In vitro anti-oxidant, anti-wrinkle and whitening effect of solvent fraction from takli-san

Jae-Myo Yu¹ · Yun-Hwan Kang¹ · Dong-Hee Kim¹ · Tae-Soon Park¹

타리산 용매 분획물의 *in vitro* 항산화, 주름 억제 및 미백 효과

유재묘¹ · 강윤환¹ · 김동희¹ · 박태순¹

Received: 22 June 2017 / Accepted: 24 July 2017 / Published Online: 30 September 2017
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2017

Abstract In this study, the activity of Takli-san for anti-oxidation, anti-wrinkle and whitening effect was verified and its applicability as a cosmetic material was confirmed. 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenge, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenge, elastase and tyrosinase inhibitory activity were investigated by solvent fraction, and ethyl acetate fraction of water extract from Takli-san (TW-EA) showed the highest inhibitory activity. Western blot was performed to confirm anti-wrinkle and whitening effect in the cells, and it was investigated that the TW-EA inhibition effect was superior to that of the positive control used for the comparison test. Through the results of the experiments, the applicability as a cosmetic material of Takli-san was verified.

Keywords Anti-oxidant · Anti-wrinkle · CCD-986sk · HEM · Takli-san · Whitening

서론

노화란 기능적, 구조적, 생화학적으로 신체 조직 및 세포 전 기간에 걸쳐 일어나는 변화라고 말할 수 있다. 피부의 노화는 내인성 노화(intrinsic aging)와 광노화(photoaging)에 의해 나타나며 이로 인해 주름과 색소침착이 증가하게 된다(Gilchrest 1990; Ha 2006).

노화의 원인으로써 reactive oxygen species (ROS)를 들 수 있는데 세포 및 조직에서 생성되어 생체 내에 존재하는 superoxide dismutase (SOD), peroxidase, catalase 등에 의해 대부분 소멸된다. 그러나 ROS가 제대로 제거되지 않을 경우 free radical로 인한 산화적 스트레스를 받게 되므로 생체는 노화를 비롯한 각종 질병이 유발 되기도 한다(Karin 등, 2000; Meinhard 2001). 또한, 광노화의 주요인자인 자외선에 의해서도 ROS가 생성되는데, 이는 collagen 감소, elastin 변성, 단백질 산화 등을 유발하거나(Yaar와 Gilchrest 2007), matrix metalloproteinase (MMP)의 생성을 증가시켜 주름을 유발한다(Charous 등, 1997; So 등, 2008).

또한, 자외선은 주름뿐만 아니라 색소침착을 증가시키는데, 이것은 자외선에 의한 피부 세포 손상을 억제할 목적으로 melanin이 생성된 결과이다. 체내에서 melanin의 합성은 melanocyte에서 cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A 경로에 의해 합성된다(Ha 2009). 여기서 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 melanogenic gene promoters들에 결합 및 활성화하여 tyrosinase, tyrosinase related protein (TRP)-1, TRP-2의 발현을 촉진시킴으로써 최종적으로 melanin synthesis를 유발한다(Busca와 Ballotti 2000; Saha 등, 2006).

한방에서는 피부노화, 미백 등과 같은 피부 미용에 관한 관심이 증가되고 있으며 그에 따라 기존 처방을 이용한 한방화장품 등이 개발되고 있다. 개발 과정에서 경구처방이 사용되는 사례가 많은데, 이 처방은 고전 문헌 또는 임상 치료의 결과에서

Tae-Soon Park (✉)
E-mail: taesoon2p@nikom.or.kr

¹National Development Institute of Korean Medicine, Gyeongsan 712-260, Republic of Korea

This is an Open Access article 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.

내복약 위주의 데이터를 확보해왔기 때문에 피부에 도포하는 경 피부용 소재로서 검증은 미비하다고 할 수 있다(Kim 등, 2015). 기존에 한약처방으로 보고된 연구로는 연교승마탕(Kim 등, 2008a), 황연해독탕(Yun 등, 2008), 경옥고 가미방(Choi 등, 2007), 신호탁리산(Kang 등, 2016) 등이 있다. 본 연구에서는 탁리산을 이용하여 연구하고자 한다.

