

육종용 추출물의 미백과 항노화 효과

양원태 · 김경숙 · 권용삼 · 김두현 · 김도훈

Whitening and anti-aging effects of *Cistanche deserticola* extract

Won Tae Yang · Kyoung Sook Kim · Yong Sham Kwon · Du Hyun Kim · Doh Hoon Kim

Received: 10 October 2016 / Revised: 31 October 2016 / Accepted: 1 November 2016
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study assessed the whitening and anti-aging effects of the *Cistanche deserticola* extract, to develop a cosmetic substance. The cell viability of the *Cistanche deserticola* extract was evaluated in B16F10 melanoma cells by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. The cell viability of the extract was determined to be 90% at 4mg/ml concentration. Furthermore, the tyrosinase, collagenase, and elastase mRNA expression level were measured by RT-PCR, using the *Cistanche deserticola* extract treated B16F10 melanoma cells. At 4 mg/ml concentration, mRNA expression level of tyrosinase, collagenase, and elastase was dramatically decreased to 80.9%, 37.6%, and 70.9%, respectively. The antioxidant activity of the *Cistanche deserticola* extract was determined by DPPH free radical scavenging. The DPPH free radical scavenging capacities ranged from 70.6% to 82.6%, when evaluated from 2 mg/ml to 10mg/ml concentrations. The effects of whitening and anti-aging of the *Cistanche deserticola* extracts were examined at 2, 4, 6, 8, and 10 mg/ml concentration. Tyrosinase activities were inhibited from 66.8% to 78.5%, elastase activities were inhibited from 67.6% to 79.3%, collagenase activities were inhibited from 72.3% to 83.6%, and hyaluronidase activities were inhibited from 65.8% to 69.2%, respectively. These data suggest that the *Cistanche deserticola* extract is effective in whitening and anti-aging; therefore, it is considered to be a functional cosmetic material in cosmetic products.

Keywords Cosmetic product, Tyrosinase, Elastase, Collagenase, Hyaluronidase

서론

생활수준의 향상과 노령화 사회의 가속화로 인하여 현대인들은 외적인 미에 대한 관심이 증가 하면서 피부의 기능뿐만 아니라 피부 노화에 대한 관심 또한 크게 증가하고 있다. 피부는 외부의 자극으로부터 인체를 보호해주는 방어 조직이며, 피부색은 멜라닌과 카로틴 등의 색소 성분의 양과 분포, 혈관의 분포 및 혈액, 각질층의 두께 및 피부 자체의 두께와 색 등에 의해 결정된다.

피부 노화는 유전적 요인, 나이가 들어감에 따른 호르몬의 변화, 대사적 과정 등의 내적 요인과 오염된 환경, 야외활동 증가에 따른 장기적 자외선 노출과 사회활동에서 오는 스트레스 증가에 따른 활성산소의 증가 등 다양한 외적 요인이 피부 조직의 콜라겐과 엘라스틴을 변성시켜 피부 탄력을 저하시키고 피부 주름을 생성함으로써 피부 노화를 촉진한다. 이로 인하여 건강기능성식품과 기능성화장품에 대한 관심과 수요가 증가하고 있으며, 생리활성물질을 이용한 기능성 화장품 개발 연구가 활발히 진행되고 있다(Lim and Kim 2009; Kim et al. 2006; Gang et al. 2009). 또한, 염증은 피부가 붓고 열을 동반한 통증과 피부의 기능장애 등을 일으키며, 그 주된 원인은 미생물 감염 및 자가 면역 질환으로 알려져 있다(Jeong et al. 1997). 최근 천연물에서 분리된 생리활성 물질들의 미백, 항산화, 항균, 보습 등의 피부노화 억제 효과가 밝혀지고 있으며, 건강기능성식품의 항산화 활성 및 항노화 효과에 대한 연구도 이루어지고 있다(Mun and Park 1995; Kligman 2000; Kim et al. 1994; Sharman et al. 1994).

Ascorbic acid와 arbutin 등의 물질은 화장품의 소재로 많이 이용되고, 강한 항산화 효과 및 미백효과를 가지고 있

W. T. Yang · K. S. Kim · Y. S. Kwon · D. H. Kim · D. H. Kim (✉)
동아대학교 생명자원과학대학
(College of Life Science and Natural Resources, Dong-A University,
Busan, 604-714, Korea)
e-mail: dhkim@dau.ac.kr

으나 경제성과 안전성문제로 인하여 대체 물질의 개발이 필요하며, 최근에 천연물 유래의 생리활성 물질을 이용한 항산화 및 항노화 기능을 가진 화장품 소재 개발과 관련된 많은 연구가 이루어 지고 있다(Lee et al. 2006; Lee and Cho 2007).

본 연구에 이용된 육종용은 *Cistanche* 속, 열당과에 속하는 약용식물로서 중국 서부의 사막지대에서 자라며 *Haloxylon ammidendrum* 의 뿌리에 기생하는 약용 식물이다. 육종용은 1980년대부터 현재까지 일본과 중국의 연구자들로부터 많은 관심을 받아왔으며 17개의 phenylethanoid glycosides 화합물이 분리되었고, 약리작용으로는 항산화작용, 항노화작용, 항염작용 및 진정작용 등이 보고되어 있다(Lu 1998; Kobayashi et al. 1984; Kobayashi et al. 1984; Kobayashi et al. 1985). 따라서 본 연구는 육종용을 이용한 기능성 화장품 소재개발을 목적으로 생리활성 물질의 항산화 및 항노화 관련 효능을 검정하였다.

