

백삼 추출물이 아토피 피부염 관련 사이토카인 분비 및 항산화, 항노화에 미치는 영향

홍창의¹ · 유수연^{2*}

¹전북대학교 생물학과, ²순천대학교 약학과

Effects of Three Korean White Ginseng Extracts on Atopic Dermatitis-Related Cytokines, and Antioxidant and Anti-aging Activities

Chang-Eui Hong¹ and Su-Yun Lyu^{2*}

¹Department of Biology, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Korea

²Department of Pharmacy, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea

Abstract – Inflammation that is considered to be mainly related to pathogenesis of atopic dermatitis (AD) is the biological response of a host to stimuli, such as cellular injury or infection. In this study, we investigated the anti-inflammatory and antioxidative activities of white ginseng roots by ultra high pressure extraction (Gin-UHP), fermentation followed by ultra high pressure extraction (Gin-UHPF), and polyol extraction (Gin-POL). As a result, ginseng extracts were able to decrease the secretion of pro-inflammatory cytokines (interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha) and immunoglobulin E. Also, Gin-POL had the highest DPPH radical scavenging activity and when we compared the SOD-like activity, Gin-UHP had the highest. Moreover, we looked into the effect of these ginseng extracts on anti-aging to show the possible usefulness as a raw material of cosmetics. As a result, ginseng extracts were able to reduce the production of melanin, and inhibit the tyrosinase and elastase activities in a dose-dependent manner. The extracts also decreased the expression of MMP-1 and had a significant hyaluronidase inhibitory activity. Taken together, these results demonstrate that ginseng extracts may have an improvement effect on AD by using its anti-inflammatory and antioxidant properties.

Keywords – Korean white ginseng, Anti-inflammation, Antioxidant, Atopic dermatitis

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer, *Araliaceae*)은 아시아, 미주, 그리고 유럽 등 세계에서 가장 널리 쓰이는 천연 면역 조절제 중 하나이다.¹⁾ 전통적으로 인삼은 스트레스를 완화해주거나, 항암, 항당뇨, 항산화, 동맥경화 및 고혈압 예방 등 여러 목적으로 사용되어 왔다. 인삼의 주요 활성 물질은 진세노사이드(ginsenosides), 다당체(polysaccharides) 등이 알려져 있다.^{2,3)} 시중에는 수삼, 백삼, 홍삼, 흑삼 등 다양한 인삼을 접할 수 있는데, 생삼인 수삼, 수삼의 주근을 벗겨서 말린 백삼, 2-3시간 동안 95-100°C의 수증기로 한 번 찌서 말린 홍삼, 홍삼을 아홉 번 찌고 말린 흑삼 등이 있다.^{4,6)}

아토피 피부염(atopic dermatitis, AD)은 만성적이며 재발하기 쉬운 염증성 피부 질환이며, 학교, 가정, 사회 생활에

큰 불편을 겪을 수 있는 등 삶의 질이 저하될 수 있는 질환이다.⁷⁾ 지난 수십년 간 AD의 발병률은 서서히 증가하고 있는데 이 질환은 TH1/TH2 면역 반응과 큰 연관이 있다.⁸⁾ 항원이 제시되면 원시 T 세포(naïve T cell)는 인터루킨(interleukin, IL)-12, IL-18, 또는 IL-4에 노출되어 TH1이나 TH2 세포로 분화된다.⁹⁾ TH1 세포는 염증성 사이토카인인 인터페론 감마(interferon-gamma, IFN- γ)와 종양괴사인자(tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)를 분비하며 TH2를 억제하는 반면, TH2 세포는 IL-4, IL-5, IL-13 등을 분비하며 TH1 반응을 억제한다.¹⁰⁾ IL-8은 주로 염증과 연관이 되는 인터루킨이다. 산화적 스트레스에 의해 증가되는 것으로 알려진 IL-8은 국소적 염증에 중요한 매개 변수가 된다.¹¹⁾ 또한 대부분의 AD 환자는 말초 혈액 내 호산구와 혈청 면역글로블린 E(immunoglobulin E, IgE)가 증가되어 있는 상태이다.⁷⁾ AD 환자들에게서 나타나는 IgE의 증가는 TH2 사이토카인의 발현이 증가되었다는 뜻으로 볼 수가 있다.¹²⁾

*교신저자(E-mail): suyun@scnu.ac.kr
(Tel): +82-61-750-3759

산화적 스트레스는 염증성 사이토카인들을 발현하는 유전자들이 증가하면서 조직에 염증을 일으킨다.¹³⁾ AD 환자들은 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이나 oxidant가 일으키는 손상에 특히 더 예민하다.¹⁴⁾ Omata 등은 산소/질소 라디칼 균형이 무너졌거나, 산화적 스트레스가 증가되는 현상을 유아기 AD의 병태생리와 연관지어 설명하고, 산화적 스트레스를 억제하는 것이 AD 치료에 도움이 될 것이라고 하였다.¹⁵⁾ 산화적 스트레스가 AD 발병과 깊은 연관이 있으므로, 생활 환경을 개선하고, 심리적 스트레스를 줄이면서 피부 장벽을 증가시키고, 항산화 보조제를 섭취하는 것이 중요할 것으로 생각된다.¹³⁾

과거 연구들을 보면 인삼은 AD 환자들에게 좋은 치료 보조제가 될 것으로 보인다. 인삼 추출물이나 주요 성분인 진세노사이드 등은 항알러지,^{16,17)} 항염증,^{1,19)} 그리고 항산화 효능⁴⁾이 있는 것으로 보고되고 있다. 그러나 대부분의 연구는 마우스 모델에 치중하고 있다. 또한 백삼의 ethyl acetate 분획이 멜라닌 생성 억제 효과가 있다는 연구 결과는 있으나¹⁸⁾ 초고압이나 폴리올 추출물에 대한 연구 결과는 없다. 이전에 본 연구진은 이미 홍삼 물추출물이 사람의 피부 각질 세포에서 항염증 및 항산화 효과가 있다고 밝힌 바 있다.²⁰⁾ 이번 연구에서 우리는 한국산 백삼의 초고압, 발효 초고압 및 폴리올 추출물을 이용하여 다양한 세포(사람 각질 형성 세포, 단핵구 세포, B 세포) 내에서 아토피 피부염 관련 사이토카인을 측정하고, 항산화 효능을 알아보았다.

또한, 화장품으로서의 가치를 평가하기 위하여 백삼 추출물의 미백 및 항노화 활성도 알아보았다. 로션이나 크림 등을 이용한 피부 장벽을 강화시키는 것은 AD를 예방하는 첫 걸음이다.⁷⁾ Hyaluronic acid와 elastin은 결합 상피 조직에 널리 분포되어 있으며, 피부의 중요한 구성 인자이다. 나이가 들면서 hyaluronic acid와 엘라스틴은 점차 hyaluronidase (HAase)와 elastase에 의해 분해된다.²¹⁾ 그러므로 피부 구조에 어떤 영향을 미치는지 알기 위해서 이 두 가지 효소에 대한 저해능을 알아보는 것도 좋은 방법이 된다.²²⁾ 또한 tyrosinase는 피부 색소 침착과 관련 있는 멜라닌 합성과 관련이 있으며,²³⁾ 피부 광노화에 중요한 역할을 담당하고 있는 matrix metalloproteinase-1(MMP-1)은 피부 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다.²⁴⁾ 그러므로 본 실험에서는 HAase, elastase, MMP-1, tyrosinase 저해 활성 등도 함께 측정하였다.

