

## 기니아 피그 동물모델에서 삼릉 에탄올추출물의 미백 효과

고 주 영, 최 경 화, 김 영 철\*

계명대학교 대학원 공중보건학과

### Effect of *Scirpi rhizoma* Ethanol Extract on Skin Whitening in an Animal Model of Brown Guinea Pigs

Ju-Young Ko, Kyung-Hwa Choi and Young-Chul Kim\*

Department of Public Health, Graduate School, Keimyung University

#### ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate the skin whitening effect of *Scirpi rhizoma* ethanol extract (SREE) in an animal model. For the experiment of the study, three brown guinea pigs weighing about 450 g to 550 g were exposed to ultraviolet-B rays on the backs at 500 mJ/cm<sup>2</sup> once a week, three consecutive weeks and the total quantity of light was 1,500 mJ/cm<sup>2</sup>. The artificial tanning spots were divided into six different groups including normal (N), control (C), vehicle control (VC), positive control (PC), experimental 1 (E1, 1% SREE), experimental 2 (E2, 2% SREE) groups. Then, 30 μL of SREE was transdermally applied on the artificial tanning spots twice a day and 5 days a week for 8 weeks. With the result of a gross observation, it was found that the degree of pigmentation became apparently thinner in the group applied with E2, compared to the control or the vehicle control group. The melanin index of E2 group was significant lower than the control or the vehicle control group. In the observation with a light microscope, it was found that the degree of melanin pigmentation and S-100 protein expression considerably decreased in the groups applied with SREE, compared to the control or the vehicle control group. With the numerical analysis of melanin pigmentation and S-100 protein expression by using image-analysis software, it was found that the tendency was coincide with the results of microscopic observation.

**Key words** : brown guinea pig, melanin index, melanin pigmentation, S-100 protein

#### 서 론

현대인들은 대기오염의 증가에 따른 오존층 파괴와 주 5일제 근무로 인한 야외활동의 증가로 인해 자외선의 피부노출량이 증가하고 있으며, 피부

에 자외선 노출량이 과다하면 홍반, 화상, 피부암, 피부노화와 같은 병리적 문제를 일으킬 수 있다 (Matsumura and Ananthaswamy, 2004). 자외선으로 인한 피부의 색소침착은 멜라닌 생성에만 좌우되는 것이 아니라 생성된 멜라닌이 인접한 각질형성 세포로 운반된 후 피부의 표피에 분포하기 때문에 피부색 결정에 있어서 각질형성세포의 역할 또한 중요하다 (Hearing, 2007). 피부의 색소침착은 일시적 색소침착 (immediate pigment darkening, IPD), 지

\* To whom correspondence should be addressed.  
Tel: +82-53-580-5931, Fax: +82-53-588-5233  
E-mail: yckim@kmu.ac.kr

속적 색소침착 (persistent pigmentation), 지연형 색소침착 (delayed tanning, DT)으로 구분된다. 일시적 색소침착은 낮은 광량의 UVA에 노출 중 또는 노출 후 형성되며 곧 바로 없어진다. 지속적 색소침착은 높은 광량의 UVA에 노출 후 형성되며 수 주일간 남아 있는 반면, 지연형 색소침착은 UVB에 노출된 수 일 후에 tyrosinase 활성이 증가되고 각질형성세포로의 멜라노솜의 이동이 증가됨으로써 형성되는데 색소침착 전에 염증을 동반한다 (Maeda and Hatao, 2004).

멜라닌의 합성 단계는 세 단계로 구분된다. 첫 번째 단계는 멜라닌이 생성되기 이전의 과정으로 이 단계에서는 자외선 차단, 효소발현 억제 등을 통해 멜라닌 합성을 억제시킬 수 있다. 두 번째 단계는 멜라닌이 합성되는 과정으로 이 단계에서는 효소활성 저해, 멜라닌 생성관련 호르몬 조절을 통해 멜라닌 합성을 억제시킬 수 있다. 세 번째 단계는 합성된 멜라닌이 각질형성세포로 이동하는 과정으로 멜라닌세포와 각질형성세포 간 멜라닌 전달을 억제하고 생성된 멜라닌의 제거를 촉진하는 방법을 통해 피부의 색소침착을 줄일 수 있다 (Briganti *et al.*, 2003). 그러나 현재까지 멜라닌세포에서 각질형성세포로 멜라노솜의 운반을 차단시키는 색소 유전자는 확인되지 않고 있다 (Hearing, 2007).

현재 사용되는 미백원료는 거의 대부분이 tyrosinase 활성을 직·간접적으로 조절하여 멜라닌 생합성을 저해하는 기능을 가지고 있다. 멜라닌 합성 억제제로 사용되고 있는 hydroquinone은 tyrosinase 활동을 경쟁적으로 저해시키는 물질로서 색소침착 방지에 효능이 있으나 멜라닌 세포에 독성을 나타낸다 (Ando *et al.*, 2007). Hydroquinone의 배당체인 arbutin ( $\beta$ -D-glucopyranoside)은 tyrosinase 활성을 경쟁적 또는 비경쟁적으로 저해시키고 eumelanin의 생성을 억제하는데 (Ando *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007),  $\alpha$ -arbutin이 arbutin보다 tyrosinase 활성 저해에 더 효과적인 것으로 알려져 있다 (Sugimoto *et al.*, 2003). 다만 FDA에서는 미백제 사용 시 tyrosinase를 경쟁적으로 저해하는 kojic acid는 2%, arbutin은 7%로 허용농도를 제한하고 있으며 hydroquinone은 5% 이상의 농도로 장기간 사용 시 피부염, 홍반, 백반증, 화상 및 과색소침착의 원인이 될 수도 있기 때문에 처방전이 있어야 사용할 수 있도록 규정하고 있다 (Lin *et al.*, 2007). 이와 같은 합성

미백제의 안전성 문제로 인하여 최근에는 인체피부에 자극이 없는 천연미백제에 대한 선호도가 증가하고 있으며 이에 부합하여 천연물 미백소재 탐색연구가 활발하게 이루어지고 있다.

