

Original Article / 원저

## 건칠의 항주름 효과와 미백효과 연구

안재형 · 김경준

가천대학교 한의과대학 한방안이비인후피부과

### The effect of wrinkle care and whitening by *Rhus verniciflua Stokes*

Jae-Hyung Ahn · Gyung-Jun Kim

Department of Ophthalmology, Otolaryngology and Dermatology, College of Korean Medicine, Gachon University

#### Abstract

**Objectives** : Recently, the demands for the effective and safe depigmentating and anti-aging agents of the skin have increased due to the medical, pharmaceutical and cosmetic reasons. The aim of this study is to search new materials from the traditional herbal medicines which inhibit the aging process of skin in vitro.

**Methods** : Human dermis cell (HS68) was used to test the effect of *Rhus verniciflua Stokes* (RVS). 80% ethanol or water extracts were screened for their inhibitory activities against elastase. Elastase inhibition effect was tested by microplate reader instrument. And MMP-1 suppression effect of RVS was tested by western blot. These cells were investigated the viability by MTS assay. And also the inhibition effect of tyrosinase by RVS was tested.

**Results** : RVS (final concentration 1 mg/ml) appeared over 30% of inhibition of elastase activity. So we are investigated anti wrinkle effects of *Rhus verniciflua Stokes* look through MMP-1 inhibition activity, also Extracts of RVS showed higher anti-tyrosinase activity than arbutin as final concentration 1 mg/ml. These results suggest that herbal medicines could be strong potential sources of inhibition of anti-aging and whitening effects for the skin.

**Conclusions** : RVS was the best suppressor candidate of elastase activity among other control oriental drugs. It was found that RVS did not have toxicity to cells. We found proper concentration of RVS to treat in HS68 culture and investigated not only wrinkle care effect but also whitening effect of RVS.

---

**Key words** : RVS; wrinkle care; whitening; elastase; MMP-1; tyrosinase

## I. 서 론

일반적으로 피부의 노화는 주름, 기미, 주근깨 등이 생기고, 피부이완 현상으로 나타난다. 이 중 주름은 피부노화의 대표적인 현상이므로 가장 중요한 문제가 되고 있다. 주요 생성원인은 크게 자연적인 나이의 내인성 노화(intrinsic aging: 內因性 老化)와 태양광선, 특히 자외선의 영향으로 인한 광 노화(photoaging: 光 老化)에 의한 진피성분의 변화로 논점의 대상을 좁혀 갈 수 있다<sup>1)</sup>. 이 중, 광 노화가 피부노화의 주된 원인이며 대부분의 미용적인 문제를 야기한다<sup>1-3)</sup>.

UVB(자외선B, 290-320 nm)는 UVA(320-380 nm)와 달리 단순한 빛이 아니라, 1000배 정도 강력한 에너지력을 가진다. 그러므로 일반적인 일광화상은 주로 UVB에 의하여 일어난다. 한편, 열을 포함하고 있지는 않지만, UVA에 의한 피부손상 역시 무시할 수 없다. 다시 말해서, UVA는 UVB와 함께 피부손상을 일으키는데, 햇빛 안에 존재하는 UVA 양이 UVB 보다 10배나 풍부한데다가, 이는 진피까지 깊이 침투하는 특징을 가지고 있으며, UVA에만 자주 노출되어도 진피 교원질(collagen)과 탄력섬유(elastin fiber)를 손상시켜 광노화를 일으킬 수 있다고 보고되어 있다<sup>4)</sup>.

일반적으로 진피층의 70 %를 차지하고 있는 콜라겐은 피부의 강도와 장력을 부여하여 외부의 자극으로부터 피부를 보호하는 역할을 한다. 따라서 콜라겐의 감소는 피부의 노화와 밀접한 관련이 있다<sup>5)</sup>. 이러한 콜라겐을 분해하는 효소는 그 종류가 다양한데, 그 중 하나가 기질 단백질 분해 효소-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1, collagenase)이다<sup>6)</sup>.

MMP-1이 발현되어 피부손상이 일어나면, 주름만 유발되는 것이 아니라 손상과 함께 UV를 쬐인 피부의 melanocyte에서 tyrosine의 활성이 높아지고, 동시

에 melanin을 생성시킴으로써 피부에서 색소침착이 증가되는데, 이는 멜라닌 세포가 피부에 해가 되는 자외선이 진피 내에 흡수되는 것을 막기 위하여 멜라닌을 형성하기 때문이다. 멜라닌은 자외선이 체내로 투과하는 것을 막아 내부 장기가 손상되는 것을 지켜주며 자외선으로 인한 피부조직 유전자의 변형을 막아내고 피부암의 발생을 억제하는 역할을 수행한다<sup>2,3)</sup>. 멜라닌은 피부색을 결정하는 주요 인자로 표피 기저층에 존재 하는 melanocyte 내 melanosome 소기관에서 합성이 된다. 멜라닌의 전구물질은 Tyrosine이라는 단백질로 Tyrosinase라는 효소에 의해 L-DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanin)로 전환하는 가수분해 활성과 L-DOPA를 DOPA quinone으로 전환시키는 산화과정을 거쳐서 멜라닌이 형성이 된다<sup>1,2,7)</sup>. 현재 arbutin 및 ascorbic acid와 이들 유도체가 의약품의 품과 기능성 화장품의 미백 원료로 사용되고 있으나<sup>8)</sup>, 피부 투과, 세포독성 및 체형 내에서의 안전성등과 같은 문제점들이 있어 보다 경제적이고 효율적인 천연 한방 성분에 대한 관심이 높아지고 있다<sup>9,10)</sup>.

