

승마, 황련, 황백, 후박 추출 혼합물의 항노화 및 멜라닌 생성 저해효과

신서연·김규원·강세원*·조홍석*·김은지*·박경목†

동신대학교 제약공학과, *(주)월드코스텍
(2016년 9월 9일 접수, 2017년 2월 7일 수정, 2017년 2월 15일 채택)

Anti-aging and Anti-melanogenesis Effect of *Cimicifuge dahurica*, *Coptis chinensis*, *Phellodendri amurense* and *Magnol obovata* Extracts Mixture

Seo Yeon Shin, Gue Won Kim, Se Won Kang*, Hong Suk Cho*, Eun Ji Kim*, and Kyung Mok Park†

Department of Pharmaceutical Engineering, Dongshin University, 185 Gunjae-ro, Naju, Jeollanam-do 58245, Korea

*WorldCostech Co, LTD, Nam-myeon, Jangseong, Jeollanam-do 57248, Korea

(Received September 9, 2016; Revised February 7, 2017; Accepted February 15, 2017)

요약: 한의학에서 승마(*Cimicifuge dahurica*, *C. dahurica*), 황련(*Coptis chinensis*, *C. chinensis*), 황백(*Phellodendri amurense*, *P. amurense*) 추출물은 해독작용을 하며 후박(*Magnol obovata*, *M. obovata*) 추출물은 항균 효과가 있다고 알려져 있다. 본 연구에서는 승마, 황련, 황백, 후박 추출물을 혼합하여 기능성 화장품 소재로서의 이용 가능성을 검토하였다. MTT assay를 이용한 세포 독성평가와 DPPH와 ABTS를 이용한 항산화 효과를 측정된 결과, 단일 추출물보다 추출혼합물이 더 안전함을 확인 하였으며 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가됨을 확인하였다. 뿐만 아니라 NO 생성을 억제함으로써 우수한 항염증 효과가 있을 것으로 예상되며, 섬유아세포에서 UVB로 유도된 세포 손상을 보호하면서 type 1 pro-collagen 합성량이 증가되는 것을 관찰하였다. 또한 추출 혼합물은 melanin 합성과 tyrosinase 활성 및 melanin 합성 관련 인자 및 효소들(MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2)의 발현을 효과적으로 억제하였다. 이러한 연구결과로 보아 승마, 황련, 황백, 후박 추출 혼합물은 항노화 및 미백 등 기능성 화장품 소재로서 개발 가능성이 높을 것으로 사료된다.

Abstract: *Cimicifuge dahurica* (*C. dahurica*), *Coptis chinensis* (*C. chinensis*) and *Phellodendri amurense* (*P. amurense*) extracts has an detoxification effect and *Magnol obovata* bark (*M. obovata*) extracts has an antibacterial effect in oriental medicine. This study investigated the possibility of the extract mixture as a functional cosmetic ingredient by mixing *C. dahurica*, *C. chinensis*, *P. amurense* and *M. obovata* extracts. MTT assay was carried out for toxicity test and DPPH/ABTS experiments for antioxidant effects of the extract mixture. Results show that the extract mixture was safer and antioxidant effects in a dose-dependent manner than single extract of the mixture. The mixture effectively inhibited NO (nitric oxide) production, which indicate good efficacy for anti-inflammation. The mixture also protected UVB-induced cell damage and increased type 1 pro-collagen synthesis in fibroblast. In addition, it's treatment inhibited the melanin synthesis and tyrosinase activity by lowering expression of MITF, tyrosinase and TRPs in B16F10 melanoma cell. These results suggest that medicinal herbal extract mixture may be useful as a functional ingredient for anti-aging and skin whitening cosmetic formula.

Keywords: medicinal herbs, anti-oxidation, anti-aging, anti-melanogenesis, cosmetic ingredient

† 주 저자 (e-mail: parkkm@dsu.ac.kr)
call: 061)330-3273

1. 서 론

피부노화는 일반적으로 피부의 구조적, 생리적인 기능이 감소하는 내인성 노화와 광노화와 같은 외부 스트레스에 의해 발생하는 외인성 노화가 있다. 지속적으로 자외선에 노출되면 피부에 색소침착과 홍반, 광독성, 광알레르기 같은 질병을 유발시키고, 자유 라디칼을 생성하여 만성적 광노화를 일으킨다. 또한 세포내 collagen 및 elastin fiber 등의 기질 단백질이 손상되어 collagen양이 부족해지고, elastin fiber가 변성되어 주름을 생성하는 등 피부 노화를 촉진한다. 뿐만 아니라 피부가 자외선에 노출되면 염증 반응을 일으켜 홍반, 수포 및 소양증 증상이 관찰될 수 있으며, 과도한 멜라닌 생성으로 기미, 주근깨 같은 피부 색소 침착, 피부암을 유발할 수 있다. 이러한 반응이 지속되고 과도하게 발현이 되면 피부에 2차적인 손상을 입히는데 그때 생성되는 NO는 피부조직의 손상 및 유전자 변이를 일으켜 피부 속에 존재하는 콜라겐 섬유와 탄력 섬유를 분해하여 염증반응에 의한 광노화를 촉진시킨다 [1-5].

