

Original Article / 원저

金銀花 열수 추출물이 피부 美白에 미치는 영향

우배언 · 김혜화 · 이유림 · 박수연 · 정민영 · 최정화
동신대학교 한의과대학 한방안이비인후부과교실

Effects of Hot Water Extracts from *Lonicera Japonica Flos* Extracts on whitening using B16F10 cell lines

Pei-Yen Yu · Hye-Hwa Kim · Yu-Lim Lee · Soo-Yeon Park · Min-Yeong Jung · Jung-Hwa Choi

Dept. of Oriental Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, College of Oriental Medicine, Dongsin University

Abstract

Objectives : This study was designed to investigate effects of *Lonicera Flos* Extracts(LFE) on whitening using B16F10 cell lines.

Methods : In this experiment, we observed effects of LFE on cell viability, inhibitory effects of melanin synthesis, inhibitory effect on tyrosinase, tyrosinase activity, superoxide dismutase(SOD)-like activity and mRNA expression.

Results : In results, more than 2000 $\mu\text{g/ml}$ of LFE treated group showed lowered cell viability rates significantly compared to albutin treated group. More than 2000 $\mu\text{g/ml}$ of LFE treated groups were lower levels of melanin synthesis. Inhibitory effects of melanin production showed in 1000 $\mu\text{g/ml}$ of LFE treated group. 1,000 $\mu\text{g/ml}$ of LFE treated group significantly suppressed tyrosinase activities in vitro. LFE and albutin treated group significantly decreased tyrosinase activity compared to non treated group. SOD-like activity of LFE treated group was lower than vitamin C treated group but increased depending on concentration. 500 $\mu\text{g/ml}$ of LFE treated group and 1,000 $\mu\text{g/ml}$ of LFE treated group was significantly increased. Tyrosinase mRNA expression of α -MSH and LFE 250 $\mu\text{g/ml}$ treated group significantly decreased compared to α -MSH treated group.

Conclusions : These results suggest that LFE can inhibit melanin synthesis through inhibitory action on tyrosinase activity. And LFE suppressed tyrosinase activities B16F10 cells significantly. So I suggest LFE can apply to whitening.

Key words : Whitening; *Lonicerae Flos* Extracts; LFE; B16F10 cells

© 2017 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. 서론

멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 멜라닌 세포의 멜라닌소체에서 합성되어 수상돌기를 통하여 표피의 각질화 세포로 이동되어 피부의 색을 나타낸다. 멜라닌은 자외선이나 외부자극 물질 등으로부터 피부를 보호하는 긍정적인 기능도 있지만, 과도한 색소 침착은 기미와 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하는 등 부정적인 기능을 가지고 있다¹⁾.

최근 길어진 평균 수명과 함께 생활수준이 높아짐에 따라 피부 노화 및 피부 미백에 대한 관심이 증가하고 있는 추세이며, 그에 따라 관련 연구 또한 활발히 진행되고 있다²⁻⁵⁾.

금은화(金銀花, *Lonicerae Japonica Flos*)는 인동과에 속한 다년생 반상록목질등본인 인동덩굴(*Lonicera Japonica THUNB.*)의 꽃봉오리를 건조한 약재로, 그 性味는 甘寒 無毒하고 肺, 胃, 心으로 歸經하며 清熱解毒, 涼散風熱의 효능이 있으며, 熱毒瘡癰을 치료하는 대표적인 약물로 외이도염, 피부염, 중이염, 바이러스성 결막염, 화농증⁶⁻⁷⁾등 주로 염증성 질환에 많이 사용되고 있다⁸⁻⁹⁾, 항균, 항바이러스 효과¹⁰⁾, 간 보호 효과¹¹⁾, 항암효과¹²⁾, 면역증진효과¹³⁾ 항산화 효과¹⁴⁾ 등금은화에 대한 연구가 폭넓게 이루어지고 있다.

금은화 추출물의 UVB 와 H₂O₂ 로 유도된 사람 각질형성 세포 손상에 대한 보호 효과를 관찰한 결과, 항산화 작용이 있는 9가지 물질 중에서 금은화가 가장 우수한 DPPH radical 소거능을 보인 것으로 보고되고 있다¹⁵⁾.

이에 저자는 우수한 항산화 효과가 있는 금은화 열수 추출물이 피부 미백에 미치는 효과와 그 기전을 알아보고자 인간유래 악성 흑색종 세포주인 B16F10

cell을 이용하여 세포 생존율, 멜라닌 생합성율, tyrosinase 활성을 및 mRNA 유전자 발현 그리고 항산화 효소인 superoxide dismutase 유사활성도를 관찰한 결과 유의성을 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 연구에 사용한 금은화¹⁶⁾ (*Lonicerae Japonica Flos*)는 인동과에 속한 다년생 반상록목질등본인 인동(*Lonicera japonica THUNB.*)의 花蕾를 건조한 것으로 동신대학교 광주 한방병원에서 구입하여 사용하였다.

2) 세포주 배양

인간 유래 악성 흑색종(melanoma) 세포주인 B16F10 cell lines은 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하였으며, B16F10 세포주의 생육 배지는 DMEM(Gibco, 11995-065, USA)을 이용하였다. 10% fetal bovine serum(Gibco LOT, NO. 1006842, FBS, USA)과 Antibiotic-Antimycotic(penicillin G sodium 10,000 units/ml streptomycin sulfate 10,000ug/ml, amphotericin B 25ug/ml, Gibco, Grand Island, NY)을 배지에 첨가하였다. 실험하는 기간 동안의 세포주는 5% CO₂ 인큐베이터(vision, Korea)에서 계대배양 하였다.

