Brown guinea pig에서 백지 열수추출물의 미백효과

김필순 · 김영철[†]

계명대학교 대학원 공중보건학

(2009. 9. 5. 접수/2009. 9. 25. 수정/2009. 10. 19. 채택)

The Whitening Effect of *Angelicae dahuricae* Radix Water Extract in Brown Guinea Pigs

Pil-Sun Kim · Young-Chul Kim[†]

Department of Public Health, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

(Received September 5, 2009/Revised September 25, 2009/Accepted October 19, 2009)

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the whitening effect of *Angelicae dahuricae* Radix water extract (ADWE) by its application on artificial tanning spots which were induced by 1,500 mJ/cm² of UVB radiation on the backs of brown guinea pigs weighing approximately 450~500 g. Thirty μ l of ADWE, at each application, were applied twice a day, 5 days a week, for 8 weeks to the guinea pigs. The artificial tanning spots were divided into 3 groups which were vehicle control group [propylene glycol: ethanol: water (5:3:2)], positive control group (2% hydroquinone) and experimental group (2% ADWE). The visible whitening effect and changes in melanin index were evaluated once a week. On completion of the experiment, the animals were sacrificed under anesthetization, and the artificial tanning spots were excised by biopsy punch and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) to observe histological change and also stained with Fontana-Masson's silver (F-M) and S-100 to observe melanin pigmentation and melanocytes. In the gross observation, the experimental group showed higher pigmentation than the positive control group but lower pigmentation than the vehicle control group. Histological observation confirmed that ADWE had a positive whitening effect by showing a lower distribution of melanin and melanocytes in the epidermis of experimental group than in the vehicle control group.

Keywords: *Angelicae dahuricae* Radix, brown guinea pig, melanin, whitening effect

I. 서 론

피부에 영향을 주는 환경요인 중 가장 중요한 것은 자외선이다.¹⁾ 그 중 일광화상의 주원인이 되는 UVB는 인체에 가장 많은 영향을 미치는 파장으로²⁾ 일정기간 피부가 자외선에 노출되면 홍반, 부종, 동통을 동반한 염증반응이 일어나며 표피와 각질이 두꺼워지고 색소 침착이 증가된다.^{3,4)} 자외선에 노출이 많아진 현대인들은 피부를 건강하게 유지시키면서 미화의 효과를 주는 기능성화장품으로 선호도가 바뀌고 있다.⁵⁾

피부의 색소침착은 표피의 기저층에 있는 멜라닌세포에 의해서 생성되는 멜라닌이 원인이다.⁶⁾ 멜라닌의 주요

기능으로는 미생물에서 자외선 조사, 전파, 건조, 극한온도 등에 대한 생존 능력을 높여주며, 동물의 피부와 모발에서는 자기보호를 위한 수단의 기능을 하지만,⁷⁾ 과도한 색소 침착은 기미와 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하는 등 미용적인 면에서 부정적인 기능을 나타낸다.⁸⁾

멜라닌 생합성은 표피 기저층에 존재하는 멜라닌세포에서 자외선 등과 같은 외부적인 요인에 의해 증가하고, 생성된 멜라닌은 유극층, 과립층의 각질세포로 전달되어 피부 표피에 축적되고, 각질층의 각질세포 속에 포함된 채 떨어져 나가는 현상을 28일 주기로 반복하고 있다.^{9,10)} 멜라닌의 생합성은 주로 tyrosinase의 작용에 의해 이루어지며 tyrosinase에 의해 생성이 촉진되는 동물 멜라닌은 pheomelanin(yellow and red melanin)과 eumelanin(brown and black melanin)으로 구분된다. Tyrosinase는 tyrosine을 DOPAquinone으로 전환시

[†]Corresponding author : Department of Public Health, Keimyung University
Tel: 82-53-580-5931, Fax: 82-53-588-5233
E-mail : yckim@kmu.ac.kr