재료 및 방법

시료 추출

건조한 육종용 분말 시료150 g에 물 1L을 가하여 40°C에서 24시간 동안 처리하여 3회 추출하였고, Whatman No. 2 여과지로 여과하여 얻어진 여과액을 감압 농축한 후 실험에 사용하였다.

MTT assay

B16F10 melanoma 세포를 이용하여 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay를 수행하였다. 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100U/ml)과 streptomycin (100ug/ml)이 첨가된 Dulvecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco-BRL, Rockville, MD)에 B16F10 melanoma 세포를 넣어 37°C 온도조건으로 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 안정화 시킨 후 실험에 이용하였다.

배양된 B16 melanoma 세포를 6-well plate에 1X10³ cell/well로 분주하여 배양한 다음 육종용 추출물을 각각 다른 농도로 희석시켜 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 PBS로 세척하고 100 ul의 MTT 용액 (5 mg/ml)을

각 well에 가하여 37°C 배양기에서 4시간 정치한 후 MTT 용액을 제거하였다. 그리고 100 ul DMSO를 가하여 세포 내에 형성된 formazan 결정체를 용해한 후 570 nm에서 ELISA plate reader (Bio-rad, Hercules, CA)를 이용하여 세포생존율을 측정하였다.

피부노화 관련 유전자의 발현 검정

육종용 추출물을 처리한 B16F10 melanoma 세포에 Trizol reagent (Sigma, USA) 를 이용하여 Total RNA를 추출하였다. Total RNA 1ug을 Tetro cDNA synthesis kit (BioLine, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였고, single stranded cDNA에 10X buffer 2 ul, 10 mM dNTP 1.6 ul, 25 mM MgCl₂ 1.6 ul, 500 U Ex Taq polymerase 0.2 ul와 각각 1 ul의 유전자 특이적 primer (Table 1)를 가하여 RT-PCR을 수행하고 유전자 발현을 검정하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl hydrazyl) 용액을 methanol에 녹여 0.2 mM로 준비하였다. 시료와 DPPH용액을 1:4 비율로 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 흡광광도계(U-5100, HiTachi, Japan)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 활성은 DOPA oxidase 활성을 측정한 것으로 나타났다. DOPA oxidase 활성은 L-DOPA를 기질로 하여 tyrosianse에 의해 생성되는 반응산물인 dopachrome을 492 nm에서 측정했다. 각 처리구의 tyrosinase 활성측정을 위해 67 mM phosphate buffer (pH6.8)에 녹인 L-DOPA (8.3 mM) 120 ul에 40 ul 육종용 추출물과 tyrosinase (125 U) 40 ul을 가하고, 37°C에서 10분간 반응시킨 후 흡광광도계를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Elastase 저해 활성 측정

Elastase 활성 측정은 육종용 추출물 100 ul와 50 mM Tris-HCl buffer (pH8.6)에 녹인 elastase pancreatic solution Type I : from Porcine Pancreas (0.6 unit/ml)용액 50 ul에 50 mM Tris-HCl

Table 1 List of primers used for RT-PCR analysis in this study

Name	Forward primer (5'to3')	Reverse primer (5'to3')
<i>Collagenase</i>	<i>CTCGAGGTGGACACCACCT</i>	<i>CAGCTGGATGGCCACATCGG</i>
<i>Tyrosinase</i>	<i>CATTTTGATTGAGTGCT</i>	<i>TGTGGTAGTCGTCTTTGTCC</i>
<i>Elastase</i>	<i>TGCTGATGACATACGTGGCA</i>	<i>AGGATTTGGCAAGCGTTGG</i>
<i>β-Actin</i>	<i>ACCGTGAAAAGATGACCCAG</i>	<i>TACGGATGTCAACGTCACAC</i>

buffer (pH8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide (1 mg/ml)을 100 μ l 가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 흡광광도계를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Collagenase 저해 활성 측정

Collagenase 활성 측정을 위해 1M Tris-HCl buffer (pH7.5)에 4mM CaCl₂와 4-phenylazovenzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-Arg (0.3 mg/ml)를 녹인 기질액 250 μ l에 육종용 추출물 100 μ l와 collagenase (0.2 mg/ml) 150 μ l를 가한 후 실온에서 20분간 배양하고 6% citric acid 500 μ l을 넣어 반응을 정지시켰다. Ethylacetate 1.5 ml을 가한 후 상등액을 취하고 흡광광도계를 이용하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase의 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Hyaluronidase 저해 활성 측정

Hyaluronidase 활성은 sodium-hyaluronic acid (HA)로부터 형성된 N-acetylglucosamine을 glucoxazoline 유도체로 변형시킨 후 p-dimethylaminobenzal dehyde (DMAB)로 발색시켜 효소 활성을 측정하였다. 0.1M acetate buffer (pH3.5)에 녹인 HAase (7,900 U/ml) 50 μ l에 육종용 추출물 100 μ l를 혼합한 후 37°C에서 20분간 배양한 후 12.5 mM CaCl₂ 100 μ l를 가하여 37°C에서 20분간 배양하였다.