3) 시약 및 기기

본 연구는 EZ-Cytox Assay kit(DOGen Bio, Korea), PBS(바이오세상, Korea), NaOH(Sigma, USA), α -melanocyte stimulating hormone(Sigma, USA), L-DOPA(Sigma, USA), mushroom tyrosinase(Sigma, USA), arbutin(Sigma, USA), pyrogallol(Sigma, USA), vitamin C(Sigma, USA),

Corresponding author : Jung-Hwa Choi, Department of Korean Medicine Ophthalmology, Otolaryngology and Dermatology, Gwangju Oriental Hospital of Dongshin University, 141 Wolsan-ro, Nam-gu, Gwangju, Korea
(Tel : 062-350-7217, E-mail : choi7217@hanmail.net)

●Received 2017/4/3 ●Revised 2017/5/8 ●Accepted 2017/5/15

Hcl(Sigma, USA), TRIzol reagent(Gibco-BRL, USA), chloroform(Sigma, USA), isopropanol(Sigma, USA), DEPC-treated water(Biosolution, Korea) 등의 특급 시약을 사용하였다. 감압농축기(EYELA, USA), 동결건조기(ILSHIN, Korea), Syringe filter(Sartorius, USA), Microplate Reader(Bio-rad, USA), vortex(JEIO tech, Korea), 원심분리기(Vision, Korea), Biophotometer(Eppendorf, Germany), PCR(Eppendorf, Germany) 등의 기기를 이용하여 실험을 진행하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

금은화 100g을 증류수 1,500ml과 함께 2시간 동안 100℃의 열수로 전탕한 후 15분 동안 3,000rpm에서 원심분리해서 찌꺼기를 제거하고 상층액을 얻었다. 그리고 감압농축기(EYELA, USA)를 이용하여 농축액을 만들어 동결건조기(ILSHIN, Korea)를 이용해서 동결건조 분말(*Lonicerae Flos Extracts*, LFE) 13.6g을 얻었다. 연구에 사용하기 위한 LFE는 인산완충액(Phosphate Buffered Saline, PBS)으로 다시 녹여서 0.20 μ m의 Syringe filter(Sartorius, USA)로 걸러 멸균을 대신하였다.

2) 세포 생존율 측정

EZ-Cytox Assay kit(Dogenbio, Korea)를 사용하여 LFE가 B16F10 세포의 생존율에 미치는 효과를 측정하였다. 96 well plate에 B16F10 세포를 배양하여 각각 well당 5 \times 10⁴ cells/well의 농도로 분주하였고, 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. 다음으로 LFE를 각 농도별(0, 125, 250, 500, 1,000, 2,000 μ g/ml)로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 EZ-Cytox용액 10 μ l를 각각의 well에 처리하였다. 그 후 2시간 동안 세포배양한 후, Microplate Reader(Bio-rad, USA)를 사용하여 450nm에서 측정,

흡광도를 분석하였다.

3) 멜라닌 생합성을 측정

Hosei 등의 방법¹⁷⁾을 참고하여 LFE가 멜라닌 생성에 미치는 영향을 측정하였다. 24 well plate에 B16F10 세포주를 배양하여 모든 well 당 3 \times 10⁴ cells/well의 농도로 분주하였고, 부착 및 안정화를 위해 24시간 동안 배양했다. 배양이 끝난 다음 LFE를 각각 농도별(0, 250, 500, 1,000 μ g/ml)로 처리하여 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 48시간 동안 배양했다. 배양한 후 각 well를 PBS(바이오세상, Korea) 세척하고 1N NaOH(Sigma, USA) 용액 400 μ l을 첨가했고 1시간 동안 60℃에서 용해한 다음 Microplate Reader를 사용하여 405nm에서 측정하였다.

α -MSH(α -melanocyte stimulating hormone Sigma, USA)으로 유도된 멜라닌 생합성에 대한 LFE의 효과를 알기 위해서는 LFE 250 μ g/ml를 처리한 후 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 α -MSH 100 nM를 처리한 후 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 48시간 동안 배양하였다. 그 이후 각각의 well를 PBS로 세척하고 1N NaOH 용액 400 μ l을 첨가했고 1시간 동안 60℃에서 용해한 다음 Microplate Reader를 사용하여 405nm에서 측정하였다.

4) 시험관 내 tyrosinase 활성을 측정

Yagi 등의 방법¹⁸⁾을 이용해 LFE가 tyrosinase 활성에 미치는 효과를 측정하였다. 10mM L-DOPA(Sigma, USA)용액 0.2ml 그리고 0.175M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 0.5ml를 가하였다. 그 후 FRD를 buffer에 녹이고 최종농도(0, 125, 250, 500, 1,000 μ g/ml)가 되도록 0.1ml를 가한 후 mushroom tyrosinase(110 unit/ml, Sigma, USA) 0.2ml를 첨가하여 37℃에서 2분간 반응한 후 475nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해율의 계산은 다음과 같이 하였다.

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

- A : 효소만 첨가된 반응 용액
- B : 효소와 시료가 모두 첨가된 반응 용액
- C : 시료만 첨가된 반응 용액
- D : 효소와 시료가 모두 첨가되지 않은 반응 용액

5) 세포 내 tyrosinase 활성을 측정

Martinez-Esparza 등의 방법¹⁹⁾을 이용해 LFE가 세포 내 tyrosinase 활성에 미치는 효과를 측정하였다. B16F10 세포를 세포배양접시에 각각 1.5×106 cells/dish의 농도로 분주한 후, 24시간 동안 incubation해서 부착 및 안정화를 시킨 다음 LFE 250 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 인큐베이터에서 추가로 24시간을 배양하였다. 그 후, 세포를 1% Triton X-100(Sigma, USA)을 함유한 10mM PBS 100 μl 에 현탁시키고 vortex(JEIO tech, Korea)를 이용해 vortexing한 후 원심분리기(Vision, Korea)를 이용하여 1,000rpm에서 5분 간 원심분리한 상층액을 활성 측정 효소액으로 사용하였다. 96 well plate에 기질인 L-DOPA(2mg/ml) 100 μl 를 넣고, 효소액 40 μl 를 첨가하였다. 그 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 인큐베이터에서 1시간 동안 반응하게 한 후 Microplate Reader를 사용하여 405nm에서 tyrosinase의 활성을 측정하였다. 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 tyrosinase의 활성 저해율을 계산하였다.

α -MSH에 의하여 유도된 세포내 tyrosinase 활성에 미치는 효과를 알기 위해 LFE 250 $\mu\text{g/ml}$ 와 arbutin(Sigma, USA) 250 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리하였다. 1시간이 경과한 후 α -MSH 100nM를 처리했고, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포를 1% Triton X-100을 함유한 10mM PBS 100 μl 에 현탁시키고 vortex를 이용해 세포를 vortexing한 후 원심분리기를 이용하여 1,000rpm에서 5분 간 원심분리한 상층액을 활성 측정 효소액으로 사용하였다. 이후 실험과 저해율 계산은 tyrosinase의 활성 저해율과 동일한 방법으로 실시하였다.