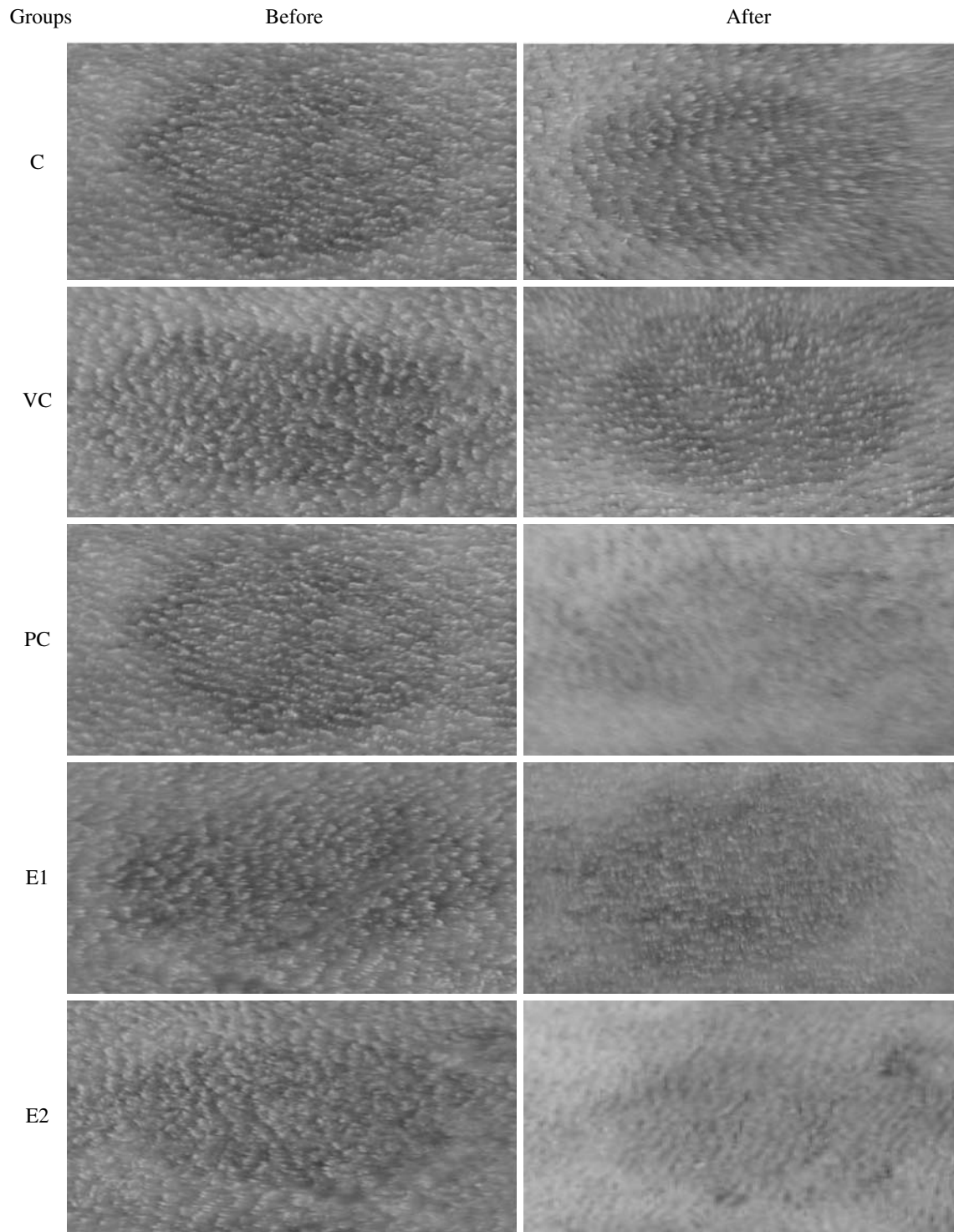
삼릉 (*Scirpi rhizama*)은 흑삼릉과 (Sparganiaceae)의 흑삼릉 (*Sparganium stoloniferum* Hamilton)의 덩이뿌리를 말린 약재이며, 신수용 등 (2000)은 삼릉 에탄올추출물로부터  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol-3- $\beta$ -D-glucuronopyranoside, 3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid, sorbose, 1-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(2S, 3R, 4E, 8Z)-2-[[2(R)-hydroxyeicosanoyl]amino]-4,8-octadecadiene-1,3-diol,  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -glucopyranoside 등 6가지 성분을 분리보고하였다. 김정균 등 (2003)은 삼릉의 생리활성에 대한 연구에서 항산화 효과와 항균 활성을 보고하였고 이범천 등 (2005)은 세포주 실험에서 삼릉이 tyrosinase 활성 저해 효능이 있음을 보고한 바 있다. 그러나 현재까지 삼릉의 *in vivo* 실험을 통한 미백효과에 대한 연구보고는 확인되지 않고 있다.

Brown guinea pig은 털과 모낭주위, 포피에 인간과 유사한 적당한 수의 멜라닌세포와 멜라노솜을 가지고 있어 자외선과 화학제품에 반응을 잘 보이기 때문에 자외선으로 인한 노화와 색소침착 연구에 실험동물모델로서 널리 사용되고 있다 (Yoshida *et al.*, 2002; Tobiishi *et al.*, 2005). 이에 본 연구는 *in vivo* 실험으로 brown guinea pig에 반복적으로 UVB를 조사하여 인공적인 색소침착을 유발한 후 삼릉 에탄올추출물을 도포하여 피부 미백효과를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

Hydroquinone은 Sigma 사 (Italy), propylene glycol은 (주)동양제철화학 (한국)의 제품을 사용하였고 염산 케타민은 유한양행 (한국)의 제품을 사용하였다. 그 외 일반시약들은 특급품을 사용하였다. 실험기기 중 자외선 조사장치는 UVB sunlamp (UVM-225D, Mineralight Lamp UVP, USA)를 사용하였고 자외선 측정장치는 UV-radiometer (HD 9021, Delta OHM, Italy)를 사용하였으며 멜라닌 지수 측정기는 mexameter (MX18, CK electronic GmbH, Ger-



**Fig. 1.** Gross observation on depigmenting effect in brown guinea pig skin treated with *Scirpi rhizoma* ethanol extract for 8 weeks. SREE has a positive whitening effect by showing higher depigmenting effect than C and VC groups.