기질로 0.1M acetate buffer (pH3.5)에 녹인 HA (12 mg/ml) 250 μ l을 가하고 다시 40분간 배양하였다. 0.4 N potassium-tetraborate 100 μ l와 0.4 N NaOH 용액 100 μ l을 가한 후 끓는물에서 3분동안 가열하고 상온에서 완전히 냉각시켰다. 냉각시킨 반응물에 발색제로 DMAB 3 ml을 가한 후 37°C에서 20분간 배양하고, 흡광광도계를 이용하여 585 nm에서 흡광도를 측정하였다. Hyaluronidase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

결과 및 고찰

B16F10 melanoma 세포 생존율 측정

MTT는 노란색의 수용성 물질로서 살아 있는 세포에 존재하는 reductase에 의해 보라색의 formazan 결정체로 변형된다. MTT assay는 세포 생존율을 측정할 수 있는 방법으로 변형된 formazan 결정체의 양을 통하여 살아있는 세포의 양을 측정할 수 있다(Kwak and Kim 2011; Gross and Lapiere 1962).

B16F10 melanoma 세포를 이용한 세포 생존율을 측정하여 세포 독성 검정을 실시한 결과는 Figure 1과 같다. 육종용 추출물을 0, 2, 4, 6, 8, 10 mg/ml의 농도로 처리한 결과 2-4 mg/ml농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 보여 B16 melanoma 세포에 대해 독성이 거의 없는 것으로 나타났다. 육종용 추출물 4 mg/ml의 농도까지 화장품 조성물로 이용할 수 있는 최적 농도로 확인되었다. Chin and Cho (2005)의 어성초 추출물의 경우 100 μ g/ml의 농도에서 74% 세포 생존율을 보였으며, Lee and Yoon (2015)의 연잎 추출물의 경우 1 mg/ml의 농도에서 81% 세포 생존율을 보인 결과와 비교하여 육종용 추출물의 B16 melanoma 세포 생존율이 4~40배 높은 농도에서도 독성이 거의 없는 것을 확인할 수 있었다.

피부노화 관련 유전자 발현 측정

육종용 추출물이 피부 미백 및 노화관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 육종용 추출물을 0, 2, 4, 6, 8, 10 mg/ml 농도로 24시간 처리한 B16F10 melanoma 세포를 회수 하여 RNA를 추출하고, RT-PCR로 유전자 발현을 검정한 결과는 Figure 2와 같다.

β -Actin을 positive control로 사용하였고, 피부노화와 관련된 유전자인 tyrosinase, collagenase 및 elastase 유전자 특이 primer를 이용하여 유전자 발현량을 조사한 결과 육종용 추출물을 처리구에서 추출물의 농도가 증가함에 따라 유전자 발현이 현저히 억제되었으며, 특히 4 mg/ml 농도에서 tyrosinase는 80.9%, collagenase는 37.6%, elastase는 70.9%로 급격히 유전자의 발현량이 감소한 것으로 나타났다.

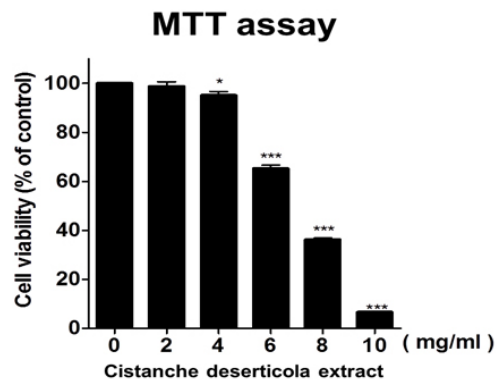


Fig. 1 Effect of *Cistanche deserticola* extracts on cell viability of B16F10 melanoma cells. Cells were treated with various concentrations of *Cistanche deserticola* extracts (0-10 mg/ml). Cell viability was measured by the MTT assay. Values are expressed as mean \pm SD of three independent experiments, and represented as % of control cell viability (* p < 0.05, *** p < 0.0001)

