

화장품소재로서의 인삼복합물의 항염증 및 미백효능 검증

장영아[†]

대구한의대학교 화장품약리학과
(2018년 4월 27일 접수: 2018년 6월 19일 수정: 2018년 6월 22일 채택)

Anti-inflammatory and whitening effects of ginseng complex as a cosmetic material

Young-Ah Jang[†]

Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongsan-si,
Gyeongsangbuk-do, Korea

(Received April 27, 2018; Revised June 19, 2018; Accepted June 22, 2018)

요약 : 본 연구는 화장품 소재로서 인삼복합물의 가능성을 확인하기 위한 것이다. 이를 위해 우리는 인삼복합물 에탄올 추출물을 사용하여 항염증, 미백 효과에 대한 생물학적 활성 평가를 수행하였다. 시료는 인삼(A), 상항(B), 리기다소나무(C)를 각 70% 에탄올로 추출한 후 (A)1 : (B)1 : (C)0.5의 비율로 혼합한 시료를 사용하였다. 대식세포(RAW 264.7 cells)내에서 시료의 항염증 효과를 평가하기 위해 MTT assay를 이용한 샘플의 독성평가와 nitric oxide 생성 저해 활성 및 염증관련 단백질 및 유전자의 발현량을 확인하였다. 시료의 미백 효과를 평가하기 위해서 멜라노마(B16F10 cell)를 이용해 MTT assay를 통한 샘플의 독성평가, cellular tyrosinase 저해율 측정 및 멜라닌 생합성량을 측정하였다. LPS로 유도된 RAW 264.7 세포내에서 시료의 nitric oxide 저해 활성 결과는 25 µg/mL 농도에서 71.2%의 우수한 효능을 나타내었으며 western blot 실험결과 iNOS, COX-2 단백질의 발현은 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. Tyrosinase 활성 억제 실험에서 인삼복합물의 농도 50 µg/mL 에서 36.8%의 감소를 나타냈으며 멜라닌 생합성 억제 평가 결과에서 농도 50 µg/mL 에서 47.8%의 감소를 나타냈다. 상기 실험 결과로부터 인삼복합물의 우수한 항염증, 미백 효능을 확인하였으며 향후 안전한 천연 화장품 원료로 사용될 수 있음을 확인하였다.

주제어 : 인삼복합물, 항염증, 미백, 천연, 화장품

Abstract : This study is for checking the possibility of ginseng complex as cosmetic materials. For this we carried out biological active evaluation about anti-inflammatory and whitening effects by using ethanol extract of ginseng complex. Samples were prepared by extracting 70% ethanol from each of *Panax ginseng* C. A. Meyer (A), *Phellinus linteus* (B) and *Pinus rigida* Mill. (C), and

[†]Corresponding author
(E-mail: yaviol@nate.com)

mixing them at a ratio of (A) 1 : (B) 1 : (C) 0.5. In order to evaluate the anti-inflammatory effects of the samples in macrophages (RAW 264.7 cells), MTT assay was used to evaluate the toxicity of the samples and the inhibitory activity of nitric oxide production and the expression levels of inflammation-related proteins and genes. To evaluate the whitening effect of the samples in melanoma (B16F10 cell), MTT assay was used to evaluate the toxicity of the sample, cellular tyrosinase inhibition, and melanin contents. The inhibitory activity of nitric oxide in the LPS-induced RAW 264.7 cells was 71.2% at 25 $\mu\text{g/mL}$ concentration and western blot analysis showed that the expression of iNOS and COX-2 protein decreased in a concentration-dependent manner. Inhibition of tyrosinase activity showed 36.8% inhibition at 50 $\mu\text{g/mL}$ concentration of ginseng complex and inhibition of melanin contents showed 47.8% inhibition at 50 $\mu\text{g/mL}$ concentration. From the results of the experiment, it was confirmed that the ginseng complex had excellent anti-inflammatory and whitening effect and could be used as a safe natural cosmetic material in the future.

Keywords : ginseng complex, anti-oxidant, whitening, natural, cosmetic

1. 서론

현대인의 생활수준 향상에 따른 인간의 평균 수명이 증가됨에 따라 건강과 미에 대한 관심이 높아지고 있다[1]. 화장품은 아름다움을 추구하는 인간의 심리에 가치성을 지니며 생명과학의 발달과 고령화 사회의 특성이 반영되어 제품의 개발이 다각도로 진행되고 있다[2]. 화장품 원료에 널리 사용되는 천연물은 광합성 과정에서 발생하는 활성산소에 대항하는 항산화 물질을 생산하는 것으로 알려져 있어 이러한 특성을 이용한 천연물 소재개발이 활발히 진행되고 있다[3]. 지금까지 천연물로부터 유용성분을 추출하고 생리활성을 규명한 연구에는 피부노화 억제에 대한 연구가 가장 많은 부분을 차지하고 있으며 그 외 기미, 주근깨와 같은 색소침착 피부질환과 뽀루지, 염증성 여드름 등의 피부트러블을 개선시키는 소재에 대한 연구가 활발히 진행되었다[4,5]. 피부색은 멜라닌색소, 베타카로틴, 혈액 등에 의해 결정되는데 그 중에서 가장 영향이 큰 요인이 멜라닌 색소이다. 피부에 색소침착을 만들어내는 멜라닌(melanin)은 고분자 천연색소 성분으로 표피층의 멜라노사이트(melanocyte) 내에 존재하는 멜라노솜(melanosome)에서 합성되어 만들어지고 과도한 자외선에 노출되거나 환경오염, 외부 화학물질 등의 자극적인 요인과 호르몬, 염증유발 인자 등에 의해 과잉 생성되는 것으로 알려져 있다[6]. melanin의 과잉생성은 생성과정 중 전구물질들에