키는 초기 반응 단계와 eumelanin 형성 단계의 반응을 촉매하며, tyrosinase related protein(TRP)은 tyrosinase를 안정화시키는 기능을 하는 것으로 알려져 있기 때문에 tyrosinase는 eumelanin 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어져 있다.¹¹⁾

현재 미백제 원료로 사용되고 있는 유효 성분 중 hydroquinone은 멜라닌 형성의 억제력이 높아 미백 활성 물질로 사용되고 있지만, DNA와 RNA 합성 모두에 영향을 줌으로써 세포물질대사의 가역적 저해를 초래하고 세포 독성이 강하여 유전자 변이까지 일으킬 수 있다고 보고되었으며,¹²⁾ 누룩곰팡이의 이차 대사산물인 kojic acid 또한 tyrosinase의 활성화에 필요한 구리 이온(Cu^{2+})을 킬레이트 시켜 멜라닌 생성을 저해하는 우수한 미백효능을 나타내지만 사용 중의 변색, 물질 자체의 불안정성, 피부암 유발 같은 문제점이 있다는 보고가 있다.¹³⁾ Arbutin(hydroquinone-D-glucopyranside)은 세포 독성이 없고 멜라닌 생성 억제 작용 및 tyrosinase 활성을 저해하여 피부에 대한 미백제로 사용되고 있지만, hydroquinone에 당이 붙어 있는 구조로 세포 투과성 문제로 인해 미백활성이 상대적으로 저하된다는 보고가 있다.¹⁴⁾ 이로 인해 생체에 미치는 독성은 적으면서 tyrosinase 억제 및 멜라닌합성을 감소시키는 미백효능이 있는 천연물질 탐색에 대한 관심은 날로 증가하고 있으며, 이에 부응하여 최근에는 화장품뿐만 아니라 의약품의 원료 공급원으로서 천연 물질이 주목받고 있다.¹⁵⁾

백지(*Angelicae Dahuricae Radix*)는 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 구릿대의 뿌리에서 얻어진 생약으로, 함유된 성분으로는 20여종 이상의 coumarin 성분과 imperatorin, angelicosin, anomalin 등이 분리 동정되었으며 약 0.07%의 정유 성분을 함유하는 것으로 선행 논문에서 밝혀졌다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 백지에 대한 *in vitro* 생리활성 연구로는 콜라겐 생성촉진 효과, 항산화 효과, 항혈전 효과 등이 보고되어져 있다.¹⁹⁻²¹⁾ 이와 같이 백지의 다양한 생리활성에 대한 연구가 많이 이루어져 있으나, 현재까지 *in vivo*에서의 미백효능 연구는 확인되지 않는 실정이다. Brown guinea pig은 표피에 인간과 유사하게 적당한 수의 멜라닌세포와 멜라노솜을 가지고 있어 자외선과 화학제품에 반응을 잘 보임으로써,²²⁾ 많은 연구자들이 피부 색소침착의 병증을 연구하기 위해 사용하고 있다.²³⁾ 이에 본 연구는 brown guinea pig을 이용하여 멜라닌합성 억제 및 피부 미백효과가 기대되는 백지 열수추출물의 미백효과를 평가하여 피부 미백제로서의 활용 가능성을 알아보고자 하였다.

II. 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 멜라닌지수 측정은 mexameter(MX18, CK electronic GmbH, Germany)를 이용하였다. 시료추출은 초고속 감압 저온 추출기(COSMOS-660, 경서 기계 산업, 한국)를 사용하였고, 조직표본관찰은 fluorescence microscope(Axio imager, Carl Zeiss, Germany)를, 영상분석은 i-solution(IMT i-solution ver. 8.0, Canada)을 사용하였다.

2. 시료 조제

경북 안동시에서 재배한 유기농 백지 600 g을 구입하여 증류수 6 l를 첨가하여 초고속 감압 저온으로 2시간 30분간 열수 추출한 후 5 l 양을 얻어 감압 농축 용기에 담아 2 l로 농축한 다음 동결 건조시켰다. 백지 열수추출물을 동결 건조시켜 측정 한 수율(yield rate)은 38.6%였다. 실험군 시료는 동결 건조시킨 백지 열수추출물을 용매{propylene glycol: ethanol: water (5:3:2)}에 2% 농도로 용해시켜 사용하였다.