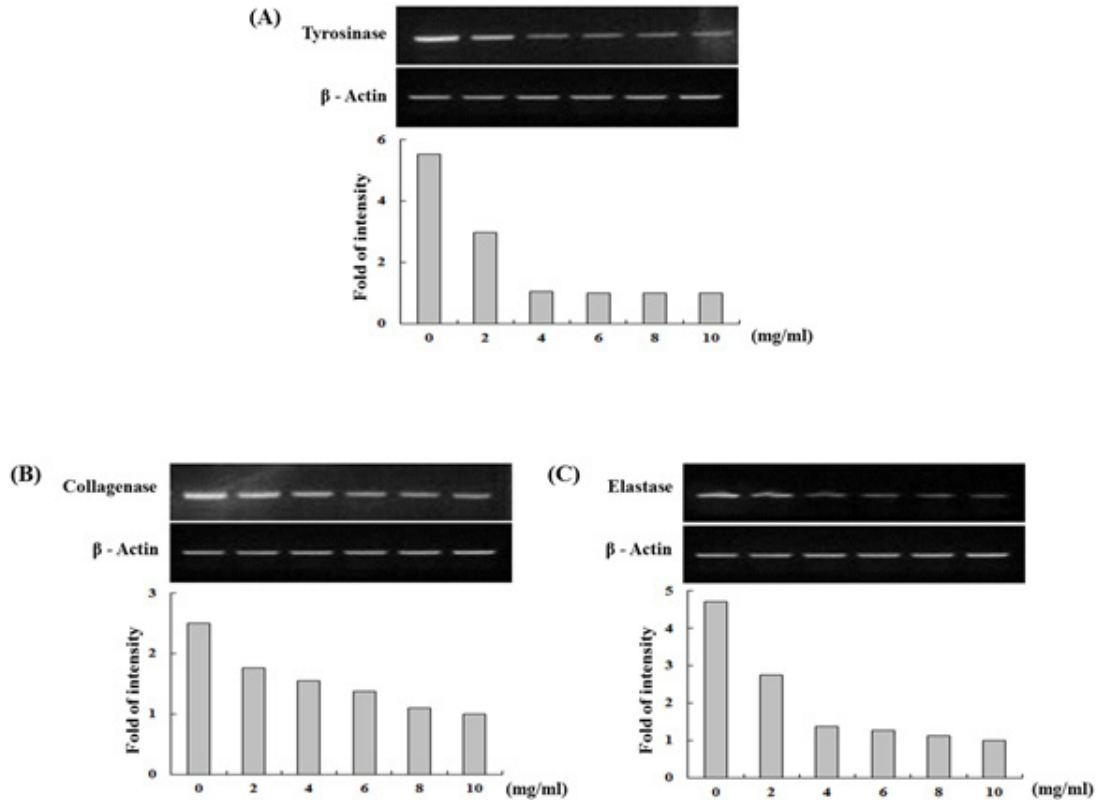


Fig. 2 Transcriptional expression levels of genes related to anti-aging, from *Cistanche deserticola* extracts treated B16F10 melanoma cells. The cells were treated with 0, 2, 4, 6, 8 and 10 mg/ml of *Cistanche deserticola* extract for 24h. Transcriptional expression level of tyrosinase (A), collagenase (B), and elastase (C) genes were analyzed by RT-PCR using total RNA extracted from B16F10 melanoma cells. β -Actin is the loading control. The graph represents the fold value of exposed band intensity

항산화 활성(DPPH) 측정

DPPH는 free radical이 안정화된 물질로 질소 중심의 radical이며, flavonoid 및 phenolic 물질과 반응하여 DPPH의 감소가 진행되면 free radical의 소거반응이 일어나 처리물질의 항산화 활성 및 활성산소에 대한 억제 정도를 확인할 수 있다(Luciana et al. 2001; Blois 1958). 육종용 추출물과 대조구인 Vit. C의 free radical scavenging rate를 측정한 결과는 Figure 3과 같다. 육종용 추출물 2, 4, 6, 8, 10 mg/ml 처리구의 free radical scavenging rate는 70.6%, 75%, 76.6%, 79.6%, 82.6%로 나타났으며, 대조구 Vit. C 0.1 mg/ml의 free radical scavenging rate는 67.6%로 나타났다. 특히 4 mg/ml 이상의 농도에서 대조구보다 항산화 활성이 높게 나타났다.

Kwak et al. (2010)은 자색고구마 추출물의 경우 5 mg/ml 농도에서 46.8% 보다 높은 항산화 활성을 보였다고 하였고, Yoon et al. (2015)은 23종의 약용식물 메탄올 추출물을 대상으로 한 실험에서 두충, 구기자, 화살나무, 비수리, 주목 및 뽕나무 등 6종의 추출물 4 mg/ml 농도에서 각각 80.1%, 64.2%, 73.6%, 78.2%, 70.5%, 67.8%의 항산화 활성을 보였다고 하였다. 따라서, 이들 보고와 본 연구의 결과를 비교하여 볼 때 육종용 추출물이 높은 항산화 활성

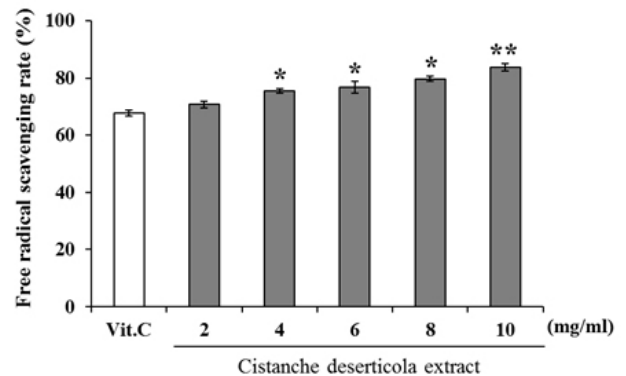


Fig. 3 Dose-dependant DPPH free radical scavenging rate of *Cistanche deserticola* extracts. Concentration of Vit C as positive control is 0.1 mg/ml. Values are expressed as mean \pm SD of three independent experiments, and represented as % of control cell viability (*p < 0.05, **p < 0.01).