의한 독성으로 세포의 변형 및 사멸을 촉진하고 피부 노화 촉진, 피부암을 유발 하는 것으로 알려져 있다[7]. 멜라닌의 합성은 enzyme인 tyrosinase와 기질인 tyrosine의 합성으로 3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA)과 DOPA quinone으로 변환되는 연속적인 산화와 중합반응 과정을 통하여 이루어진다[8,9]. 멜라닌합성 과정에서 중요한 전사 조절 인자인 Microphthalmia-associated transcription factor(MITF)는 tyrosinase, tyrosinase related protein 1 (TRP-1), tyrosinase related protein 2 (TRP-2)의 전사를 촉진 시킨다[10]. 따라서 미백화장품 원료개발의 핵심은 MITF 조절인자의 균형을 통해 tyrosinase의 활성을 저해하고 멜라닌 생합성을 억제하여 피부 색소침착을 저해할 수 미백제제를 찾는 연구로 진행된다[11]. 미백기능성 화장품의 주성분에 대한 식약청 고시에 따르면 고시 주성분은 닥나무추출물 2%, 알부틴 2~5%, 에칠아스코빌에텔 1~2%, 유용성 감초추출물 0.05% 등이 있으며 고시성분 외에도 속수자 종자추출물, 백출유, 감국추출물, 루시놀 등이 개별적으로 기능성을 인증 받아 사용 중에 있으며 인체 안전성에 경쟁을 갖는 천연물 화장품 조성물에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[12]. 염증반응은 세균 감염 등 외부의 물리적 자극이나 화학적 자극으로부터 생체를 보호하는 생리적인 반응이지만 만성적 염증반응은 오히려 인간에게 질병을 일으키는 원인이 된다[13]. 염증반응에 관여하는 주요

세포는 대식세포(macrophage)로 알려져 있으며, 그람 음성균의 내독소로 알려진 Lipopolysaccharide (LPS)에 의해 대표적인 염증 매개인자(inflammatory mediators)인 nitric oxide (NO), prostaglandin E₂ (PGE₂)를 유발하여 염증 반응을 촉매한다[15,16]. NO는 매우 반응성이 큰 물질로 inducible NO synthase (iNOS)로부터 생산되며 다량 침투한 항원이나 세균으로부터 보호, 혈압조절 역할 그리고 신체 내의 암세포에 대하여 독성을 가지고 있어 신체방어 물질로 잘 알려져 있다[17,18]. PGE₂를 생성하는 cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 prostaglandins로 전환하는 효소로 cyclooxygenase 1 (COX-1)과 COX-2로 나뉘어 지는데, COX-1은 정상적인 생체 기능에 작용하지만, COX-2는 염증반응 부위에서 발현된다[19]. 따라서 NO를 생성하는 효소인 iNOS와 PGE₂의 생합성을 매개하는 효소인 COX-2가 염증반응을 조절하는 중요한 매개체로서 이들의 발현을 억제하는 물질이 유용한 항염증제로 사용되고 있다[20]. 이에 본 연구에서는 인삼복합물의 항염증과 미백효능을 알아보고자 인삼, 상황, 리기다의 시료를 다양한 비율로 선행 실험 한 후 가장 효능이 좋은 인삼 : 상황 : 리기다 비율을 1 : 1 : 0.5 로 혼합하여 연구를 진행하여 화장품 소재로 이용하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 실험 재료

2.1.1. 실험 재료

본 실험에서 사용한 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 풍기인삼농협으로 부터 뿌리(건삼) 6년근을 구입하여 불순물을 털어내고 시료를 분쇄하였고, 리기다는 경북 청도 소재에 생육하고 있는 리기다소나무(*Pinus rigida* Mill.) 수피를 제거하여 물로 세척 음건 후 건조된 시료를 분쇄하였다. 상황버섯(*Phellinus linteus*)은 캄보디아산으로 경북 울진군 소재의 (주)바이오길드에서 제공받아 물로 세척 음건 후 건조된 시료를 분쇄하였다.

2.1.2 실험 세포 및 시약

실험에 사용된 세포주 Raw 264.7 mouse macrophage cell (murine macrophage cell line)

은 한국세포주은행(Korea)에서 구입하였고 B16F10 mouse melanoma cell은 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양은 10% fetal bovine serum (FBS; Introgen Therapeutics, USA)과 1% penicillin/streptomycin (Hyclone™, GE Healthcare Life Sciences, USA) 100 U/mL을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA) 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator (Forma™, Thermo Fisher Scientific)에 적응시켜 계대 배양하였다. 실험을 위한 시약 3-[4,5-dimethylthiazol(2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT) 와 0.4% trypan blue stain, mushroom tyrosinase, tyrosine, L-DOPA, griess reagent는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 단백질정량 시약 RIPA buffer는 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하였으며 1차 항체 mouse anti-MITF, goat anti-tyrosinase, mouse anti-iNOS, mouse anti-COX-2와 2차항체 mouse-anti-goat IgG, rabbit-anti-mouse IgG 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. mRNA 측정된 시약인 Go Script™ Reverse Transcriptase, GoTaq® Flexi DNA Polymerase는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 사용된 측정기기는 ELISA reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 분석하였다.