최근, 한방 분야에서는 허브를 이용하여 wrinkle care를 비롯한 whitening 효과를 가지는 약제에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 여러 가지 천연물로부터 미백성분을 추출하여 그 효과를 검증하려는 연구들이 그것이다<sup>11,12)</sup>. 이에 破癩작용이 있고 溫 有小毒한 성미를 가지고 있는 乾漆이 진피층의 물리적 손상을 일으킨 후 섬유아세포를 자극함으로써 피부재생 효과를 유발할 것으로 생각하여 이러한 사실을 바탕으로 Elastase 활성억제 실험과 MMP-1 억제효능 실험을 통하여 항 주름효과와 Tyrosinase 효능 억제 실험을 통한 미백효과를 탐구 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약제

Corresponding author : Gyoung-Jun, Kim, College of Korean Medicine, Gachon University, 21 Keunumul-ro, Jung-Gu, Incheon, South Korea.

(Tel: +82-32-770-1300, E-mail: ksjj215@gachon.ac.kr)

• Recieved 2016/7/8 • Revised 2016/8/10 • Accepted 2016/8/17

실험에 사용된 약재들은 Sunten Pharmacructical Co.(Taipei, Taiwan)과 옴니허브(Korea)에서 구입하였다. Sunten에서 구입을 한 것은 water extract 상태로 구입을 하였다. 사용 시에는 물에 녹인 후 분말에 녹은 전분을 제거하여 사용을 하였다. 옴니허브에서 구입한 약재들은 100 g을 정량 후 80 % 에탄올을 가하여 30분 동안 2회에 걸쳐 초음파진동을 이용하여 추출액을 획득하였다. 지름 185 mm 종이여과지(Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압 여과 하였다. 그 후 감압 농축기(Eyela, Japan)를 사용하여 농축한 다음, 동결 건조기(Freezedryer, Matsushita, Japan)로 동결 건조하여 분말을 얻어 DMSO에 녹여 사용하였다.

## 2) 시약

Elastase 억제효과를 살피기 위하여 구입한 Elastase (pancreatic from porcine pancreas) N-Succinyl-(Ala)3-p-nitroanilide, Ursolic acid 와 Tyrosinase억제 효과를 살피기 위하여 mushroom tyrosinase, L-tyrosine, arbutin는 Sigma aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Hand Hold UV lamp는 Vilber Lourmat (B.P.66-Z.I.sud france)에서 구입하였으며, MMP-1 일차 항체는 R&D system, 이차 항체는 Jackson Immuno Reasearch Laboratories, Inc 에서 구입하여 실험하였다.

## 3) 세포주

사람의 섬유아세포인 HS68(ATCC, CRL1635) cell 은 10 % fetal bovine serum(FBS)을 첨가한 Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM)에 100 U/ml Penicillin과 100  $\mu$ g/ml Streptomycin(P-S)을 첨가한 배지에서 2-3일 마다 배양액을 교환해 주었으며, 배양 환경은 37  $^{\circ}$ C 포화 습도로 유지되는 5 % CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

## 2. 방법

### 1) Elastase 활성 측정

96well plate에 100 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 넣은 뒤 농도에 따른 한약 시료를 넣었다. 2.9 mM의 N-Succinyl-(Ala)3-p-nitroanilide(sigma, S4760)을 20  $\mu$ 씩 분주 뒤 0.2 unit으로 조제한 Elastase 효소액(sigma, E0258) 15  $\mu$ 를 넣고 최종 양을 150  $\mu$ 로 만들어준 뒤 조제한 것이 잘 섞이도록 파이펫팅을 해주었다. 그 후 25  $^{\circ}$ C에서 20분 동안 방치하였다. 얼음에서 5분간 방치하여 반응을 중지 시킨 뒤 410 nm 파장의 microlpate reader기를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 ursolic acid를 사용하였으며 음성대조군으로 elastase 효소액 대신 100 mM Tris-HCl buffer를 동량 분주하였다.