**Table 1.** Changes of melanin index in the skin of brown guinea pigs measured by a mexameter

Weeks	Control groups			Experimental groups	
	C	VC	PC	E1	E2
0	550.4±11.5 <sup>a</sup>	542.4±10.8 <sup>a</sup>	544.0±14.6 <sup>a</sup>	547.8±21.5 <sup>a</sup>	546.8±14.9 <sup>a</sup>
1	540.2±9.7 <sup>a</sup>	538.2±9.7 <sup>a</sup>	540.8±14.4 <sup>a</sup>	546.2±21.2 <sup>a</sup>	543.4±14.2 <sup>a</sup>
2	538.6±8.5 <sup>a</sup>	528.2±6.9 <sup>a</sup>	521.8±14.8 <sup>a</sup>	534.2±20.6 <sup>a</sup>	529.4±15.4 <sup>a</sup>
3	529.0±7.1 <sup>a</sup>	511.8±7.0 <sup>a</sup>	503.8±13.8 <sup>a</sup>	512.2±13.4 <sup>a</sup>	519.0±15.4 <sup>a</sup>
4	506.2±6.2 <sup>a</sup>	489.0±5.6 <sup>a</sup>	477.2±12.3 <sup>a</sup>	500.2±20.2 <sup>a</sup>	497.6±18.4 <sup>a</sup>
5	503.2±5.7 <sup>b</sup>	477.0±5.5 <sup>ab</sup>	439.8±9.2 <sup>a</sup>	470.2±13.4 <sup>ab</sup>	474.2±19.4 <sup>ab</sup>
6	493.6±4.5 <sup>c</sup>	457.2±4.3 <sup>b</sup>	411.2±8.4 <sup>a</sup>	448.4±11.9 <sup>b</sup>	448.2±19.7 <sup>b</sup>
7	484.4±3.5 <sup>c</sup>	439.6±3.2 <sup>b</sup>	389.6±3.5 <sup>a</sup>	432.8±12.4 <sup>b</sup>	418.2±11.3 <sup>b</sup>
8	471.2±3.4 <sup>c</sup>	423.0±2.5 <sup>d</sup>	362.2±2.3 <sup>a</sup>	411.4±1.9 <sup>c</sup>	384.6±2.4 <sup>b</sup>

Test compounds were transdermally applied on the artificial tanning spots twice a day and 5 days a week for 8 weeks.

Unit: AU (Arbitrary Unit)

C: UVB irradiation group

VC: UVB irradiation+vehicle [propylene glycol : ethanol : water (=5 : 3 : 2)] application group

PC: UVB irradiation+hydroquinone (2%) application group

E1: UVB irradiation+*Scirpi rhizoma* ethanol extract (1%) application group

E2: UVB irradiation+*Scirpi rhizoma* ethanol extract (2%) application group

Values are the means±SE of 5 samples. Values with different superscripts in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

many)를 사용하였다. 조직표본관찰은 fluorescence microscope (Axio imager, Carl Zeiss, Germany)를, 영상분석은 i-solution (IMT i-solution ver. 8.0, Canada)을 사용하였다.

## 2. 시 료

한국 식물추출물 은행에서 분양받은 삼릉 에탄올추출물(PBC-203A)을 실험에 사용하였다.

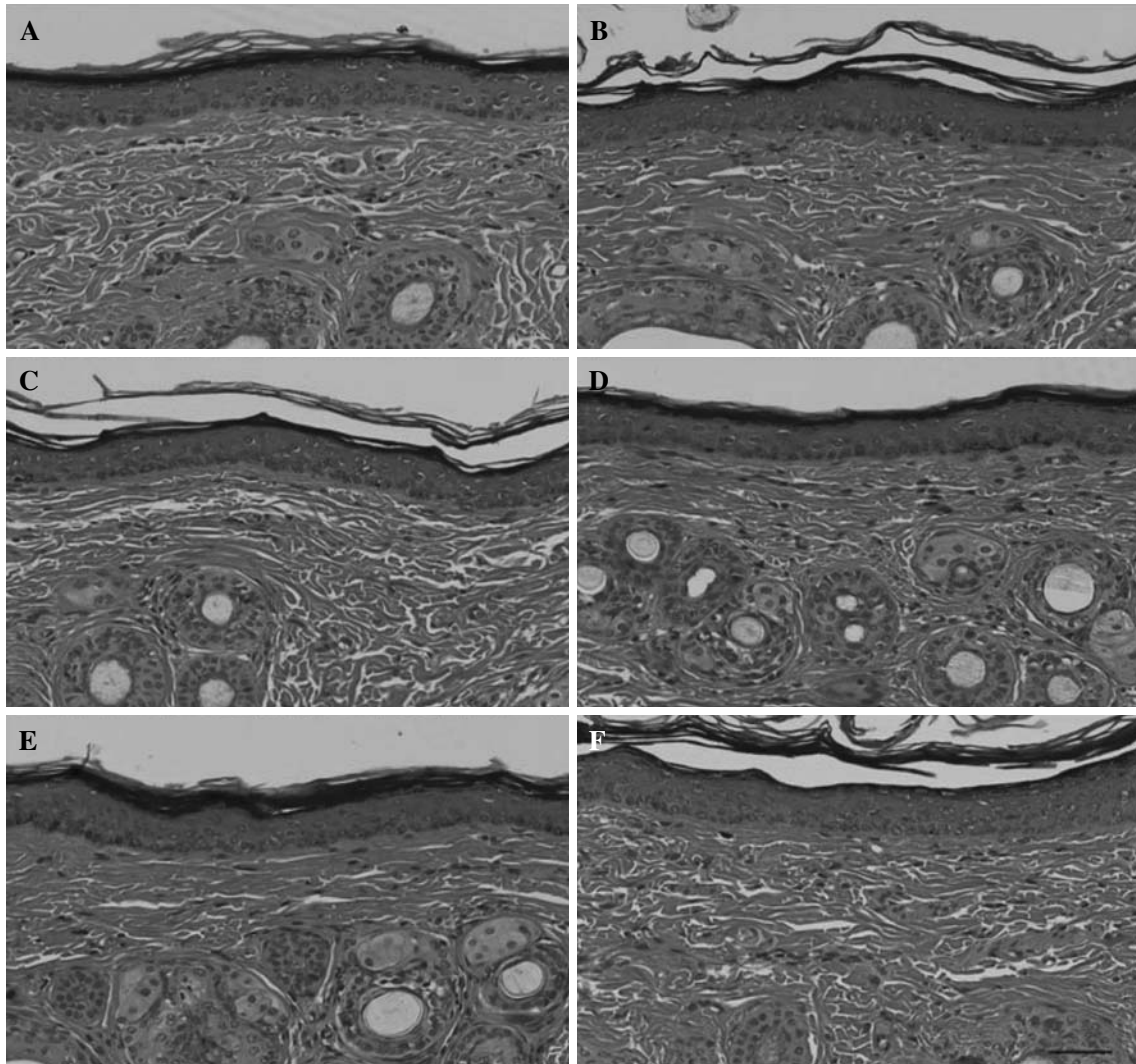
## 3. 실험동물 및 처치

약 450~550g의 brown guinea pig 3마리를 OYC (Oriental Yeast Co. Ltd, Japan)로부터 분양받아 사육실에서 1주일 적응시킨 후 실험 전 기간 동안 사료와 물은 자유로이 공급하였다. 사육실온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 5\%$ , 조명주기 12시간씩 밤낮을 유지하였다. 실험동물은 실험 8주째 되는 날 염산 케타민으로 마취한 후 시료를 도포한 인공색소반 부위를 직경 12 mm의 biopsy punch로 절취하여 10%의 중성 포르말린 용액에 12시간 실온에서 고정된 후 조직학적 관찰에 사용하였다. 인공색소반을 정상군(normal group, N): 아무런 처치를 하지 않은 군, 대조군(control group, C): 자외선 조사+생