3. 실험동물 및 시료도포

약 450~550 g의 brown guinea pig 3마리를 OYC (Oriental Yeast Co. Ltd, Japan)로 부터 분양받아 1주일 동안 동물 사육실에서 적응시킨 후, 온도 $22\pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$, 조명주기 12시간씩 밤낮을 유지하였고, 실험 전 기간 동안 사료와 물은 자유롭게 공급 하였다. 실험동물은 실험 8주째 되는 날 염산 케타민으로 마취한 후 시료를 도포한 인공색소반 부위를 $\phi 12$ mm의 biopsy punch로 절취하여 10%의 중성 포르말린 용액에 24시간 실온에서 고정한 후 조직학적 관찰에 사용하였다. 자외선에 의한 인공색소반의 제작은 Choi²⁴⁾의 방법으로 수행하였다. Brown guinea pig 등 부위를 animal clipper를 이용하여 털을 깎고 면도기로 깨끗이 면도한 후 염산 케타민(100 mg/kg BW)으로 마취한 다음, 자외선 조사 부위($\phi 12 \text{ mm}$)에 원형으로 뚫은 가죽 천을 접착시킨 후 302 nm의 UVB를 방출하는 sunlamp를 사용하여 자외선을 조사하였다. 자외선은

1회 500 mJ/cm² 광량으로 주 1회, 3주간 연속으로 하여 총 1,500 mJ/cm² 조사하였다. UVB 조사에 의해 유발된 인공색소반에 미백 물질을 도포하는 시점은 색소침착 안정화를 위해 마지막 자외선을 조사한 10일 후부터 실험군은 2% 백지 열수추출물을, 양성대조군은 2% 하이드로퀴논을 1일 2회, 주 5일, 매회 30 μ l (0.53 mg/cm²)씩 micro pipette을 이용하여 8주간 도포하였다. 용매대조군은 용매[propylene glycol: ethanol: water(5:3:2)]를 도포하였다.

4. 육안적 관찰 및 기기 평가

시료 도포전과 도포 시작 후 매주 1회, 8주 동안 실험동물 피부의 색소침착(pigmentation) 상태를 용매대조군, 양성대조군, 시료도포군의 도포 부위에 대해 육안적으로 관찰하여 상대적인 미백 효능을 비교·분석하였고, 피부표면 색소침착 정도를 디지털 카메라로 촬영하였다. Mexameter를 사용하여 비침습적 방법으로 시료도포 전과 후의 색소침착 변화를 1주일에 1회씩 인공색소반 부위에 대해 3회 반복 측정하여 평균값을 구하여 색소침착 정도를 객관적으로 비교·분석하였다.

5. 피부조직의 조직학적 관찰

1) Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색 관찰

절취한 피부조직을 실온에서 10% 중성 포르말린 용액에 24시간 고정한 후 통상적인 방법으로 수세, 탈수, 투명, 침투과정을 거친 다음 paraffin에 포매하고 4 μ m 두께로 절편을 만들어 H&E 염색 후 광학현미경으로 피부조직의 변화양상을 관찰하였다.

2) Fontana-Masson's silver 염색 관찰

4 μ m 두께 박절편을 xylene에 탈파라핀, 함수, 증류수에 수세 후 Masson²⁹⁾법에 준하여 56°C에서 silver nitrate 용액에 넣어 60 분간 염색하고 수세한 다음 0.2% gold chloride 용액에 조색하고 수세 후 5% sodium thiosulfate 용액에 5분간 정착시켰다. 다시 수세 후 nuclear fast red 용액에 대조 염색 한 후 95%, 95%, 100%, 100% 알코올에 탈수, xylene에 투명, Canada balsam으로 봉입 후 광학현미경으로 멜라닌 색소침착 정도를 관찰하였고 영상분석(image analysis) 소프트웨어를 이용하여 멜라닌 색소침착 정도를 수치화하여 분석하였다.