탁리산은 인삼(人蔘), 황기(黃芪), 백작약(白芍藥), 백출(白朮), 진피(陳皮), 당귀(當歸), 숙지황(熟地黃), 백복령(白茯苓), 감초(甘草) 총 9가지 약재로 구성되어있고, 《동의보감(東醫寶鑑)》에서 응저(癰疽)가 기혈(氣血)이 허하여서 나올 수가 없고 나온 것들도 다시 수렴되며 추운 것을 싫어하고 열(熱)이 나며 기육(肌肉)이 영양을 원활히 받지 못하는 것을 치료하는 데에 쓰던 처방으로 기재되어 있다. 현재까지 연구결과로는 마우스를 이용한 항암효능 연구(Choi 등, 2005), Balb/c 3T3의 증식에 미치는 영향 연구(Eun 등, 1993), 보습 효능에 대한 임상적 연구(Kang 등, 2016) 등이 보고되어 있다.

본 연구에서는 탁리산 열수추출물의 용매 분획물을 이용하여 항산화, 주름억제, 미백효과에 대한 활성을 검증하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 구성 약재는 2016년 2월 (주)휴먼허브(Gyeongsan, Korea)에서 구입하여 실험 재료로 사용하였다. 효능 실험과 세포 독성 측정 시약 1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), potassium persulfate, porcine pancreas elastase, L-ascorbic acid, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), n-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide, collagenase from *Clostridium histolyticum*, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)은 Sigma chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양에 사용되는 dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, 0.25% trypsin-EDTA, 0.4% trypan blue stain은 gibco BRL Co. (Grand Island, New York, USA), haemocytometer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany)를 구입하였다. Melanin 생성 유발을 위한 human tumor necrosis factor- α with carrier, sterile (TNF- α)는 Cell Signaling사(Danvers, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 주름 및 항산화활성 측정을 위해 procollagen type I C-peptide kit (Takara Shuzo, Kyoto, Japan)와 ROS-Glo™ H₂O₂ assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 구입하여 사용하였다. Primary antibody인 MMPs 및 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2와 secondary antibody는 Santa cruz biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

시료 추출 및 용매 분획

인삼(人蔘) 8 g, 황기(黃芪), 백출(白朮), 진피(陳皮), 당귀(當歸), 숙지황(熟地黃), 감초(甘草)를 각각 4 g, 백복령(白茯苓), 백작약(白芍藥)을 각각 2 g 계량하고, 이것의 3회 분량의 시료 중량에 10 배의 물을 넣어 환류추출기에서 3시간씩 3회 반복 추출한 다음

filter paper (Whatman No. 2, Tokyo, Japan)로 여과하고 감압 농축기로 농축하여 추출물 29.3 g을 얻었다. 그중 14 g을 가지고 순차적 용매분획법을 이용하여 n-hexane 분획물(0.67 g), ethyl acetate 분획물(1.1 g), butanol 분획물(4.57 g) 최종 물분획물(7.5 g)을 확보하였다.

세포배양

본 실험에 사용된 세포주는 fibroblast인 CCD-986sk cell과 melanocyte인 HEM cell을 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지와 human melanocyte growth medium (CEFO, Seoul, Korea)에 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 배지를 각각 사용하였으며, 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 독성 측정

세포 독성 측정은 Carmichael 등(1987)의 방법에 따라 측정하였다. CCD-986sk cell과 HEM cell을 각각 96 well plate에 1×10^4 , 3×10^4 cells/well을 분주하고 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 새 DMEM을 200 μ L 넣고 시료를 농도 별로 처리한 후 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 20 μ L를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well에 DMSO 150 μ L를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율(%)로 나타내었다.

DPPH radical scavenging activity 측정

DPPH radical 소거능에 대한 실험은 Blois 등 (1958)을 변형하여 96 well plate를 이용하여 측정하였다. 각 시료 100 μ L에 0.2 mM의 DPPH 용액 50 μ L를 넣고 교반 한 후 10분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 나타냈다.