재료 및 방법

시험 물질 - 본 실험에 사용한 시료인 6년근 백삼은 2009년 10월에 영천에서 구입하였으며, 서울여자대학교 자연과학대학 이종석 교수가 감별하였다. 표본은 순천대학교 약학과 천연물의약품 실험실에 보관하고 있다. 백삼은 수세 후

70% 에탄올로 소독하고 건조한 다음 백삼 초고압 추출(Gin-UHP), 발효 초고압 추출(Gin-UHPF), 그리고 폴리올 추출(Gin-POL)하여 실험에 사용하였다. Gin-UHP는 백삼 분말 100 g과 증류수 1,000 g을 1,000 Mpa, 25°C에서 초고압 추출기(FOOD CIP-70-350-80, Ilshin autoclave, Daejeon, Korea)를 이용하여 24시간 추출하였다. Gin-UHPF는 백삼 분말 100 g과 증류수 1,000 g에 saccharomyces를 1×10^7 cells/mL로 접종하여 48시간동안 발효하였다. 이후 발효물을 1,000 Mpa, 25°C에서 초고압 추출기(FOOD CIP-70-350-80, Ilshin autoclave)의 조건으로 24시간 추출하였다. Gin-POL은 시료 100 g에 400 g의 1,3-butylene glycol과 증류수 600 g의 혼합액을 넣어 7일간 상온에서 침지하였다. 모든 추출물은 400 mesh 필터를 이용하여 1차 필터하고, 0.45 μ m 로 2차 필터하여 사용하였다.

시약 - Folin-Denis reagent, tannic acid, 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), ascorbic acid, pyrogallol, xanthine oxidase, nitro blue tetrazolium(NBT), HAase, hyaluronic acid, L-3,4-dihydroxyl phenylalanine(DOPA), mushroom tyrosinase, porcine pancreas elastase, N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide, lipopolysaccharide(LPS)는 Sigma(St. louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Bovine serum albumin(BSA)은 VWR life science(Radnor, PA, USA)에서 구입하였다.

세포 배양 및 생존률 측정 - 사람 각질형성세포(HaCaT), 사람 B세포(U266B1), 마우스 멜라노마 세포(B16F10)는 American type culture collection(ATCC, Rockvill, USA)에서, 사람 단핵구 세포(THP-1)는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서, 사람 피부 아세포(Human dermal fibroblast)인 HDF-n 세포는 Modern Tissue Technology(MTT, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. HaCaT, B16F10, HDF-n 세포는 각각 10% fetal bovine serum(FBS, GibcoBRL, Grand Island, USA), 1% penicillin/streptomycin(GibcoBRL)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, GibcoBRL) 배지로 배양하였다. U266B1과 THP-1 세포는 각각 10% fetal bovine serum(FBS, GibcoBRL, Grand Island, USA), 1% penicillin/streptomycin(GibcoBRL)이 첨가된 RPMI-1640(GibcoBRL) 배지로 사용하였고, 모든 세포는 CO₂ incubator(Sanyo, Japan, 5% CO₂, 95% air, 37°C)에서 배양하였다. 세포 생존률을 측정하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 사용하였다. 백삼 추출물을 세포에 처리한 뒤, phosphate buffered saline(PBS)에 녹인 MTT dye reagent를 50 μ L씩 분주하고 4시간을 배양하였다. 그 후 MTT를 포함한 배양액을 제거하고, formazan 침전물은 dimethylsulfoxide 200 μ L로 용해시킨 후 microplate reader(Sunrise, Tecan, Austria)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사이토카인 분비 변화 측정 - Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) sets(IL-8, TNF- α , IgE)는 BD Pharmingen(UK)에서 구입하였다. 96-well plate에 capture antibody를 coating buffer(0.1 M sodium carbonate, pH 9.5)에 희석하여 100 μ L씩 분주한 후 4°C에서 24시간 방치하였다. Washing buffer(PBS/tween-20)으로 3번 세척한 후 blocking buffer(1% BSA)를 200 μ L씩 분주한 후 1시간 동안 상온에 방치하였다. 다시 washing buffer로 3회 세척한 후 standard와 sample을 각각 100 μ L씩 분주하고 2시간 동안 상온에 방치하였다. Washing buffer로 5회 세척 후 detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase 혼합액을 100 μ L씩 분주한 후 1시간 동안 상온에 방치하였다. Washing buffer로 7회 세척 후 TMB substrate reagent(BD Pharmingen)를 100 μ L씩 분주한 후 상온에 30분 방치하였다. Stop solution(1 M phosphoric acid)으로 반응을 정지시키고 450 nm에서 흡광치를 측정하였다.

전자공여능 측정 - 전자공여능은 Blois의 방법²⁵⁾을 변형하여 측정하였다. 각 시료용액에 0.1 mM의 DPPH 용액을 동량 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Superoxide Dismutase(SOD) 유사 활성 측정 - SOD 유사 활성은 Marklund의 방법²⁶⁾에 따라 측정하였다. 각 시료 용액 0.2 mL에 tris-HCl 완충용액(50 mM tris/10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하여 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 M HCl 0.1 mL를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사 활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

HAase 저해 활성 - HAase 활성은 hyaluronic acid가 HAase와 반응하고 남는 hyaluronic acid를 침전시켜 측정하여 HAase의 활성을 결정하였다. HAase를 차가운 20 mM sodium phosphate, 77 mM sodium chloride, 0.01%(w/v) BSA(pH 7.0) solution에 5 units/mL로 만들어 125 μ L 넣고, 농도 별 시료를 넣은 후, 최종량을 20 mM sodium phosphate, 77 mM sodium chloride, 0.01%(w/v) BSA(pH 7.0) solution을 이용하여 맞춰준다. 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 300 mM sodium phosphate(pH 5.35)에 녹인 0.03%(w/v) hyaluronic acid를 37°C로 데워 놓았다가 250 μ L씩 넣어준다. 뒤집어 가면서 섞은 다음, 37°C에서 45분간 반응시킨다. 반응액을 125 μ L에, 24 mM sodium acetate, 79 mM acetic acid, 0.1%(w/v) BSA(pH 3.75) 625 μ L와 섞어 준 후, 10분간 방치하고, 침전되어 나오는 hyaluronic acid를 600 nm에서 측정하였다.

Tyrosinase 저해 활성 - Tyrosinase 저해 활성 측정은 Yagi 등의 방법²⁷⁾에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M

sodium phosphate buffer(pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 mL 및 시료 용액 0.1 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110 U/mL) 0.2 mL를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해 활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Melanoma 세포에서의 Tyrosinase 저해 활성 - B16F10 세포를 2×10^5 cells/well로 6 well plate에 접종한 후, 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고, 농도 별 시료를 넣은 배지를 넣고 48시간 동안 배양하였다. 다시 배지를 제거하고, PBS로 2회 세척 후, 1%(w/v) triton X-100을 함유한 100 mM sodium phosphate(pH 6.8) 100 μ L를 넣고 -80°C에서 30분 동안 방치하면서 세포 용해과정을 거친다. 이 후, 12,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하고 상층액을 수거하고, 단백질 정량을 통해 100 μ g에 해당하는 상층액에 100 mM sodium phosphate(pH 6.8)에 녹인 2 mg/mL L-DOPA 80 μ L를 넣고, 37°C에서 반응시킨 후, 490nm에서 tyrosinase에 의해 DOPA로부터 형성되는 DOPA chrome의 양을 측정하여, 상대적 tyrosinase 활성으로 나타내었다.