Inhibition of tyrosinase activity (%)=  $[1-(S-B)/C] \times 100$   
S: 효소액 및 시료용액 첨가 시 흡광도 변화 값  
B: 효소액 대신 100 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0) 첨가 시의 흡광도 변화값  
C: 시료 용액 대신, 100 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0) 첨가 시의 흡광도 변화값

### 2) MTS assay

HS68 cell에 건칠을 농도별로 처리했을 때 생존율을 MTS(Promega, Madison, USA) assay로 조사하였다. stock을 분주한 후에 7일 정도 안정화를 시킨 후에, Hemocytimeter를 사용하여 셀 다음 세포를 96-well culture plate에 각각  $2 \times 10^4$  개가 되도록 심어 주었다. 24시간 배양을 한 다음 배지를 제거하고 건칠 추출물을 농도별로 처리한 후 total volume을 100  $\mu$ 가 되게 하여 24시간 다시 배양하였다. MTS의 최종 농도를 0.25 mg/ml로 처리한 뒤, 암소에서 2시간 동안 반응하였다. micro plate reader기를 490 nm에서 흡광도를 측정하여 약제의 세포독성 및 증식효과에 대한 영향을 조사하였다.

### 3) UV 조사

Human Dermal Fibroblast인 HS68 cell에 UV를

조사하여 MMP-1의 발현을 유도하였다. 100 mm에 세포를  $6 \times 10^5$ 로 심어 24시간 배양 하였다. 배지를 제거하고 PBS를 사용하여 두 번 헹구어준 뒤, PBS를 500  $\mu$ l 넣고 15 cm의 높이에서 UVA(peak 365 nm, 50 mJ/cm)를 1분 30초 동안 쬐어 주었다. 그 후에 FBS를 넣지 않은 배지를 넣어 24시간 배양하였다. 한약재를 처리할 시에는 FBS를 넣지 않은 배지에 한약재 추출물을 농도별로 넣어 배양을 하였다.

#### 4) Western blot 분석

자외선에 의하여 생성되는 MMP-1은 HS68 세포의 배지를 회수하여 배지에 분비된 MMP-1의 발현량을 분석하는 방법을 사용하여 원하는 단백질을 얻었다. 배양하였던 세포의 배지를 회수한 후 Amicon (millipore, U.S.A.)을 이용하여 농축을 하였다. 농축된 배지 26  $\mu$ l에 Loading buffer 4  $\mu$ l를 넣은 후 10% acrylamide gel을 만들어 전기 영동하였다. 이것을 nitrocellulose membrane(Schleicher&Schuell Bioscience, Dassel, Germany)에 transfer하여 PBS-T에 1% skim milk와 1% BSA가 든 blocking 용액에서 1시간 동안 blocking한 후 PBS-T로 5분간 3회 세척하였다. Anti MMP-1(R&D systems, Moimneapolis, MN, USA)를 이용하여 1차 항체반응을 4  $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시킨 다음 PBS-T로 세척을 하였다. Mouse-IgG(Jackson Immuno Reserch Laboratories, Inc, westGrone, pa, USA) 2차 항체반응을 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS-T로 10분, 15분, 30분간 세척한 후 ECL (Amersham Biosciences, UK)로 발광하여 X-ray film에 노출시켜 단백질 발현 분석을 실시하였다.

#### 5) Tyrosinase 활성 억제 효과

한약재에 대한 Tyrosinase 저해 활성 측정은 96well을 사용하여 흡광도를 측정하였다. 96well micro plate에 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.5)를 분주한 후 한약에서 추출한 시료를 농도별로

넣는다. 그 후 2000 unit/ml의 mushroom tyrosinase (fluka, 93898)를 potassium phosphate buffer에 녹여서 만든 것을 10  $\mu$ l씩 넣은 뒤 15 mM의 tyrosine (sigma, T3754)을 20  $\mu$ l씩 분주 후 최종 양을 150  $\mu$ l로 만든 뒤 잘 섞어 주고 37  $^{\circ}$ C에서 20분간 반응을 시켰다. 신속하게 얼음에서 5분간 방치하여 반응을 중단 시키고, 490 nm에서 흡광도를 측정하고 tyrosinase 효소활성억제율을 구하였다.

양성대조군으로 arbutin을 사용하였으며 음성대조군으로 tyrosinase 대신 0.1 M sodium phosphate buffer를 동량 분주하였다.

Inhibition of tyrosinase activity (%) =  $\frac{[I-(S-B)]}{C} \times 100$   
 S: 효소액 및 시료용액 첨가 시 흡광도 변화 값  
 B: 효소액 대신 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 첨가 시의 흡광도 변화 값  
 C: 시료 용액 대신, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 첨가 시의 흡광도 변화값

#### 6) 통계처리

결과는 mean $\pm$ SD 값으로 표기하였다. 자료를 통계학적으로 유의한 수준으로 분석하기 위하여 SPSS system을 이용하였으며, 같은 실험을 최소 3번 이상 시행하여 그 결과를 처리하였다. 자료 상호 간 유의할 만한 차이를 판가름하는 P값은 0.05 미만으로 설정하였다.

### III. 결 과

#### 1. 건칠의 Elastase 억제 효과

물 추출과 80% 에탄올 추출을 한 한약재에 대하여 elastase assay를 통하여 한약재들이 가지고 있는 억제 활성을 탐색하여 보았다. 80% Ethanol 추출물인 건칠에서 elastase 억제활성을 가지는 것으로 나타났다. 가장 효능이 뛰어났던 건칠의 농도별 Elastase 활성억제 실험을 하였다. 모두 20분 동안의 반응 시간을 주었으며, 1000  $\mu$ g/ml의 농도를 사용하여 시험하

Table 1. The Effects of Elastase Inhibition by *Rhus verniciflua Stokes* Extracts.