ABTS radical scavenging activity 측정

ABTS radical 소거능을 이용한 항산화력 측정은 Re 등 (1999)의 방법을 이용하여 측정하였다. 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺를 형성시킨 후 ethanol로 1:9로 희석하여 사용하였다. 각 시료 50 μ L에 희석한 ABTS용액 100 μ L를 가하여 5분 동안 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ROS 생성량 측정

ROS-Glo™ H₂O₂ assay kit를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 ROS 발생량을 측정하였다. CCD-986sk cell을 이용하여 96-well plate에 각 well 당 1×10^4 cells/well 세포가 되도록 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 이후, 배양된 배지를 제거하고 PBS를 넣어 UV-B (20 mJ/cm²)를 처리하고 PBS를 제거한 뒤 DMEM 배지를 각 well에 넣고 TNF- α 를 10 ng/mL의 농도로 첨가한 후 시료를 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양하고

ROS 발생량을 microplate reader를 사용하여 측정하였다.

Elastase 저해활성 측정

Elastase 저해활성은 Cannell 등 (1998)의 방법에 따라 측정하였다. 동일 농도의 시료를 조제하여 40 µL씩 96 well plate에 분주하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 2.5 U/mL porcine pancreas elastase 용액을 40 µL 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 30분 간 반응시킨 후 445 nm에서 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율(%)로 나타내었다.

Procollagen type-I 생합성 측정

CCD-986sk cell 1×10^4 cells/well 을 96 well plate에 접종한 후 24시간 동안 배양하였다. 그 후 UV-B (20 mJ/cm²)를 조사하고 TNF-α를 10 ng/mL의 농도로 처리한 후 각 well에 시료를 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 이렇게 배양한 세포의 배양액을 채취하여 procollagen type-C peptide (PIP) EIA kit (Takara Bio)를 사용하여 propeptide의 양을 측정하였다.

Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등(1986)의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 500 µL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 200 µL 및 시료 100 µL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 200 µL을 첨가하여 25 °C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 492 nm에서 측정하였다. tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율(%)로 나타내었다.

Western blot을 통한 주름 및 미백 관련 단백질의 발현 측정

CCD-986sk cell을 6 well plate에 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후 PBS로 교환하여 UV-B (20 mJ/cm²)를 조사하고 다시 배지교환 후, TNF-α를 10 ng/mL의 농도로 첨가하고 시료를 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 후 차가운 PBS로 세척하였다. HEM cell은 6 well plate에 3×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였고, 그 후 DMEM 배지로 교환하고 forskolin (1 nM)과 시료를 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 세포는 lysis buffer를 well 당 30 µL를 첨가하여 세포를 용해시키고 원심분리하여(12,000 rpm, 4 °C, 20 min) 단백질을 추출하였다. 원심분리하여 얻은 단백질은 bradford assay로 정량하였으며, 동일량의 단백질을 10%의 SDS-PAGE를 이용하여 전기영동한 후, PVDF membrane에 transfer하였다. PVDF membrane을 1×TBST에 녹인 5% BSA에 1시간 동안 반응시켜 background를 제거하고 TBST로 3회 washing 한 후 primary antibody (1:500)를 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 secondary antibody (1:500)를 2.5시간 동안 반응시키고 TBST로 3회 washing 한 후 Immobilon chemiluminescent reagents로 측정하였다. Band density는 ImageQuant LAS-4000 (GE life sciences, Taipei, Taiwan)으로 확인하였다.

통계처리

통계처리는 SPSS 10.0을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(ANOVA: analysis of variance) 프로그램을 이용하여 *t*-test를 통해 통계적 유의수준 $p < 0.05$ 에서 검증하였다.

결과 및 고찰

MTT assay에 의한 세포 독성

타리산 열수추출물의 에틸아세테이트 분획물(TW-EA)로 CCD-986sk cell과 HEM cell에서 세포 독성을 확인하기 위하여 시료를 6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100, 200 µg/mL의 농도로 처리하여 관찰하였다. 그 결과 CCD-986sk cell은 6.25-100 µg/mL 농도에서는 세포 독성을 확인 할 수 없었고, 200 µg/mL 이상에서 독성이 관찰되었다. HEM cell의 경우 100 µg/mL 농도 이상에서 세포독성이 관찰되었다(Fig. 1).