Melanoma 세포에서의 Melanin 생성량 측정 - 피부 melanoma 세포로부터의 melanin 생합성 저해 측정은 Hosoi 등의 방법²⁸⁾에 따라 측정하였다. B16F10 세포를 2×10^5 cells/well로 6 well plate에 넣고, 24시간 동안 배양한다. 배지를 제거하고, 농도 별 시료를 넣은 배지를 넣고 48시간 동안 배양한다. 다시 배지를 제거하고, PBS로 2회 세척 후, 1%(w/v) triton X-100을 함유한, 100 mM sodium phosphate(pH 6.8) 100 μ L를 넣고 -80°C에서 30분 동안 방치하면서 세포 용해 과정을 거쳤다. 이 후 12,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 pellet을 수거하고, 10% DMSO를 함유한 1 N NaOH를 적정량 넣고 65°C에서 1시간 동안 방치하면서 melanin을 녹여주었다. 405 nm에서 용해된 melanin의 흡광도를 측정해 상대적 melanin 생성량으로 나타내었다.

MMP-1 저해 효과 측정 - HDF-n 세포를 100 mm culture dish에 1×10^6 cells/mL로 분주한 다음 24시간 동안 배양하였다. 자외선 조사 직전에 PBS로 1회 세척하여 배지 내 serum을 제거 후, PBS를 세포가 살짝 잠길 정도로 넣어 준 상태에서 plate 뚜껑을 열고 6.3 J/cm²의 자외선(UVA)을 조사하였다. HDF-n 세포에 UVA를 조사한 후 시료를 농도 별로 처리하여 24시간동안 배양한다. 배양한 배지를 200 μ L씩 96-well plate에 분주하여 4°C에서 24시간 동안 coating하였다. PBS/tween-20으로 세척하고 3% BSA/PBS로 37°C에서 2시간 blocking 한다. PBS/tween-20으로 세척 후, mouse monoclonal anti-MMP-1(BD Pharmingen)을 1 : 3,000으로 blocking solution(3% BSA)에 희석하여 100 μ L씩 분주하고 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 다시 PBS/tween-20으로

세척 후, anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate (BD Pharmingen)를 1 : 3,000으로 blocking solution에 희석하여 100 μ L 씩 분주하고 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, PBS/tween-20으로 세척한 다음 MTT solution 100 μ L 를 첨가하여 발색시킨다. 15분 후, 1 N HCl을 50 μ L 첨가하여 반응을 완전히 중지시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Elastase 저해 활성 측정 - Elastase 저해 활성 측정은 Cannell 등의 방법²⁹⁾에 따라 측정하였다. 기질로서 N-succinyl-(L-Ala)₃-*p*-nitroanilide를 사용하여 37°C에서 20분간 기질로부터 생성되는 *p*-nitroanilide의 생성량을 410 nm에서 측정하였다. 즉, 각 시험 용액을 일정 농도가 되도록 조제하여 0.5 mL씩 시험관에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase(2.5 U/mL) 용액 0.5 mL를 가한 후 기질로 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-Ala)₃-*p*-nitroanilide(0.5 mg/mL)을 첨가하여 20분간 반응시켜 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

통계처리 - 결과 통계 처리는 SPSS 10.0을 사용하였으며, 유의차 검증은 student's *t*-test에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

HaCaT, THP-1, U266B1, B16F10 세포에 대한 백삼 추출물의 세포 독성 - 백삼 추출물이 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 수행하였다. MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 550 nm 근처에서 최대가 되며, 이는 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하는 것이다.³⁰⁾ HaCaT, THP-1, U266B1, B16F10 세포에 각각 백삼 추출물을 농도 별로 처리하고 48 시간 배양하여 세포의 생존율을 확인하였다. 그 결과, 모든 백삼 추출물은 1 mg/mL 이하의 농도에서 80% 이상의 생존율을 보여 세포 생존에 영향을 끼치지 않는 것으로 나왔으며(Fig. 1), 이 결과를 바탕으로 다음 단계의 실험을 진행하였다.

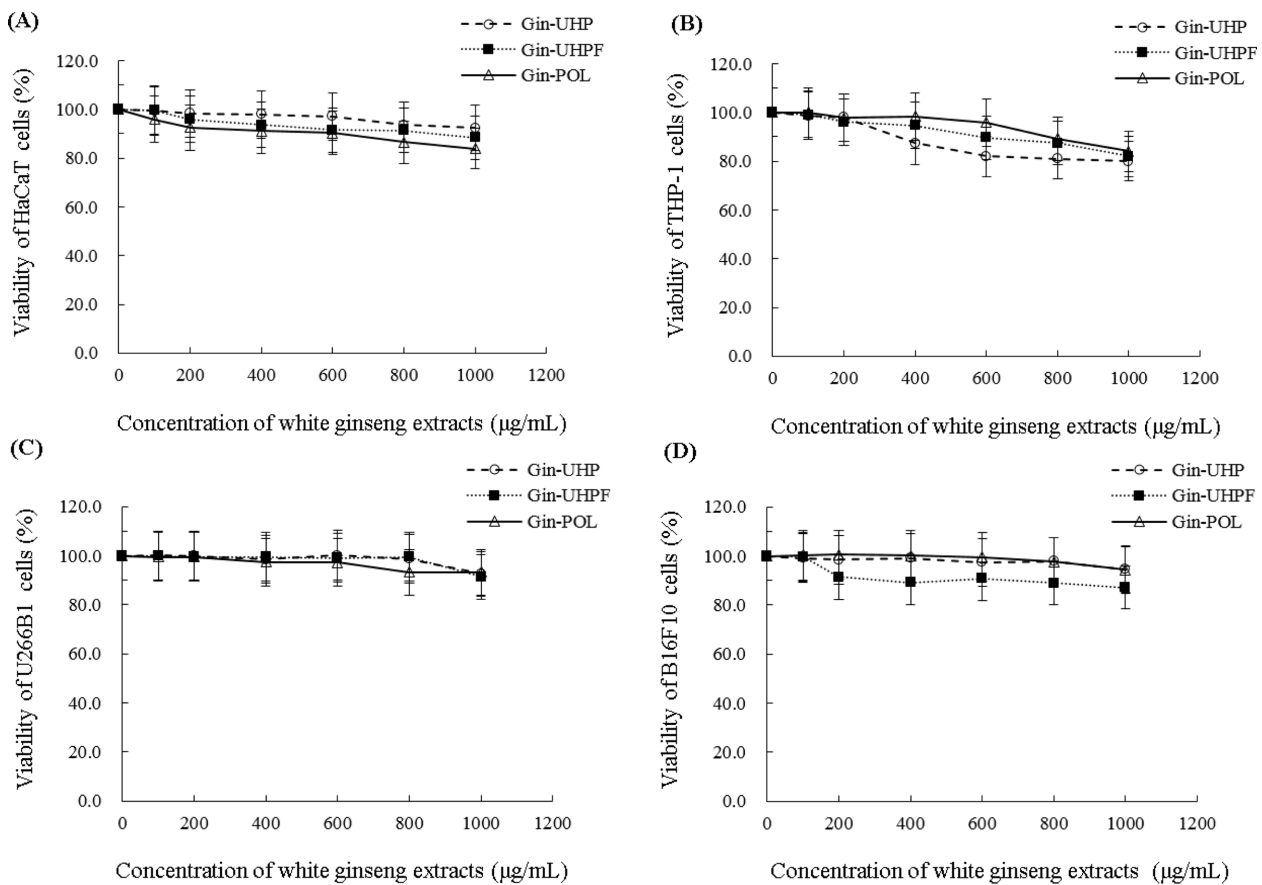


Fig. 1. Effect of white ginseng extracts on cell viability. (A) HaCaT, (B) THP-1, (C) U266B1 and (D) B16F10 cells were treated with different concentration of white ginseng extracts for 48 h. Cell viability was measured by MTT assay. Viability of untreated control cells was defined as 100% and the values are expressed as the means \pm S.D. ($n = 3$).