2.1.3. 추출물의 제조

각 시료는 70% 에탄올을 용매로 하여 시료중량의 10배 양을 가하여 실온에서 24 h 침지하고 상층액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 개별 시료를 원심 분리 및 여과한 다음, rotary vacuum evaporator (HS-10SP; Hahnshin S&T, Korea)를 사용하여 농축한 후 동결기(FD5525; Ilshin BioBase, Korea)로 건조하였다. 건조한 시료는 냉장실에 보관하여 사용할 때마다 인삼 : 상황 : 리기다 비율을 1 : 1 : 0.5 비율로 혼합하여 사용하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 세포독성 측정

세포생존율 측정은 다음과 같이 측정하였다.

Raw 264.7 세포 및 B16F10 세포는 96 well plate에 well당 0.6×10^5 세포로 180 μ L 분주하고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. 배양 후 인삼복합물의 최종농도가 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL이 되도록 각각 20 μ L씩 첨가한 후 24 h 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 배양 후 각 well에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT (Sigma-Aldrich) 용액 20 μ L를 첨가하여 4 h 배양한 후 배양액을 제거하고 dimethyl sulfoxide와 에탄올을 1:1로 섞은 용액을 각 well당 150 μ L를 가하여 실온에서 30 min 동안 반응시킨 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존을 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

2.2.2. Nitric oxide (NO) 측정

Raw 264.7 세포를 6 well plate에 1×10^5 cells/mL로 24 h 배양하였다. 다음날 세포 밀도가 80% 되었을 때 phosphate buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich)으로 2회 세척한 후 무혈청 배지를 사용하여 24 h 배양한 후 LPS (1 μ g/mL)를 Normal 군을 뺀 모든 well에 넣어서 자극시켰다. 2 h 후에 인삼복합물을 농도별(10, 25, 50 μ g/mL) 처리하고 24 h 후에 상층액 100 μ L와 griess reagent 100 μ L를 1:1로 10 min 동안 반응시킨 후에 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성량을 확인하였다.

2.2.3. Cellular tyrosinase 저해율 측정

Cellular tyrosinase 저해율 측정은 Choi 등[21]의 방법을 변형하여 측정하였다. B16F10 세포를 6 well plate에 5×10^4 cells/well이 되도록 접종하고 각 well에 인삼복합물 (6.25, 12.5, 25) μ g/mL을 48시간 동안 처리하였다. 처리 후 PBS로 2회 세척한 후 각 well의 세포에 lysis buffer (1% triton X-100, 0.1 M sodium phosphate buffer, 50 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 6.8)를 가하였다. 얼음 위에서 세포를 용출시키고 12,000 rpm, 4°C, 30분간 원심 분리한 후 상층액만 따로 모아 효소용액으로 사용하였다. L-DOPA를 2 mg/mL 농도로 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여 기질을 준비하고 기질 160 μ L에 효소용액 40 μ L를 가하고

37°C에서 1시간 가온하고 생성된 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정한 후 억제율을 계산하였다.

2.2.4. Melanin 정량

멜라닌 양은 Hosoi 등[22]의 방법을 변형하여 사용하였다. B16F10 세포를 6 well에 5×10^4 cells/well이 되도록 분주하여 24시간 뒤, 각각의 well에 인삼복합물을 농도별(6.25, 12.5, 25) μ g/mL로 48시간 동안 처리하였다. 처리 후 phosphate buffered saline (PBS; Gibco, NY, U.S.A)로 2회 세척한 후 12,000 rpm, 4°C, 30분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 침전물에 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Duksan, Korea)가 첨가된 1N NaOH 용액을 150 μ L 첨가하고 60°C에서 1시간 용해하였으며 405 nm에서 흡광도를 측정한 후 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하여 나타내었다.

2.2.5. Western Blot을 이용한 단백질의 발현 측정

Raw 264.7 세포는 6 well plate에 1×10^5 cells/mL의 농도로 접종 및 배양하여 세포 밀도가 80% 되었을 때 무혈청 배지로 교환하고 24 h 배양한 후 LPS (1 μ g/mL)를 Normal 군을 뺀 모든 well에 넣어서 자극시켰다. 2 h 후에 인삼복합물을 농도별(6.25, 12.5, 25) μ g/mL로 처리하고 24 h 배양하였다. 그 후 상층액을 제거하고 PBS로 2회 세척한 후에 scrapper로 세포를 수확하였다. B16F10 mouse melanoma cell은 6 well plate에 5×10^4 cells/well이 되도록 분주하고 24시간 동안 안정화 하였다. 배지를 제거한 후 인삼복합물을 농도별(6.25, 12.5, 25) μ g/mL 48시간 처리 후 PBS로 세척하여 세포를 수확하였다. 수확된 각 세포에 Lysis buffer를 well 당 30 μ L를 첨가하여 세포를 용해시키고 원심분리 하여 (12,000 rpm, 4°C, 30 min) 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 bradford assay로 정량하였으며, 20 μ L의 단백질을 10%의 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 전기 영동한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 PVDF membrane에 옮긴 다음 60 V에서 2시간 이상 transfer하였다. Transfer가 끝나면 5% skim milk에 1시간동안 방치하여