3) 면역조직화학적(S-100) 염색 관찰

4 두께의 박절편을 coating slide에 부착하여 탈파라핀하고 함수 후 BenchMark XT automated immun-

ostainer(Ventana Medical Systems, USA)를 사용하여 염색하였다. 자동화 과정은 reaction buffer로 3분간 세척하고 3% H₂O₂에 3분간 담구어 peroxidase의 활성을 억제 시킨 후 일차항체 S-100을 1:100으로 희석하여 반응시키고 reaction buffer로 세척하였다. 이 후 biotin과 streptavidin에 각각 25분 반응시키고 DAB(Ventana Detection Kit, USA)에 발색 후 대조염색, 봉입하여 광학현미경으로 관찰한 다음 영상분석(image analysis) 소프트웨어를 이용하여 멜라닌 세포내 S-100 단백질 발현 정도를 수치화하여 분석하였다.

6. 자료 분석

통계적 분석은 SPSS 14.0 for windows(SPSS Inc., USA)를 이용하여 정상군, 용매대조군, 양성대조군, 백지 열수추출물 도포군 간에 동질성을 일원배치분산분석(one-way ANOVA)으로 확인하였다. 각 그룹간의 차이를 검증하기 위하여 Duncan's multiple range test를 이용하여 사후분석을 실시하였고 통계학적인 유의성 검증은 $\alpha=0.05$ 에서 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 멜라닌색소 침착 육안적 변화

Brown guinea pig은 사람의 피부에서와 같이 표피에 멜라닌세포가 존재하여 자외선에 의해 색소침착이 유도된다. Snell²⁵⁾은 brown guinea pig에 자외선을 조사하여 멜라닌세포 내 멜라닌색소 양의 증가, 멜라닌세포 수와 크기의 증가 및 수지상돌기가 길고 넓어지는 현상을 관찰하였다. 자외선에 의해 생성된 색소침착 부위의 색소탈설은 i) tyrosinase, tyrosinase related protein-1(TRP1), tyrosinase related protein-2(TRP2), peroxidase의 전사 및 활성 조절, ii) 멜라노솜의 각질형성 세포로의 이동 및 각질형성세포에서의 분배 조절, iii) 멜라닌과 멜라노솜의 분해와 색소화 된 각질형성세포의 tum-over 조절에 의해 성취될 수 있다.⁶⁾ UVB 조사로 멜라닌 색소침착이 유도된 brown guinea pig 피부에 대한 백지 열수추출물의 미백 효과를 육안적으로 비교한 결과, 시료도포 3주까지는 모든 군에서 멜라닌 색소침착의 변화가 관찰되지 않았다. 시료도포 4주에는 양성대조군과 실험군에서 색소침착 정도가 부분적으로 없어지는 현상이 확인되었다. 실험 6주부터는 용매대조군에 비해 양성대조군과 실험군의 색소침착 부위가 전반적으로 줄어들음을 확인하였고, 7주부터는 색소침착 부위가 현저하게 줄어들음을 관찰하여 백지 열수 추출물의 미백 효과를 육안으로 확인하였다(Fig. 1).

Fig. 1. Gross observation on depigmenting effect in brown guinea pig skin treated with *Angelicae dahuricae* Radix water extract for 8 weeks. A: before treatment B: after 8-week treatment, C: UVB irradiation + non-treatment group, VC: UVB irradiation + vehicle [propylene glycol: ethanol: water (5:3:2)] application group, PC: UVB irradiation + 2% hydroquinone application group E: UVB irradiation + 2% *Angelicae dahuricae* Radix water extract (ADWE) application group.

최근에 Park 등²⁶⁾도 1%와 2% 백차 열수추출물을 brown guinea pig 피부에 8주간 도포한 결과 육안적으로 확인한 미백효과가 있음을 보고한바 있다.