백삼 추출물이 염증 관련 사이토카인에 미치는 영향 - 백삼 추출물이 염증성 사이토카인을 억제할 수 있는지 알아보기 위하여 ELISA를 이용하여 IL-8과 TNF- α 의 분비량을 측정하였다. 사람 피부각질형성 세포인 HaCaT을 TNF- α (100 ng/mL)로 자극하여 IL-8의 분비량을 측정하였고, 사람 단핵구 세포인 THP-1은 LPS(100 ng/mL)로 자극하여 TNF- α 의 분비량을 측정하였다. IL-8은 다양한 조직과 혈액 세포에서 분비되는 화학유인물질 사이토카인(chemoattractant cytokine)이며, 염증 부위에서 호중구를 끌어 모은다.^{31,32} HaCaT cell에 TNF- α 처리 후 백삼 추출물을 농도 별로 처리한 다음 24시간 배양 후 TNF- α 에 의해 활성화된 세포포

부터 분비되는 사이토카인의 양을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 추출물들이 염증성 사이토카인인 IL-8의 생성 억제에 미치는 영향을 조사 한 결과 Fig. 2A와 같이 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으며 1 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 Gin-UHP, Gin-UHPF, 그리고 Gin-POL이 각각 34%, 17%, 20% 감소시켰다. TNF- α 는 LPS를 비롯한 여러 가지의 자극에 반응 하여 monocytes와 macrophages에 의해 방출되는 peptide mediator로 endotoxin의 제거효과를 가지는 가장 중요한 것으로 알려져 있다.^{33,34} 그러나 TNF- α 는 LPS의 shock에 의해 Kupper cell로부터 방출되며, 간장에 상처를 주고 간세포의 사멸을 일으키며, TNF- α 의 과잉생산은 광범위의 pathogenic 상태를 일으킨다.³⁵ 배양된 THP-1 세포에 LPS에 의해 유도된 TNF- α 의 생성량에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 2B와 같이 나타났다. 모든 추출물에서 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 특히 1 mg/mL의 농도에서 Gin-UHP는 38%, Gin-UHPF는 30%를 감소시켰다.

백삼 추출물이 IgE 분비에 미치는 영향 - IgE 매개성 아토피 피부염은 TH2 세포의 국소 침윤과 관계된다고 알려져 있다.³⁶ IgE가 원인이 되는 아토피 피부염은 전체 아토피 피부염의 약 70 - 80%를 차지하며, 특히 IgE 항체의 농도와 질병의 중증도 사이의 연관성이 보고되고 있다.³⁷ 사람 B세포인 U266B1 세포에서 LPS(4 μ g/mL)에 의해 분비된 IgE의 억제 효과를 확인하기 위해 백삼 추출물을 농도 별로 처리한 후 24시간 동안 배양하여 IgE에 대한 효과를 ELISA kit를 이용하여 확인하였다. 모든 추출물에서 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 1 mg/mL의 농

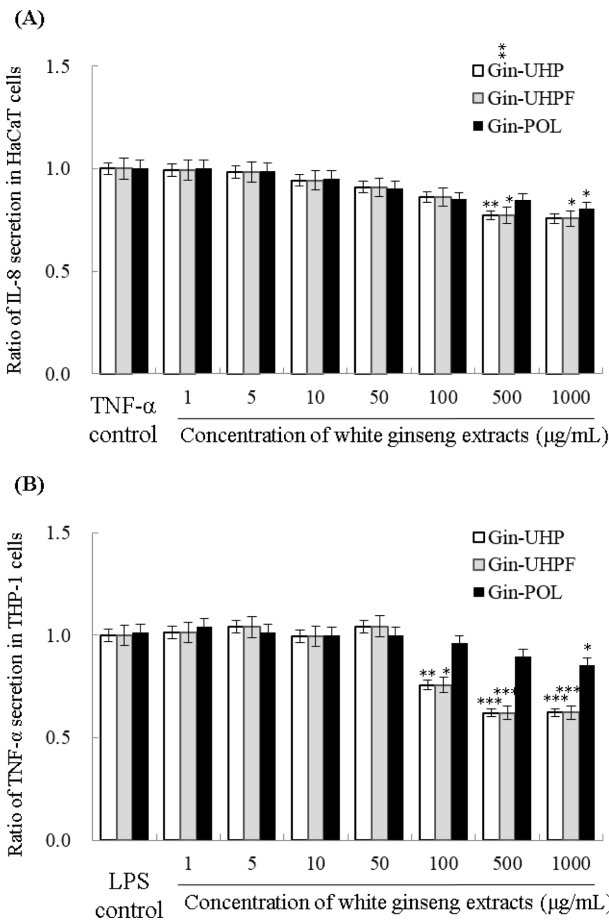


Fig. 2. Effect of white ginseng extracts on the production of (A) IL-8 in TNF- α -stimulated HaCaT cells, and (B) TNF- α in LPS-stimulated THP-1 cells. HaCaT cells were co-incubation with different extracts of white ginseng and TNF- α (100 ng/mL) for 24 h. THP-1 cells were incubation with LPS (100 ng/mL) for 24 h, followed by co-incubation with different extracts of white ginseng. The treated culture media was collected and assayed for IL-8 and TNF- α production using an ELISA kit. Each bar represent mean \pm S.D. ($n = 3$). (***)represents significant differences between TNF- α or LPS and samples treated group $P < 0.001$, (** $P < 0.01$, (* $P < 0.05$).

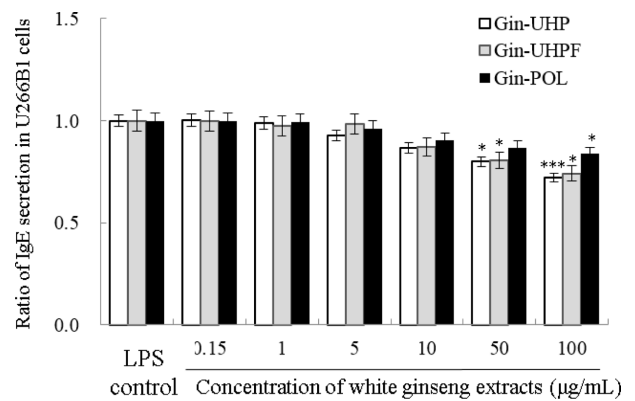


Fig. 3. Effect of white ginseng extracts on the production of IgE in LPS-stimulated U266B1 cells. Cells were pretreated with 4 μ g/mL of LPS for 4 h, followed by treatment of white ginseng extracts for 24 h. The treated culture media was collected and assayed for IgE production using an ELISA kit. Each bar represent mean \pm S.D. ($n = 3$). (***)represents significant differences between LPS and samples treated group $P < 0.001$, (** $P < 0.01$, (* $P < 0.05$).