background를 제거시켰다. 1×TBST로 3회 washing 후 1차 antibody (1:1000)를 24 h 붙인 후 1×TBST로 5회 washing 후 2차 antibody (1:1000)를 2 h 반응한 후 ECL kit (Amersham Pharmacia, England)를 이용하여 film에 옮겨 측정하였다. Band density는 Image Quant LAS-4000 (GE life sciences, Taiwan)으로 확인하였다.

2.2.6. 유전자 발현 분석을 위한 RNA 분리 및 RT-PCR

인삼복합물의 항염증효능을 알아보기 위해 iNOS, COX-2 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. Raw 264.7 세포를 6 well plate에 1×10^5 cells/mL의 농도로 접종 및 배양하여 세포 밀도가 80% 되었을 때 무혈청 배지로 교환하고 24 h 배양한 후 LPS (1 μ g/mL)를 Normal 균을 뺀 모든 well에 넣어서 자극시키고 2 h 후에 인삼복합물을 농도별(6.25, 12.5, 25) μ g/mL로 처리하고 24 h 배양하였다. 그 후 total RNA를 분리하기 위해 배양액을 제거하고 세포를 PBS로 3번 세척한 뒤, trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 분리하였다. 인삼복합물의 미백효능을 알아보기 위해 Tyrosinase, MITF, GAPDH 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. B16F10 세포에 5×10^4 cells/well에 되도록 분주하고 24시간 동안 안정화 하였다. 배지를 제거한 후 인삼복합물을 농도별 (6.25, 12.5, 25) μ g/mL로 처리하고 1 h 후 멜라닌 자극제인 α -Melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) 200 nM으로 Normal균을 제외하고 세포를 자극한 후 48시간 후 PBS로 세척하여 세포를 수확하였다. 그 후 total RNA는 PBS로 3번 세척하고 세포를 수확한 다음, trizol reagent를 이용하여 분리하였다. 각 세포의 total RNA 2 μ g과 PCR primer oligonucleotide를 RT-PCR mixer와 혼합하고 RT-PCR을 시행하였다. RT의 조건은 42°C에서 1시간 방치하여 cDNA를 제조하고 94°C에서 5분간 방치하여 reverse transcriptase를 불활성화 시켰다. 이후의 PCR 조건은 94에서 30초(denaturation), 50°C에서 30초(annealing), 72°C에서 90초(extension)의 반응을 30회 반복하는 것을 기본으로 target cDNA 종류에 따라 최적의 조건으로 조절하였다. 증폭된 cDNA는 1.2% agarose gel을 사용한 전기영동으로 분리하고 LAS 4000 image analyzer

으로 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 인삼복합물의 세포 생존율 측정

분자생물학적 검증을 위해 실험 시료가 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 대식 세포인 Raw 264.7 cell 과 멜라노마 B16F10 cell의 인삼복합물에 의한 세포독성을 MTT assay를 평가하였다(Fig. 1.). 인삼복합 추출물의 세포 생존율과 실험에 사용될 유효농도 범위를 결정하기 위해 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리한 결과 Raw 264.7 cell 및 B16F10 cell 에서 25 μ g/mL 이하 농도의 세포생존율이 90% 이상으로 나타났으며 50 μ g/mL 농도에서 세포독성을 나타낸 결과를 토대로 인삼복합 추출물의 항염증, 미백 실험의 시료농도를 25 μ g/mL 이내의 범위에서 진행하였다.

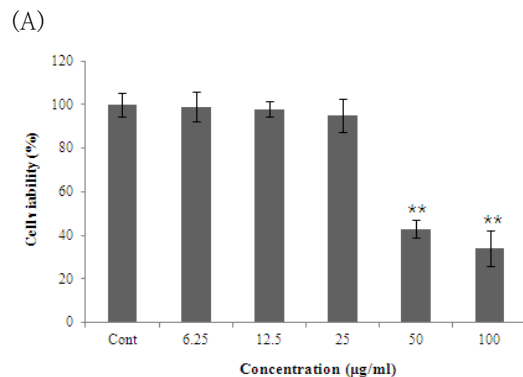


Fig. 1-A. Cell viability of ginseng complex on treated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations (6.25-100 μ g/mL) of ginseng complex. Cell viability was measured using the MTT assay. The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. * p <0.05, ** p <0.01 *** p <0.005 compared with control.