을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 항산화 활성이 우수한 Vit. C는 수용액상태에서 쉽게 산화되고 장기 보관의 문제와 색상 변색화로 피부 외용제로 사용하기가 어려운 반면, 육종용 추출물은 수용액상태에서도 안정적으로 항산화 활성을 나타내기 때문에 기능성 화장품 소재로 적합할 것으로 생각된다.

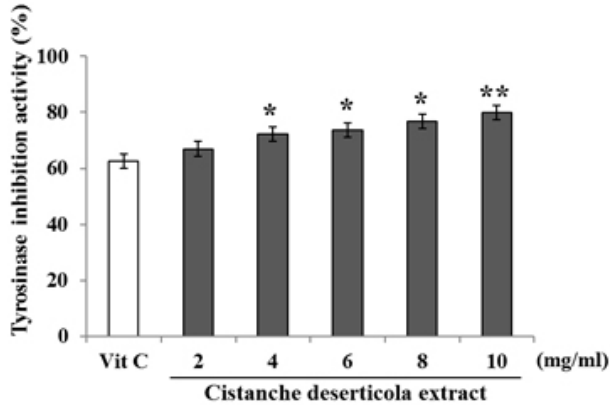


Fig. 4 Dose-dependant tyrosinase inhibition activity of *Cistanche deserticola* extracts. Concentration of Vit C as positive control is 0.1 mg/ml. Values are expressed as mean \pm SD of three independent experiments, and represented as % of control cell viability (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Tyrosinase 저해 활성 측정

멜라닌은 tyrosine hydroxylase에 의해 tyrosine이 DOPA (dihydroxyphenylalanine)로 전환되고 DOPA oxidase에 의해 DOPA가 DOPA quinone으로 전환되는 두 단계의 반응을 거치며 tyrosinase의 작용에 의해 생합성 된다. Tyrosinase는 피부 색소인 멜라닌 형성을 조절 할 수 있는 중요한 효소로서 tyrosinase 저해 활성의 측정은 천연물의 피부미백 개선 효과를 검증하는데 있어 유용한 방법이다(Uitto 1986).

육종용 추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 Figure 4와 같다. 육종용 추출물의 처리농도가 증가 할수록 tyrosinase 저해활성이 증가하였고, 육종용 추출물 2, 4, 6, 8, 10 mg/ml 처리 농도에서 각각 66.8%, 72.2%, 73.5%, 76.6%, 78.5%의 tyrosinase 저해활성을 보였고, 대조구인 Vit. C 0.1 mg/ml 농도에서 62.4% tyrosinase 저해활성이 나타났으며, 육종용 추출물 4 mg/ml 이상의 농도에서 대조구에 비해 높은 tyrosinase 저해 활성을 보였다. Cho et al. (2009)의 솔솔과 솔잎 추출물 4 mg/ml 농도에서 각각 15.2%, 6.9%의 tyrosinase 저해 활성을 보인 결과와 본 연구의 결과를 비교하였을 때 육종용 추출물의 tyrosinase 저해활성이 높게 나타나 피부미백 개선효과가 클 것으로 생각된다.

Elastase 저해 활성 측정

Elastin은 피부 진피와 피부탄력섬유를 구성하는 중요한 성분 중 하나로서 elastin의 감소는 피부 주름 생성과 탄력 저하를 야기하고 피부노화를 촉진시킨다. Elastase는 elastin을 분해하는 효소이고, elastase의 활성을 저해하는 물질은 피부주름을 개선하는 효과를 가진다(Dewitt et al. 1981).

육종용 추출물의 elastase 저해활성을 측정한 결과 Figure 5

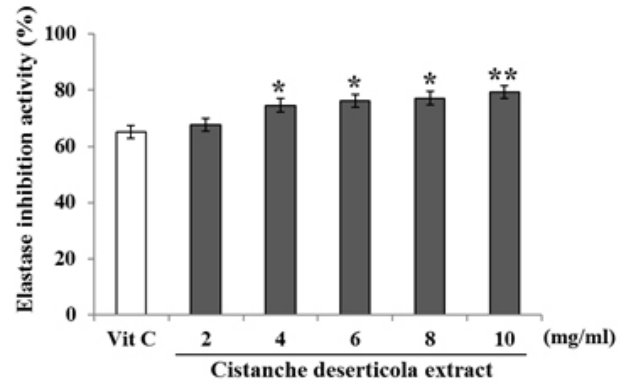


Fig. 5 Dose-dependant elastase inhibition activity of *Cistanche deserticola* extracts. Concentration of Vit C as positive control is 0.1 mg/ml. Values are expressed as mean \pm SD of three independent experiments, and represented as % of control cell viability (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

와 같다. 육종용 추출물의 처리 농도가 증가할수록 elastase 저해 활성이 증가하였고, 육종용 추출물 2, 4, 6, 8, 10 mg/ml 처리 농도에서 각각 67.6%, 74.5%, 76.1%, 77.1%, 79.3% elastase 저해활성을 보였고, 대조구인 Vit. C 0.1 mg/ml 농도에서 65.1% elastase 저해활성이 나타났으며, 육종용 추출물 4mg/ml 이상의 농도에서 대조구에 비해 elastase 저해 활성이 현저히 높게 나타났다. Jung and Kim (2009)은 황기, 자초 추출물 1 mg/ml 농도에서 elastase 저해활성이 3.7%, 8.7%로 나타난 결과와 본 연구 결과를 비교하였을 때 육종용 추출물의 elastase 저해활성이 매우 높은 나타나 피부노화 방지를 위한 화장품 소재로 개발의 가능할 것으로 생각된다.