2. 멜라닌 지수 변동

피부에서 반사되는 빛을 측정하는 기구로 사용되는 mexameter는 660 nm와 880 nm에서 빛을 방출하는 기기로 녹색광과 적색광을 피부에 5 mm 크기로 방출한 후 반사되는 광선을 감지하여 멜라닌 색소지수를 측정한다.²⁷⁻²⁸⁾ 멜라닌 색소침착 정도의 변화를 객관적으로 분석하기 위하여 mexameter를 사용하여 비침습적 방법으로 멜라닌 지수를 측정한 결과, 시료도포 시작 후 모든 군에서 멜라닌 색소침착 정도는 경시적으로 감소하였으며, 용매대조군에 비해 양성대조군은 실험 전 기간 동안 멜라닌 지수가 낮았고 실험군은 실험 3주부터 낮아지기 시작하였다. 실험 6주에 양성대조군과 실험군은 용매대조군에 비해 각각 약 4.0%, 2.6% 낮았으며 실험 8주에는 양성대조군과 실험군은 용매대조군에 비해 각각 7.2%, 5.6% 낮게 나타나 육안적 관찰에 부합하는 결과를 확인할 수 있었다(Table 1). Park 등²⁶⁾의 연구에서는 실험 8주에 양성대조군(2% 하이

Table 1. Changes in melanin index of brown guinea pig skin in 8-week experiment

Weeks	Control		Experimental
	VC	PC	E
0	665.0±49.1 ^a	652.0±50.3 ^a	668.0±81.3 ^a
1	659.0±49.2 ^a	647.3±49.2 ^a	661.0±83.0 ^a
2	648.6±52.2 ^a	641.8±45.6 ^a	651.0±82.0 ^a
3	630.3±46.5 ^a	615.0±42.9 ^a	618.8±84.0 ^a
4	607.3±47.6 ^a	594.0±35.0 ^a	596.5±80.9 ^a
5	583.0±44.1 ^a	565.3±32.3 ^a	573.8±84.4 ^a
6	559.5±43.0 ^a	537.0±39.6 ^a	545.0±80.7 ^a
7	537.5±78.4 ^a	507.7±36.6 ^a	515.3±78.4 ^a
8	517.0±46.6 ^a	479.7±37.7 ^a	488.3±79.8 ^a

Values are the means±SD of 5 samples.

Unit: AU (Arbitrary Unit)

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

PC: UVB irradiation + 2% hydroquinone application group
E: UVB irradiation + 2% *Angelicae dahuricae* Radix water extract (ADWE) application group

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

Fig. 2. Histological observation on brown guinea pig skin treated with *Angelica dahurica* Radix water extract for 8 weeks. H&E stain, $\times 200$, scale bar 250 μm . N: Non-treatment group, VC: UVB irradiation + vehicle [propylene glycol: ethanol: water (5:3:2)] application group, PC: UVB irradiation + 2% hydroquinone application group, E: UVB irradiation + 2% *Angelica dahurica* Radix water extract (ADWE) application group.

드로 퀴논)과 2% 백차 열수추출물의 경우 용매대조군에 비해 각각 10.4%, 10.7% 낮은 수치를 나타내 백차 열수추출물이 매우 우수한 미백효과를 가지고 있음을 확인하였다.

3. 표피 및 진피조직의 변화

광노화시 표피세포는 DNA, RNA, 단백질의 합성 및 핵분열의 증가로 과각화증 및 표피가 두꺼워지는 경향을 보이고 각질형성세포의 배열이 불규칙적이고 모양이 비정상적으로 변화한다.²⁹⁾ 피부손상, 염증, 표피와 진피 변화 등을 알아보기 위해 수행한 H&E 염색결과 용매대조군에서는 표피의 비후가 경미하게 나타난 반면, 백지 열수추출물 도포군에서는 별다른 이상 소견을 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

4. 멜라닌색소 침착 조직학적 비교

F-M 염색은 악성 흑색종의 병리학적 진단 및 멜라닌 색소를 염색하여 피부 색소침착 정도를 관찰하는데 이용되고 있다.^{24,30)} 자외선으로 인한 피부색소침착은 즉시