리식염수 도포군, 용매대조군(vehicle control group, VC): 자외선 조사+용매 [propylene glycol : ethanol : water (=5 : 3 : 2)] 도포군, 양성대조군(positive control group, PC): 자외선 조사+2% hydroquinone 도포군, 실험군 1(experimental group 1, E1): 자외선 조사+1% 삼릉 에탄올추출물 도포군, 실험군 2(experimental group 2, E2): 자외선 조사+2% 삼릉 에탄올추출물 도포군, 총 6개군으로 나누어 각 군당 5개씩 실험에 사용하였다. 모든 실험은 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 원칙에 따라 수행하였다.

## 4. 인공색소반 (artificial tanning spot) 제작 및 시료도포

자외선 조사장치의 광원은 302 nm의 UVB를 방출하는 sunlamp를 사용하였다. 자외선 조사량은 UV-radiometer로 측정하였으며, brown guinea pig의 등 부위를 hair clipper로 털을 깎고 깨끗이 면도한 후 염산 케타민(100 mg/kg BW)으로 마취한 다음, 동물의 등에 마리당 10개씩 조사 부위( $\phi$  12 mm)를 원형으로 뚫은 가죽으로 제작한 천을 덮고 균등하게  $500 \text{ mJ/cm}^2$ 의 광량으로 1주일에 1회, 3주 동안 조사하여 총 30개의 인공색소반을 만들었다.



**Fig. 2.** Histological observation on brown guinea pig skin. H & E stain,  $\times 200$ , scale bar  $50\mu\text{m}$ . A: N group, B: C group, C: VC group, D: PC group, E: E1 group, F: E2 group.

피부 색소침착 안정화를 위해 마지막 자외선을 조사한 10일 후부터 1일 2회, 주 5일, 8주 동안 매회  $30\mu\text{L}$ 씩 마이크로 피펫을 사용하여 시료를 도포하였다(1%:  $0.53\text{ mg/cm}^2/\text{일}$ , 2%:  $1.06\text{ mg/cm}^2/\text{일}$ ).

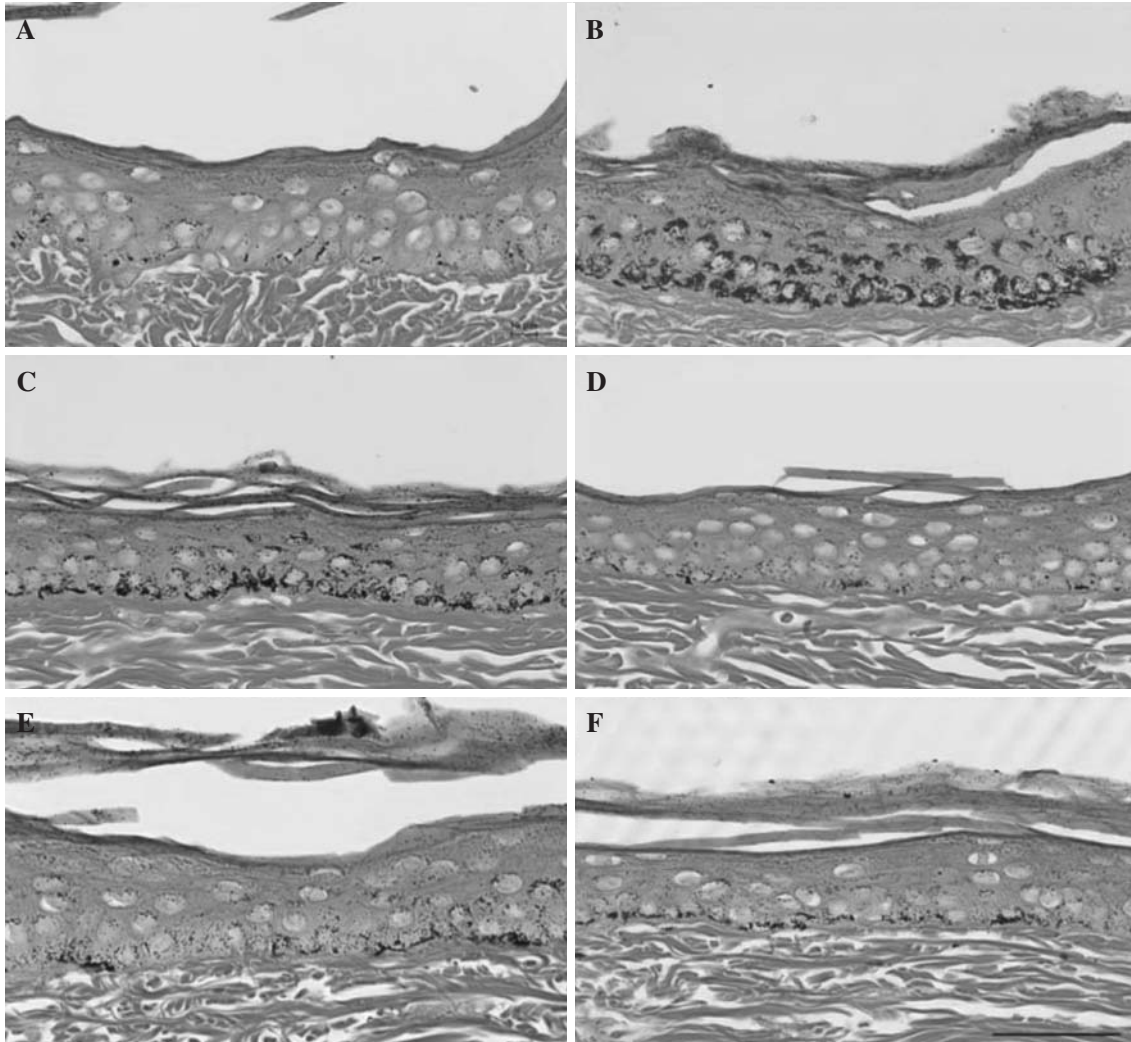
### 5. 육안적 관찰

피부의 육안적 관찰은 실험기간 동안 매주 1회 착색 상태를 대조군 도포부위와 시료군 도포부위를 비교하여 상대적인 미백 효과를 관찰하였다. 피

부표면의 육안적 상태는 디지털카메라로 촬영하였다.