따라서 항산화 활성 효능을 가지고 있는 건강식품 또는 미백, 주름개선 효과가 있는 기능성 소재의 개발이 필요한 실정이며, 최근에는 화학적 성분이 아닌 천연 소재를 이용한 생리활성 연구가 활발하게 진행되고 있다[6-11]. 특히 한방 약재는 예로부터 약용으로 많이 사용되어 피부에 미치는 영향이 적고, collagenase와 elastase활성 억제 및 항산화, 항균, 미백 등의 연구가 보고된 바 있다[12-16].

또한 최근에는 다양한 한방약재를 서로 복합하여 각각의 성분이 가지고 있는 유효성분을 더욱 증가시킴으로써 안정적이고 생리활성이 높은 화장품 소재의 개발이 이루어지고 있으며 항산화 활성 효능과 미백 및 주름개선 실험에서 우수한 효과를 보여 기능성 한방 화장품 소재로서 이용가치가 높다고 보고된 바 있다 [17,18].

승마(*C. dahurica*)는 phenylpropanoid 계열의 화합물 중 isoferulic acid, ferulic acid, caffeic acid 등이 함유되어 있으며 한방에서는 진통작용을 나타내고 청열 해독 작용을 가지고 있어 발한, 해열, 해독 소염제로 분류되며 화농성 질환에 사용된다.

황련(*C. chinensis*)은 장이나 위에 쌓여서 일어나는

설사나, 위열로 인한 구토에 유효하며 해열과 해독작용이 뛰어난 것으로 알려져 있으며 특히 berberine은 항균작용, 항염증, 지혈, 항암 작용 등이 우수하며, 중추신경억제, 신장염 치료효과가 있다고 알려져 있다 [19].

황백(*P. amurensis*)은 한방에서는 염증, 폐염, 소염약으로 쓰이며, 황백의 성분은 여러 종류의 alkaloid를 함유하며, obacunone, obaculactone, berberin, 점액질 등이 주성분이다. 황백의 성분 중 berberine은 혈압을 낮추는 작용, 항산화 작용, 해열 및 항염 작용이 있는 것으로 알려져 있다[20,21].

후박(*M. obovata*)은 주요성분으로 magnolol, isomagnolol, honokiol, machiol과 같은 성분이 함유되어 있으며 이 중 honokiol은 biophenolic compound로 항우울, 신경 안정제, 항균 효능 나타내는 유용한 물질로 이용되고 있다. 또한 magnolol은 발암억제, 암 증식억제, 항산화 활성 등이 보고된 바 있다[22-25].

이와 같이 승마, 황련, 황백, 후박은 승마황련탕 및 황련해독탕 등 약용으로도 많이 이용되어 왔으며 다양한 생리활성 효과가 있다고 알려져 있지만 이들 혼합물에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 국내 자생하는 천연 한방원료인 승마, 황련, 황백, 후박의 단일 추출물과 이들 각 추출물을 혼합한 추출 혼합물의 항산화, 항염 및 자외선에 의한 피부 손상과 주름개선, 미백효과 등의 생리활성을 조사하여 기능성 화장품 소재로서의 사용 가능성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 기기 및 시약

효능 평가 기기로는 ELISA reader (Biochrom, England)를 사용하였다. UVB 조사 기기로는 UV crosslinker (BLX-312, Vilber Lourmat, France)를 사용하였다. DPPH와 ABTS 흡광도 측정은 UV/vis spectrophotometer (Optizen 2120 UV, Mecasys, Korea)를 사용하였다. 세포 배양에 사용된 배지는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GE Healthcare, USA), fetal bovine serum (FBS, GE Healthcare, USA), penicillin-streptomycin (Lonza Walkersville, USA)을 사용하였다. 그 외 실험에 사용된 시약은 dimethyl sulfoxide (DMSO), 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline

Table 1. The Mixture Ratio of Ethanol Extracts of Medicinal Herbs (v/v)

No.	<i>C. dahurica</i>	<i>C. chinensis</i>	<i>P. amurense</i>	<i>M. obovata</i>
Mix 1	4	1	1	4
Mix 2	3	1	1	5
Mix 3	2	2	2	4
Mix 4	2	3	2	3
Mix 5	2	2	3	3

-6-sulfonic acid) (ABTS) diammonium salt, 3 (4,5-demethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), lipopolysaccharide (LPS), Griess reagent, sulfanilamide, phosphoric acid, *N*-1-naphthylethylenediamine 등은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. Phosphate buffered saline (PBS, Lonza Walkersville, USA), procollagen type C-peptide EIA kit (Takara, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 시약은 분석용 등급 이상으로 사용하였다.

2.2. 추출물의 제조

본 실험에서 사용된 승마, 황련, 황백, 후박 한약재는 전남 화순 한방유통센터에서 구입하여 사용하였다. 건조된 시료는 파쇄하여 분말로 사용하였으며 시료 100 g에 70% 발효주정을 첨가하여 80 °C에서 4 h 추출하고 6-10 h 숙성과정을 걸쳐 추출하였다. 추출 후 여과지(Advantec No. 2)로 여과한 후 회전감압 농축기(N-1000, Eyela, Japan)를 이용하여 감압 농축 후, 각 시료를 동결건조하여 얻은 분말은 DMSO로 용해하여 0.45 μm 필터에 필터링한 후 사용하였다. 혼합추출물 또한 각 시료를 농축하고 동결 건조하여 얻은 분말을 DMSO에 녹여 필터링 후 Table 1과 같이 부피비로 혼합하여 실험에 사용하였다.