Collagenase 저해 활성 측정

Collagen은 피부조직결합력 및 세포접착성 등의 기능을 가지며 진피의 90%에 달하는 주요 구성 성분으로서 외부 자극으로부터 피부를 보호하고 유지시키는 기능을 한다. Collagen의 감소는 피부탄력을 유지시키는 결합을 파괴시켜 피부의 탄력 저하와 주름이 발생된다. Collagenase는 collagen을 분해하는 효소로서, collagenase의 활성을 저해하는 물질은 피부탄력을 유지하고 주름방지 효과를 나타낸다(El-Domyati et al. 2002).

육종용 추출물의 collagenase 저해활성을 측정한 결과 Figure 6과 같다. 육종용 추출물의 처리 농도가 증가할수록 elastase 저해 활성이 증가하였고, 육종용 추출물 2, 4, 6, 8, 10 mg/ml 처리 농도에서 각각 72.3%, 80.2%, 81.1%, 83.4%, 83.6%의 collagenase 저해활성을 보였고, 대조구인 Vit. C 0.1 mg/ml 농도에서 62.3% collagenase 저해활성이 나타났으며, 육종용 추출물 4 mg/ml 이상의 농도에서 대조구에 비해 높은 collagenase 저해활성을 나타냈다. Cheon

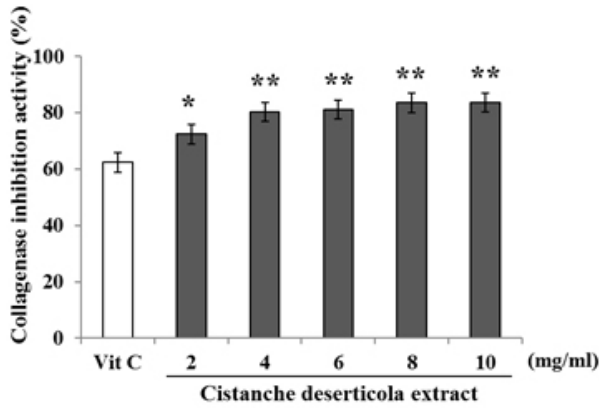


Fig. 6 Dose-dependant collagenase inhibition activity of *Cistanche deserticola* extracts. Concentration of Vit C as positive control is 0.1mg/ml. Values are expressed as mean ± SD of three independent experiments, and represented as % of control cell viability (*p < 0.05, **p < 0.01)

etal. (2008) 은 상황버섯 추출물 1 mg/ml 에서 collagenase 저해활성이 6.8%로 나타났고, 추출방법에 따른 collagenase 저해 활성의 차이가 크다고 보고하였다. 상황버섯의 결과와 육종용 추출물의 결과를 비교하였을 때 collagenase 저해활성 효과가 높은 것으로 나타나 피부주름 개선효과가 클 것으로 생각된다.

Hyaluronidase 저해 활성 측정

Hyaluronidase (HAase)는 glycosaminoglycan 중합체인 hyaluronic acid (HA)의 glucosamine 결합을 절단하는 mucopolysaccharide 효소로서 체내의 모세혈관 투과성과, 염증반응 등에 관여한다(Ghosh 1994). 산성다당류인 HA는 피부진피의 구성요소로서 뇌, 근육, 연골, 탯줄 등에 존재하고 절반 이상이 피부에 존재한다. Hyaluronic acid는 염증형성 요인인 phagocytic ability를 저해하고, hyaluronic acid는 상처 치유과정에서 fibrosis 및 collagen deposition 등을 증가시키며, 많은 양의 물과 함께 존재하기 때문에 피부에서 완충제 역할을 한다. 피부노화가 진행되면 피부 수분량의 감소와 함께 hyaluronic acid 농도 또한 감소하기 때문에 피부에 충분한 수분을 공급하기 위하여 hyaluronic acid를 화장품의 보습제 원료로 널리 이용하고 있다. HAase는 항알레르기나 항염증 물질에 의해 활성이 억제되며, HAase 활성을 저해함으로써 항알레르기 및 항염증 효과를 기대할 수도 있다(Seo 1988; Batt et al. 1988; Meyer 1947).