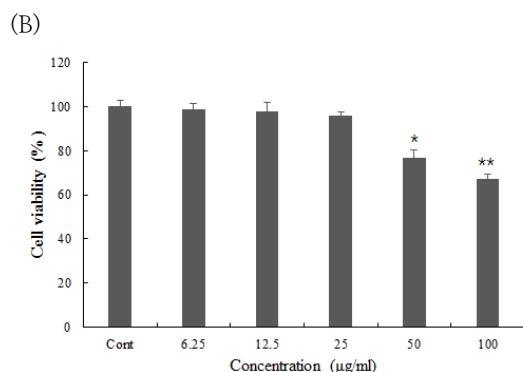


Fig. 1-B. Cell viability of ginseng complex on treated B16F10 cells. B16F10 cells were treated with various concentrations (6.25–100 µg/mL) of ginseng complex. Cell viability was measured using the MTT assay. The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. * p <0.05, ** p <0.01 *** p <0.005 compared with control.

3.2. 인삼복합물의 Nitric oxide (NO) 저해능

NO 측정은 cell supernatant를 안전한 형태인 nitrate로 환원시켜 griess reagent를 사용하여 측정하였으며 인삼 복합물의 항염증 효과를 확인하기 위해 NO생성 억제활성을 측정한 결과는(Fig. 2.)와 같다. LPS 처리군인 control 군은 LPS 무처리 군에 비하여 4배에 가까운 NO 발현을 나타내었으며 복합물을 6.25, 12.5, 25 µg/mL의 농도로 처리한 결과 농도가 증가할수록 각 30.3, 50.2, 69.4%의 NO 발현량이 저해됨을 확인하였다.

3.3. 인삼복합물의 B16F10 cell의 Cellular tyrosinase 및 melanin 생합성 저해율

멜라노마 B16F10 cell내 인삼복합물의 미백활성을 분석한 결과, Cellular tyrosinase 저해활성에서 α -MSH 자극군에 대비 복합물을 농도별(6.25, 12.5, 25, 50) µg/mL로 처리하였을 때 각

25.9, 32.6, 34.6, 36.7%의 tyrosinase 활성이 저해 되는것을 확인하였다(Fig. 3-A.). 반면 천연물의 미백활성을 나타내는 데이터 중 백차추출물은 25µg/mL 농도에서 18.2% [23], 여정자 추출물은 동일 농도에서 26.2% [24]를 나타내어 인삼복합물의 저해율이 더 우수함을 확인하였다. Melanin 생합성에 미치는 영향을 측정한 결과 인삼복합물 50 µg/mL 농도에서 멜라닌의 합성을 48% 저해하였다(Fig 3-B.). 이러한 결과로 보아 인삼복합물은 B16F10 세포내에서의 tyrosinase 활성을 저해시킴으로써 멜라닌 생합성 저해에 영향을 주는 것으로 확인되었다.

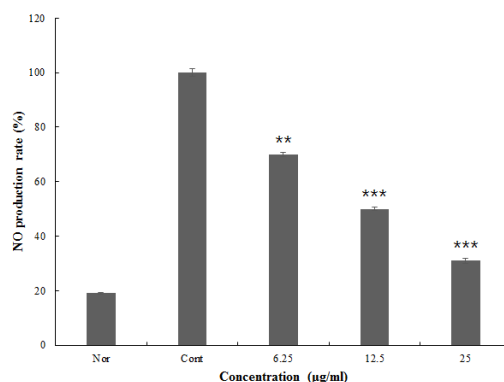


Fig. 2. Inhibitory effects of ginseng complex on NO production. RAW 264.7 cells (1×10^5 cells/mL) were treated with 1 µg/mL LPS for 2 h, except Nor group. ginseng complex were then added to sample groups with the indicated concentrations. The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. * p <0.05, ** p <0.01 *** p <0.005 compared with control. NO, nitric oxide; LPS, lipopolysaccharide; Nor, normal group (LPS-untreated group); Con, control group (LPS-treated group).

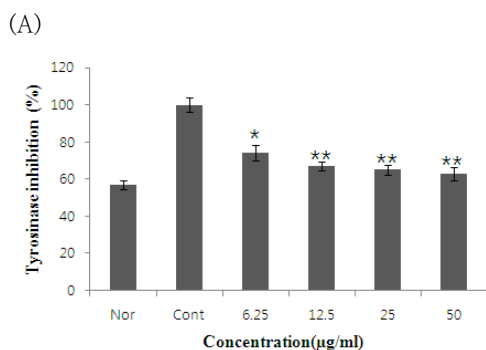


Fig. 3-A. Effect of ginseng complex on inhibition of intra cellular tyrosinase activity. The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. * p <0.05, ** p <0.01 *** p <0.005 compared with control. Nor, normal group (α -MSH-untreated group); Con, control group (α -MSH-treated group).

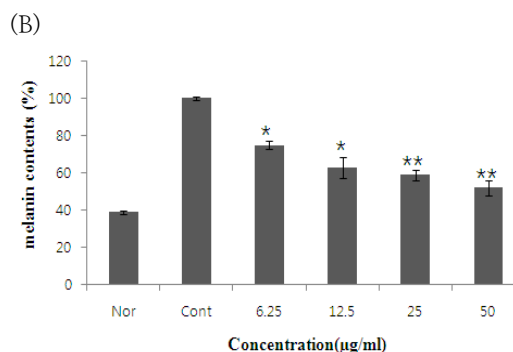


Fig. 3-B. Effect of ginseng complex on melanin synthesis rate, The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. * p <0.05, ** p <0.01 *** p <0.005 compared with control. Nor, normal group (α -MSH-untreated group); Con, control group (α -MSH-treated group)