2.3. DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능에 대한 실험은 Blois의 방법 [26]을 변형하여 각각의 희석한 추출물 2 mL를 0.2 mM DPPH 2 mL과 혼합한 후 약 37 °C에서 30 min간 방치시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 7 mM ABTS와 2.45 mM과 황산칼륨을 증류수에 용해시키고 암실에서 24 h 동안

방치하여 ABTS 라디칼을 형성시킨 후 사용하였다. 라디칼이 형성된 ABTS 용액을 에탄올로 희석하여 734 nm에서 측정된 흡광도가 0.70가 되도록 조정하였다. 소거능은 ABTS 용액 500 μL와 시료 500 μL을 혼합하여 6 min간 반응 시킨 후 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 734 nm에서 각 농도별 시료와 혼합하여 사용하였다.

2.5. 세포 배양

본 실험에서 사용한 CCD-986sk, RAW 264.7 세포는 ATCC에서 구입하여 사용하였다. 구입한 세포는 DMEM 배지에 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycine을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2.6. 세포 독성 및 증식 측정

세포 독성 평가는 MTT assay로 측정하였다. 세포를 96-well plate에 1 × 10⁴ cells/well의 농도로 분주한 후 37 °C, 5% CO₂ 하에서 24 h 동안 배양하여 승마, 황련, 황백, 후박 혼합 추출물을 농도별로 처리하고 다시 24 h 동안 배양한 후 PBS로 세척해주었다. MTT를 5 mg/mL 농도가 되도록 PBS에 녹여 각 well에 20 μL 첨가하여 3 h 배양한 후 각 well에 DMSO를 200 μL 넣고 실온에서 15 min간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.7. NO 저해활성 측정

96-well plate에 1 × 10⁴ cells/well 농도로 RAW 264.7 세포를 분주하여 24 h 동안 배양하였다. 각각의 추출물을 농도별(25, 50 μg/mL)로 1 h 전처리 후 염증 반응 유도 인자인 LPS 1 μg/mL를 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 생성된 NO의 양은 세포 배양 상등액 50 μL와 Griess 시약 1% (w/v) sulfanilamide 50 μL를 첨가하여 차

광 시킨 뒤 10 min 동안 실온에 방치한 후 2.5% (v/v) phosphoric acid에 녹인 *N*-1-naphthylethylenediamine을 50 μ L 혼합하여 10 min간 차광하여 반응시키고, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8. Pro-collagen 생합성 측정

CCD-986sk세포에 추출물 혼합물을 농도별로 처리했을 때 pro-collagen type 1의 합성량을 측정하기 위해 24-well plate에 각 well당 1×10^4 cells/well로 분주하여 24 h 배양하였다. 이 후 배양액을 제거하고 추출물 혼합물을 농도별로 처리한 후 48 h 배양하였다. 각 well 으로부터 상등액을 회수하여 pro-collagen type C-peptide EIA kit를 통해 측정하였다.

2.9. 멜라닌 합성 저해활성 측정

B16F10 melanoma 세포를 6-well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하여 24 h 동안 배양한 후 추출 혼합물을 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 배양된 세포를 PBS으로 세척한 뒤 10% DMSO가 포함된 1 N NaOH (Sigma, USA) 용액을 처리하여 80 $^{\circ}$ C에서 1 h 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.10. Tyrosinase 저해활성 측정

B16F10 melanoma 세포를 60 mm dish에 2×10^5 cells/well로 분주하여 24 h 동안 배양한 후 추출 혼합물을 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 배양 후 cold PBS로 세척한 뒤 lysis buffer (pro-prep)를 200 μ L 처리하여 얼음 위에서 세포를 용해시키고 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 rpm으로 15 min간 원심분리한 후 상층액만 따로 모아 효소용액으로 사용하였다. L-DOPA를 1 mg/mL 농도로 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여 기질을 준비하고 기질과 효소용액을 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 1 h 반응시켰다. 단백질은 Bradford 시약으로 정량하여 효소용액의 양을 결정하였으며, 생성된 DOPA chrome의 양은 405 nm에서 측정하였다.

2.11. Western Blot을 통한 미백 관련 단백질 발현 측정

B16F10 melanoma 세포를 60 mm dish에 2×10^5 cells/well로 분주하여 24 h 동안 배양한 후 추출 혼합물을 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 세포를 용해시킨

후 원심 분리하여 얻은 단백질은 Bradford 시약을 사용하여 정량하였으며, 동량의 단백질(10-50 μ g)을 취하여 sample buffer와 혼합하여 100 $^{\circ}$ C에서 10 min간 끓여 샘플을 준비하였다. 전기영동은 10% SDS-PAGE gel을 이용하였으며 NC membrane에 transfer 하였다. membrane은 5% skim milk로 1 h 동안 blocking 한 후 1차 항체는 5% skim milk에 희석하여 상온에서 2 h 반응시켰으며 2차 항체는 상온에서 1 h 동안 반응시켰다. membrane 세척은 tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 10 min씩 4번 진행하였으며 enhanced chemiluminescence (ECL) kit를 이용하여 단백질 발현 양상을 관찰하였다.