육종용 추출물의 HAase 저해활성을 측정한 결과 Figure 7 과 같다. 육종용 추출물과 메탄올추출물 2, 4, 6, 8, 10 mg/ml 처리 농도에서 각각 65.8%, 67.2%, 67.3% 68.2%, 69.2% HAase 저해활성을 보였고, 대조구인 Vit. C 0.1 mg/ml 농도에서 59% 저해활성이 나타났으며, 육종용 추출물 2 mg/ml 이

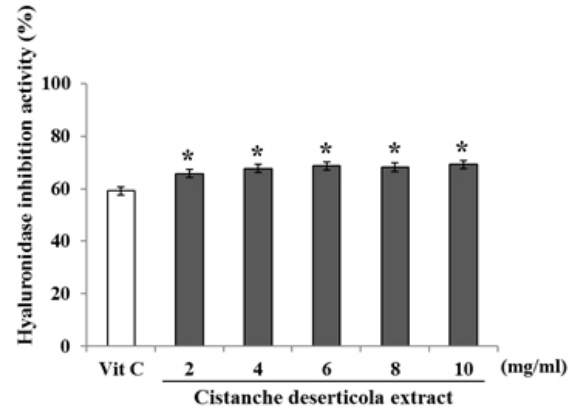


Fig. 7 Dose-dependant hyaluronidase inhibition activity of *Cistanche deserticola* extracts. Concentration of Vit C as positive control is 0.1 mg/ml. Values are expressed as mean ± SD of three independent experiments, and represented as % of control cell viability (*p < 0.05, **p < 0.01)

상의 농도에서 대조구에 비해 큰 HAase 저해활성을 나타냈다. Choi et al. (2008) 이 보고한 목과, 상황버섯 추출물 1mg/ml 농도에서 HAase 활성이 각각 58.2%, 55.2% 로 나타났다고 보고하여, 육종용 추출물의 경우 HAase 저해활성에 미치는 효과가 우수한 것으로 판단된다.

본 연구에서 MTT assay를 이용한 B16F10 melanoma 세포의 생존율 실험에서 육종용 추출물 4 mg/ml 농도 이하에서 세포생존율이 90% 이상으로 나타났고, 이 농도에서 tyrosinase, collagenase 및 elastase 유전자의 발현이 각각 80.9%, 37.6% 및 70.9% 로 급격히 감소하는 것으로 나타나 미백 및 항노화에 효과적인 농도로 생각되었다. 육종용 추출물의DPPH 라디칼 소거능은 대조구인 Vit. C와 비교하여 육종용 추출물은 70~80% 이상의 우수한 항산화 효능을 나타내어 피부노화 방지에 효과적일 것으로 평가되었다. 미백, 항노화 및 항염증 효능을 검증하기 위해 육종용 추출물을 처리한 결과, tyrosinase 저해활성은 60~70%, elastase 저해활성은 60~70%, collagenase 저해활성은 70~80%, hyaluronidase 저해활성은 60-70%로 각각 나타났으며, 대조구 Vit. C의 50~60%와 비교하여 우수한 미백, 항노화 및 항염 효과가 인정되었다.

이상의 연구 결과를 종합해 보면, 육종용 추출물은 높은 항산화 효능을 가지고 tyrosinase, elastase, collagenase 및 hyaluronidase 저해활성도 우수한 것으로 나타났으며, 특히 세포의 독성과 효능을 고려할 때 4 mg/ml 농도가 기능성 화장품 소재로 이용할 수 있는 적정 농도로 판단된다. 그리고 육종용 추출물은 화장품 소재뿐만 아니라 의약품, 식품 등의 기능성 소재로서 가치가 있을 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 육종용을 이용한 기능성 화장품 소재 개발을 목적으로 육종용 추출물의 피부 미백 및 항노화 효능 검정을 위해 수행되었다. 육종용 추출물의 세포 생존율은 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 MTT assay를 수행하여 측정된 결과, 육종용 추출물 4 mg/ml 농도에서 90% 이상의 세포 생존율을 보였다. 육종용 추출물을 처리한 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 RT-PCR로 유전자 발현을 검정한 결과 tyrosinase, collagenase 및 elastase 유전자의 발현을 육종용 추출물 4 mg/ml 농도에서 각각 80.9%, 37.6%, 70.9% 억제 하였다. 육종용 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 측정을 이용한 항산화 활성은 2~10 mg/ml 농도에서 70.6%~82.6%로 높게 나타났다. 육종용 추출물의 미백과 항노화 효과를 검정하기 위하여 육종용 추출물을 2, 4, 6, 8 및 10 mg/ml 농도로 처리하여 확인하였다. 육종용 추출물의 tyrosinase 저해활성은 66.8%~78.5%, elastase 저해활성은 67.6%~79.3%, collagenase 저해활성은 72.3%~83.6%로 각각 나타났으며, hyaluronidase 저해활성은 65.8%~69.2%로 나타났다. 따라서 육종용은 피부 미백 및 노화방지를 위한 기능성 화장품 소재로 우수한 것으로 평가되며, 세포생존율과 각종 효능을 고려할 때, 육종용 추출물 4 mg/ml 농도가 적정농도로 판단된다.

Acknowledgments

This work was supported by the Dong-A University research fund.