6) Superoxide dismutase (SOD)유사활성도 측정

LFE의 SOD 유사활성도는 Marklund 등의 방법²⁰⁾을 이용해 활성 산소종을 과산화수소(H₂O₂)로 전환시키는 반응의 촉매 역할을 하는 pyrogallol(Sigma, USA)의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성을 나타내었다. 양성대조군은 vitamin C 250 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, USA)을 처리하였을 때의 SOD 유사활성으로 하고, LFE 처리 후 나타나는 유사활성을 알아보기 위해 LFE 각 농도(0, 125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$)를 buffer에 녹인 다음 10 μl 씩 96 well plate에 첨가하였다. 그 후 7.2mM pyrogallol 10 μl 와 Tris-HCl Buffer(50mM Tris aminomethane, 10mM EDTA, pH 8.0) 150 μl 를 첨가하여, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 1N Hcl(Sigma, USA) 50 μl 를 첨가해 반응을 정지시킨 다음 ELISA Reader를 사용하여 420nm에서 흡광도를 측정하였다. LFE 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이에 대한 백분율(%)로 SOD 유사활성도를 계산하였다.

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

- A : 추출물 첨가구의 흡광도
- B : 추출물 무첨가구의 흡광도

7) Tyrosinase mRNA 발현 관찰

① 총 RNA 분리

100mm 세포배양접시에 세포 수가 1.5×106 개가 되도록 넣고 세포배양접시에 붙을 수 있도록 성장배지 (10% FBS가 포함된 DMEM)에서 24시간 동안 배양하였다. 그 다음 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 arbutin과 DRCE를 각각 처리한 다음 1시간 후에 α -MSH 100nM를 각각 처리하여 24시간 incubation하여 RNA를 추출하였다. RNA를 분리하기 위해 실험배지를 제거하고 10mM PBS(pH 6.8)로 남아있는 배지를 씻어주었다.

TRIzol reagent(Gibco-BRL, USA)를 넣어 상온에서 10분간 반응시켜 1.5ml tube에 모았다. -70℃에 10분 보관 후 실온에서 녹인 다음 chloroform(Sigma, USA)를 넣고 잘 흔들어 준 후, 4℃에서 5분간 13,200rpm의 속도로 원심분리를 수행하여 상층액을 isopropanol(Sigma, USA)이 들어있는 1.5ml tube에 옮겨 15초간 흔들어 섞어준 후 실온에서 5분간 RNA를 침전시키고 4℃에서 5분간 13,200rpm의 속도로 원심분리를 수행하였다. 상층액을 제거하고, RNA pellet에 75% ethyl alcohol과 함께 DEPC-treated water(Biosolution, Korea)를 넣고 4℃에서 13,200rpm의 속도로 5분간 원심분리를 실행하여 RNA pellet을 washing해 주었다. 그 후 상층액을 제거하고 RNA pellet을 실온에서 10분간 건조한 후 DEPC water에 RNA pellet을 녹였다. RNA 정량은 50배 희석하여 Biophotometer(Eppendorf, Germany)를 이용하여 260nm에서 흡광 측정하여 total mRNA 양을 정량하였다.

② cDNA

DNA 합성을 위해 5 μ g/ml total RNA와 500 μ g/ml의 Oligo(Sigma, USA)을 RT Premix(Bioneer, Korea)에 넣고 DEPC water로 총 volume이 50 μ l가 되게 하였다. 70℃에서 5분간, 4℃에서 5분간, 42℃에서 60분간, 94℃에서 5분간, 4℃에서 5분간 반응시켰다.

③ RT-PCR

Reverse transcription 반응 과정에서 일차적으로 생성된 cDNA를 주형으로 이용하였다. cDNA 증폭을 위하여 10 μ mol의 sense, anti-sense primer를 사용하였다.

Tyrosinase의 PCR(Eppendorf, Germany) 조건은 95℃에서 5분간 preincubation하고, 94℃에서 30초 동안 denaturation, 57℃에서 30초 동안 annealing, 72℃에서 30초 동안의

extension, 72℃에서 10분, 4℃에서 10분을 총 40 cycles로 수행하였다. GAPDH의 PCR조건은 95℃에서 5분간 preincubation하고, 94℃에서 30초간 denaturation, 55℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 30초 동안의 extension, 72℃에서 10분, 4℃에서 10분, 35cycles 을 수행하였다. 그 다음 1.5% agarose gel을 사용해 전기영동한 후, Gel Imaging system (Davinch-K, Korea) 에서 PCR product를 확인하였다.

3. 통계처리

수집한 데이터를 통계 처리할 때, SigmaPlot 11.1(www.systat.com)를 활용하여 one-way ANOVA 기법을 사용하였으며, 통계적 유의성은 Tukey 방법을 이용하여 사후검정을 시행하였다. p-value가 0.05 미만일 경우만 통계적으로 유의한 것으로 인정하였다.

III. 실험결과

1. 세포 생존율에 미치는 효과

LFE가 B16F10 세포 생존율에 미치는 효과를 알아보기 위해 세포주에 LFE를 농도별(0, 125, 250, 500, 1,000, 2,000 μ g/ml)로 처리 후, 24시간 배양한 다음 생존율을 측정하였다(Fig. 1). LFE를 처리하지 않았을 때의 B16F10 세포주의 생존율을 100.00 \pm 1.90%라 하였을 때 LFE 250 μ g/ml를 처리하였을 때는 90.61 \pm 5.08%로 감소하기 시작하였고, 특히 2,000 μ g/ml를 처리하였을 때는 처리하지 않았을 때보다 71.89 \pm 2.70%로 유의성(p (0.05) 있게 세포 생존율을 억제하였다.

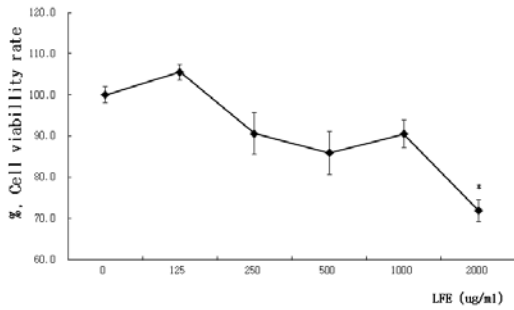


Fig. 1. Effects of LFE on cell viability rate in B16F10 cells.

LFE: Hot water extract made from *Lonicera Flos*, Results are presented as mean±SD (n=8).