Ursolic acid ( $\mu\text{g/ml}$ )		<i>Rhus verniciflua Stokes</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	
500	100	500	1000
36.2 $\pm$ 5.92	29.27 $\pm$ 5.69	41.49 $\pm$ 0.79	49.21 $\pm$ 3.19

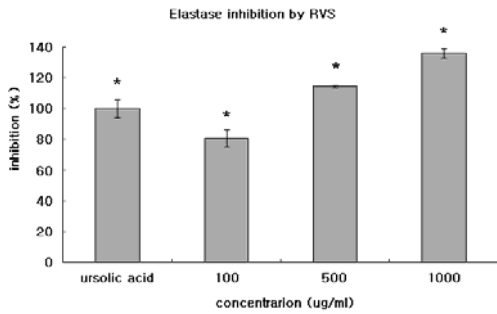


Fig. 1. *Rhus verniciflua Stokes* extracts inhibited the elastase activity. Ursolic acid was using as the positive control that final concentration was 500  $\mu\text{g/ml}$ . *Rhus verniciflua Stokes* was examined on final concentration of 1000:100, 1000:500, 1000:1000  $\mu\text{g/ml}$ . Results are provided as percentage of total cells and represent mean $\pm$ S.E.M. of three to six independent experiments, ( $P<0.05$ )

였다. 양성 대조군으로는 ursolic acid (500  $\mu\text{g/ml}$ )를 사용하였다. 반응 후 얼음으로 반응을 정지시킨 후 micro plate reader기를 사용하여 측정된 결과, 100, 500, 1000 ( $\mu\text{g/ml}$ )의 세 가지 농도에서 관찰을 한 결과 농도가 높아질수록 Elastase의 억제 활성을 높게 가지는 것을 알 수가 있었다. Ursolic acid와 같은 농도인 500 ( $\mu\text{g/ml}$ )에서도 41.49 $\pm$ 0.79 % 으로 Ursolic acid 보다 높은 활성을 보이면서 월등한 효과를 나타 내었다(Table 1, Fig. 1).

## 2. HS68 cell의 세포 생존률에 미치는 효과

건칠(*Rhus Verniciflua Stokes*)이 세포독성을 가지는지 실험하였다. 기존의 보고들을 토대로, elastase에

대한 억제 활성을 가장 높게 가진다고 이미 알려져 있는 대항을 control group으로 설정하였고, 건칠(RVS)을 100, 250, 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 관찰하였다. control group의 결과를 100 %로 잡고, 건 칠이 나타낸 상대치의 결과를 그래프로 나타내었다. 이와 같은 조건으로 HS68 세포의 세포 생존률을 MTS assay를 통하여 살펴보았다. HS68 세포를 세 번 정도 계대하여 안정화 시킨 후 실험 진행하였다. 그 결과 모두 98 %이상을 보이면서 세포에 대한 독성이 보이지 않음을 관찰을 할 수가 있었고 세포에 대하여 시료 처리에 대한 농도를 참고하여 지표로 삼을 수 있었다(Fig. 2).

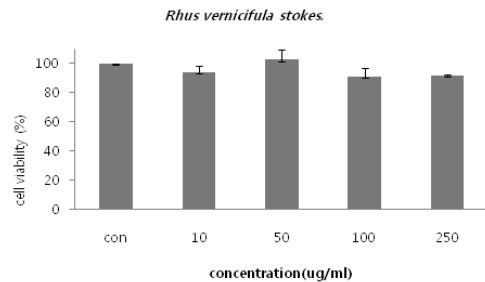


Fig. 2. The effect of RVS in cell viability. *Rhus verniciflua Stokes* was examined on final concentration of 10, 50, 100 and 250  $\mu\text{g/ml}$ . Final concentration of MTS was 250  $\mu\text{g/ml}$ . Results are provided as percentage of total cells and represent mean $\pm$ S.E.M. of three to six independent experiments. ( $P<0.05$ )

## 3. 건칠에 의한 MMP-1의 발현 억제

피부의 노화에 중추적인 역할을 하는 MMP-1의 발 현은 UVA에 의하여 세포에서 JNK/p38 활성도가 증

가하고 전사인자인 AP-1 region의 활성이 증가하여 MMP-1의 발현이 증가하여 collagen의 결핍이 야기 된다고 알려져 있다<sup>13,14</sup>. 이러한 사실을 바탕으로 UV 조사가 HS68 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Western blot 방법을 사용해 MMP-1 단백질의 발현량을 측정하였다. MMP-1를 모으기 위하여 UV를 조사 후 동일 한 양의 배지를 사용하고 회수하였다. 회수하였던 배지를 Amicon(millipore, USA)를 사용하여 같은 농도로 농축을 시켜 Western blotting을 하였다. UVA를 2분 동안 조사한 세포는 MMP-1를 UVA를 조사하지 않은 세포에 비하여 다량으로 발현하였음을 눈으로 확인 할 수 있었다. 이렇게 발현을 시킨 세포에 건칠을 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리를 하여 하루 동안 배양한 뒤 측정을 해본 결과, MMP-1의 발현이 월등하게 줄어들었다(Fig. 3).