항산화 활성

시료의 항산화 효과를 검증하기 위해 DPPH, ABTS radical 소거능 측정, ROS-Glo™ H₂O₂ assay kit를 이용한 ROS 생성량 측정을 수행하였다. DPPH는 라디칼 전자의 비편재화에 의해 안정한 구조의 라디칼로 존재하는 화합물 내 질소 중심의 라디칼이다. 517 nm에서 최대 흡수를 하며, 환원되면 517 nm에서 흡수가 없어지므로 DPPH의 환원 정도는 환원제의 환원력에 달려있다고 할 수 있다(Lee 2011). 기존 보고에서 제주 자생 조록나무 분획물의 DPPH 라디칼 소거능 측정결과 에틸아세테이트 분획물(EA)이 100 µg/mL의 농도에서 약 50%의 소거능을 보여주었고(Kim 등, 2016), 사과꽃잎 70% 에탄올 추출물의 EA는 100 µg/mL에서 약 58%의 저해활성을 나타내었다(Choi 등, 2011). 타리산 열수추출물의 헥산(TW-H), 에틸아세테이트(TW-EA), 부탄올(TW-B), 물(TW-W) 분획물은 100, 1,000 µg/mL의 농도에서 각각 19, 62, 43, 22%와 33, 92, 90, 83%의 소거능을 나타내었고, 그 중 TW-EA의 효과가 가장 우수했다(Fig. 2A). TW-EA의 RC₅₀ 값은 75.4±4.2 µg/mL로 측정되었다.

ABTS radical 소거능 측정법은 항산화물질의 수소 이온 공여

Fig. 1 Cytotoxicity of cell (CCD-986sk and HEM) of solvent fraction isolated from Takli-san. ■: CCD-986sk cell. ▨: HEM cell. TW-EA: ethyl acetate fraction of water extract from Takli-san. Result are means ± SD of triplicate data. * $p < 0.05$ vs. Con

Fig. 2 Anti-oxidant activity of solvent fractions isolated from Takli-san. (A) DPPH radical activity. (B) ABTS cation radical activity. (C) ROS production rate. TW-H: hexane fraction of water extract from Takli-san. TW-EA: ethyl acetate fraction of water extract from Takli-san. TW-B: butanol fraction of water extract from Takli-san. TW-W: water fraction of water extract from Takli-san. Vit. C: L-ascorbic acid. PC100: treatment of adenosine by 100 µg/mL. Result are means $\pm$ SD of triplicate data. # p < 0.05 vs. non-treated Nor. * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. Con

능을 측정하는 분석법으로 과산화칼륨과 반응에 의해 생성된 $ABTS^+$ 자유라디칼이 시료속의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용하여 항산화 효과를 측정한다(Re 등, 1999). 구절초 꽃의 항산화 활성 연구에서는 메탄올추출물의 EA에서 약 65%(100 µg/mL)로 보고되었고(Hyun 등, 2011), 무청 에탄올 추출물의 EA는 약 43%의 소거능을 나타내었다(Lee 등, 2013). TW-H, TW-EA, TW-B, TW-W는 100과 1,000 µg/mL의 농도에서 소거활성이 각각 12, 93, 68, 60%와 22, 97, 96, 86%로 나타나서 더 높은 소거능을 확인하였고, 분획물 중에서는 TW-EA의 효과가 가장 높게 나타났다(Fig. 2B). TW-EA의 RC_{50} 값은 40.8 ± 3.7 µg/mL로 측정되었다.

UV-B에 노출된 피부는 활성산소종(ROS)을 생성하는데 이것은 세포내에 영향을 주어 피부손상을 주기 때문에 이것의 제거능을 검증하기 위해(Fisher 등, 1997; Yoon 등, 2003; Di Girolamo 등, 2006; Shimauchi 등, 2008; Han 등, 2013), ROS를 유도한 뒤 DPPH와 ABTS radical 소거능 측정결과에서 가장 우수한 효능을 나타낸 TW-EA를 농도별로 처리하여 항산화능을 측정하였다. 그 결과 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였고 100 µg/mL의 농도에서 46.4%의 저해효과를 보여주었다(Fig. 2C).

