Lee JY. Effects of citrus essential oils melanin production in B16 melanima cell. *J Yakhak Hoeji*, 2003;47:15-30.
 12. Homebeck W. Downregulation of tissue inhibitor of matrix metallo protease-1(TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *J Pathol Biol*, 2003;51(10):569.
 13. Kubo M, Matsuda H. Development tudies of cuticle and medicinal drug from natural sources on melanin biosynthesis. *Fragrance J*, 1995;8:48-55.
 14. Pratt DE, Birac PM. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J Food Sci*, 1979;44:1720-28.
 15. Ryu IS, Lee SJ, Lee SW, Mun YJ, Woo WH, Kim YM et al. Dermal Bioactive Properties of the Ethanol Extract from Flowers of *Lespedeza bicolor*. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 2007;20(2):1-9.
 16. No ST. Study of Skin Depigmenting Mechanism of the Ethanol Extract of *Fagopyrum esculentum*. Wonkwang University, 2006.
 17. W laschej M, Brivib K, Stricjlin GP, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Singlet oxygen may ediate the ultraviolet A in induced synthesis of interstitial collagenase. *J. Invest. Dermatol*, 1995;104:194.
 18. Won OY. Efficacy Evaluation of Deramal Bioactive Properties of the Chealbakgo Extract. Kwangju Women's University, 2014.
 19. Haratake A, Uchida Y, Schmuth M, UVB-induced alterations in permeability barrier function: roles for epidermal hyperprolifera-tion and thymocyte-mediated response. *J Invest Dermatol*, 1998;108:769-75.
 20. Homebeck W. Downregulation of tissue inhibitor of matrix metallo protease-1(TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *J Pathol Biol*, 2003;51(10):569.
 21. Do JR, Baek SY, Im SD, Kim YM, Kim IH, Han DS et al. Selection of beauty material from Fruits and Vegetables. *J Kor Soc Food Sci, Nutr*, 2008;10:248.
 22. Zague V. A new view concerning the effects of collagen hydrolysate intake on skin properties. *Arch. Dermatol. Res*, 2008;300: 479-83.
 23. Inouye H, Nakamura Y. Studies on monoterpene glucosides and related natural products. XVI. Occurrence of secoiridoid glucosides in gentianaceous plants especially in the genera *Gentiana* and *Swertia*. *Yakugaku Zassh*, 1971;91(7):755.
 24. Brinckmann J, Acil Y, Wolff HH, Muller PK. Collagen synthesis in (sun-) aged human skin and in fibroblasts derivedf rom sun-exposed and sin-protected body sites. *Photochem Photobiol B*, 1995;27:33-8.
 25. Chang YH, Kim C, Jung M, Lim YH, Lee S, Kang S. Inhibition of melanogenesis by selina-4(14), 7(11)-dien-8-one isolated from *Atractylodis Rhizoma Alba*. *Biol Pharm Bull*, 2007;30:719-23.
 26. Hearing VJ, Jimnez M. Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int J Biochem*,

1987;19:1141-7.

27. Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J Pharm Pharmacol*, 1994;46:982-5.
28. Seo CW. Studies on Antioxidant and Whitening Efficacy of Extracts from *Smilax china* L. by Supercritical CO₂. Ajou University, 2006.