### 6. 기기를 이용한 평가

Mexameter를 사용, 시료도포 전과 도포 후의 멜라닌 지수 변동을 측정하였다. 매주 1회, 8주 동안 동일 부위에 대해 3회 반복 비침습 방법으로 측정하고 평균값을 구하여 색소침착 정도를 비교·분석하였다.



**Fig. 3.** Histological observation on melanin pigmentation in brown guinea pig skin. F-M stain,  $\times 400$ , scale bar  $50\ \mu\text{m}$ . Groups are the same as described in Fig. 2. E2 group showed obviously lower melanin pigmentation in skin epidermis than C and VC groups.

## 7. 피부의 조직학적 관찰

### 1) Hematoxylin and eosin (H & E) 염색 관찰

절취한 피부조직을 실온에서 10% 중성 포르말린 용액에 12시간 고정된 후 통상적인 방법으로 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거친 다음 파라핀에 포매하고  $4\ \mu\text{m}$  두께의 박절편을 Harri's hematoxylin 용액에 옮겨 5분간 핵을 염색한 후 흐르는 물에 수세하고 1% HCl-alcohol 용액으로 3회 침적 후 충분히 수세하여 1% ammonia 용액으로 청색화하였으며

eosin 용액에 3분간 세포질을 염색하였다. 80% 알코올로 이동하여 95%, 95%, 100%, 100% 알코올을 사용하여 탈수시켰다. 청명 과정을 거친 후 canada balsam으로 봉입 후 현미경으로 관찰하였다.

### 2) Fontana-Masson's silver (F-M) 염색 관찰

$4\ \mu\text{m}$  두께의 박절편을 xylene에 탈파라핀, 함수, 증류수로 수세 후 Masson (1928)법에 준하여  $56^\circ\text{C}$ 에서 silver nitrate 용액에 넣어 60분간 염색하고 수세한 다음 0.2% gold chloride 용액에 조색하였다.

**Table 2.** Comparison of melanin pigmentation in the skin epidermis of brown guinea pig

Area	Groups					
	N	C	VC	PC	E1	E2
Total ( $\mu\text{m}^2$ )	8182.1 $\pm$ 3297.4	8250.2 $\pm$ 1981.6	8594.0 $\pm$ 2064.2	7942.7 $\pm$ 2178.0	8782.0 $\pm$ 1544.4	8048.6 $\pm$ 1633.6
Melanin pigment ( $\mu\text{m}^2$ )	201.2 $\pm$ 66.1	1544.5 $\pm$ 512.8	1057.9 $\pm$ 351.3	269.0 $\pm$ 74.0	841.1 $\pm$ 148.5	560.1 $\pm$ 132.0
% of melanin pigment	2.4 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	18.6 $\pm$ 3.1 <sup>e</sup>	12.4 $\pm$ 2.1 <sup>d</sup>	3.4 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	9.3 $\pm$ 0.4 <sup>e</sup>	7.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>

Test compounds were transdermally applied on the artificial tanning spots twice a day and 5 days a week for 8 weeks.

N: Non-treatment

C: UVB irradiation group

VC: UVB irradiation+vehicle [propylene glycol : ethanol : water (=5 : 3 : 2)] application group

PC: UVB irradiation+hydroquinone (2%) application group

E1: UVB irradiation+*Scirpi rhizoma* ethanol extract (1%) application group

E2: UVB irradiation+*Scirpi rhizoma* ethanol extract (2%) application group

Values are the means $\pm$ SD of 5 samples. Values with different superscripts in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

수세 후 5% sodium thiosulfate 용액에 5분간 정착시켰다. 다시 수세 후 nuclear fast red 용액에 대조 염색한 후 95%, 95%, 100%, 100% 알코올에 탈수, xylene에 투명, canada balsam으로 봉입 후 현미경으로 멜라닌 분포양상을 관찰하였다. 영상분석(image analysis) 소프트웨어를 이용하여 멜라닌 색소침착 정도를 수치화하여 분석하였다.

### 3) S-100 염색 관찰

4 $\mu\text{m}$  두께의 박절편을 coating slide에 부착하여 탈파라핀 함수 후 benchmark XT automated immunostainer (Ventana Medical Systems, USA)를 사용하여 염색하였다. 자동화 과정은 reaction buffer로 3분간 세척하고 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 3분간 담구어 peroxidase의 활성을 억제시킨 후 일차항체 S-100을 1:100으로 희석하여 반응시키고 reaction buffer로 세척한 다음 biotin에 20분 반응 후 streptavidin에 25분 반응시켰다. DAB (diamino-benzidine)에 발색 후 대조염색, 봉입한 다음 현미경으로 S-100 단백질의 발현 정도를 관찰하였다. 영상분석(image analysis) 소프트웨어를 이용하여 멜라닌세포 내 S-100 단백질 발현 정도를 수치화하여 분석하였다.

## 8. 자료 분석

SPSS (v 14.0) 통계프로그램을 이용하여 유의성 검정을 위해 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 이용하여 동질성을 확인한 후, 각 군 간의 비교는 Duncan's 다중 비교분석을 이용해 사후분석을 실시하였다. 통계학적인 유의성 검증은  $\alpha=0.05$ 에

서 실시하였다.