3.4. 인삼복합물의 염증 관련 단백질 및 유전자 발현에 미치는 영향

염증매개 물질인 NO를 생성하는 iNOS와 PGE₂를 합성하는 COX-2에 대한 인삼복합물의 저해능을 확인하기 위하여 LPS를 1 µg/mL의 농도가 되도록 처리하고 2시간 뒤 인삼복합물을 각 농도별로 처리한 후 Western blot을 통해 iNOS와 COX-2 단백질의 발현량을 확인하였다 (Fig. 4-A). 그 결과 LPS로 유도된 control군 대비 25 µg/mL 농도에서 iNOS는 69%, COX-2는 73%의 높은 저해율을 나타내었으며 농도의존적으로 발현량이 감소되는 경향을 나타내었다. 또한 인삼복합물의 염증관련 유전자 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 RT-PCR을 통한 mRNA 발현량을 알아본 결과 iNOS는 유의성 있게 발현량이 저해되었고 COX-2는 25 µg/mL에서 감소됨을 확인하였다 (Fig. 4-B). 이를 통해 인삼복합물은 유전자발현 단계에서부터 염증을 저해하여 단백질 합성을 저해하는 것으로 나타났으며 기능성 항염증 소재 개발에 응용할 수 있는 우수한 소재가 될 가능성을 보였다.

3.5 인삼복합물의 미백 관련 단백질 및 유전자 발현에 미치는 영향

인삼복합물의 미백활성을 알아보기 위해 melanin 합성에 관여하는 중요한 효소인 tyrosinase와 tyrosinase 발현을 촉진하는 전사인자인 MITF의 단백질 발현량을 확인하였다 (Fig. 5-A). tyrosinase 및 MITF 발현은 α -MSH 자극군에서 현저히 증가되는 것을 확인하였고 복합물을 농도별 (6.25, 12.5, 25, 50) µg/mL로 처리하였을 때 농도 의존적으로 저해되는 것을 확인하였다. 인삼복합물의 tyrosinase 및 MITF 유전자 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 RT-PCR을 통한 mRNA 발현량을 알아본 결과에서도 α -MSH 자극군에 대비해서 복합물의 농도가 높아질수록 저해율이 높아짐을 보였으며 25 µg/mL 농도에서는 tyrosinase 및 MITF 유전자 발현량이 40% 정도의 높은 저해율을 보여 인삼복합물은 유전자발현 단계에서부터 MITF의 전사를 억제하여 tyrosinase 생성을 감소시켜 멜라닌생성을 저해하는 것을 확인하였다 (Fig. 5-B).

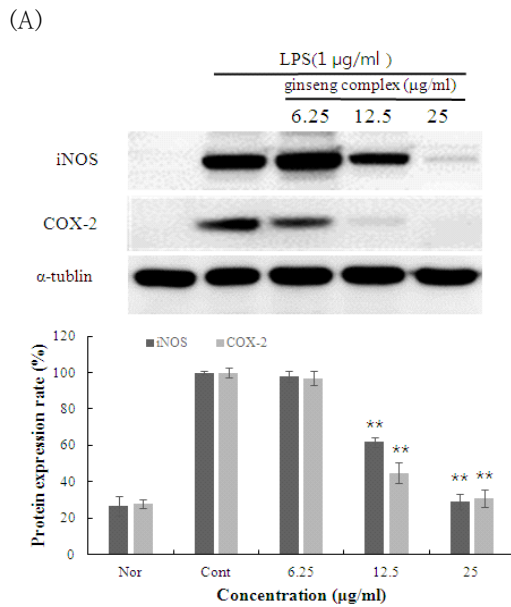


Fig. 4-A. Inhibitory effects of ginseng complex on inflammation-related protein expression in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10^5 cells/mL) were treated with 1 μ g/mL LPS for 2 h, except Nor group. ginseng complex were then added to sample groups with the indicated concentrations. The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ compared with control. NO, nitric oxide; LPS, lipopolysaccharide; Nor, normal group (LPS-untreated group); Con, control group (LPS-treated group).

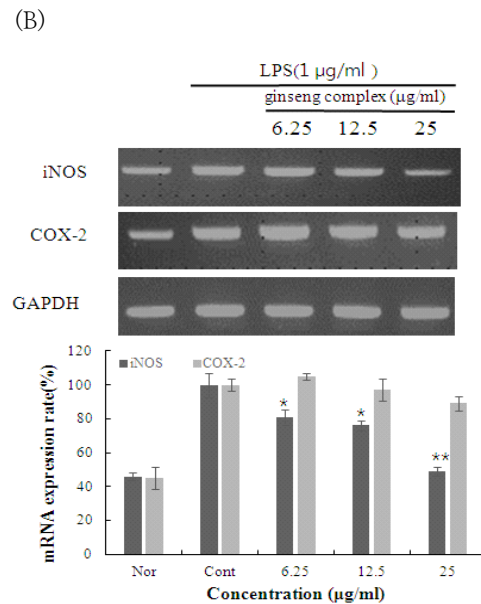


Fig. 4-B. Inhibitory effects of ginseng complex on the mRNA expression of inflammation-related genes in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells (1×10^5 cells/mL) were treated with 1 μ g/mL LPS for 2 h, except Nor group. Complex extracts were then added to sample groups with the indicated concentrations. The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ compared with control. NO, nitric oxide; LPS, lipopolysaccharide; Nor, normal group (LPS-untreated group); Con, control group (LPS-treated group).