#### 4. 건칠의 tyrosinase 활성 억제효과

Elastase를 억제하는 효능을 가진 건칠이 MMP-1 발현 억제 뿐 아니라 미백에 관여하는 효소인

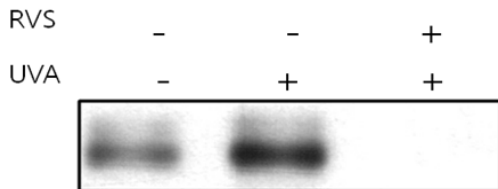


Fig. 3. The effects of *Rhus verniciflua* Stokes extract on the product of matrix metalloprotein-1 cause by ultraviolet A irradiation of cultured human skin fibroblasts. HS68 cell was irradiated 2min and treated RVS (50  $\mu\text{g/ml}$ ).

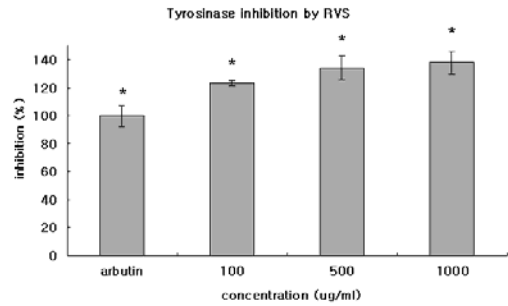


Fig. 4. Tyrosinase inhibition effect of *Rhus verniciflua* Stokes extracts. Arbutin was used to positive control of Tyrosinase activity inhibition. Inalconcentration of arbutin was 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Results are provided as percentage of total cells and represent mean $\pm$ S.E.M, of three to six independent experiments. ( $P<0.05$ )

Tyrosinase에 대하여 어떠한 효능을 지녔는지 알아보기 위하여 Tyrosinase 효소를 이용하여 건칠의 농도 별로 실험을 하여 표와 그래프로 나타낸 결과이다. Tyrosinase와 기질인 L-tyrosine을 넣고 건칠을 농도 별로 처리한 후 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응을 한 다음 얼음으로 반응을 정지하고 micro plate reader기를 사용하였다. 건칠이 100, 500, 1000 ( $\mu\text{g/ml}$ )의 모든 농도에서 대조 군인 arbutine (68,21 $\pm$ 7.43 %)의 Tyrosinase 억제 활성력보다 높은 것으로 나타났다(Table 2, Fig. 4).

#### IV. 고 찰

乾漆은 漆樹科(옻나무과: *Anacardiaceae*)에 속한 落葉喬木인 옻나무(*Rhus verniciflua* Stokes)의 樹脂를

Table 2. Tyrosinase Inhibition Effect of *Rhus verniciflua* Stokes Extracts.

Herbal medicines	Inhibition (%)		
	100 ( $\mu\text{g/ml}$ )	500 ( $\mu\text{g/ml}$ )	1000 ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Rhus verniciflua</i> Stokes	84.07 $\pm$ 1.74	91.59 $\pm$ 8.54	94.19 $\pm$ 7.99
arbutin			68.21 $\pm$ 7.43

건조한 것으로, 여름에 莖幹과 樹皮에 刺傷을 입혀 흘러나오는 樹脂를 乾澁하여 만든다<sup>15)</sup>. 乾漆의 性은 溫有少毒하고, 味는 辛苦하며 肝 胃經으로 歸經한다<sup>16)</sup>. 그 性味가 辛酸苦泄하고 溫通行滯하여 破血攻堅하므로 瘀血이 머물러 나타나는 證을 치료하는데 破血을 진피층의 물리적 손상을 일으켜 섬유아세포를 자극한 후 콜라겐 리모델링을 유도함으로써 피부재생효과를 기대하는 것으로 해석하여 주름개선 및 미백에 응용할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 乾漆의 溫한 성질 또한 주름개선에 도움을 줄 수 있을 것이라 생각된다. 本品은 破血通經의 작용이 비교적 강하기 때문에 營血과 衛氣를 손상할 우려가 있으므로, 孕婦나 몸이 虛한자는 應用이 부적합하다<sup>15)</sup>. 乾漆의 주성분은 우루시올(urushiol)이며, 염증을 치료하고 신생혈관 생성을 억제하는 파세틴(pacitin) 성분도 포함되어 있다. 처음에는 무색투명하나 공기에 접촉되면 산화작용에 의하여 검게 변화하여 옷이 되는데, 이는 산이나 알칼리 또는 70도 이상의 고열에서도 변하지 않는 안정성을 나타낸다<sup>17)</sup>.