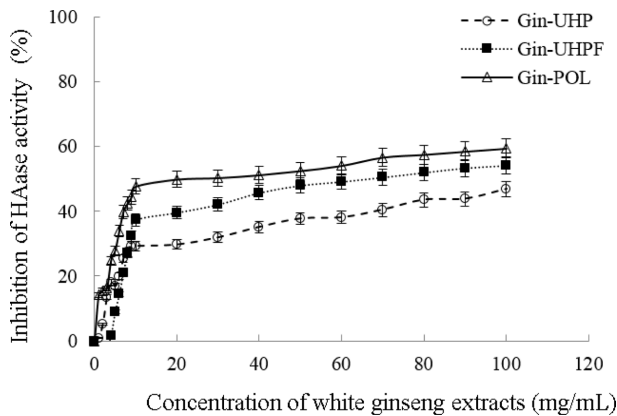


Fig. 4. Inhibition of hyaluronidase activity by white ginseng extracts. Hyaluronidase solution (5 unit/mL) was preincubated with extracts of white ginseng extracts for 60 min at 37°C, and the mixture was added to hyaluronic acid (0.03%) for 45 min at 37°C. Each bar represent mean ± S.D. (n = 3).

도에서 Gin-UHP는 38%, Gin-UHPF는 36%, Gin-POL은 16%를 감소시켰다(Fig. 3).

HAase 저해 활성 - HAase는 mucopolysaccharide를 가수 분해하는 효소로써 hyaluronic acid를 분해하는 작용 이외에 모세혈관 투과성에 관여하며 급성부종을 야기하는 기염제로 알려져 있다.³⁸⁾ 따라서 HAase의 활성저해제는 항알레르기 작용과 보습작용을 가지는 것으로 생각되어져 저해 물질이 항염증 약물 및 화장품의 재료로 사용된다.³⁹⁾ 그러므로 본 연구에서는 백삼 추출물에서 HAase저해 효과를 조사하였다. 그 결과, Fig. 4와 같이 백삼 추출물들은 농도가 증가에 따라 의존적으로HAase의 활성을 저해 시켰으며, Gin-POL은 10 mg/mL에서 EC₅₀을 나타내어 뛰어난 HAase저해 활성을 나타내었다. 이에 비해, Gin-UHPF는 40 mg/mL, Gin-UHP는 100 mg/mL의 농도에서 EC₅₀을 보여 Gin-POL에 비해 낮은 HAase저해 활성을 보였다.

DPPH 자유 라디칼 소거 활성 - DPPH는 알코올 등의 유기용매에 매우 안정하며 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있어 다양한 천연소재로 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다.⁴⁰⁾ 백삼 추출물을 다양한 농도에서 DPPH 라디칼 소거능을 측정된 결과, Fig. 5와 같이 Gin-UHP가 약 5 mg/ml 농도에서 EC₅₀을 나타내어 높은 항산화력을 보였다. 하지만, Gin-POL과 Gin-UHPF는 100 mg/ml의 농도에서 EC₅₀를 나타내어 소거 효과가 없는 것으로 분석되었다. 이 결과는 Table I의 양성 대조군을 사용된 alpha-tocopherol이 약 20 µg/ml에서 EC₅₀을 나타낸 것에 비해서 미비하나 백삼 추출물이 alpha-tocopherol 이 단일 물질인 것을 감안하여 판단할 필요가 있을 것이다.

SOD 유사 활성 확인 - Superoxide radical에 대한 소거

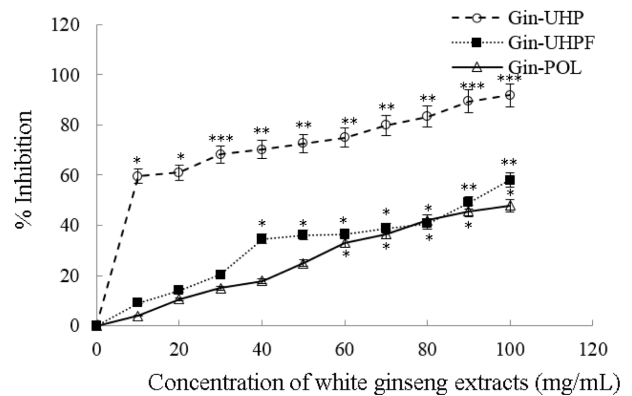


Fig. 5. DPPH free radical scavenging activity white ginseng extracts. Alpha-tocopherol was used as a positive control. The values are expressed as the means ± S.D. (n = 3). (***)represents significant differences between LPS and samples treated group P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05).

Table I. Free radical scavenging activity of alpha-tocopherol

Concentration (µg/ml)	Free radical scavenging activity (%)
0	0
0.1	0.2
1	2.9
5	16.7
10	33.9
20	52.3

활성은 Fig. 6와 같이 나타났다. Gin-UHP의 경우 SOD 유사 활성이 각 추출물의 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 증가하였으며, 70 mg/mL에서 ED₅₀를 나타내어, 추출물 중 가장 높은 활성을 보였다. 그러나 Gin-POL과 Gin-UHPF의 경우 큰 SOD 유사 활성을 볼 수가 없었다.

Tyrosinase 저해 활성 - Tyrosine은 멜라닌 세포내에서의 tyrosinase에 의해 DOPA, DOPA quinone으로 산화되고, 그 후 DOPA quinone이 DOPA chrome, 5,6-dihydroxyindole, indole-5,6-quinone이 되며, 이어서 indole-5,6-quinone으로의 중합에 의해 melanin을 생성하는 것으로 알려져 있다.⁴¹⁾ 피부의 색조를 결정하는 주요한 인자인 melanin은 표피 기저층의 melanocyte라고 불리는 색소 세포내의 melanosome에서 생합성 되며, 멜라닌을 합성하는데 있어서의 출발 물질은 아미노산의 일종인 tyrosine이다.⁴²⁾ 이렇게 피부 내에서 멜라닌 중합체 생합성을 효과적으로 저해할 수 있는 tyrosinase 저해 활성을 측정된 결과는 Fig. 7에 나타내었다. Tyrosinase에 대한 추출물들의 직접적인 영향을 알아보기 위하여 추출물을 다양한 농도로 조제한 후, L-tyrosine을 이용하여 tyrosinase의 활성 억제율을 알아보았다. 각 추출물들은 농도 의존적으로 tyrosinase 억제 활성을 나타내었으며,

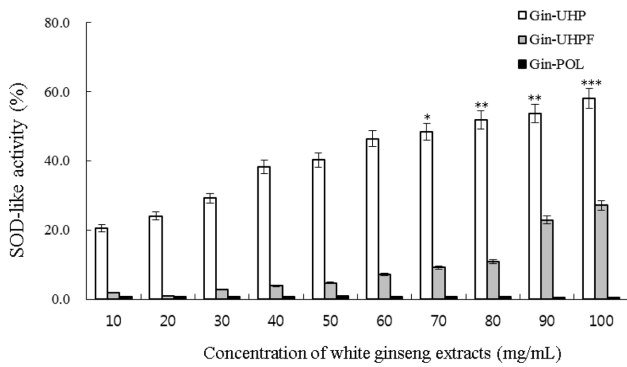


Fig. 6. SOD-like activity of white ginseng extracts. The values are expressed as the means ± S.D. (n = 3). (***)represents significant differences between LPS and samples treated group P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05).