: Statistically significance compared with non-treated group (0ug/ml) (: p<0,05)

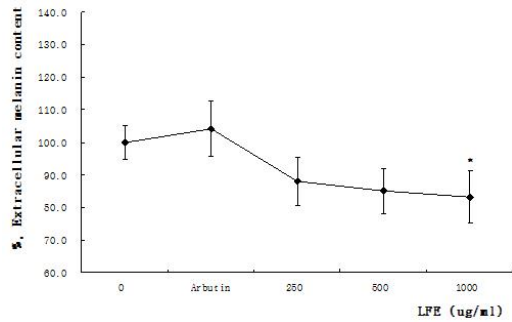


Fig. 2. Inhibitory effects of LFE on melanin production in B16F10 cells.

LFE: Hot water extract made from *Lonicera Japonica Flos*, Results are presented as mean±SD (n=4).

: Statistically significance compared with arbutin treated group (:p<0,05)

2. 멜라닌 생합성율에 미치는 효과

LFE가 B16F10 세포주의 멜라닌 생합성율에 미치는 저해효과를 알아보기 위하여 LFE를 농도별(0, 250, 500, 1,000ug/ml)로 처리 후 24시간 배양한 다음 멜라닌 생합성율을 측정된 결과 다음과 같았다(Fig. 2). Arbutin과 LFE를 처리하지 않은 군의 멜라닌 생합성율을 100.00±5.21%라 하였을 때, arbutin 250ug/ml을 처리한 군의 멜라닌 생합성율은 104.19±8.44%로 나타난 반면 LFE를 처리하였을 때는 처리농도별로 멜라닌 생합성율이 감소하였고, LFE 1,000ug/ml을 처리하였을 때의 멜라닌 생합성율은 83.23±8.09%로 arbutin 처리시보다 유의성(p<0,05) 있게 억제하였다.

또한, LFE가 α-MSH으로 유도된 멜라닌 생합성에 대한 효과를 측정된 결과는 다음과 같았다(Fig. 3). 아무런 처리를 하지 않은 처리군의 멜라닌 생합성율을 100.00±3.19%라 하였을 때, α-MSH에 의해 유도된 멜라닌 생합성율은 112.05±10.25%로 증가하였으나 α-MSH와 arbutin 250ug/ml을 혼용처리한 양성대조군과 α-MSH와 LFE 250ug/ml를 혼용처리군의 멜라닌 생합성율은 각각 103.01±1.15%와 104.22±2.06%로 α-MSH 단독 처리군보다 감소하였다.

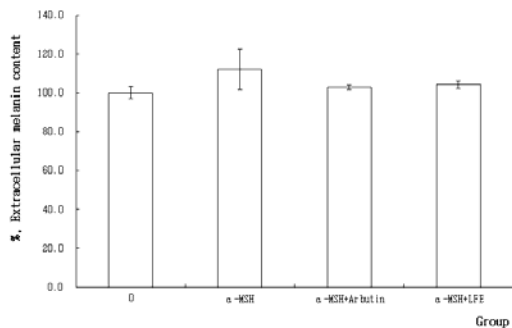


Fig. 3. LFE Inhibits melanin production in α-MSH stimulated B16F10 cells.

LFE: Hot water extract made from *Lonicerae Flos*, α-MSH : Group that treated α-melanocyte stimulating hormone 100nM, α-MSH + arbutin : Group that treated α-MSH 100 nM and arbutin 250ug/ml, α-MSH + LFE : Group that treated α-MSH 100 nM and LFE 250ug/ml, Results are presented as mean±SD (n=4).

3. 시험관 내 tyrosinase 활성율에 미치는 효과

LFE가 tyrosinase 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 LFE를 농도별(0, 125, 250, 500, 1,000ug/ml)로 처리 후 tyrosinase 활성율을 측정하였다(Fig. 4). LFE를 처리하지 않은 군의 tyrosinase 활성율을 100.00±0.69%라 하였을 때 LFE의 처리농도가 증가할수록 tyrosinase 활성은 감소하였다. LFE 250ug/ml과 500ug/ml를 처리하였을 때의 tyrosinase 활성율은

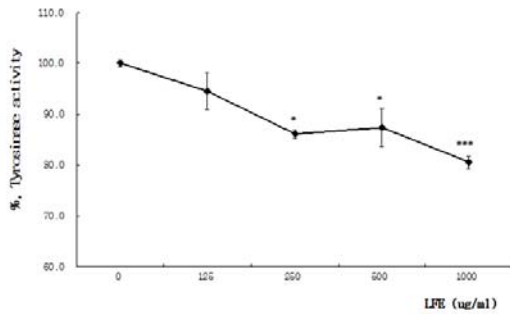


Fig. 4. The effects of LFE on tyrosinase activity in vitro. LFE: Hot water extract made from *Lonicera Japonica Flos*, Results are presented as mean±SD (n=4). *: Statistically significance compared with non-treated group(0µg/ml)(* : p<0.05, *** : p<0.001).

86.02±0.81%와 87.29±3.76%로 LFE를 처리하지 않았을 때보다 유의성(p<0.05) 있게 감소하였다. 특히 LFE 1,000µg/ml 를 처리하였을 때 tyrosinase의 활성율은 LFE를 처리하였을 때보다 80.51±1.09%로 유의성(p<0.001) 있게 감소하였다.

4. 세포 내 tyrosinase 활성율에 미치는 효과

LFE가 세포 내 tyrosinase 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 B16F10 세포주에 LFE를 처리한 다음 tyrosinase 활성율을 측정된 결과 다음과 같았다 (Fig. 5). Arbutin 250µg/ml과 LFE 250µg/ml을 처리를 하지 않은 군의 tyrosinase 활성율을 100.00±1.65%라 하였을 때, arbutin과 LFE를 처리한 처리군의 tyrosinase 활성율은 각각 91.83±0.60%와 91.22±0.94%로 LFE를 처리하지 않은 군에 비해 유의성(p<0.001) 있게 감소하였다.