2.12. 통계처리

본 연구의 실험 결과는 3회 반복하였으며, 실험결과를 mean \pm S.D.로 나타내었다. 통계적 유의성은 Student's *t*-test 방법으로 분석하였으며, 유의성 수준은 **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001로 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포 독성효과

RAW 264.7 세포와 B16F10 melanoma 세포에 단일 추출물과 추출 혼합물을 50-200 μ g/mL 농도로 처리하여 세포독성을 측정한 결과 승마, 후박 추출물은 100 μ g/mL 이상 농도에서 세포독성이 나타났으며 황련, 황백 추출물과 추출 혼합물은 동일 농도에서 세포 생존율이 90% 이상으로 세포독성이 나타나지 않았다 (Figure 1). 따라서 이 후 실험에서는 단일 추출물과 추출 혼합물 모두 세포에 크게 자극을 일으키지 않는 100 μ g/mL 이하 농도에서 실험을 진행하였다.

3.2. DPPH 라디칼 소거활성

DPPH 라디칼 소거활성은 시료의 자유 라디칼 소거 능력이나 수소공여 능력을 평가하는 방법으로 항산화 활성을 평가하는데 널리 이용되고 있다. 항산화 물질이 풍부한 물질은 피부의 노화방지 및 멜라노사이트의 멜라닌 색소침착을 억제한다고 알려져 있다. 이러한 항산화 효과를 평가하기 위해 추출 혼합물을 25-100 μ g/mL로 처리하여 DPPH radical 소거활성을 측정하였

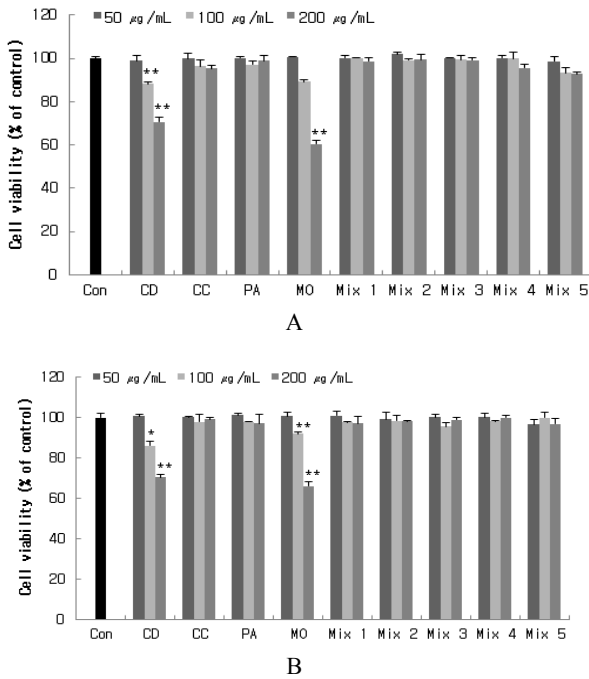


Figure 1. Effect of single extract and extracts mixture on the cell viability of RAW 264.7 cells (A) and B16F10 melanoma cells (B). (Con: control, CD: *C. dahurica*, CC: *C. chinensis*, PA: *P. amurense*, MO: *M. obovata*, Mix 1-5: extracts mixtures referred to Table 1). Results are the means ± S.D. of three samples. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 compared with control.

다. 그 결과 Figure 2와 같이 농도 의존적으로 라디칼 소거활성이 증가하였다. 특히 후박은 100 µg/mL에서 95%의 소거활성을 나타내면서 L-ascorbic acid와 유사하게 우수한 소거 활성을 보였으며 추출 혼합물 역시 각각 94%, 91%, 86%, 87%, 85% 정도로 승마, 황련, 황백의 단일 추출물에 비해 높은 소거활성을 보임으로써 추출 혼합물의 상승효과를 확인하였다.

3.3. ABTS 라디칼 소거활성 측정

항산화 효과를 평가할 수 있는 방법 중 하나인 ABTS 라디칼 소거활성 측정은 Re 등의 방법[27]을 변형하여 측정하였다. 추출혼합물에 의한 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과 DPPH 결과와 마찬가지로 농도 의존적으로 소거활성이 증가되는 패턴을 보였으며 100 µg/mL에서는 각각 46%, 39%, 37%, 44%, 40% 정도의 소거 활성을 보였다(Figure 3).

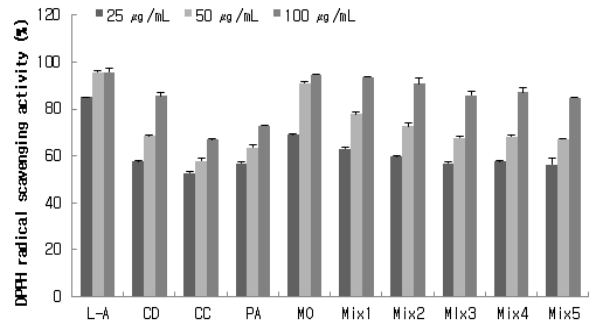


Figure 2. DPPH free radical scavenging activity of extracts mixture (L-A: L-Ascorbic acid, CD: *C. dahurica*, CC: *C. chinensis*, PA: *P. amurense*, MO: *M. obovata*, Mix 1-5: extracts mixtures referred to Table 1). Results are the means ± S.D. of three samples.