주름 억제

시료의 주름억제 효능을 검증하기 위해 elastase 억제활성과 PIP 생성량 확인 및 collagen 분해를 통한 광노화 유도 인자인 MMPs에 대해 western blot을 실시하였다. 피부 주름은 진피에

존재하는 collagen과 elastin의 그물망 구조가 깨지면서 일어나는데, 이것은 자외선, 나이 그리고 스트레스 등으로 인해 과발현된 elastase에 의해서 이루어진다(Voegeli 1996). 따라서 탁리산 용매 분획물로 elastase의 억제율을 측정하여 주름억제 활성을 검증하였으며 TW-H, TW-EA, TW-B, TW-W는 1,000 µg/mL의 농도에서 각각 29, 49, 26, 32%의 억제율을 나타냈고 TW-EA가 용매 분획물 중 가장 높은 저해활성을 보여주었다(Fig. 3A). 동일한 농도에서 선택적 EA는 약 53%의 억제효과를 나타내었고(Yoon 등, 2012), 오이풀 뿌리 분획물의 약리활성 연구에서는 70% 아세톤으로 추출한 오이풀 뿌리의 EA가 1,000 µg/mL의 농도에서 약 21%의 억제율을 보여주었다(Jang 등, 2012).

CCD-986sk cell에 elastase 억제활성 측정결과 가장 우수한 효능을 나타낸 TW-EA를 이용하여 procollagen의 합성량을 평가하기 위해 PIP EIA kit를 이용하여 free propeptide 생성량을 검출하였다. Collagens는 procollagens이라고 불리는 전구체로 합성되고 이것은 propeptides라고 불리는 펩타이드 서열을 포함하고 있다(Kim 등, 2008b). 따라서 free propeptide의 양은 합성된 collagen 분자의 양을 말한다. TW-EA를 농도별로 처리하여 확인한 결과 최고 농도인 100 µg/mL의 농도에서 각각 89%의 procollagen 합성율을 나타내었다(Fig. 3B).

주름관련 단백질 발현을 검증하기 위해 western blot을 실시하였으며, 주름이 생성되는 원인으로 교원질의 결핍을 들 수 있는데 이것은 진피의 주요 구성물질이며 특히 광노화된 피부에서 MMP-1, -2, -9, 13 등과 같은 효소의 작용으로 인해 주름

Fig. 3 Anti-wrinkle activity of solvent fractions isolated from Takli-san. (A) Elastase inhibition rate. (B) procollagen synthesis rate. TW-H: hexane fraction of water extract from Takli-san. TW-EA: ethyl acetate fraction of water extract from Takli-san. TW-B: butanol fraction of water extract from Takli-san. TW-W: water fraction of water extract from Takli-san. EGCG: epigallocate chin-3-gallate. PC100: treatment of adenosine by 100 μg/mL. Result are means ± SD of triplicate data. [#]*p* < 0.05 vs. Con. ^{*}*p* < 0.05 vs. non-treated Nor

Fig. 4 Wrinkle-related protein expression rate of Takli-san on fibroblast cell (CCD-986sk). Histogram show the densitometry of protein normalized to α-tubulin. (A) MMP-1 protein expression rate. (B) MMP-2 protein expression rate. (C) MMP-9 protein expression rate. (D) MMP-13 protein expression rate. PC100: treatment of adenosine by 100 μg/mL. The data represent the mean ± SD of three separate experiments. [#]*p* < 0.05 vs. non-treated Nor. ^{*}*p* < 0.05, ^{**}*p* < 0.01 and ^{***}*p* < 0.001 vs. Con

Fig. 5 Tyrosinase inhibition rate of solvent fractions isolated from Takli-san. TW-H: hexane fraction of water extract from Takli-san. TW-EA: ethyl acetate fraction of water extract from Takli-san. TW-B: butanol fraction of water extract from Takli-san. TW-W: water fraction of water extract from Takli-san. Vit. C: L-ascorbic acid. Result are means $\pm$ SD of triplicate data

을 형성하게 된다(Seo 등, 2001).