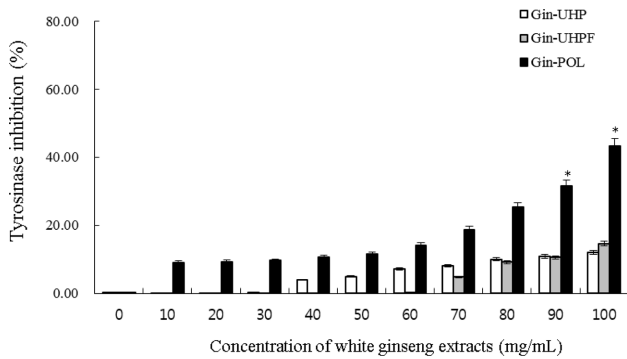


Fig. 7. Inhibitory effect of white ginseng extracts on mushroom tyrosinase activity. The values are expressed as the means ± S.D. (n = 3). *Significant difference in comparison with control at P < 0.05. (***)represents significant differences between LPS and samples treated group P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05).

특히 Gin-POL은 100 mg/ml의 농도에서 43.2%를 억제하여 눈에 띄는 저해 활성을 나타내었다.

Melanoma 세포 내 Tyrosinase 저해 활성 및 Melanin 생성량 - Tyrosinase 활성억제제는 피부 내에서 멜라닌 polymer 합성을 효과적으로 저해할 수 있기 때문에 중간 생성단계에서 tyrosinase에 의해 생성되는 반응 산물인 DOPA chrome의 저해 정도를 확인하는 L-DOPA oxidase 방법을 채택하였다. 백삼 추출물이 B16F10 melanoma 세포의 tyrosinase 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위해 추출물을 농도 별로 처리하여 배양한 후, 세포를 수거해 tyrosinase 활성을 측정해 보았다. 그 결과 Fig. 8A와 같이 백삼 추출물은 모두 큰 tyrosinase 저해 활성을 보였다. 특히 100 µg/ml의 농도에서, Gin-UHPF는 약 37.6%, Gin-UHP와 Gin-POL은 약 39.7%의 큰 저해 활성을 나타내었다. 사람의 피부색을 결정하는 가장 중요한 요인인 melanin은 피부의 광노화나 일광각화증을 억제할 뿐만 아니라, 기미, 주근깨, 검버섯

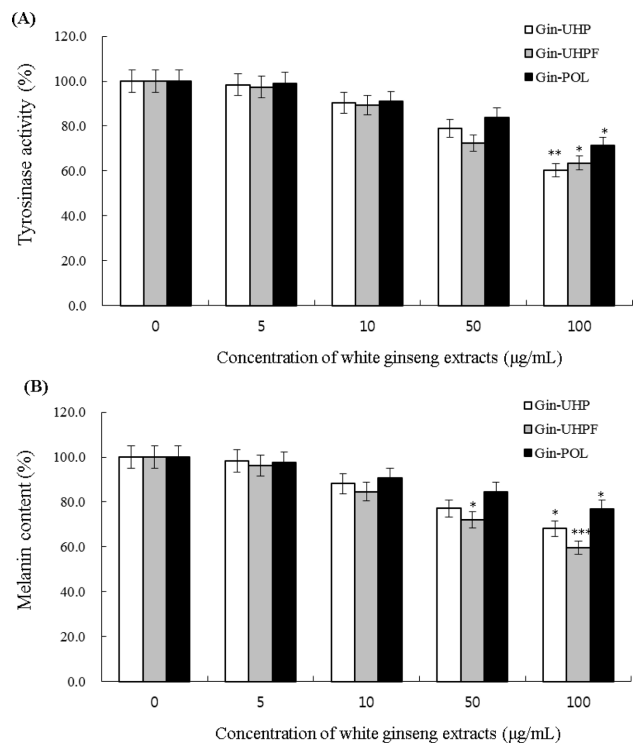


Fig. 8. Inhibitory effect of white ginseng extracts on (A) tyrosinase activity and (B) melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. Cells were seeded at 2×10^5 cells/well for 24 h and treated with various concentrations of white ginseng extracts for 48 h. Tyrosinase activity was measured at 490 nm and melanin contents were measured at 405 nm. Each bar represent mean ± S.D. (n = 3). (***)represents significant differences between LPS and samples treated group P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05).

등의 부분적인 hyperpigmentation을 일으키는 역할을 하고 있다.^{43,44)} Melanosome 내에서의 melanin 생성과정은 tyrosine이 tyrosinase의 작용에 의해 DOPA, DOPA quinone으로 산화되고, 이들은 효소의 작용 및 자동산화 반응에 의해 DOPA chrome, indole carboxylic acid, indole quinone 류 등으로 대사되어 최종적으로 melanin을 합성한다.^{45,46)} 백삼 추출물이 B16F10 melanoma 세포의 신호전달경로를 통하여 간접적으로 tyrosinase 활성에 관여하는지를 확인하기 위하여 melanin 합성에 대한 백삼 추출물의 억제작용을 알아보았다. 우선 추출물을 농도 별로 처리하고 48시간이 지난 후 melanin 생성량을 측정하였다. Tyrosinase 활성의 결과와 유사하게 백삼 추출물을 B16F10 세포에 처리했을 때 melanin 생성량이 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8B). 특히 Gin-UHP와 Gin-UHPF 추출물은 100 µg/ml에서 멜라닌 생성량을 각각 32.9%와 41.3%씩 감소시켰다.

MMP-1 저해 효과 측정 - 피부 광노화에 있어 중요한 역할을 담당하고 있는 MMP-1의 발현은 UVA에 의해 세포에

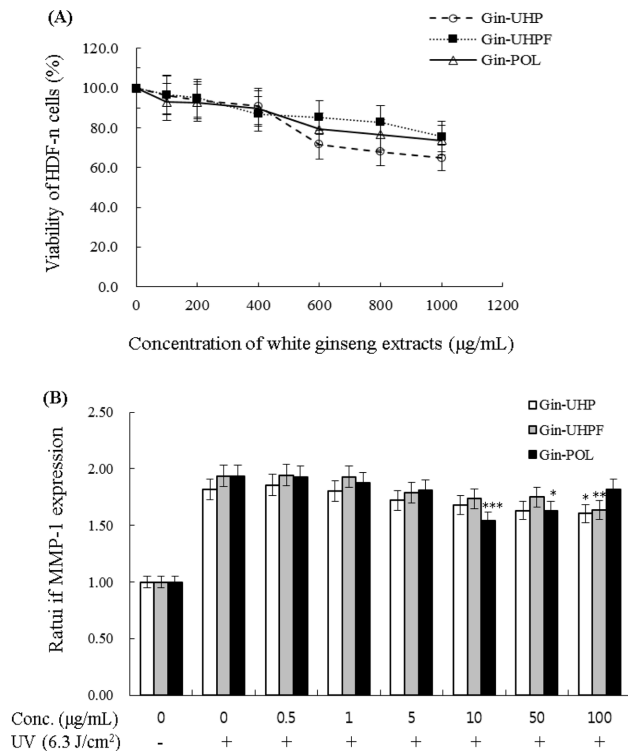


Fig. 9. Effects of white ginseng extracts on the (A) cell viability of HDF-n cells and (B) the production of MMP-1. Cell were treated with various concentrations of white ginseng extracts and the cell viability was determined by MTT assay. Also, cells were irradiated with UVA and the ratio of MMP-1 expression was determined. Each bar represent mean \pm S.D. (n = 3). (***)represents significant differences between LPS and samples treated group P < 0.001, (**P < 0.01, *P < 0.05).