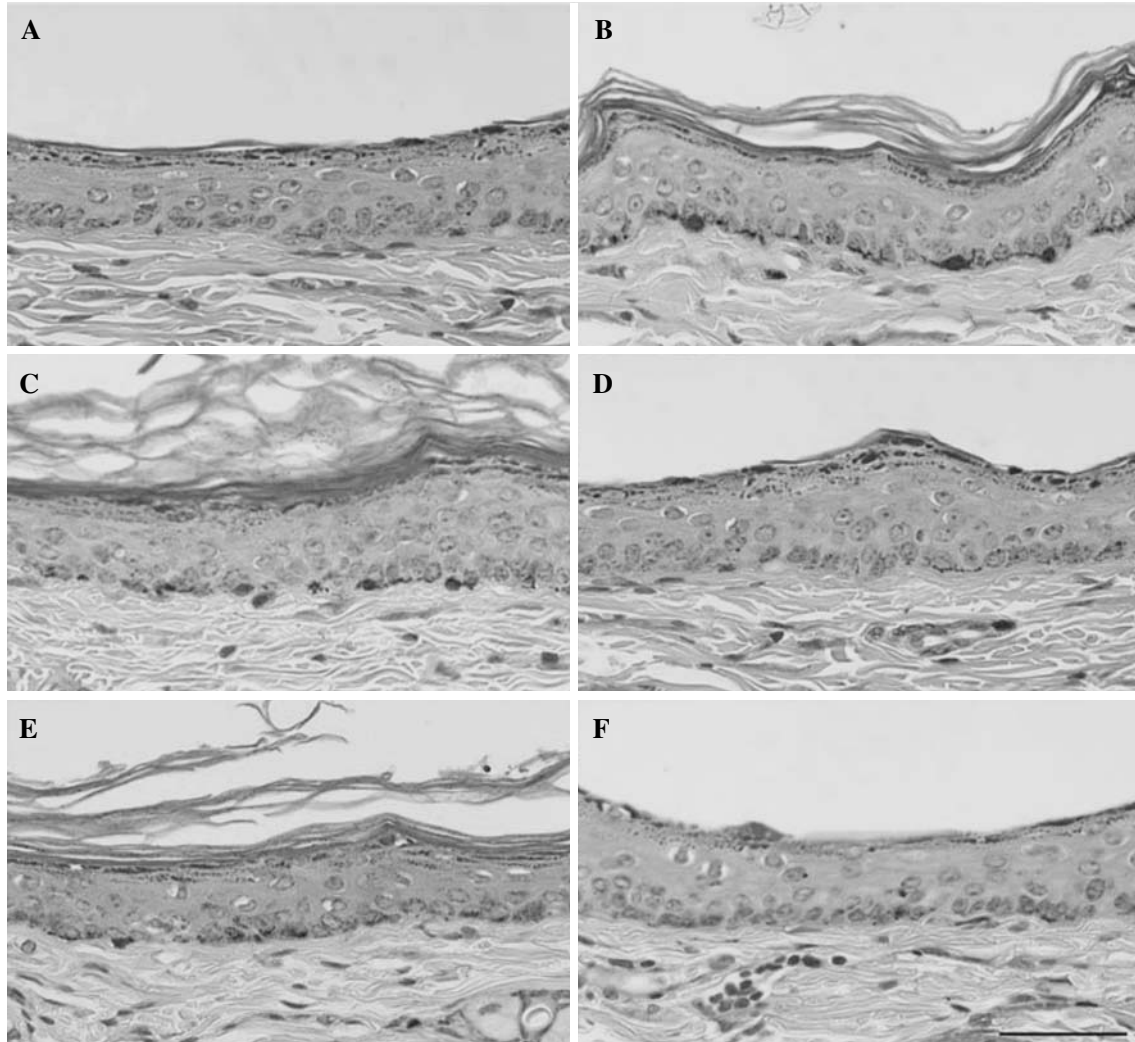
## 결과 및 고찰

### 1. 멜라닌 색소 착색 육안적 변화

Brown guinea pig은 자외선이 조사된 인공색소반 부위에서 멜라닌세포가 증가하고 결집된 형태가 아닌 일정한 배열형태를 보이기 때문에 (Tobiishi *et al.*, 2004) 미백실험에 적합한 동물모델이다. 본 연구에서는 삼릉의 미백효과를 알아보기 위하여 brown guinea pig의 등 부위에 UVB 조사로 인공색소반( $\phi$  12 mm)을 유발시킨 후 삼릉 에탄올추출물을 주 5일, 8주간 도포하였다. 실험 5주부터 대조군에 비해 양성대조군과 2% 삼릉 에탄올추출물 도포군은 색소착색 부위가 차츰 벌어지기 시작하여 실험 8주에는 확연한 차이를 보였다(Fig. 1). 최상윤 등(2007)도 인공색소반이 유발된 brown guinea pig의 피부에 한약재로 쓰이는 도깨비부채뿌리 메탄올 추출물을 6주간 도포한 실험에서 실험 4주부터 색소착색 정도를 뚜렷하게 감소시켰다는 보고를 하였는데, 본 연구에 사용한 삼릉(*Scirpi rhizama*)이 흑삼릉(*Sparganium stoloniferum* Hamilton)의 덩이뿌리를 말린 약재인 점을 감안할 때 이들 식물 뿌리 부분에 대한 유효성분의 비교연구는 의미 있는 자료를 제공해 줄 것으로 생각된다.

### 2. 멜라닌 지수 변동

피부에서 반사되는 빛을 측정하는 기구로 사용



**Fig. 4.** Histological observation on production of melanocytes in brown guinea pig skin. S-100 immunohistochemical stain,  $\times 400$ , scale bar  $50 \mu\text{m}$ . Groups are the same as described in Fig. 2. E2 group showed obviously lower production of melanocytes in skin epidermis than C and VC groups.

되는 mexameter는 660 nm와 880 nm에서 빛을 방출하며 green과 red 파장에서 직경 5 mm의 피부에 흡수되고 반사된 빛의 강도를 계산하여 멜라닌 지수를 산출한다(Clarys *et al.*, 2000). 본 연구에서는 멜라닌 지수의 오차를 줄이기 위해 동일 시간대 같은 장소에서 같은 자세로 동일한 조명하에 측정하였다. 멜라닌 지수 변동을 측정할 결과, 실험 전 기간 동안 모든 군은 멜라닌 지수가 점차적으로 감소하였고 실험 8주에는 삼릉 에탄올추출물 도포군

은 양성대조군에 비해 감소된 정도는 덜하지만 대조군과 용매대조군에 비해 유의하게 감소하였는데 (Table 1), 이는 삼릉의 생리활성 효과로 인한 색소 탈실의 결과로 인해 나타난 것으로 판단된다.

### 3. 피부의 조직학적 변화

#### 1) 표피 및 진피조직

302 nm의 UVB 자외선을 조사한 후 피부조직의



**Table 3.** Comparison of S-100 protein expression in the skin epidermis of brown guinea pig

Area	Groups					
	N	C	VC	PC	E1	E2
Total ( $\mu\text{m}^2$ )	7682.62 $\pm$ 1755.5	7374.5 $\pm$ 642.7	8193.9 $\pm$ 714.1	8165.6 $\pm$ 1757.6	7628.5 $\pm$ 641.0	8555.3 $\pm$ 1181.0
S-100 protein ( $\mu\text{m}^2$ )	1277.21 $\pm$ 98.0	979.5 $\pm$ 444.2	631.9 $\pm$ 286.6	136.3 $\pm$ 54.5	388.3 $\pm$ 119.8	235.0 $\pm$ 77.4
% of S-100 protein	1.5 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	13.3 $\pm$ 7.0 <sup>c</sup>	8.3 $\pm$ 4.4 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	5.7 $\pm$ 1.8 <sup>ab</sup>	2.9 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>

Test compounds were transdermally applied on the artificial tanning spots twice a day and 5 days a week for 8 weeks.