또한, LFE가 α-MSH에 의하여 유도된 tyrosinase 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 B16F10 세포주에 α-MSH와 함께 LFE를 병용처리한 다음 tyrosinase 활성율을 측정된 결과 다음과 같았다(Fig. 6). 아무런 처리를 하지 않은 처리군의 tyrosinase 활성율을 100.00±0.32%라 하였을 때, α-MSH 유도에 의한 tyrosinase 활성율은 138.65±2.53%로 증가하였

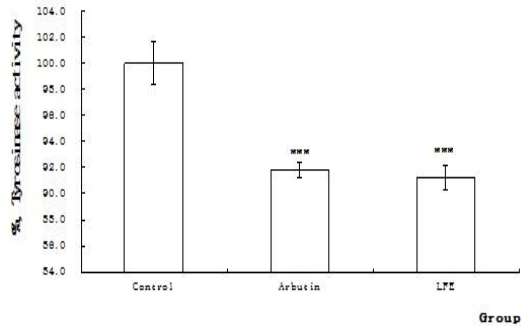


Fig. 5. Inhibitory effects of LFE on tyrosinase activity in B16F10 cells.

Control : Non-treated group, Arbutin : Arbutin 250µg/ml treated group, LFE : Group that treated hot water extract made from *Lonicera Japonica Flos* 250µg/ml, Results are presented as mean±SD (n=8).

*: Statistically significance compared with Control group(*** : p<0.001).

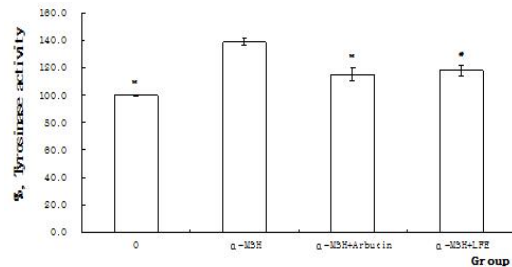


Fig. 6. The effects of LFE and α-MSH on tyrosinase activity in B16F10 cells.

α-MSH : Group that treated α-melanocyte stimulating hormone 100nM, α-MSH + Arbutin : Group that treated α-MSH 100nM and arbutin 250µg/ml, α-MSH + LFE : Group that treated α-MSH 100nM and LFE 250µg/ml, LFE : Hot water extract made from *Lonicera Japonica Flos*, Results are presented as mean±SD (n=8).

: Statistically significance compared with α-MSH treated group(: p<0.05).

: Statistically significance compared with non-treated group(# : p<0.05).

고, α-MSH와 arbutin 250µg/ml을 혼용처리한 양성 대조군의 tyrosinase의 활성율은 115.00±4.65%로 α-MSH 단독처리 하였을 때보다 유의성 (p<0.05) 있게 감소하였다. 또한 α-MSH와 LFE 250µg/ml를 혼용처리 하였을 때의 tyrosinase의 활성율도 117.75±3.91%로 양성대조군의 활성율과 비슷하게 α-MSH

단독처리 하였을 때보다 감소하였다.

5. Superoxide dismutase 유사활성에 미치는 효과

LFE가 SOD 유사활성에 미치는 효과를 알아보기 위해 LFE를 농도별(125, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하였다. 그렇게 한 후, SOD 유사활성도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다(Fig. 7). LFE가 SOD 유사활성에 미치는 효과의 관찰을 위해 vitamin C 250 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 양성대조군의 SOD 유사활성도를 $100.00 \pm 1.96\%$ 라 했을 때, LFE를 농도별로 처리하였

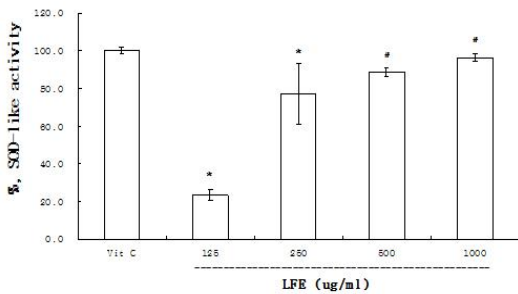


Fig 7. Superoxide dismutase-like activity of LFE depending on concentration.

Vit C : vitamin C 250 $\mu\text{g/ml}$ treated group, LFE : Hot water extract made from *Lonicera Japonica Flos*, Results are presented as mean \pm SD (n=8).

: Statistically significance compared with Vitamin C treated group (; p(0.05).

#: Statistically significance compared with LFE 125 $\mu\text{g/ml}$ treated group (# ; p(0.05).

을 때의 SOD 유사활성도는 양성대조군보다는 낮았지만 농도 의존적으로 SOD 유사활성도가 증가하였고, 투여농도(500 $\mu\text{g/ml}$, 1,000 $\mu\text{g/ml}$)간 SOD 유사활성도도 유의성 (p(0.05) 있게 증가하였다.

6. Tyrosinase mRNA 발현에 미치는 효과

LFE가 유전자 발현에 미치는 효과를 알아보기 위하여 tyrosinase mRNA 발현정도를 측정한 결과 다음과 같았다(Fig. 8). 아무런 처리를 하지 않았을 때의 tyrosinase mRNA 유전자 발현을 100%라 하였을 때 LFE를 처리한 tyrosinase 유전자 발현은 arbutin을 처리하였을 때(98.1%)보다 약간 감소하는 경향 (97.8%)을 보였다. 또한 α -MSH를 처리를 하지 않은 군의 tyrosinase mRNA 유전자 발현을 100%라 하였을 때 α -MSH로 유도한 처리군의 tyrosinase 유전자 발현은 120.6%로 현저히 증가하였다. 하지만 α -MSH와 arbutin 250 $\mu\text{g/ml}$ 를 혼용 처리하였을 때는 102.5%로 감소하였고, α -MSH와 LFE 250 $\mu\text{g/ml}$ 를 혼용 처리하였을 때의 tyrosinase 유전자 발현은 107%로 α -MSH 단독처리 시보다 두드러지게 감소하였다.

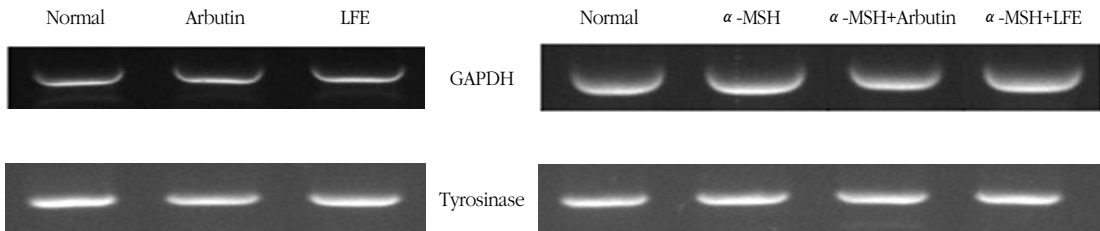


Fig. 8. Effects of LFE on tyrosinase mRNA expression in B16F10 cells.