서 JNK/p38 활성도가 증가하고 전사인자인 activator protein-1(AP-1)의 활성도가 증가되는 신호전달경로를 통해 MMP-1 발현을 증가시켜 피부에서 교원질의 결핍을 초래한다고 알려져 있다.⁴⁷⁾ 이러한 UVA에 의해 발현이 증가되는 MMP-1에 백삼 추출물이 미치는 영향을 알아보기 전에, 먼저 섬유아세포인 HDF-n에 UVA를 조사한 후, 백삼 추출물의 영향을 MTT assay를 통해 알아보았다. UVA가 조사된 HDF-n 세포에 백삼 추출물을 처리하고, 48시간 배양하여 세포의 생존률을 확인한 결과 1 mg/mL 이하의 농도에서는 세포 생존에 큰 영향을 끼치지 않는 것을 알 수 있었다(Fig. 9A). 다음으로 HDF-n에 6.3 J/cm² UVA를 조사하고 추출물을 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 MMP-1 발현 저해 효과를 ELISA를 통해 알아보았다. 그 결과 Fig. 9B와 같이 100 µg/mL의 농도에서 Gin-UHPF와 Gin-UHP는 40% 저해 효과를 보였으며, Gin-POL은 10 µg/mL의 농도에서 50%의 MMP-1 저해 활성을 나타내었다.

Elastase 저해 활성 - Elastase는 진피 내 피부탄력을 유지하는 기질 단백질인 elastin의 분해에 관여하며, collagen

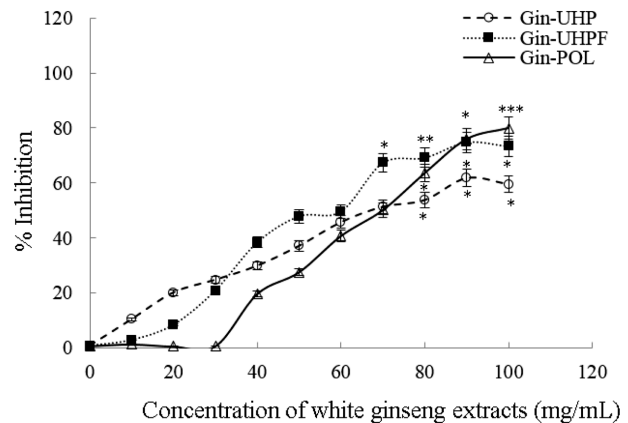


Fig. 10. Elastase inhibitory activity of white ginseng extracts. The values are expressed as the means \pm S.D. (n = 3). (*represents significant differences between LPS and samples treated P < 0.05). (***)represents significant differences between LPS and samples treated group P < 0.001, (**P < 0.01, *P < 0.05).

을 분해할 수 있는 비 특이적 가수분해 효소이다.²²⁾ 또한 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나로 이 상조직에서는 활성이 높아져 조직 파괴의 직접적인 원인이 되며, 피부의 주름 및 탄력성 소실 등을 유발하므로 elastase를 저해하는 물질은 피부의 주름을 개선하는 효과가 있다.^{48,49)} 백삼 추출물의 elastase 저해 활성을 조사한 결과는 Fig. 10과 같이 전반적으로 농도가 증가함에 따라 저해 활성이 증가하였다. 그 중 Gin-POL과 Gin-UHPF는 다른 추출물에 비해 elastase 저해 활성이 높게 나타났다.

결론

백삼 추출물의 항염증 효과를 측정된 결과 사람 각질형성 세포와 단핵구 세포에서 각각 염증성 사이토카인인 IL-8과 TNF- α 의 분비를 억제하였고, 사람 B세포에서 아토피를 매개하는 면역글로블린인 IgE를 억제하였다. 특히 추출물 중 Gin-UHP가 아토피 피부염과 관련하여 가장 뛰어난 효과를 보여주었다. 또한 항산화 효과, HAase 저해를 통한 보습 효과, tyrosinase 저해 활성 및 melanin 생성량 측정을 통한 미백 효과, elastase, MMP-1 저해 효과를 통한 항노화 효과를 알아본 결과, 백삼 추출물에서 우수한 효과를 확인할 수 있었으며, 그 중 Gin-POL이 가장 뛰어난 효과를 나타내었다.

인용문헌

- Kim, A. J., Kang, S. J., Lee, K. H., Lee, M. S., Ha, S. D., Cha, Y. S. and Kim, S. Y. (2010) The chemopreventive potential and anti-inflammatory activities of Korean black