N: Non-treatment

C: UVB irradiation group

VC: UVB irradiation+vehicle [propylene glycol : ethanol : water (=5 : 3 : 2)] application group

PC: UVB irradiation+hydroquinone (2%) application group

E1: UVB irradiation+*Scirpi rhizoma* ethanol extract (1%) application group

E2: UVB irradiation+*Scirpi rhizoma* ethanol extract (2%) application group

Values are the means  $\pm$  SD of 5 samples. Values with different superscripts in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ) by ANOVA and Duncan's multiple range test.

형태학적 변화양상을 알아보기 위한 H&E 염색 관찰에서 삼릉 에탄올추출물 도포군은 표피와 진피층 배열이 규칙적이며 염증관련 세포들의 침윤을 거의 관찰할 수 없었다. 반면 대조군은 다른 실험군에 비해 표피가 경미한 정도로 두꺼워진 것을 확인하였다(Fig. 2). Pathak and Fitzpatrick (1993)은 290~320 nm 파장의 UVB가 표피의 각질형성세포의 증식과 각질층의 비후에 가장 효과적이며 표피와 각질층이 비후되는 것은 자외선으로부터 손상받기 쉬운 각질형성세포를 보호하기 위한 생체의 방어적 반응으로 해석하였다.

## 2) 멜라닌 색소침착

Horikoshi *et al.* (2000)은 자외선이 조사된 brown guinea pig 피부에서 멜라닌세포의 수와 멜라닌의 증가와 함께 선명한 색소침착 현상을 관찰하였고, Kuwabara *et al.* (2006)은 자외선이 조사된 피부조직의 F-M 염색에서 과립 형태의 멜라닌을 관찰하였다. 본 연구에서 멜라닌 침착 정도를 알아보기 위해 F-M 염색 후 현미경으로 관찰한 결과 실험 8주에 삼릉 에탄올추출물 도포군은 표피의 멜라닌 침착 정도가 대조군과 용매대조군에 비해 현저하게 낮았다(Fig. 3). 이를 보다 객관적으로 분석하기 위하여 멜라닌 색소의 침착된 정도를 영상분석 소프트웨어로 수치화한 결과 대조군은 정상군에 비해 유의하게 높은 수치를 보여 자외선이 색소형성에 효과적임을 확인하였고 삼릉 에탄올추출물 도포군은 대조군과 용매대조군에 비해 유의하게 낮은 수치를 보였다(Table 2). 인체에서 표피의 90% 이상을 차지하는 각질형성세포는 기저층에서 생성

되어 약 28일 간격으로 표피의 각질층으로부터 탈락되며 이러한 세포의 교체를 턴오버(tern-over)라고 한다(하병조 등, 2002). 색소탈실은 i) tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2), peroxidase의 전사 및 활성 조절, ii) 멜라노솜의 각질형성세포로의 이동 및 각질형성세포에서의 분포 조절, iii) 멜라닌과 멜라노솜의 분해와 색소화된 각질형성세포의 턴오버 조절에 의해 성취될 수 있다(Briganti *et al.*, 2003). 이를 근거로 볼 때 삼릉 에탄올추출물이 표피의 각질형성세포의 세포분열을 촉진시키고 이로 인해 세포의 교체가 빨라져 색소탈실을 유도해 양호한 미백 효과를 보인 것으로 생각되나 추후 정확한 규명이 요구된다.

## 3) 멜라닌세포 생성

칼슘결합 단백질인 S-100은 멜라닌세포 연구에서 통상적으로 사용되는 가장 민감한 멜라닌세포의 지표이다. 이 단백질은 사람의 과립성 백혈구 및 대식세포, 멜라닌세포의 감별법으로 발견되었다(Arai *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2004). 본 연구에서 멜라닌세포에 비특이적으로 존재하는 S-100 단백질을 면역 염색하여 멜라닌세포의 수를 간접적으로 관찰한 결과 대조군과 용매대조군은 많은 수의 멜라닌세포가 관찰된 반면, 삼릉 에탄올추출물 도포군은 멜라닌세포의 수가 확연하게 줄어든 것을 확인하였다(Fig. 4). S-100 단백질 발현면적을 영상분석 소프트웨어를 통해 수치화하여 객관적으로 비교 분석한 결과에서도, 대조군과 용매대조군은 정상군에 비해 S-100 단백질 발현면적이 유의하게 높은

것을 확인하였고 삼릉 에탄올추출물 도포군은 양성대조군인 hydroquinone에 비해 다소 뒤지지만 대조군과 용매대조군에 비해 S-100 단백질 발현면적이 유의하게 줄었다(Table 3). 한편 Choi *et al.* (2005)은 중국에서 의학 식물로 사용되는 다닥냉이 (*Lepidium apetalum*) 에탄올추출물을 인공색소반이 유발된 brown guinea pig의 피부에 4주 동안 도포한 후 F-M 염색을 한 결과 대조군에 비해 실험군 도포부위의 색소침착 정도가 감소하였으나 S-100 면역조직화학 염색 관찰에서 멜라닌세포의 수는 대등한 수치를 나타냈다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 삼릉 에탄올추출물이 멜라닌세포의 수와 멜라닌의 감소를 함께 초래하였는데, 이는 표피의 기저층에서 멜라닌세포의 증식을 억제하고 멜라닌의 생성을 억제/멜라닌의 탈실을 촉진한 것으로 해석되나 추후 시간에 따른 변화를 관찰하여 정확한 기전을 확인할 필요가 있다.

## 결 론

본 연구는 약 500 g의 brown guinea pig 3마리의 등 부위에 1,500 mJ/cm<sup>2</sup> 광량의 자외선 조사로 유발시킨 인공색소반에 1%, 2% 삼릉 에탄올추출물을 도포하여 피부 표피에서의 멜라닌색소 침착 정도와 멜라닌세포 생성 정도를 확인하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다. 삼릉 에탄올추출물 도포군(실험군), 대조군, 용매대조군, hydroquinone 도포군(양성대조군)의 미백효과를 육안적으로 비교한 결과, 실험 8주에 2% 삼릉 에탄올추출물은 양성대조군에 비해 다소 낮았으나 대조군과 용매대조군에 비해 색소착색 정도가 현저하게 떨어지는 양호한 미백효과를 확인하였다. Mexameter를 이용한 멜라닌 지수 측정에서 실험 8주에 양성대조군인 2% hydroquinone 도포군과 2% 삼릉 에탄올추출물 도포군은 대조군과 용매대조군에 비해 유의하게 낮았다.