CCD-986sk cell에 TW-EA를 농도 별로 처리하여 MMP-1, -2, -9, 13의 활성을 확인하였으며 각 각 100 µg/mL의 농도에서 79, 55, 64, 63%의 저해활성을 보여주었다(Fig. 4).

미백 활성

시료의 미백 효과를 검증하기 위해 tyrosinase 저해활성과 western blot을 실시하였다. Tyrosinase는 melanin 생성에 중요한 역할을 하는 효소로 기질인 tyrosine이 tyrosinase에 의해 산화되어 생성되는 melanin의 흡광도를 측정함으로써 시료의 tyrosinase 억제 활성 효과를 검토하는 방법으로 미백 효과 연구에 사용되고 있다(Ko 등, 2012). 기존에 보고된 연구로는 구아마일 70% 메탄올 추출물의 EA이 1,000 µg/mL에서 65%의 저해활성을 나타내었고(Park과 Onjo 2008), 섬초롱 80% 에탄올 추출물의 EA는 동일한 농도에서 약 25%의 억제효과를 보여주

Fig. 6 Whitening-related protein expression rate of Takli-san on melanocyte cell (HEM). Histogram show the densitometry of protein normalized to α -tubulin. (A) MITF protein expression rate. (B) Tyrosinase protein expression rate. (C) TRP-1 protein expression rate. (D): TRP-2 protein expression rate. PC50: treatment of arbutin by 50 µg/mL. The data represent the mean $\pm$ SD of three separate experiments. # p < 0.05 vs. non-treated Nor. * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. Con

었다(Kim 등, 2012). 반면 탁리산 용매 분획물은 TW-H, TW-EA, TW-B, -TW-W이 동일한 농도에서 각각 10, 69, 23, 7%의 저해활성을 나타내었고, 그 중 TW-EA가 가장 우수한 효능을 나타내었다(Fig. 5).

미백 관련 단백질 발현을 확인하기 위해 western blot을 실시하였고, melanin은 기저층에 존재하는 melanocyte에서 생성되는데 주변의 각질형성세포, 섬유아세포 등에서 분비되는 인자의 영향을 받기도 한다(Chen 등, 1991; Kameyama 등, 1993). Melanocyte에는 melanin을 합성하는 효소를 가지고 있는 melanosome이 존재하고, 그 중 tyrosinase는 tyrosine을 DOPA, DOPA quinone으로 산화시키는 과정에 관여하여 melanin 생합성에 영향을 준다(Iwata 등, 1990). 이에 세포에서 미백효능을 확인하기 위해 melanocyte의 한 종류인 HEM cell에 TW-EA와 positive control인 arbutin을 농도별로 처리하였고 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현을 검증하였다. MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 순서로 50 µg/mL의 농도에서 62, 58, 34, 19%의 저해활성을 나타내었고 positive control인 arbutin은 동일 농도에서 각각 33, 48, 22, 8%의 억제효과를 보여 TW-EA의 효능이 더 높게 나타났다(Fig. 6).

위 실험결과들을 통해 탁리산의 항산화, 주름 억제, 미백 효과를 확인함으로써 복합적인 한방처방의 다중 활성을 통한 피부개선효과를 증명할 수 있었다. 이는 탁리산의 기능성 화장품 소재로의 개발 가능성을 보여준다고 사료된다.

초 록

본 연구에서는 탁리산 열수추출물을 용매 분획하여 항산화, 주름억제, 미백효과에 대한 활성을 검증하여 화장품 소재로서 이용가능성을 연구하였다. 용매 분획물로 DPPH radical scavenge, ABTS radical scavenge, elastase, tyrosinase 저해활성을 확인하였고 에틸아세테이트 분획물(TW-EA)이 가장 높은 저해활성을 나타내었다. 세포내에서의 주름억제, 미백효과를 확인하기 위해 western blot을 실시하였고 비교 검증을 위해 사용한 positive control보다 TW-EA의 억제효과가 뛰어난 것을 확인하였다. 이러한 결과로 탁리산의 화장품소재로서 적용 가능성을 검증하였다.