건칠의 피부노화 억제 효능을 언급하기에 앞서, 피부조직의 구조적 특징을 파악해볼 필요가 있겠다. 피부는 외측으로부터 크게 表皮, 眞皮, 皮下脂肪의 세 부분으로 구성되어 있다<sup>3,18,19)</sup>. 이 중 표피는 keratinocyte로 주로 이루어져 있고, 이 keratinocyte가 형성하는 각질층에 존재하는 자연보습인자(Natural Moisturizing Factor:NMF), melanin을 형성분비하는 melanocyte, 그리고 피부에 영양을 공급하는 조직외기질 등과 관련하여 일부 피부노화와 관계가 있으며, 피하조직은 외부로부터의 傷害를 완화하는 완충 역할을 할 뿐이라고 알려져 있다<sup>3,18-20)</sup>. 피부노화의 결과인 주름형성의 근본적 이유는 진피에 있다고 볼 수 있겠다. 섬유성분에는 피부를 팽팽하게 하는 collagen 섬유가 약 70 %를 차지하며, elastin이 2 % 정도의 소량을 차지하고 있다<sup>3)</sup>. 이 섬유성분들은 진피에 존재하는 섬유아세포에 의해 섬유성분을 분해하는 collagenase, elastase 라는 효소에 작용하여 섬

유성분의 합성과 분해를 반복시킨다.

실험 결과, 건칠은 眞皮 조직의 세포 HS68의 elastase의 활성을 억제하며(Table 1, Fig. 1), MMP-1 발현을 억제함으로써 항주름 효과를 보인다는 결과와 함께(Fig. 3), 건칠이 미백에 관여하는 효소인 tyrosinase 또한 억제하여(Table 2, Fig. 4) 미백 효과를 동시에 가지는 것으로 판단되었다. 건칠이 MMP-1 외에도 melanocyte 활성을 억제하는 이러한 결과를 보여준 건칠의 안정성을 확인하기 위하여 MTS assay를 시행하여 세포독성이 없음을 확인하였으며, 이상의 결과가 세포 내 protein 함량 감소에 의한 단순 결과가 아님을 확인하였다.

첫째로, 건칠의 elastase와 MMP-1 활성억제 효과에 대하여 살펴보도록 하겠다. 한약재들에 대하여 elastase의 억제활성을 측정하여 본 결과 건칠이 가장 높은 억제 활성을 갖는 것으로 나타나(Table 1, Fig. 1) 피부의 탄력성을 잃게 하는 주된 요인인 elastase를 저해하는 효과가 있는 것으로 생각되었다. HS68 세포에 처리하여 세포에 대한 건칠의 처리 농도를 결정하기 위하여 MTS assay를 통하여 세포의 생존율을 측정한 결과, 250  $\mu\text{g/ml}$  까지 처리하여도 세포 독성을 가지지 않는 것으로 사료 되었다(Fig. 2). 콜라겐은 MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)에 의하여 끊기며, 그로 인하여 피부 주름이 유발되는데<sup>21)</sup>, 이 MMP-1 (matrix metalloproteinase-1)은 자외선을 받게 되면 자외선으로 인하여 활성산소를 생성하고 이것들이 신호전달 과정을 거치면서 세포의 핵에서 JNK 와 p38을 생성하고 유전자의 AP-1 지역에서 c-FOS와 c-JUN이 합쳐져 이형체를 형성하게 된다. 그 결과로 Pro collagen 합성 프로모터가 저해되고 MMP-1의 프로모터가 활성화 되면서 MMP-1, 즉 collagenase가 생성이 되어 콜라겐의 fiber구조를 끊게 되고 주름을 유발하게 되는 것이다<sup>3,5,21)</sup>. 이러한 사실을 바탕으로 MMP-1의 단백질의 발현 정도를 관찰하기 위하여 Western Blot 분석 방법을 사용하였다. 그 결과, UVA에 의하여 다량 발현을 한 MMP-1이

건철을 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 HS68에서는 눈에 띄게 줄어드는 탁월한 효능을 보이는 것으로 나타나 (Fig. 3), 적은 양으로도 MMP-1를 저해하는 우수한 효과가 있다고 사료되었다.

피부의 노화에 중추적인 역할을 하는 MMP-1의 발현은 UVA에 의하여 세포에서 JNK/p38 활성도가 증가 하고 전사인자인 AP-1 region의 활성이 증가하여 MMP-1의 발현이 증가하여 collagen의 결핍이 야기된다고 알려져 있다<sup>14)</sup>. 이는 intrinsic aging에 의한 피부노화와 연관 지을 수 있는데, 성장기에는 진피상층 구조를 형성하는 콜라겐 纖維束은 코일狀으로, 엘라스틴 纖維束은 직선狀의 網을 형성하며 피부면적의 확장에 따라 합성이 왕성해진다. 그러나 노화가 진행되면서 섬유성분의 생산량은 현저하게 저하될 뿐만 아니라 일반적으로 다른 단백질보다 대사속도가 느린 콜라겐은 섬유아세포의 영향을 받는 collagenase의 작용 증가로 그 대사속도가 빨라져 그 환원형으로 연결된 형태가 증가하며, 엘라스틴 纖維束의 경우에도 콜라겐에 의해 변형되면서 직선성을 잃게 되어 굴곡된 형태를 취하게 된다. 이러한 현상은 노화에 따라 현저해지며, 동시에 새로 생기는 엘라스틴 纖維束은 불규칙한 가는 망을 형성하고 덩어리로 침착하기도 하므로 피부의 탄력성은 저하되고 팽팽한 힘이 사라지면서 피부는 변화한다고 알려져 있다<sup>3,18-20,22)</sup>. 이 과정에서 MMP-1이 피부노화에 따라 증가하면서 주름을 형성하는데 조력 작용을 미치게 된다. 건철(RVS)은 이러한 mechanism 상에서 MMP-1 발현을 억제하는 것으로 사료된다. 그런데, 2분 동안 UVA를 조사시킨 HS68 세포에 건철을 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 하루 동안 배양한 뒤 측정을 해본 결과, MMP-1의 발현이 월등하게 줄어들었음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 다시 말해서, 건철이 적정 농도로 처리될 경우, 항주름 효과를 가질 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