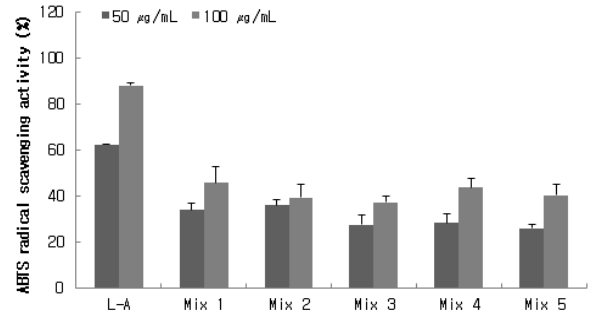


Figure 3. ABTS free radical scavenging activity of extracts mixture (L-A: L-ascorbic acid, Mix 1-5: extracts mixtures referred to Table 1). Results are the means ± S.D. of three samples.

3.4. NO 생성 억제 효과

NO는 일반적으로 박테리아나 종양을 제거하는 역할을 하지만 생체의 피부가 염증상태에 빠지게 되면 inducible NOS (iNOS)가 발현되어, 생성된 NO는 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다[28,29]. 이러한 NO 생성 억제효과를 측정하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS로 자극을 주고, Griess 시약을 사용하여 NO 생성량을 측정한 결과 추출 혼합물은 농도 의존적으로 NO 생성량을 감소시켰으며, 50 µg/mL 농도로 처리하였을 때 LPS 처리군 대비 260% 이상 감소시키면서 우수한 NO 억제효과를 보였다(Figure 4).

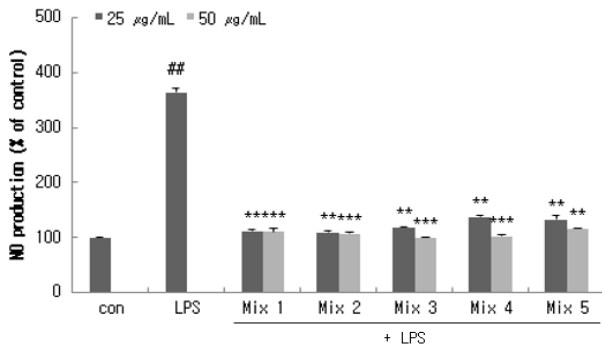


Figure 4. Inhibition of LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells by extracts mixture (Mix 1-5: extracts mixtures referred to Table 1). Results are the means \pm S.D. of three samples. ### p < 0.01 compared with control, ** p < 0.01, *** p < 0.001 compared with LPS treated group.

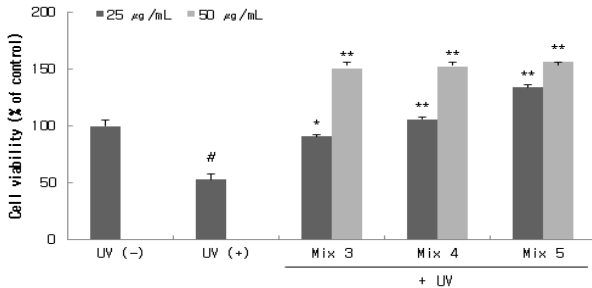


Figure 5. Protective effects of extracts mixture on UVB-exposed CCD-986sk cells (Mix 3-5: extracts mixtures referred to Table 1). Result are the means \pm S.D. of three samples. # p < 0.05 significant as compared to untreated normal, * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with the UVB exposed group.

3.5. 주름개선 평가

3.5.1. UVB 스트레스에 대한 세포 독성 억제효과

UVB는 염증 유발과 산화적 스트레스로 인한 주름 생성을 촉진 시켜 노화가 진행 되게 하는 역할을 한다. 따라서 UVB로 유도된 섬유아세포 손상에 대한 추출 혼합물의 보호효과를 측정하기 위해 UVB를 조사한 세포에 추출 혼합물을 처리하여 세포에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 Figure 5과 같이 세포에 UVB를 80 mJ/cm² 조사하였을 때 UVB를 처리하지 않은 무처리군에 비해 세포 생존율이 47%정도 감소되었으며, Mix3, Mix4, Mix5를 50 µg/mL 처리할 경우 UVB 처리

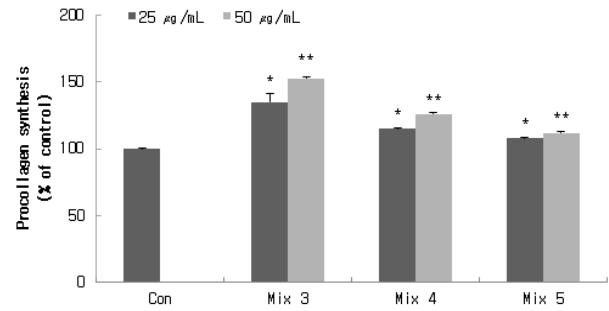


Figure 6. Effect of extracts mixture on pro-collagen type 1 synthesis. CCD-986sk cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing 0.5% FBS, were treated with various concentrations of mixed extracts for 48 h. The supernatant was collected from each well and type 1 pro-collagen was determined by ELISA kit (Mix 3-5: extracts mixtures referred to Table 1). Result are the means \pm S.D. of three samples. * p < 0.05, ** p < 0.01: significant as compared with untreated group.

군에 비해 각각 98%, 99%, 104% 정도 증가되었다.