LFE : Hot water extract made from *Lonicera Japonica Flos*, Cells were incubated with medium containing LFE 250 $\mu\text{g/ml}$ for 24 hrs. The tyrosinase mRNA levels in each sample was normalized to the quantity of GAPDH. The fold induction of tyrosinase mRNA in treated cells was calculated as ratio of the corresponding mean value of the control cells, Results are presented as mean \pm SD.

IV. 고 찰

최근 효과가 빠르고 좋은 미백용품에 대한 연구가 각 분야에서 활발히 진행되고 있다. 피부색의 결정 인자는 표피에 분포하는 멜라닌, 진피에 분포하는 헤모글로빈 그리고 피하조직에 분포하는 카로틴 등이며^{21,23,24}, 그 중 피부 표피에 존재하는 멜라닌 세포의 분포 면적과 양적 다소가 피부색의 중요 결정인자가 된다²¹⁻²⁴.

멜라닌은 동식물 및 미생물에 널리 존재하는 melanocyte라는 흑색세포 내에서 만들어지는 페놀류의 고분자 물질로 피부와 머리카락의 색을 결정 할 뿐만 아니라 자외선에 의한 세포손상을 막아주고, 독성 약물의 흡수 등과 같은 중요한 작용을 수행한다¹.

최근 미백효과에 대한 연구는 피부 미백, 항산화작용, 안티에이징 등을 포함하는 포괄적 개념으로 진행되고 있다. 현재 시행되고 있는 미백에 대한 연구는 멜라닌 세포에 멜라닌의 합성을 명령하는 신호 전달 물질인 cytokine의 작용을 조절하는 연구, 자외선 차단 소재 연구, tyrosinase 작용 억제, 유전자 발현억제, 활성산소 제거 소재, 각질층 제거 촉진 소재, 색소 환원 연구 등 여러 방법으로 연구되고 있는 추세이다^{21,25,26}. 한의학계에서 이루어진 미백 관련 연구로 최 등²⁷이 枸杞子 추출물을 B16F110 세포에 처리하여 세포 증식율에 미치는 영향과 멜라닌 생합성 저해율 및 tyrosinase 저해활성 및 유해활성을 측정하였고, 박 등²⁸은 五倍子가 B16 세포의 tyrosinase 및 tyrosinase 활성 억제를 측정하였다. 안 등²⁹은 乾漆의 tyrosinase 저해활성에 대하여 연구하였고, 안 등³⁰의 溫清飲, 박 등³¹의 加味歸脾湯, 김³²의 瀉白散 등과 같은 복합제 그리고 이³³의 麻黃 및 摩風膏, 최³⁴의 桑白皮주 oxyresveratrol, 손³⁵의 加減西施玉容散과 같은 산제 및 고형제를 적용한 연구가 이루어지고 있다. 이와 같이 다양한 재료를 통해 세포 생합성율, tyrosinase 저해활성 및 유해활성, mRNA,

superoxide dismutase 유사활성도에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

금은화(金銀花, *Lonicera Japonica Flos*)는 인동과(Caprifoliaceae)에 속한 인동 덩굴(*Lonicera Japonica Thunb.*)의 꽃봉오리를 초여름 꽃이 피기 전에 채취해서 말린 약재이다. 최근 연구 동향 분석에 따르면 금은화는 감염성 질환, 화농증, 외이도염, 바이러스성 결막염, 중이염, 인플루엔자, 폐렴 등 폭넓은 염증성 질병에 사용되고 있을^{6,7} 뿐만 아니라 항균, 항바이러스 효과¹⁰, 항산화 효과¹⁴, 간보호 효과¹¹, 항암효과¹², 면역증진효과¹³ 등이 있는 것으로 밝혀졌다. 2010년을 기준으로 지난 10년간 금은화에 대한 연구 논문의 동향을 살펴보면 항염작용 및 독성에 대한 연구들이 가장 많은 것으로 보아 清熱解毒藥의 특성에 부합하는 연구들이 많았고, 그 중 호흡기질환 영역에 대한 연구가 높은 빈도를 보였다³⁶.

금은화는 폐에 歸經하는 약재로 《黃帝內經》에서는 “肺는 숨은 皮요,鬚는 毛가 되며, 肺가 皮毛를 主管한다.”하여 폐와 피부의 연관성을 언급했으며³⁷⁻³⁹, 또한 항산화효과¹⁴에 유의성 있는 연구결과로 미루어 볼 때 금은화 열수 추출물(Lonicera Flos Extracts, LFE)이 악성 흑색종 세포주인 B16F10 세포의 생존율과 멜라닌 합성율에 유의성 있는 효과가 있을 것이라 생각하여 본 연구를 하게 되었다.

LFE가 B16F10 세포의 생존에 미치는 효과를 관찰한 결과 LFE를 처리하지 않았을 때의 B16F10 세포주의 생존율에 비해 LFE 250ug/ml를 처리하였을 때 생존율이 감소하기 시작하여 고농도를 처리하였을 때는 LFE를 처리하지 않았을 때보다 약 30% 정도 세포생존율을 억제하였다(Fig. 1). 또한, B16F10 세포주의 멜라닌 생합성율에 대한 저해효과를 관찰한 결과, LFE 처리농도별로 멜라닌 생합성율이 감소하였고(Fig. 2), 특히 α-MSH와 LFE 250ug/ml를 혼용처리하였을 때의 멜라닌 생합성율은 α-MSH와 arbutin 250ug/ml을 혼용처리한 처리군의 멜라닌 생합성율과 비슷하게 α-MSH 단독처리군보다 감소하였다(Fig. 3).

표피에 분포하는 멜라닌은 자외선을 차단하는 색소로 자외선에 피부가 노출될 때 세포손상을 방어하기 위한 수단으로 생성⁴⁰⁾되기 때문에 만약 자외선에 과다하게 노출되거나 α -MSH(α -melanocyte stimulating hormone)에 의하여 멜라닌이 생성⁴¹⁾되면 멜라닌은 피부표면에 침착된다. 이는 기미, 주근깨 등과 같은 다양한 색소 침착을 유발한다⁴²⁾. 이러한 기전에서 볼 때 LEF가 인간 유래 흑색종 세포의 생존을 및 멜라닌 생합성을 억제하는 것으로 생각된다.