- ginseng in Colon26-M3.1 carcinoma cells and macrophages. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **53**: 101-105.
2. Tanaka, N., Tanaka, O. and Shibata, S. (1972) Chemical studies on the oriental plant drugs. XXVIII. Saponins and saponinins of ginseng; Stereochemistry of saponin of ginsenoside Rb1, Rb2 and Rc. *Chem. Pharm. Bull.* **20**: 1212-1216.
 3. Wu, J. Y., Gardner, B. H., Murphy, C. I., Seals, J. R., Kensil, C. R., Recchia, J., Beltz, G. A., Newman, G. W. and Newman, M. J. (1992) Saponin adjuvant enhancement of antigen-specific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine. *J. Immunol.* **148**: 1519-1525.
 4. Lee, S. R., Kim, M. R., Yon, J. M., Baek, I. J., Park, C. G., Lee, B. J., Yun, Y. W. and Nam, S. Y. (2009) Black ginseng inhibits ethanol-induced taratogenesis in cultured mouse embryos through its effects on antioxidant activity. *Toxicol. in vitro* **23**: 47-52.
 5. Lee, J. H., Shen, G. N., Kim, E. K., Shin, J. H., Myung, C. S., Oh, H. J., Kim, D. H., Roh, S. S., Cho, W., Seo, Y. B., Park, Y. J., Kang, C. W. and Song, G. Y. (2006) Preparation of black ginseng and its antitumor activity. *Kor. J. Ori. Med. Physiol. Pathol.* **20**: 951-956.
 6. Song, G. Y., Oh, H. J., Roh, S. S., Seo, Y. B., Park, Y. J. and Myung, C. S. (2006) Effect of black ginseng on body weight and lipid profiles in male rats fed normal diets. *Kor. J. Pharmacogn.* **50**: 381-385.
 7. Leung, D. Y. M. (2000) Atopic dermatitis: New insights and opportunities for therapeutic intervention. *J. Allergy Clin. Immun.* **105**: 860-875.
 8. Taylor, M. L. and Metcalfe, D. D. (2001) Mast cells in allergy and host defense. *Allergy Asthma Proc.* **22**: 115-119.
 9. Bieber, T. (2008) Atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* **358**: 1483-1494.
 10. Spergel, J. M. (2010) From atopic dermatitis to asthma: the atopic march. *Ann. Allergy Asthma Im.* **105**: 99-106.
 11. Vlahopoulos, S., Boldogh, I., Casola, A. and Brasier, A. R. (1999) Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood* **94**: 1878-1889.
 12. Leung, D. Y. M. (1995) Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immun.* **96**: 302-319.
 13. Ji, H. and Li, X.-K. (2016) Oxidative Stress in Atopic Dermatitis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**: 2721469-2721469.
 14. Sivaranjani, N., Rao, S. V. and Rajeev, G. (2013) Role of reactive oxygen species and antioxidants in atopic dermatitis. *J. Clin. Diagn. Res.* **7**: 2683-2685.
 15. Omata, N., Tsukahara, H., Ito, S., Ohshima, Y., Yasutomi, M., Yamada, A., Jiang, M., Hiraoka, M., Nambu, M., Deguchi, Y. and Mayumi, M. (2001) Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci.* **69**: 223-228.
 16. Lee, J. H. and Cho, S. H. (2011) Korean red ginseng extract ameliorates skin lesions in NC/Nga mice: An atopic dermatitis model. *J. Ethnopharmacol.* **133**: 810-817.
 17. Bae, E. A., Trinh, H. T., Yoon, H. K. and Kim, D. H. (2009) Compound K, a metabolite of ginsenoside Rb1, inhibits passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice. *J. Ginseng Res.* **44**: 93-98.
 18. Hwang, E. Y., Kong, Y. H., Lee, Y. C., Kim, Y. C., Yoo, K. M., Jo, Y. O. and Choi, S. Y. (2006) Comparison of phenolic compounds contents between white and red ginseng and their inhibitory effect on melanin biosynthesis. *J. Ginseng Res.* **30**: 82-87.
 19. Ro, J. Y., Ahn, Y. S. and Kim, K. H. (1998) Inhibitory effect of ginsenoside on the mediator release in the guinea pig lung mast cells activated by specific antigen-antibody reactions. *Int. J. Immunopharmacol.* **20**: 625-641.
 20. Hong, C. E. and Lyu, S. Y. (2011) Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of Korean red ginseng extract in human keratinocytes. *Immune Netw.* **11**: 42-49.
 21. Fore, J. (2006) A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Ostomy Wound Manage.* **52**: 24-35; quiz 36-27.
 22. Lee, K. K., Cho, J. J., Park, E. J. and Choi, J. D. (2001) Anti-elastase and anti-hyaluronidase of phenolic substance from *Areca catechu* as a new anti-ageing agent. *Int. J. Cosmet. Sci.* **23**: 341-346.
 23. Hyun, S. K., Lee, W. H., Jeong, D. M., Kim, Y. and Choi, J. S. (2008) Inhibitory effects of kurarinol, kuraridinol, and trifolirhizin from *Sophora flavescens* on tyrosinase and melanin synthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **31**: 154-158.
 24. Lahmann, C., Bergemann, J., Harrison, G. and Young, A. R. (2001) Matrix metalloproteinase-1 and skin ageing in smokers. *Lancet (London, England)* **357**: 935-936.
 25. Blois, M. S. (1958) Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **181**: 1199-1200.
 26. Marklund, S. and Marklund, G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**: 469-474.
 27. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Med.* **39**: 517-519.
 28. Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**: 1474-1478.
 29. Cannell, R. J., Kellam, S. J., Owsianka, A. M. and Walker, J. M. (1988) Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Med.* **54**: 10-14.
 30. Park, J. G., Kramer, B. S., Steinberg, S. M., Carmichael, J., Collins, J. M., Minna, J. D. and Gazdar, A. F. (1987) Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res.* **47**:

- 5875-5879.
31. Bickel, M. (1993) The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J. Periodontol.* **64**: 456-460.
 32. Russo, R. C., Garcia, C. C., Teixeira, M. M. and Amaral, F. A. (2014) The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**: 593-619.
 33. Chamulitrat, W., Blazka, M. E., Jordan, S. J., Luster, M. I. and Mason, R. P. (1995) Tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production in endotoxin-primed rats administered carbon tetrachloride. *Life Sci.* **57**: 2273-2280.
 34. Harbrecht, B. G., Di Silvio, M., Demetris, A. J., Simmons, R. L. and Billiar, T. R. (1994) Tumor necrosis factor-alpha regulates in vivo nitric oxide synthesis and induces liver injury during endotoxemia. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **20**: 1055-1060.
 35. Hamada, E., Nishida, T., Uchiyama, Y., Nakamura, J., Isahara, K., Kazuo, H., Huang, T. P., Momoi, T., Ito, T. and Matsuda, H. (1999) Activation of Kupffer cells and caspase-3 involved in rat hepatocyte apoptosis induced by endotoxin. *J. Hepatol.* **30**: 807-818.
 36. Hamid, Q., Naseer, T., Minshall, E. M., Song, Y. L., Boguniewicz, M. and Leung, D. Y. (1996) In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **98**: 225-231.
 37. Kim, H. S., Jung, J. I., Suh, S. B. and Jung, J. A. (2013) Characteristics between IgE mediated and non-IgE mediated atopic dermatitis. *Allergy Asthma Respir. Dis.* **1**: 339-343.
 38. Girish, K. S., Kemparaju, K., Nagaraju, S. and Vishwanath, B. S. (2009) Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic perspective. *Curr. Med. Chem.* **16**: 2261-2288.
 39. Scotti, L., Singla, R. K., Ishiki, H. M., Mendonca, F. J., da Silva, M. S., Barbosa Filho, J. M. and Scotti, M. T. (2016) Recent advancement in natural hyaluronidase inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**: 2525-2531.
 40. Jin-Chul, H., Ja-Young, P., Sang-Mi, A., Jin-Man, L., Chi-Young, Y., Shin, H.-M., Kwon, T. K. and Lee, S.-H. (2006) Anti-oxidant and anti-tumor activities of crude extracts by *Gastrodia elata* Blume. *Korean J. Food Preserv.* **13**: 83.
 41. Prota, G. (1980) Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.* **75**: 122-127.
 42. Pavel, S. and Muskiet, F. A. (1983) Eumelanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma: a preliminary report. *Cancer Detect. Prev.* **6**: 311-316.
 43. Mishima, Y., Hatta, S., Ohyama, Y. and Inazu, M. (1988) Induction of melanogenesis suppression: cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res.* **1**: 367-374.
 44. Sugimoto, K., Nishimura, T., Nomura, K., Sugimoto, K. and Kuriki, T. (2004) Inhibitory effects of alpha-arbutin on melanin synthesis in cultured human melanoma cells and a three-dimensional human skin model. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 510-514.
 45. Ando, S., Ando, O., Suemoto, Y. and Mishima, Y. (1993) Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitors. *J. Invest. Dermatol.* **100**: 150s-155s.
 46. Imokawa, G. and Mishima, Y. (1982) Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glucosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res.* **42**: 1994-2002.
 47. Han, A. R., Lim, T. G., Song, Y. R., Jang, M., Rhee, Y. K., Hong, H. D., Kim, M. H., Kim, H. J. and Cho, C. W. (2018) Inhibitory effect of *Opuntia humifusa* fruit water extract on solar ultraviolet-induced MMP-1 expression. *Int. J. Mol. Sci.* **19**.
 48. Tsuji, N., Moriwaki, S., Suzuki, Y., Takema, Y. and Imokawa, G. (2001) The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem. Photobiol.* **74**: 283-290.
 49. Vostalova, J., Tinkova, E., Biedermann, D., Kosina, P., Ulrichova, J. and Rajnochova Svobodova, A. (2019) Skin protective activity of silymarin and its flavonolignans. *Molecules (Basel, Switzerland)* **24**.

(2019. 4. 2 접수; 2019. 5. 1 심사; 2019. 5. 9 게재확정)