둘째로, 건철이 가지는 항 주름에 대한 효과에 있어서 건철에 대한 미백효능을 알아보도록 하겠다. 기미, 주근깨와 반점을 생성하는 원인이 멜라닌이다. 이러

한 멜라닌을 유도하는 중요한 효소인 tyrosinase를 억제하는 실험을 수행하였다. melanin 생성을 억제하는 물질은 L-ascorbic acid, kojic acid, arbutin, lactic acid 등이 이미 개발되었으나, 피부자극성이나 안정성에 문제가 있어 제한된 양을 사용하고 있다고 보고가 있는 상태이다<sup>23)</sup>. 이에, 건철의 tyrosinase 억제 가능성을 검증해보았다. Tyrosinase는 멜라닌을 생성하는 L-tyrosinase를 DOPA로 산화시켜서 결국 멜라닌을 생성하게 해주는 중요한 요소이다<sup>14)</sup>. 따라서 Tyrosinase를 억제한다면 멜라닌 생성이 억제 될 것이라고 가설을 세우고, 이를 토대로 건철이 가지는 미백효과를 탐구하였다. 그 결과, 건철은 93.11±5.16 % (100  $\mu\text{g/ml}$ )의 값을 나타내며 대조군인 Arbutin의 68.21±7.43 % (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) 보다 월등한 효과를 지니는 것으로 나타났으며 보다 적은 양으로도 높은 효능을 보이는 것으로 사료되었다(Table 2, Fig. 4). 또한, 건철은 농도 의존적으로 효능이 점차 높아지는 것으로 관찰되었다. 이는 photoaging과 연관되는 mechanism으로, 태양광선 중 특히 UVB에 의한 피부노화에 기인하는 문제이다<sup>1,3,4)</sup>. 피부의 表皮에는 자외선의 영향을 최소화하는 melanin이 광범위하게 분포하고 있다. 이 melanin은 아미노산의 일종인 티로신(tyrosine)으로부터 de novo synthesis 되며<sup>24,25)</sup>, 이 합성의 합성 속도결정단계에는 keratinocyte에 의해 조절되는 효소인 tyrosinase가 작용하므로 keratinocyte에 의한 멜라닌 합성속도와 분해속도의 평형은 피부색을 결정하는데 중요한 인자가 된다<sup>26)</sup>. 이 평형이 깨지면 그 부분의 피부색은 변화하게 되는 것이다. 피부가 일시적으로 강한 자외선에 노출되게 되면 그 防禦作用으로 멜라닌 분해속도가 빨라지지만, 나이가 증가할수록 분해속도가 느려지고, 자외선에 의해 발생하는 sunburn cell로 인해 피부에 과립상의 침착물이 생기면서 기미, 주근깨 등을 형성하게 된다. 또한 표피가 角質化를 일으켜 건조단단해지고 眞皮의 세포외기질의 양이 감소되어 피부가 거칠고 건조해진다. 더욱이 자외선은 피부 구성성분의 질적양적인 변화만이 아니



라 유해물질인 活性酸素를 발생시킴으로 더욱 영향이 크다. Free radical의 일종인 활성산소 ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , HO·, HOO·)는 세포막 구성성분인 인지질의 불포화지방산을 산화시켜 과산화질소를 형성, 세포변성을 일으키며 세포나 생체조직에 대해 여러 가지의 惡影響을 미친다<sup>22,24</sup>. 게다가 DNA를 손상시켜 세포를 죽이거나 암을 유발하기도 하고, 유전정보를 변화시켜 노화를 촉진시킨다고 보고되고 있다<sup>3,18-20,22</sup>.

## V. 결 론

건칠이 가지는 효과를 자세히 알아보기 위하여 효능을 나타내는 적정 농도 탐색과 더불어, 그 효과 측면에서 항 주름 효과 뿐만 아니라, 건칠이 가지는 melanin의 de novo synthesis 첫 단계에 관여하는 효소인 tyrosinase<sup>24,25</sup> 활성 억제 효과를 알아보았다.

1. 건칠은 후보 한약재 중에서 가장 높은 Elastase 활성 저해력을 나타냈다.
2. UVA를 조사함으로 인하여 생성되는 콜라겐 저해 효소인 MMP-1의 저해 효과를 관찰할 수 있었다.
3. 건칠은 양성대조군인 arbutin 보다도 월등한 Tyrosinase 억제 효능을 적은 농도에서부터 농도 의존적으로 띄었다.