멜라닌은 tyrosine이 tyrosinase의 작용에 의해 여러 가지 물질로 대사되는 과정 중에서 최종적으로 합성되기 때문에⁴³⁾ 멜라닌의 생성효소인 tyrosinase의 합성이 억제되거나 그 활성이 저해되면 멜라닌 생성이 감소된다⁴⁴⁾. 그런 이유로 tyrosinase의 억제제인 arbutin 등을 미백 첨가제로 소량 활용되고 있다⁴⁵⁾.

금은화 열수 추출물(LFE)이 멜라닌 생성에 관여한다면 tyrosinase 활성에도 관련이 있을 것으로 생각하여 시험관내 tyrosinase 활성을 관찰한 결과 LFE 처리농도에 의존적으로 tyrosinase의 활성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그리고 B16F10 세포 내에서의 tyrosinase 활성을 관찰한 결과 LFE 단독 처리 시에는 arbutin을 처리한 결과와 같이 아무런 처리를 하지 않은 군의 tyrosinase 활성에 비해 유의성($p < 0.001$) 있게 감소하였고(Fig. 5), α -MSH와 LFE 250 μ g/ml를 병용처리하였을 때의 tyrosinase의 활성을도 α -MSH와 arbutin 250 μ g/ml를 병용처리한 군의 활성들과 비슷하게 α -MSH 단독처리로 증가한 tyrosinase의 활성을 억제하였다(Fig. 6). 또 tyrosinase mRNA 유전자 발현에도 관여할 것으로 생각되어 PCR 기법으로 tyrosinase mRNA 발현률을 측정하였다. LFE를 처리하였을 때 tyrosinase mRNA 유전자 발현은 아무것도 처리를 하지 않았을 때보다 감소하였고, α -MSH로 유도된 처리군에서 현저히 증가한 tyrosinase 유전자 발현 역시 α -MSH와 LFE 250 μ g/ml를 병용처리 하였을 때 감소하였고, 이는 α -MSH와 arbutin을 병용처리 하였을 때와 비슷하였다

(Fig. 8). 이와 같은 결과로 금은화 추출물이 tyrosinase의 활성을 억제함으로써 멜라닌 생합성을 감소시키는 것으로 생각되며, 금은화 추출물이 미백 치료제로 사용 될 수 있을 거라 생각된다.

활성산소는 인체에서 산화를 일으켜 세포의 노화를 유발하고, 각종 질병의 원인이 되는데 이러한 활성산소를 정상상태의 산소로 전환시켜주는 역할을 하는 것이 superoxide dismutase(SOD)로, 이와 관련한 연구가 이루어지고 있다. SOD 유사활성 물질은 효소인 SOD와는 근본적으로 다르지만 활성산소의 반응성을 억제하여 생체를 보호한다는 면에서 SOD와 같은 역할을 하며, 산화과정을 저해하여 멜라닌색소 생합성을 억제하기 때문에 색소 침착을 저해하는 효과가 있다⁴⁶⁾.

이에 따라 미백효과를 나타낸 금은화 추출물(LFE)의 작용기전이 tyrosinase 외에 또 다른 기전이 있는 지에 대하여 알아보기 위해 SOD 유사활성도를 측정하였다. 항산화성 효과가 있는 vitamin C 250 μ g/ml를 처리하였을 때의 SOD 유사활성과 비교할 때 LFE의 처리 농도가 증가할수록 vitamin C 250 μ g/ml 처리시의 SOD 유사활성과 비슷하였고, LFE 125 μ g/ml를 처리하였을 때보다 고농도에서 각각 유의성($p < 0.05$) 있게 증가하였다. 이는 금은화 추출물이 산화적 스트레스에 대한 방어효능도 있음을 알 수 있다.

이와 같은 결과로, 금은화 추출물은 tyrosinase 활성 억제, SOD 유사활성 촉진을 통한 미백효능이 있는 약물이란 생각된다. 앞으로 미백 외용약으로서의 효과, 추출방식에 따른 효과 비교 그리고 금은화를 군약으로 하는 처방에 대한 미백효과 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

금은화 열수 추출물이 인간 유래 악성 흑색종 세포주인 B16F10 cell에 미치는 미백 효과와 그 기전을

알아보기 위해 세포생존율, 멜라닌 생합성을, tyrosinase 활성을 및 mRNA 유전자 발현, superoxide dismutase(SOD) 유사활성도를 관찰한 결과 이와 같은 결론을 얻었다.

1. 금은화 추출물은 처리농도에 의존해 B16F10 세포 주의 생존율을 감소시켰다.
2. 금은화 추출물은 멜라닌 생합성을 처리농도에 의존해 감소시켰고, arbutin을 처리한 양성대조군에 비해 유의한 감소를 보였다. 또한 α -MSH로 유도한 멜라닌 생합성에 비해 감소한 양성대조군과 유사한 멜라닌 생합성의 감소현상을 나타냈다.
3. 금은화 추출물은 시험관 내 tyrosinase의 활성을 처리농도에 의존해 유의성 있게 감소시켰고, 세포 내에서도 arbutin을 처리한 양성대조군과 유사한 tyrosinase의 활성을 억제하였다. 특히, α -MSH로 유도한 tyrosinase의 활성을 유의성 있게 감소시킨 양성대조군과 유사한 억제효과를 나타냈다.
4. 금은화 추출물은 항산화성 물질인 vitamin C를 처리한 양성대조군보다 저농도 처리 시에는 SOD 유사활성이 감소하였지만 250 μ g/ml 이상을 처리한 농도에서는 양성대조군과 유사한 결과를 나타냈다.
5. 금은화 추출물이 tyrosinase mRNA 유전자 발현을 arbutin을 처리한 양성대조군과 같이 억제하였고, α -MSH로 유도된 tyrosinase mRNA 유전자 발현을 현저히 억제하였다.