3.5.2. Pro-collagen Type 1 합성 촉진 효과

Collagen은 피부 섬유아세포에서 생성 되는 주요한 기질 단백질로 피부의 견고성 및 지탱의 기능을 가지고 있다. 이러한 collagen이 감소할 경우 피부 주름을 유발하여 피부 노화를 진행시킨다[30]. 따라서 섬유아세포주인 CCD-986sk 세포를 이용하여 추출 혼합물의 세포 내 pro-collagen 합성효과를 알아보았다. 그 결과 세포 내 pro-collagen 합성이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 50 µg/mL 농도의 Mix3, Mix4, Mix5 처리군은 대조군에 비해 53%, 26%, 12% 정도 pro-collagen 합성이 증가되는 것을 확인하였다 (Figure 6).

3.6. 미백 평가

3.6.1. 멜라닌 합성 저해효과

멜라닌은 멜라닌세포의 멜라노솜이라는 세포소기관에서 만들어지는 흑갈색 색소로서 피부색에 관여하는 중요한 요소로 알려져 있다. 따라서 추출 혼합물이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16F10 melanoma 세포에 α -MSH와 추출 혼합물 또는 arbutin을 함께 처리하여 멜라닌 생성 억제능을 비교하였다.

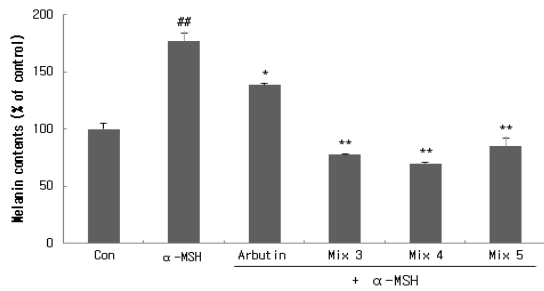


Figure 7. Effects of extracts mixture on melanin synthesis in B16F10 melanoma cells (Mix 3-5: extracts mixtures referred to Table 1). Cells were treated with to α -MSH (100 nM) alone or plus with extracts mixture (25 μ g/mL) or arbutin (100 μ g/mL) for 48 h. ## p < 0.01 compared with control, * p < 0.05 ** p < 0.01 compared with the α -MSH treated group.

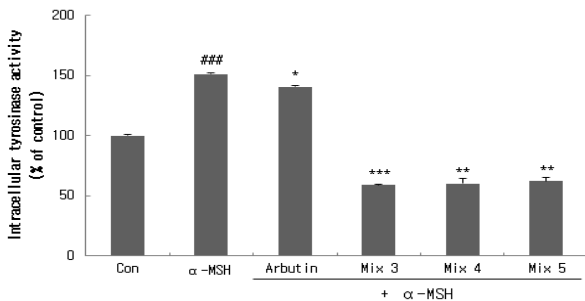
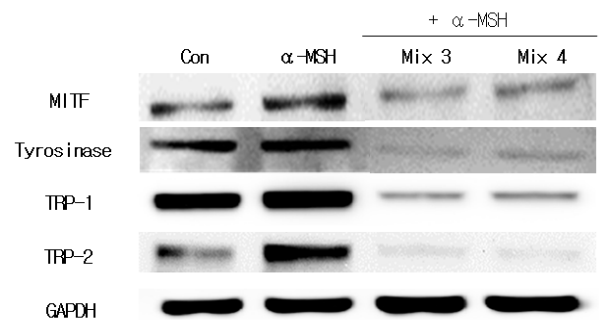


Figure 8. Effects of extracts mixture on tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells (Mix 3-5: extracts mixtures referred to Table 1). Cells were exposed to α -MSH (100 nM) alone or plus with extracts mixture (25 μ g/mL) or arbutin (100 μ g/mL) for 48 h. ### p < 0.001 compared with control, * p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001 compared with the α -MSH.

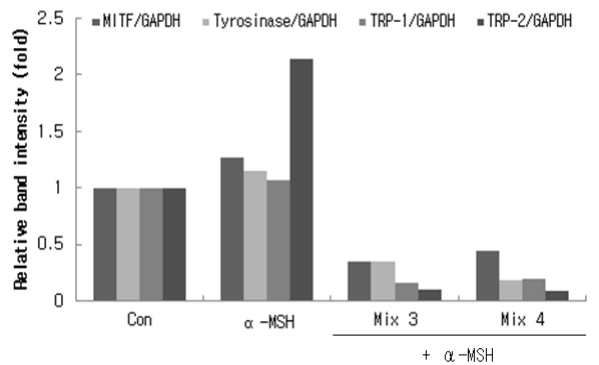
그 결과 α -MSH 처리군과 비교했을 때 Mix3, Mix4, Mix5 처리군은 각각 44%, 40%, 48% 정도 멜라닌이 크게 감소되는 것으로 나타났으며, 저농도에서도 양성 대조군인 arbutin 보다 뛰어난 억제효과를 보였다 (Figure 7).

3.6.2. Tyrosinase 활성 저해 효과

Tyrosinase는 멜라닌 합성경로에서 가장 중요하게 작용되는 효소로서 이러한 tyrosinase의 활성을 저해함으로써 멜라닌 생성을 감소시킬 수 있다. 따라서 추출 혼합물을 멜라닌 생성 저해 실험과 동일한 조건으로 25 μ g/mL 농도로 처리하여 세포내 tyrosinase 억제효과를 측정할 결과 Figure 8와 같이 α -MSH 처리군과 비교했



A



B

Figure 9. Effects of extracts mixture on melanogenesis-related protein expression levels in B16F10 melanoma cells (Mix 3-4: extracts mixtures referred to Table 1). Band intensity compared to the control (GAPDH) was determined by TotalLab 1D software.