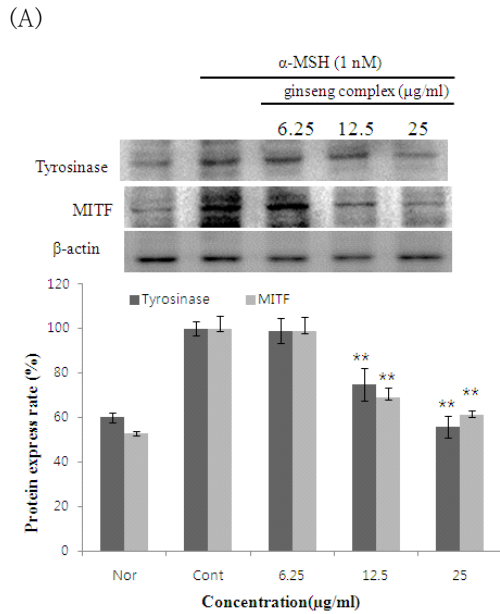


Fig. 5-A. Inhibitory effects of ginseng complex on whitening related protein expression in B16F10 cells. B16F10 cells (1×10^5 cells/mL) were treated with 200 nM α -MSH and ginseng complex except Nor group. The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.005$ compared with control. α -MSH, α -Melanocyte-stimulating hormone Nor, normal group (α -MSH-untreated group); Con, control group (α -MSH-treated group).

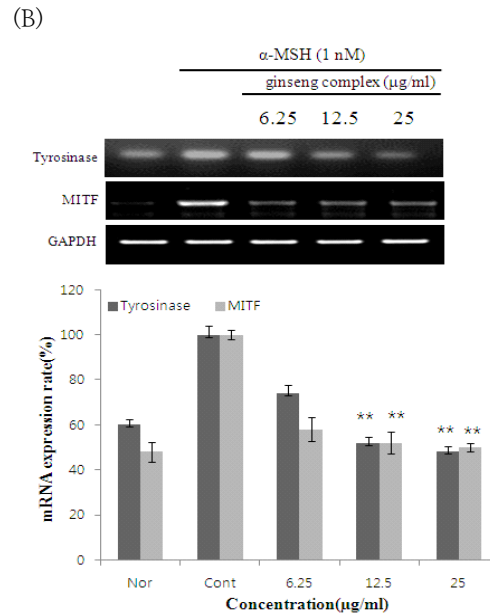


Fig. 5-B. Inhibitory effects of ginseng complex on the mRNA expression of whitening related genes in B16F10 cells. B16F10 cells (1×10^5 cells/mL) were treated with 200 nM α -MSH and ginseng complex except Nor group. The results are presented as mean \pm standard deviation of triplicate data. The results were expressed as the average of triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.005$ compared with control. α -MSH, α -Melanocyte-stimulating hormone Nor, normal group (α -MSH-untreated group); Con, control group (α -MSH-treated group).

4. 결론

본 연구에서 인삼, 상황, 리기다의 70% 에탄올 추출물의 1 : 1 : 0.5 비율의 복합물을 이용하여 항염증, 미백효능 실험을 진행하여 화장품 기능성 소재로서의 가능성에 대해 평가 하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 대식 세포인 Raw 264.7 cell내 인삼복합물의 항염증 효능 평가결과, 복합물을 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 각각 30.3%, 50.2%, 69.4%의 nitric oxide 저해를 나타내었으며 Western blot 실험을 통해 염증관련 단백질인 iNOS, COX-2 발현량을 측정한 결과, 복합물의 25 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 iNOS는 69%. COX-2는 73%의 높

은 저해율을 나타내었다. 인삼복합물의 항염 효능이 mRNA 단계에서의 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-PCR로 분석한 결과, LPS를 단독 처리한 군에 비해 복합물을 적용하였을 때 iNOS의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소되었으며 저해율이 우수함을 나타내었다.

2. 멜라노마 B16F10 cell내 인삼복합물의 미백 활성을 분석한 결과, Cellular tyrosinase 저해활성에서 α -MSH 자극군에 대비 복합물을 농도별 (6.25, 12.5, 25, 50) μ g/mL로 처리하였을 때 농도 의존적으로 tyrosinase 활성이 저해되는 것을 확인하였다. 복합물이 Melanin 생합성에 미치는 영향을 측정된 결과 50 μ g/mL 농도에서 멜라닌의 합성을 48% 저해하여 미백활성에 효능이 있음을 확인하였다. Tyrosinase 및 MITF 유전자 mRNA 발현결과 인삼복합물은 유전자발현 단계에서부터 MITF의 전사를 억제하여 tyrosinase 생성을 감소시켜 멜라닌생성을 저해하는 것을 확인하였다

이상의 결과로 보았을 때 인삼, 상황, 리기다 복합물은 세포독성이 없는 안전한 범위내의 농도에서 항염증과 미백 효능에 안전함을 확인하였다. 최근 복합적인 피부트러블을 개선하고자 하는 소비자의 요구에 따라 향후 인삼복합물의 항주름, 항산화 효능 평가가 추가 연구된다면 더욱 기능성을 가진 화장품 천연소재로 경쟁력이 있음을 시사한다.