색소침착(immediate pigment darkening, IPD)과 지연 색소침착(delayed tanning, DT)의 형태로 일어난다. 즉시 색소침착은 주로 UVA에 의해 유발되는 색소침착으로 자외선 노출 정도에 따라 수분에서 수일 후 까지 나타나는데, 이는 피부 내에 이미 존재하고 있는 멜라닌이 광학적 반응을 일으켜 유발된다.³¹⁾ 지연 색소침착은 주로 UVB에 의해 유발되고 자외선 노출 후 3-4일 내에 표출되어 10일에서 3-4주 후에 가장 높게 나타난다. 지연형 색소침착은 염증과 화상을 동반하며 멜라닌을 합성하는 효소인 tyrosinase의 활성화와 melanosome 합성을 증가시켜 새로운 멜라닌 생성을 유발한다.⁷⁾

UVB 조사에 의해 유발된 brown guinea pig의 표피 내의 멜라닌색소 침착정도와 분포양상을 알아보기 위해 F-M 염색을 하여 현미경으로 관찰한 결과, 실험 8주에 용매대조군은 멜라닌 과립의 생성 및 분포 정도가 정상군(자외선 비조사군)에 비해 증가하였고, 멜라닌 과립이 기저층(stratum basal)에서 각질층까지 골고루 분포 되어 나타났다. 실험군의 경우 용매대조군에 비해 멜라닌색소 침착량이 현저하게 적었고 표피내 멜

Fig. 3. Histological observation on depigmenting effect in brown guinea pig skin treated with *Angelicae dahuricae* Radix water extract for 8 weeks. F-M stain, $\times 400$, scale bar 250 μm . PC and E groups showed obviously lower melanin pigmentation in skin epidermis than the VC group. Groups are the same as described in Fig. 2.

Table 2. Comparison of melanin pigmentation in brown guinea pig skin epidermis treated with test compounds topically for 8 weeks

Area	Normal	Control		Experimental
	N	VC	PC	E
Total (μm^2)	6489.8 $\pm$ 460.3	7128.7 $\pm$ 558.4	7108.9 $\pm$ 204.0	7035.0 $\pm$ 322.8
Melanin pigment (μm^2)	268.1 $\pm$ 29.0	1275.7 $\pm$ 40.4	386.7 $\pm$ 37.1	510.0 $\pm$ 33.5
% of melanin pigment	2.7 $\pm$ 0.5 ^a	16.2 $\pm$ 1.9 ^c	4.0 $\pm$ 0.4 ^a	5.9 $\pm$ 0.6 ^b

Values are the means $\pm$ SD of 5 samples.

N: Non-treatment group

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

PC: UVB irradiation + 2% hydroquinone application group

E: UVB irradiation + 2% *Angelicae dahuricae* Radix water extract (ADWE) application group

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

라닌 과립 분포는 양성대조군과 비슷한 양상으로 관찰되었다(Fig. 3). 표피 내 멜라닌 색소 침착정도를 보다 객관적으로 분석하기 위하여 영상분석을 통해 측정면적 대비 멜라닌 색소 침착면적 비(%)로 수치화하였다. 용매대조군(16.2%)은 정상군(2.7%)에 비해 유의하게 높은 수치를 보임으로써 UVB가 멜라닌 색소생성에 효과적임을 확인할 수 있었고, 양성대조군과 2% 백지 열수

추출물 도포군은 각각 4.0%, 5.9%로 용매대조군에 비해 유의하게 낮은 수치를 나타냈다(Table 2). 이와 같은 결과는 백지 열수추출물이 멜라닌색소 생성을 억제시키는 효과를 가지고 있는 것으로 해석된다.

5. 멜라닌세포 생성 조직학적 비교

S-100 단백질은 멜라닌세포, 랑게르한스세포 등에서

Fig. 4. Histological observation on depigmenting effect in brown guinea pig skin treated with *Angelicae dahuricae* Radix water extract for 8 weeks. S-100 immunohistochemical stain, $\times 400$, scale bar 250 μm . PC and E groups showed obviously lower production of melanocytes in skin epidermis than the VC group. Groups are the same as described in Fig. 2.