을 때 Mix3, Mix4, Mix5 처리군은 각각 39%, 40%, 41% 정도 tyrosinase의 활성을 우수하게 억제하는 것으로 나타났으며, arbutin 보다 뛰어난 억제효과를 보였다.

3.6.3. MITF, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 발현 저해효과

멜라닌은 몇 가지 세포 내 신호전달 기전을 통하여 합성되는데 그중 MITF는 멜라닌 합성과정에서 중요한 전사 조절 인자로서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진시킨다. 따라서 추출 혼합물이 멜라닌 합성에 관여하는 전사인자와 효소들의 발현을 조절하는지 확인하기 위해 western blot을 이용하여 단백질 발현량을 관찰하였다. 추출 혼합물은 이전 실험들을 통해 전체적으로 효과가 좋았던 Mix3과 Mix4를 사용하였다. 그 결과 추출 혼합물 처리시 α -MSH에 의해 증가된 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 모두 발현량이 대폭 감소됨을 확인하였다(Figure 9).

4. 결 론

본 연구에서는 한의학에서 피부발진, 해독작용에 많이 사용되는 승마, 황련, 황백과 항균작용이 있는 후박 추출물을 다양한 혼합비로 혼합한 뒤, 이 추출 혼합물에 대한 항산화, 항염증, 주름개선 및 미백 효과에 대해 연구하여 기능성 한방 화장품 소재로서의 이용 가능성을 검토하였다.

각각의 단일 추출물과 추출 혼합물의 세포 독성 평가에서 승마, 후박 추출물은 RAW 264.7 세포와 B16F10 세포에서 독성이 나타났으며 황련, 황백 추출물과 추출 혼합물들은 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도까지 세포독성을 보이지 않았다. 이는 세포독성이 많았던 승마, 후박 추출물과 독성이 없는 황련, 황백 추출물을 혼합함으로써 세포독성을 보완해 준 것으로 사료된다.

단일 추출물과 추출 혼합물의 항산화 효과를 평가하기 위해 DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 항산화 활성이 농도 의존적으로 증가되는 것을 볼 수 있었으며 특히 후박 추출물과 추출 혼합물이 단일 추출물에 비해 비교적 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보였다. 이는 후박 추출물에 비해 효과가 미비했던 단일 추출물들을 항산화 효과가 뛰어난 후박 추출물과 혼합함으로써 상승효과를 낸 것으로 사료된다.

또한 추출 혼합물은 LPS 처리군 대비 NO 생성량을 최대 280% 정도 우수하게 감소시켰으며 CCD-986sk 섬유아세포에서의 UVB 보호효과를 측정한 결과 UVB로 인해 손상된 세포가 추출 혼합물에 의해 뛰어나게 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

뿐만 아니라 추출 혼합물은 pro-collagen 합성을 농도 의존적으로 증가시키면서 주름개선에 탁월한 효과를 보였으며 α -MSH로 유도된 멜라닌 생성과 tyrosinase 활성을 저해하고 더 나아가 멜라닌 생성에 관여하는 전사인자와 효소들인 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현을 대폭 감소시키는 것을 확인하였다.

결론적으로 승마, 황련, 황백, 후박 추출 혼합물은 단일 추출물에서 나타났던 세포독성을 완화시켰으며 보다 더 우수한 항산화 효과를 나타내었다. 또한 우수한 항염증, 주름개선, 미백 효과가 있어 이 후 다양한 피부 질환 치료 및 기능성 화장품 소재로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 2015 년, 중소기업청 “산학협력력 기술개발사업” (과제번호 C0332975)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Reference

1. D. C. LeBert and A. Huttenlocher, Inflammation and wound repair, *Semin. Immunol.*, **26**(4), 315 (2014).
2. A. Amaro-Ortiz, B. Yan, and J. A. D’Orazio, Ultraviolet radiation, aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation, *Molecules*, **19**(5), 6202 (2014).
3. H. Y. Thong and H. I. Maibach, Irritant dermatitis as a model of Inflammation, *Drug Discov. Today Dis. Mech.*, **5**(2), 221 (2008).
4. Y. Matsumura and H. N. Ananthaswamy, Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **195**(3), 298 (2004).
5. C. H. Hong, S. K. Hur, O. J. Oh, S. S. Kim, K. A. Nam, and S. K. Lee, Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells, *J. E thnopharmacol.*, **83**(1), 153 (2002).
6. S. Y. Kim, J. H. Kim, S. K. Ki, M. J. Oh, and M. Y. Jung, Antioxidant activities of selected oriental herb extracts, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**(6), 633 (1994).
7. J. M. Kang, I. H. Cha, Y. K. Lee, and H. S. Ryu, Identification of volatile essential oil, and flavor characterization and antibacterial effect of fractions from *Houttuynia cordata* Thunb-II. flavor characterization and antibacterial effect of fraction from *Houttuynia cordata* Thunb by prep-HPLC, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**(2), 209 (1997).
8. S. Sharman, D. S. Jill, G. J. Kelloff, and E. S. Vernon, Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis, *Cancer Res.*, **54**(22), 5848 (1994).