References

1. Kim GY, Go HJ, Ko GW, Kim YJ, Jang MJ. Esthetic. Paju:Soomunsa, 1997.
2. Fisher G, Kang S, Varani J, Bata CZ, Wan YS, Datta S, et al. Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin aging. Arch Dermatol, 2002;138(11):1462-70.
3. Chung JH, Yano K, Lee MK, Youn CS, Seo JY, Kim KH, et al. Differential effects of photoaging Vs intrinsic aging on the Vascularization of human skin. Arch Dermatol. 2002;138(11):1437-42.
4. Wlaschek M, Tantcheva-Poór I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. J Photochem Photobiol B. 2001;63(1):41-51.
5. Krutmann J. New developments in photoprotection of human skin. Skin Pharmacol Physiol. 2001;14(6):401-7.
6. Bensky D, Gamble A, Kaptchuk TJ. Chinese herbal medicine: materia medica, 1st ed. Seattle:Eastland Press, 1993.
7. Huang KC. The Pharmacology of Chinese herbs. 2nd ed. Cleveland:CRC press, 1998.
8. Kim DH, Kim HM, Ryu JH, Um JY, Kim SC, Yang JH, et al. Pharmacology of Oriental medicine. Seoul:Sinilsangsa, 2005.
9. Kim IR, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YG, Park GH, et al. Herbal medicine. Seoul:Younglimsa, 2007.
10. Bae JH, Kim MS, Kang EH. Antimicrobial Effect of Lonicerae Flos Extracts on Food-borne Pathogens. Kor J Food Sci Technol, 2005;37(4):642-7.
11. Ohata S, Sato N, Tu SH, Shinoda M. Protective effects of Taiwan crude drugs on experimental liver injuries. Yakugaku Zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan. 1993;113(12):870-80.
12. Rim BM, Rim CW, Choi JY, Chung YS, Jeong HG. Effects of Lonicera japonica extract as a biological response modifier. Environ.

- Mut, Car. 1992;12(1):45-54.
13. Luo ZH, The combined modulating effects of cerium nitrate with certain Chinese traditional drugs on altered cell-mediated immunities in scald mice, *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 1990;28(9):562-75.
 14. Joo JS, Kim JS, Jeong JG, Kim BK, Study of efficacy of *Foeniculi fructus* and *Lonicerae flos* extract on acute pancreatitis, *Kor J Herbology*, 2010;25(4):39-45.
 15. Seo SH, The Protective effect of *Lonicera Japonica Flos* extracts on UVB or H₂O₂-induced human keratinocyte, HaCaT damage, Gwangju:Kwangju Woman University, 2014:25-30.
 16. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine schools, *Herbology*, Seoul: Younglimsa, 2010:240-2.
 17. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T, Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ and Retinoic Acid, *Cancer Res*, 1985;45(4):1474-8.
 18. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N, The effect of tyrosinase inhibition for aloe, *Planta Medica*, 1986;3981(3981):517-9.
 19. Martínez-Esparza M, Jiménez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, García-Borrón JC, Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells, *Eur J Biochem*, 1998;255(1):139-46.
 20. Marklund G, Marklund S, Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur J BioChem*, 1974; 47:468-74.
 21. Lee YS, *Clinical dermatology*, Seoul:Yeomoongak, 1987;210.
 22. Publishing committee of Korean Dermatological Association, *Dermatology*, Seoul:Yeomoongak, 1994.
 23. Kim JD, *Skin management*, Seoul:Gomoonsa, 1994:23-113.
 24. Kim BH, *New cosmetology*, Seoul:Yangsaengeuihaksa, 1998:73-311.
 25. Eun HC, *Dermatologic Immunology*, Seoul: Publishing department of Seoul university, 1999:147-8.
 26. Schröder JM, *Cytokine Networks in the Skin*, *J Investig Dermatol*, 1995;105:S20-4.
 27. Choi JH, Choi JH, Park SY, Kim JH, Jeong MY, Effects of Lycii Fructus Extracts(LFE) on Skin whitening and Elasticity using Melanoma cells, *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 2014;27(1):58-67.
 28. Park JM, Park KJ, The Anti-wrinkle Effects and Whitening Effects of Galla Rhois, *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 2010;23(1):135-48.
 29. Ahn JH, Kim GJ, The effect of wrinkle care and whitening by *Rhus verniciflua* Stokes, *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 2016;29(3):124-33.
 30. An TEB, Kim DC, In Vitro Cytotoxicity, Skin Regeneration, Anti-wrinkle, Whitening and In Vivo Skin Moisturizing Effects of *Oncheongeum*, *J Orient Obstet Gynecol*, 2016;29(1):14-34.
 31. Park HS, Kim HJ, Kim YB, The effect of whitening by *Gamiguibitang*, *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol*, 2004;17

- (2):48-58.
32. Kim SK, Experimental Studies on the Depigmental Function of *Sabaek-san*, Seoul: Kyunghee University, 2000:1-21.
33. Lee SH, Depigmenting activity of mapoongko and ephedrae herba, Seoul:Kyunghee University, 2001:1-35.
34. Choi SY, Inhibitory Effects on Melanin Production of Resveratrol and Stilbene Derivative, Seoul:Kyunghee University, 2001: 1-39.
35. Son DS, Kim YB, Depigmentation activity of *Kakmeseosiokyong-san*, J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2002;15 (2):104-17.
36. Kim Y, Yang SY, Oh YS, Lee JW, Lee YK, Park YC, Research trends of *Lonicera Japonica* over the Last 10 years. The Journal of Daejeon Oriental Medicine Research Institute of Korean Medicine Semiannual, 2010;19(1):17-23.
37. Hong WS, Profreading of *Hwangjenaeg-yungsomun*, Seoul:Oriental medicine research institute, 1984.
38. Lee HG, Jung SG, Oriental medicine of lung system internal medicine, Seoul:Minseo-chulpansa, 1988.
39. Kim WH, Theory of Korean medicine, Seoul:Sungbosa, 1982;104-7.
40. Wang K, Lin R, Hsu F, Huang Y, Chang H, Huang C, et al, Cosmetic application of selected traditional Chinese herbal medicines, J Ethnopharmacol, 2006;106(3):353-9.
41. Sulaimon S, Kitchell B, The Biology of Melanocytes, Vet Dermatol, 2003;14(2):57-65.
42. Prota G, Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals, J Invest Dermatol, 1980;75(1):122-7.
43. Lee JY, An BJ, Whitening and Anti-wrinkling Effects of Fractions from *Prunus persica Flos*, Korean J Microbiol Biotechnol, 2012;40(4):364-70.
44. Gupta AK, Gover MD, Nouri K, Taylor S, The treatment of melasma ; a review of clinical trials, J Am Acad Dermatol, 2006;55(6):1048-65.
45. Ando S, Ando O, Suemoto Y, Mishima Y, Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitors, J Invest Dermatol, 1993;100(2):150-5.
46. Han DS, Kim SJ, Development of similar active material of SOD and Functional Food, Food technique, 1994;7(4):41-9.