Table 3. Comparison of S-100 protein expression in brown guinea pig skin epidermis treated with test compounds topically for 8 weeks

Area	Normal	Control		Experimental
	N	VC	PC	E2
Total (μm^2)	6183.8 $\pm$ 397.3	7386.8 $\pm$ 410.8	7378.9 $\pm$ 215.5	7231.9 $\pm$ 262.8
S-100 protein (μm^2)	223.7 $\pm$ 28.3	885.1 $\pm$ 73.9	209.7 $\pm$ 39.3	448.6 $\pm$ 40.7
% of S-100 protein	1.8 $\pm$ 0.4 ^a	10.2 $\pm$ 2.2 ^c	3.0 $\pm$ 0.6 ^a	4.6 $\pm$ 0.5 ^b

Values are the means $\pm$ SD of 5 samples.

Groups are the same as described in Table 2.

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

관찰되며, 이들 세포로부터 유래한 암 및 멜라닌세포 생성의 변화 등을 연구하는데 널리 사용되는 멜라닌세포에 대한 민감한 지표이다.^{24,32)} UVB가 조사된 brown guinea pig 피부에서 멜라닌세포의 수는 멜라닌과 함께 증가되어 색소침착이 일정하게 배열되어 분포되었다는 보고가 있고,³³⁾ Choi 등²⁴⁾은 S-100 단백질이 위치한 멜라닌세포는 서로 밀착되어 강하게 염색되는데 이는 시료가 독성이 없음을 의미한다고 해석하였다.

S-100 단백질 발현을 통하여 멜라닌세포의 생성정도와 분포양상을 간접적으로 관찰한 결과, 용매대조군은

정상군에 비해 멜라닌세포가 주로 기저층에 밀집되어 많이 관찰되었고, 양성대조군과 백지 열수추출물 도포군은 용매대조군에 비해 멜라닌세포수가 현저하게 감소하였다(Fig. 4). 표피 내 멜라닌세포 생성정도를 보다 객관적으로 분석하기 위하여 영상분석을 통해 측정면적대비 S-100 단백질의 발현면적 비(%)로 수치화하였다. 용매대조군(10.2%)은 정상군(1.8%)에 비해 유의하게 높은 수치를 보인 반면, 양성대조군과 2% 백지 열수추출물 도포군은 각각 3.0%, 4.6%로 용매대조군에 비해 유의하게 낮은 수치를 나타냈다(Table 3). 이러한

결과는 백지 열수추출물이 멜라닌세포 생성을 억제하는데 기인 한 것으로 해석된다.

IV. 결 론

본 연구는 백지 열수추출물의 미백효과를 알아보기 위해 brown guinea pig(450~550 g)의 등 부위에 1500 mJ/cm² 광량의 UVB 조사로 유발시킨 인공색소반에 1 일 2회, 주 5일, 매회 30 μ L씩 총 8주간 시료를 도포하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 2% 백지 열수추출물(실험군), 2% 하이드로퀴논(양성대조군), 용매대조군 간에 미백효과를 육안적으로 비교 관찰한 결과, 실험군과 양성대조군은 용매대조군에 비해 멜라닌 색소침착 정도가 점차적으로 떨어져 도포 8주에는 확연한 미백효과를 확인할 수 있었다.

2. Mexameter 기기를 이용한 멜라닌 지수 측정에서, 실험군은 양성대조군에 비해 약간 높게 나타났지만, 용매대조군에 비해서는 현저한 감소를 나타냈다.

3. 피부조직의 변화양상을 관찰하기 위한 H&E 염색 결과, 용매대조군의 표피는 약간의 비후를 보였으나, 백지 열수추출물 도포군의 피부조직은 뚜렷한 이상소견을 나타내지 않았다.

4. 멜라닌 색소침착 정도와 분포양상을 알아보기 위한 F-M 염색 결과, 백지 열수추출물 도포군은 용매대조군에 비해 멜라닌 색소침착 정도가 현저하게 감소하였다. 영상분석 소프트웨어를 이용한 멜라닌색소 침착 정도를 수치화한 분석에서, 양성대조군과 백지 열수추출물 도포군은 용매대조군에 비해 유의하게 낮은 수치를 보였다.