Keywords 미백 · 주름억제 · 탁리산 · 항산화 · CCD-986sk · HEM

감사의 글 이 연구는 산업통상자원부 지역특화(주력)산업육성사업(R0005615)의 일환으로 수행하였음.

References

- Busca R, Ballotti R (2000) Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* 13: 60–69
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936–942
- Charous SJ, Stricklin GP, Nanney LB, Burkey BB (1997) Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol* 106: 271–278
- Chen JS, Wei CI, Marshall MR (1991). Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J Agr Food Chem* 39(11): 1897–1901
- Choi JH, Kim HM, Song YS, Park SG, Kim JJ, Lee CK (2007) Physiological effects of the cosmetic product containing of saccharomyces fermented modified kyungohkgo extract on human skin. *Kor J Herbol* 22(4): 227–232
- Choi JH, Kim JH, Park SY, Yu MK (2005) Mechanism Study of Takli-San on the Anti-Cancer Action in Mice. *J Kor Med Ophthal Otol Dermatol* 18(1): 71–81
- Choi SJ, Cho EA, Cho EH, Jeong YJ, Ku CS, Ha BJ, Chae HJ (2011) Screening of functional materials from solvent fractions of apple flower leaf extract. *KSBB J* 26(2): 165–171
- Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT (2006) UVB mediated induction of cytokines and growth factors in pterygium epithelial cells involves cell surface receptors and intracellular signaling. *Invest Ophth Vis Sci* 47: 2430–2437
- Eun JS, Jeon YK, Yum JY, Suh ES, So JN, Oh CH (1993) Effect of Sinhyo-Taklee-San on the Proliferation of Fibroblast Cell (Balb/c 3T3). *Kor J Pharm* 24(2): 159–165
- Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ (1997) Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *New Engl J Med* 337: 1419–1428
- Gilchrist BA (1990) Skin aging and photoaging. *Dermatol nurs* 2(2): 79–82
- Ha TK (2009) Inhibitory effect of *Fritillaria verticillata* Willd. var. *thunbergii* Baker ethanol extract on melanin biosynthesis. Dissertation, Sangji University
- Ha TY (2006) Development of functional food materials for healthy life. *Korean J Crop Sci* 51: 26–39
- Han SB, Kwon SS, Kong BJ, Kim KJ, Park SN (2013) Antioxidative effect and tyrosinase inhibitory activity of the unripened fruit extract of *Rubus coreanus* Miquel. *J Soc Cosmet Sci Kor* 39: 295–302
- Iwata M, Corn T, Iwata S, Everett MA, Fuller BB (1990) The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J Invest Dermatol* 95: 9–15
- Jang YA, Yeo SI, Lee JT (2012) The research of pharmacological activation for Sanguisorbae Radix Fractions as cosmetic material. *Kor J Herbol* 27(2): 43–46
- Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishiyama S, Hearing VJ (1993) Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPAchrome tautomerase (TRP2), and a melanogenic inhibitor. *J Invest Dermatol* 100(2): 126–131
- Kang MS, Kim YM, Kim HT (2016) A Clinical Study for Moisturizing Effects of Herbal Cosmetics Containing Sinhyotakrisan Extracts. *J Kor Med Ophthal Otolaryngol Dermatol* 29(1): 81–92
- Karin SK, Peter B, Jutta W, Gemot H, Weijan M, Lale N, Christian M, Meinhard W (2000) Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol* 35: 307–316
- Kim DI, Kim SH, Choi MS, Park SD (2015) A Study on Application of Korean Medical Pre-scriptions Theory in Developing Transdermal Medicine and Korean Medical Cosmetic Preparation Using Oral Herbal Medicine. *J Kor Obstet Gynecol* 28(3): 74–86
- Kim HR, Park GN, Jung BK, Yoon WJ, Jung YH, Chang KS (2016) Antioxidant Activity of Solvent Fractions from *Distylium racemosum* in Jeju. *Kor J Clin Lab Sci* 48(2): 62–67
- Kim MS, Kim KH, Yook HS (2012) Antioxidative effects of *Campanula takesimana* Nakai extract. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 41(10): 1331–1337
- Kim SH, Yun DC, Kim HT, Ho DS, Yoon KS (2008a) A Clinical Research of Atopic Dermatitis treated by Yeongyuseungmatang in cosmetics. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 21(2): 126–141
- Kim YH, Chung CB, Kim JG, Ko KI, Park SH, Kim JH, Eom SY, Kim YS, Hwang YI, Kim KH (2008b) Anti-wrinkle activity of ziyuglycoside I isolated from a Sanguisorba officinalis root extract and its application as a cosmeceutical ingredient. *Biosci Biotechnol Biochem* 72(2): 303–311
- Ko MS, Lee HJ, Kang MJ (2012) Antioxidant Activities and Whitening