References

- Batt MD, Davis WB, Fairhurst E, Gerrard WA, Ridge BD (1988) Changes in the Physical properties of the stratum corneum following treatment with glycerol. *J Soc Cosmet Chem* 39:367-381
- Blois MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26:1198-1199
- Cheon SJ, Jang MJ, Jang YA, Choi EY, Jun DH, Kim YH, Cho WA, Jeong YS, Kwon HB, Kim TH, Choi KI, Do JR, Lee CE, Lee JT (2008) Anti-wrinkle Effect of Cambodian *Phellinus linteus* Extracts. *J Life Sci* 12:1718-1722
- Chin JE, Cho NC (2005) Effect of *houltuynia cordata* extracts on tyrosinase Gene Expression. *J kor Soc Food Sci Nutr* 34:1284-1288
- Cho EK, Song HJ, Cho HE, Kim MY, Choi IS, Choi YJ (2009) Inhibitory effects of ethanol extracts from Pine Buds (*Pinus densiflora*) on angiotensin converting enzyme, xanthine oxidase and nitric oxide synthesis. *J Life Sci* 19:1629-1636
- Choi SI, Lee YM, Heo TR (2003) Screening of hyaluronidase inhibitory and free radical scavenging activity in vitro of traditional herbal medicine extracts. *J Biotechnol Bioeng* 18:282-288
- DeWitt DL, Rollins T, Day JS, Gauger JA, Smith WL (1981) Orientation of the active site, and antigenic determinants of prostaglandin endoperoxide synthase in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 256:10375-10382
- El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, Ahmad H, Uitto J (2002) Intrinsic aging vs. photoaging : A comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Experimental Dermatology* 11:398-405
- Ghosh P (1994) The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid. *Clin Exp Rheumatol* 12:75-82
- Gang SR, Min KJ, Kim YC (2009) The inhibitory effect of *Saururus chinensis* water extract on skin wrinkle in hairless mice. *J Korean Soc Cosmet* 15:1389-1398
- Gross J, Lapiere CM (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissue: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci* 54:1197-1204
- Jeong SJ, Kim NY, Ahn NH, Kim YC (1997) Screening of hyaluronidase inhibition activity using a microplate assay. *Kor J Pharmacogn* 28:131-137
- Jung JH, Kim KJ (2009) Experimental studies about the inhibitory effect on tyrosinase and elastase activities by various herb medicines. *J Kor Med Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology* 22:82-91
- Kim MJ, Kim JY, Jung TK, Choi SW, Yoon KS (2006) Skin anti-aging effect of *Forsythia viridissima* L. extract. *Kor J Biotechnol Bioeng* 21:444-450
- Kim SY, Kim JH, Ki SK, Oh MJ, Jung MY (1994) Antioxidant activities of selected oriental herb extracts. *J Am Oil Chem Soc* 71:633-640
- Kligman D (2000) Cosmeveuticals. *Dermatol Clin* 18:609-615
- Kobayashi H, Karasawa H, Miyase T (1984) Studies on the constituents of *Cistanchis* Herba. III. *Chem Pharm Bull* 32:3009-3014
- Kobayashi H, Karasawa H, Miyase T (1984) Studies on the constituents of *Cistanchis* Herba. IV. *Chem Pharm Bull* 32:3880-3885
- Kobayashi H, Karasawa H, Miyase T (1985) Studies on the constituents of *Cistanchis* Herba. V. *Chem Pharm Bull* 33:1452-1457
- Kwak JH, Choi GN, Park JH, Kim JH, Jeong HR, Jeong CH, Heo HJ (2010) Antioxidant and neuronal cell protective effect of purple sweet potato extract. *J Agric Life Sci* 44:57-66
- Kwak YJ, Kim KS (2011) Fermented *Viola mandshurica* Inhibits melanogenesis in B16 melanoma cell. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 841-847
- Lee SH, Cho HS (2007) Trends in functional food ingredients for beauty and its application in skin care. *Food Sci Ind* 40:31-38
- Lee YR, Yoon N (2015) Anti-Oxidative and Anti-Diabetic Effects of Methanol Extracts from Medicinal Plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 681-686

- Lee YS, Park JH, Kim MH, Kim HJ (2006) Synthesis of tyrosinase inhibitory kojic acid derivative. *Arch Pharm (Weinheim)* 339:111-114
- Lim SJ, Kim JD (2009) Skin-whitening awareness and whitening-care behavior in women. *J Kor Soc Cosm* 15:463-474
- Lu MC (1998) Studies on the sedative effect of *Chstanche deserticola*. *J Ethnopharmacol.* 59:161-165
- Luciana L, Mensor FS, Menezes GG, Leitao AS, Reis TC, Santos D, Cintia SC, Suzana GL (2001) Screeing of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res* 15:127-130
- Meyer K (1947) The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol Rev* 27:335-359
- Mun JH, Park CW (1995) Flavonoid chemistry of *Polygonum* sect. *Tovara* (Polygonaceae) a systematic survey. *Pl Syst Evol* 153-196
- Seo YS (1988) Hyaluronic acid; properties and applications. *Polymer (korea)* 12: 484-488
- Sharman S, Jill DS, Kelloff GJ, Vernon ES (1994) Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res* 54:5848-5855
- Uitto J (1986) Connective tissue biochemistry of the aging dermis : Age-related alterations in collagen and elastin. *Dermatol Clin* 4:433-46
- Yoo DH, Joo DH, Lee SY, Lee JY (2015) Antioxidant effect of *nelumbonucifera* G. leaf extract and inhibition of MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase expression in a B16F10 melanoma cell line. *J Life Sci* 10:1115-1123