감사의 글

이 연구는 2016년도 산업통상자원부 및 산업기술평가관리원(KEIT) 연구비 지원에 의한 연구임(No.10070303)

References

1. N. K. Han, C. M. Park, J. C. Kwon, M. S. Joung, J. W. Choi. Whitening effect of Fagopyrum tataricum extract. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.40, pp. 179-186, (2014).
2. M. N. Lee, K. W. Yang, I. H. Lee. Assessment of Efficacy of 5 nm-class Nano Gold Essence Cosmetics, *Asian. J. Beauty Cosmetol.*, Vol.14, pp. 259-266, (2016).
3. N. Asano, E. Tomioka, H. Kizu, K. Matsui. Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of Morus bombycis, *Carbohydrate Research*, Vol.253, pp. 235-245, (1994).
4. J. S. Chen, C. Wei, M. R. Marshall. Inhibition mechanism of Kojic acid on polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem.*, Vol.39, pp. 1897-1901, (1991).
5. K. Urabe, P. Aroca, K. Tsukamoto, D. Mascagna, A. Paulumbo, G. Prota H. Vincent J. The inherent cytotoxicity of melanin precursors. *Biochim. Biophys. Acta.*, Vol.39, pp. 1221, 272-278, (1994)
6. G. E. Costin, V.J. Hearing, Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress, *FASEB J.*, Vol.21, pp. 976-984, (2007)
7. H. Z. Hill, W. Li, P. Xin, D. L. Michell. Melanin: a two edged sword?, *Pigment Cell Res.*, Vol. 10, pp. 127-191, (1997).
8. A. B. Lerner, T. B. Fitzpatrick. Biochemistry of melanin formation, *Physiol. Rev.*, Vol.30, pp. 91-126, (1950).
9. P. Aroca, K. Urabe, T. Kobayashi, K. Taskamoto, V. J. Hearing, Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation, *J. Biol. Chem.*, Vol.268, pp. 25650-25655, (1993).
10. R. Busca, R. Ballotti. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment, Cell Res.*, Vol.13, pp.60-69, (2000).
11. S. H. Jung, M. J. Ku, H. J. Moon, B. C. Yu, M. J. Jeon, Y. H. Lee. Inhibitory effects of fucoidan on melanin synthesis and tyrosinase activity, *J. Life Sci.*, Vol.19, pp.75-80, (2009).
12. K. S. Seo, J. S. Park, M. S. Shin. Cosmetics Industry Analysis Report, Korea

- Health Industry Development Institute, pp.19-20, (2010).
13. S. T. Lee, Y. R. Jeong, M. H. Ha, S. H. Kim, M. W. Byun, S. K. Jo. Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plantextract in mouse macrophage, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.29, pp.342-348, (2000)
 14. G. L. Larsen, P. M. Henson. Mediators of Inflammation, *Annu. Rev. Immunol.*, Vol.1, pp. 335-359, (1983).
 15. M. J. Kim, K. R. Im, K. S. Yoon. Anti-inflammatory effects of prescription extracts containing *Forsythia viridissima* L., *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, Vol.35, pp. 277-285, (2009).
 16. J. Frostegård, A. K. Ulfgren, P. Nyberg, U. Hedin, J. Swedenborg, U. Andersson, G. K. Hansson. "Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines", *Atherosclerosis*, Vol.145, pp. 33-43, (1999).
 17. I. Ioannidis, H. de Groot. Cytotoxicity of nitric oxide in Fu5 rat hepatoma cells: Evidence for co-operative action with hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, Vol.296, pp. 341-345, (1993).
 18. R. D. Curran, T. R. Billiar, D. J. Stuehr, J. B. Ochoa, B. G. Harbrecht, S. G. Flint, R. L. Simmons. Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann. Surg.*, Vol.212, pp. 462-471, (1990).
 19. J. L. Masferrer, B. S. Zweifel, P. T. Manning, S. D. Hauser, K. M. Leahy, W. G. Smith, P. C. Isakson, K. Seibert. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, Vol.91, pp. 3228-3232, (1994).
 20. N. McCartney-Francis, J. B. Allen, J. E. Albina, Q. W. Xie, C. F. Nathan, S. M. Wahl. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.*, Vol.178, pp. 749-754, (1993).
 21. B. W. Choi, B. H. Lee, K. J. Kang, E. S. Lee, N. H. Lee. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants, *Kor. J. Pharmacogn.*, Vol.29, pp. 237-242, (1998).
 22. J. Hosoi, E. Abe, T. Suda, T. Kuroki. Regulation of melanin synthesis of B16 melanoma cell by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid, *Cancer Res.*, Vol.45, pp. 1474-1478, (1985).
 23. E. Y. Park. Effects of White Tea Water Extracton Skin Whitening, Department of Public Health Graduate School Keimyung University, (2009).
 24. G. S. Han, D. S. Kim, W. H. Woo, Y. J. Mun. Inhibitory Effect of Fructus Ligustri Lucidi on Tyrosinase and MITF Expressions, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, Vol.24, pp. 296-301, (2010).