- Effects of Extracts from *Hippophae rhamnoides* L. J East Asian Soc Diet Life 22(6): 812–817
- Lee SM (2011) Effects of Angelica gigantis herbal acupuncture extracts on the elastase activity and DPPH and NO scavenging activities. Dissertation, Daegu Haany University
- Lee YS, Kwon KJ, Kim MS, Sohn HY (2013) Antimicrobial, antioxidant and anticoagulation activities of Korean radish (*Raphanus sativus* L.) leaves. Microbiol Biotechnol Letters 41(2): 228–235
- Meinhard W, Iliana TP, Lale N, Wenjian M, Lars AS, Ziba RW, Jutta SI, Karin SK (2001) Solar UV irradiation and dermal photoaging. J Photochem Photobiol B Biol 63: 41–51
- Park BJ, Onjo M (2008) Antioxidant activities and tyrosinase inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf. Kor J Plant Res 21(5): 408–412
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol Med 26: 1231–1237
- Saha B, Singh SK, Sarkar C, Bera R, Ratha J, Tobin DJ, Bhadra R (2006) Activation of the Mitf promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB. Pigment Cell Res 19: 595–605
- Seo JY, Choi HR, Rhie GE, Youn CS, Choi WW, Kim JA, Chung JH, Cho KH, Eun HC (2001) The effect of retinoic acid and vitamin C on the expression of the procollagen a1 (I), tropoelastin, and MMP-1 in human dermal fibroblast. Kor J Invest Dermatol 8: 23–28
- Shimauchi T, Sugita K, Nishio D, Isoda H, Abe S, Yamada Y, Hino R, Ogata M, Kabashima K, Tokura Y (2008) Alterations of serum Th1 and Th2 chemokines by combination therapy of interferon- α and narrowband UVB in patients with mycosis fungoides. J Dermatol Sci 50: 217–225
- So SH, Lee SK, Hwang EI, Koo BS, Han GH, Lee MJ, Chung JH, Kim NM (2008) Mechanisms of Korean red ginseng and herb extracts (KTNG0345) for anti-wrinkle activity. J Ginseng Res 32(1): 39–47
- Voegeli R (1996) Elastase and tryptase determination on human skin surface. Cosmet Toilettries 111; 51–58
- Yaar M, Gilchrist BA (2007) Photoaging: mechanism, prevention and therapy. Br J Dermatol 157: 874–887
- Yagi A, Kanbara T, Morinobu N (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. Planta medica 3981: 517–519
- Yoon I, Wee JH, Moon JH, Ahn TH, Park KH (2003) Isolation and identification of quercetin with antioxidative activity from the fruits of *Rubus coreanus* Miquel. Kor J Food Sci Technol 35: 499–502
- Yoon JY, Lee SY, Jun HJ, Lee JY (2012) Anti-aging effects of solvent fraction from *Agrimonia pilosa* L. extracts. J Appl Biol Chem 55(1): 35–39
- Yun DC, Kim HT, Kim EH, Ho DS (2008) Clinical research of atopic dermatitis treated by Hwangryeonhaedok-Tang in cosmetics. Korean J Ori Physiol Pathol 22(6): 1611–1620