9. B. A. Gilchrest, Skin aging and photoaging: an overview, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **21**(3), 610 (1989).
10. K. S. Kang, I. D. Kim, R. H. Kwon, Y. Y. Heo, S. H. Oh, M. A. Kim, H. J. Jung, H. Y. Kang, and B. J. Ha, The evaluation of anti-wrinkle effects in oriental herb extract, *J. Life Sci.*, **17**(8), 1147 (2007).
11. K. H. Wang, R. D. Lin, F. L. Hsu, Y. H. Huang, H. C. Chang, C. Y. Huang, and M. H. Lee, Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines, *J. Ethnopharmacol.*, **106**(3), 353 (2006).
12. B. J. Kim, B. K. Jo, and J. H. Kim, A promising new anti-wrinkle ingredient : pericarpium castaneae extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **25**(4), 57 (1999).
13. J. J. Cho, K. K. Lee, B. K. Jo, and J. D. Choi, Isolation and characterization of elastase inhibitor from *Areca catechu*, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **35**, 163 (2000).
14. J. S. Hwang, Y. K. Cho, J. I. Kim, W. J. Park, and J. S. Lee, The effects of retinoids on Crabp II mRNA induction and collagen synthesis in human dermal fibroblast, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **23**, 9 (1997).
15. C. W. Lee, H. B. Pyo, Y. H. Cho, and S. M. Par, Effect of Korean black soybean seed on the cellular proliferation and the production of type III collagen in skin fibroblast, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **24**(3), 31 (1998).
16. S. K. Park, M. Y. Chang, Y. D. Kim, B. Y. Jeong, Y. H. Won, J. J. Kim, and S. H. Kan, Changes of facial wrinkle after topical application of an emulsion containing medimin A, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **25**(1), 23 (1999).
17. D. C. Shin, G. C. Kim, S. Y. Song, H. J. Kim, J. C. Yang, Y. H. Lee, and B. A. Kim, Antiaging activity of mixed extracts from Korean medicinal herbs on Hs68 skin fibroblast, *Kor. J. Herbology.*, **29**(2), 39 (2014).
18. J. G. Hwang, J. K. Yun, K. H. Han, E. J. Do, J. S. Lee, E. J. Lee, J. B. Kim, and M. R. Kim, Anti-oxidation and anti-aging effect of mixed extract from Korean medicinal herbs, *Kor. J. Herbology.*, **26**(1), 111 (2011).
19. Y. J. Kim, M. J. Lee, J. W. Park, J. K. Kim, D. Y. Choi, and C. H. Kim, Antioxidant activity of water-extract from *Coptis chinensis* Franch, *J. Life Sci.*, **10**(3), 241 (2000).
20. K. H. Choi, Y. K. Kim, S. K. Kang, S. Y. Jung, J. H. Jung, H. S. Seo, and J. G. Yoo, The study on the anti-inflammatory effects of phellodendri cortex, indigo naturalis, alumen, and chinensis galla, most frequently used for the external therapy of Gu-chang, *J. Korean Orient. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.*, **18**(1), 183 (2005).
21. M. J. Lee, J. W. Park, D. S. Kim, J. K. Kim, D. Y. Choi, and C. H. Kim, Antioxidant and nitrite scavenging activity of water extract from *Phellodendron amurense* Rupr., *Kor. J. Ori. Med. Pathol.*, **13**(1), 112 (1999).
22. B. S. Chang, S. H. Son, C. P. Chung, and K. H. Bae, The effects of honokiol and magnolol on the antimicrobial, bacterial collagenase activity, cytotoxicity and cytokine production, *J. Korean Acad. Periodont.*, **23**, 145 (1993).
23. I. Kenji, H. Teru, H. Makoto, R. Noopur, K. Shaji, H. Hirumasa, S. Norihiko, Y. Hiroshi, M. R. Aldo, R. Paul, P. Klaus, L. G. Steven, C. Dharminder, T. Kazuo, A. Jack, and C. A. Kenneth, Honokiol overcomes conventional drug resistance in human multiple myeloma by induction of caspase-dependent and -independent apoptosis, *Blood*, **106**(5), 1794 (2005).
24. S. E. Yang, M. T. Hsieh, T. H. Tsai, and S. L. Hsu, Effector mechanism of magnolol-induced apoptosis in human lung squamous carcinoma CH27 cells, *Br. J. Pharmacol.*, **138**(1), 193 (2003).
25. J. Y. Yang, M. A. Della Fera, S. Rayalam, and C. A. Baile, Enhanced effects of xanthohumol plus honokiol on apoptosis in 3T3-L1 adipocytes, *Obesity*, **16**(6), 1232 (2008).
26. M. S. Blois, Antioxidants determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
27. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannaka, M. Yang, and C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization

- assay, *Free Radical Biol, Med.*, **26**(9), 1231 (1999).
28. B. M. Choi, H. O. Pae, S. I. Jang, Y. M. Kim, and H. T. Chung, Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator, *J. Biochem. Mol. Biol.*, **35**(1), 16 (2002).
29. G. J. Southan and C. Szabo, Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms, *Biochem. Pharmacol.*, **51**(4), 383 (1996).
30. C. Huang, W. Y. Ma, M. I. Dawson, M. Rincon, R. A. Flavell, and Z. Dong, Blocking activator protein-1 activity, but not activation retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**(11), 5826 (1997).