현미경 관찰에서 표피와 진피조직의 특이적 변화는 관찰할 수 없었으나 대조군의 표피가 다른 군에 비해 약간 비후된 것을 확인하였다. 멜라닌 색소침착 정도와 분포양상에서, 양성대조군과 삼릉 에탄올추출물 도포군은 대조군과 용매대조군에 비해 멜라닌 색소침착 정도가 현저하게 낮게 관찰되었다. 영상분석 소프트웨어를 이용한 멜라닌 색소

침착 정도를 측정면적대비 색소침착면적 비(%)로 수치화한 결과 대조군과 용매대조군에 비해 양성대조군과 삼릉 에탄올추출물 도포군은 유의하게 낮은 수치를 보였다. S-100 단백질 발현 정도를 통하여 멜라닌세포의 생성 정도를 간접적으로 관찰한 결과, 대조군과 용매대조군에 비해 양성대조군과 2% 삼릉 에탄올추출물 도포군은 현저하게 낮았다. S-100 단백질 발현 정도를 측정면적대비 발현면적 비(%)로 수치화한 결과, 대조군과 용매대조군에 비해 양성대조군과 2% 삼릉 에탄올추출물 도포군은 유의하게 낮은 수치를 보였다.

이상의 실험 결과를 종합해 보면, 삼릉 에탄올추출물은 brown guinea pig을 이용한 *in vivo* 동물시험에서 미백제로 검증된 hydroquinone에 비해 다소 미백효과는 낮았지만 육안적으로 확인한 미백효과를 보였고 조직학적으로는 멜라닌 색소침착과 멜라닌세포 생성을 유의하게 감소시켰다. 따라서 삼릉 에탄올추출물은 미백효과가 우수한 것으로 확인되었기에 미백 기능성 화장품 천연소재로 실용 가능성이 있을 것으로 기대된다.

## 참 고 문 헌

- 김정균, 강영미, 엄광식, 고영민, 김태영. 천연한약재(목통, 삼릉, 치자) 추출물의 항산화효과 및 항균활성효과, 농업생명과학연구 2003; 37(4): 69-75.
- 신수용, 도상학, 신국현. 흑삼릉 근경의 성분, 약학회지 2000; 44(4): 334-339.
- 이범천, 김진화, 심관섭, 장영희, 표형배. 삼릉추출물의 멜라닌 생성 저해 효과, 대한화장품학회지 2005; 31(4): 305-310.
- 최상윤, 김영찬, 김성수, 이영철, 노정해, 홍의도, 공연희, 조연옥. 미활용 식물 자원을 이용한 미백효능 평가 및 소재개발, 2007; 과천: 농림부.
- 하병조, 김주덕, 양현옥, 최은영, 고원배. 화장품화학, 2002; 서울: 수문사.
- Ando H, Kondoh H, Ichihashi M and Hearing VJ. Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase, J Invest Dermatol 2007; 127: 751-761.
- Arai K, Teratani T, Kuruto-Niwa R, Yamada T and Nozawa R. S100A9 expression in invasive ductal carcinoma of the breast: S100A9 expression in adenocarcinoma is closely associated with poor tumor differentiation, Euro J Cancer 2004; 40(8): 1179-1187.

- Briganti S, Camera E and Picardo M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pig Cell Res* 2003; 16(2): 101-110.
- Choi HJ, Ahn SM, Lee BG, Chang IS and Hwang JS. Inhibition of skin pigmentation by an extract of *Lepidium apetalum* and its possible implication in IL-6 mediated signaling, *Pig Cell Res* 2005; 18(6): 439-446.
- Choi SY, Kim S, Hwang JS, Lee BG, Kim H and Kim SY. Benzylamide derivative compound attenuates the ultraviolet B-induced hyperpigmentation in the brownish guinea pig skin, *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 707-715.
- Clarys P, Aleqaeters K, Lambrecht R and Barel AO. Skin color measurements: comparison between three instruments: the chromameter, the dermaspectrometer and the mexameter, *Skin Res Technol* 2000; 6: 230-238.
- Hearing VJ. Regulating melanosome transfer: who's driving the bus? *Pig Cell Res* 2007; 20(5): 334-335.
- Horikoshi T, Nakahara M, Kaminaga H, Sasaki M, Uchiwa H and Nuyachi Y. Involvement of nitric oxide in UVB induced pigmentation in guinea pig skin, *Pig Cell Res* 2000; 13(5): 358-368.
- Kuwabara Y, Watanabe T, Yasuoka S, Fukui K, Takata J, Karube Y, Okamoto Y, Asano S, Katoh E, Tsuzuki T and Kobayashi S. Topical application of  $\gamma$ -tocopherol derivative prevents UV-induced skin pigmentation, *Biol Pharm Bull* 2006; 29(6): 1175-1179.
- Lin YH, Yang YH and Wu SM. Experimental design and capillary electrophoresis for simultaneous analysis of arbutin, kojic acid and hydroquinone in cosmetics, *J Pharm Biomed Anal* 2007; 44(1): 279-282.
- Maeda K and Hatato M. Involvement of photooxidation of melanogenic precursors in prolonged pigmentation induced by ultraviolet A, *J Invest Dermatol* 2004; 122(2): 503-509.
- Masson P. Masson fontana stainings and their preliminary technique, *Am J Pathol* 1928; 4: 181-211.
- Matsumura Y and Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin, *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 195(3): 298-308.
- Pathak MA and Fitzpatrick TB. Preventive treatment of sunburn, dermatoheliosis, and skin cancer with sun protective agents, In *Dermatology in General Medicine*. 4th ed., Edited by Fitzpatrick TB. New York: McGraw-Hill 1993; 1689-1717.
- Sugimoto K, Nishimura T, Nomura K, Sugimoto K and Kuriiki T. Synthesis of arbutin- $\alpha$ -glycosides and a comparison of their inhibitory effects with those of  $\alpha$ -arbutin and arbutin on human tyrosinase, *Chem Pharm Bull* 2003; 51(7): 798-801.
- Tobiishi M, Haratake A, Kaminaga H, Nakahara M, Komiya A, Koishikawa H, Uchiwa H, Kawa Y and Mizoguchi M. Pigmentation in intrinsically aged skin of A1 guinea pigs, *Pig Cell Res* 2004; 7(6): 651-658.
- Tobiishi M, Haratake A, Kaminaga H, Nakahara M, Komiya A, Koishikawa H, Uchiwa H, Kawa Y and Mizoguchi M. Change in responses of UVB irradiated skin of brownish guinea pig with aging, *Pig Cell Res* 2005; 18: 651-658.
- Yoshida M, Hirotsu S, Nakahara M, Uchiwa H and Tomita Y. Histamine is involved in ultraviolet B-induced pigmentation of guinea pig skin, *J Invest Dermatol* 2002; 118(2): 255-260.