이상의 연구결과로 볼 때, 물 추출을 한 건칠은 주름을 억제시키는 효능을 가졌으며 미백에도 효과를 미치는 것을 확인하였으며, 나아가 이는 과거로부터 한약재로서 有意味 하였던 건칠을 現代科學으로 再檢證함으로써 韓醫學的 측면에서 피부노화 치료제로 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

## References

1. Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J.

Photoaging of human skin, Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine, 2000;16(6):239-44.

2. Kim SJ, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. Tyrosinase inhibitory prenylated flavonoids from *Sophora flavescens*. Biol Pharm Bull, 2003;26(9):1348-50.

3. Lee SP, Park JH. The development of cosmetic ingredients for skin anti-aging. Specialty chemical, 1996;42:14-20.

4. Kim GY. Studie zum Vergleich des natuerlichen Altern und des Alterns durch ultraviolette Strahlen an der menschlichen Haut Giyeon Kim, J Soc Cosmet Scientists Korea, 1997;3(1):21-43.

5. Cho YH, Kim JH, Shim GS, Lee DH, Lee BC, Pyo HB. Effects of Ethyl Acetate Fraction from *Melothria Heterophylla* on Antioxidant Activity and Matrix Metalloproteinase-1 Expression in Ultraviolet A-irradiated Human Dermal Fibroblasts. J Soc Cosmet Scientists Korea, 2005;31(1):103-9.

6. Shim GS, Kim JH, Na Y, Lee DH, Lee BC, Pyo HB. Anti-Oxidative and Inhibitory Effect of *Saussurea involucrata* on MMP-1 in UVA-irradiated Human Dermal Fbroblast. J Soc Cosmet Scientists Korea, 2005;31(4):329-35.

7. Hearing VJ. Biochemical control of melanogenesis and melanomal organization, J Investigative Dermatology, 1999;4:24-8.

8. Ikeda T, Tsutsumi T. Function and skin depigmental activity of crude drugs. Fragrance Journal, 1990;6:56.

9. Kim JY, Lee YH, Kim JY, Noh BK. Study of Antioxidation Action of *Lenonuri herba*

- Extract, J Soc Cosmet Scientists Korea, 2005;31(2):189-96.
10. Qui F, Komatsu K, Satio K, Kawasaki K, Yao X, Kano Y. Pharmacological properties of traditional medicines, XXII, Pharmacokinetic study of mulberroside A and its metabolites in rat. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1996;19(11):1463-7.
  11. Lee MG, Kim GJ. Experimental studies on the Whitening and Anti-allergic effect of various Herbal medicines that clear heat. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2007; 20(3):71-81.
  12. Jin YZ, Li GH, Ahn SY, Kim EK, Row KH. Extraction and effect of whitening agents from chinese plants. Analytical Science & Technology, 2006;19(3):194-202.
  13. Rittié L, Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. Ageing Research Reviews, 2002;1:705-20.
  14. Hwang JH, Lee BM. Inhibitory Effects of Plant Extracts on Tyrosinase, 1-DOPA Oxidation, and Melanin Synthesis. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2007;70(5):393-407.
  15. Nationwide College of Korean Oriental Medicine Joint Instruction Compilation Committee. Bonchohak, 6th ed. Seoul: Yeongrimsa, 2000:439-40.
  16. Yang DH. Bonchobiyohaeseok, 6th ed. Hsinchu:Gukeung publisher, 1985:393-4.
  17. Shin MK, Wonsaek Imsangbonchohak, 1st ed. Seoul:Namsandang, 1986:460-1.
  18. Kang HH. Anti-aging in Cosmetics, J Soc Cosmet Scientists Korea, 1997;23(1):57-74.
  19. Masaki H. Cell activation and improvement effect. Fragrance Journal, 1994;22(12):25-9.
  20. Ishihata S, Shimada A. To Keep Skin Young : Tales of a High-Molecular Skin Component. Kobunshi, 1995;44(6):362-4.
  21. Ho JN, Lee YH, Lee YD, Jun WJ, Kim HK, Hong BS, et al. Inhibitory effect of Aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced matrix metalloproteinase-1 production in human skin fibroblasts. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2005;69(11):2227-31.
  22. Tanaka H. Materials and technology used in recent cosmetics. Science and industry, 1993;67(4):159-65.
  23. Lee SJ, Bu HJ, Lee JA. Screening of Plants in Jeju for Whitening Materials in Cosmeceutical. J Soc Cosmet Scientists Korea, 2005;31(1):115-9.
  24. Jang KH, Roh SS. Depigmentation activity of many herb. Oriental medicine of Daejeon University, 2004;13(2):289-302.
  25. Kim EK, Lee HB. Cosmeceuticals-whitening. News & Information for chemical engineerings, 2007;25(2):138-43.
  26. Masaki H. The development of cosmetic ingredients. Bio Industry, 1995;12(4):5-12.