5. S-100 단백질 발현 정도를 통하여 멜라닌세포의 생성 정도를 간접적으로 관찰한 결과, 양성대조군과 백지 열수추출물 도포군은 용매대조군에 비해 멜라닌세포의 생성이 현저하게 적었다. 영상분석 소프트웨어를 이용한 멜라닌세포 생성 정도를 수치화한 분석에서, 양성대조군과 백지 열수추출물 도포군은 용매대조군에 비해 유의하게 낮은 수치를 보였다.

이와 같은 결과를 통하여 백지 열수추출물은 하이드로퀴논보다 약간 뒤지지만 양호한 미백효과를 가지고 있음을 확인하였다.

감사의 글

이 연구는 2008년도 2학기 계명대학교 대학원 학생 학술연구 장학금 지원에 의해 연구되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Choi, W. H., Ann, H. S., Choi, T. Y., Jin, S. Y., Ahn, R. M. : Effects of natura extracts on UVB-induced pigmentation and inflammation in C57BL/6 mouse skin. *Korean Journal of Environmental Health Science*, **32**(5), 492-498, 2006.
2. Lee, M., Yi, S. Y., Ahn, H. S., Ahn, R. M. : Lipid peroxidation and antioxidase activities on Hairless mouse induced by UVB irradiation and effects of tannic acid. *Korean Journal of Environmental Health Science*, **22**(4), 102-108, 1996.
3. Park, S. N. : Skin aging and oxygen species. *Journal of Cosmetic Science*, **23**(1), 75-132, 1997.
4. Lee, E. H., Lee, J. K., Hong, J. T., Jung, K. M., Kim, Y. K., Lee, S. E., Chung, S. Y., Lee, Y. W. : Protective effect Green Tea extract catechin on UVB-induced skin damage. *Journal of Food Hygiene and Safety*, **16**(2), 117-124, 2001.
5. Park, Y. I. : The effect of modified yeonryeonggobondan on skin care (Focused on anti-oxidant, reducing melanogenesis, anti-inflammation and anti-bacteria). Dept. of Oriental Medicine, Graduate School of Sangji University, 2006.
6. Briganti, S., Camera, E., Picardo, M. : Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Research*, **16**(2), 101-110, 2003.
7. Agar, N. and Young, A. R. : Melanogenesis : a photoprotective response to DNA damage? *Mutation Research*, **571**(1), 121-132, 2005.
8. Maeda, K., Fukuda, M. : In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *Journal of the Society Cosmetic Chemists*, **42**(6), 361-368, 1991.
9. Schrodde, J. : Cytokine networks in the skin. *Journal of Investigative Dermatology*, **105**(1), 20-24, 1995.
10. Jang, H. K., Roh, S. S. : Depigmentation activity of many herb. Dept. of Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology, College of Oriental Medicine, Daejeon University, **13**(2), 289-302, 2004.
11. Kobayashi, T., Imokawa, G., Bennett, D. C., Hearing, V. J. : Tyrosinase stabilization by Tyrpl(the brown locus protein). *Journal of Biological Chemistry*, **273**(48), 3180-3185, 1998.
12. Terasaka, H., Takayama, F., Satoh, K., Fujisawa, S., Sakagami, H. : Effect of antioxidants on radical intensity and cytotoxicity of hydroquinone. *Anticancer Research*, **20**(5), 3357-3362, 2000.
13. Cabanes, J., Chazarra, S., Garcia-Carmona, F. : Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a show binding inhibitor of cathecolase activity of tyrosinase. *Journal of Pharmacology*, **46**(12), 982-985, 1994.
14. Sugimoto, K., Nishhura, T., Nomura, K., Kuriki, T. : Inhibitory effects of alpha arbutin on melanin synthesis in cultured human melanoma cells and a three-dimensional human skin model. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **27**(4), 510-514, 2004.

15. Aburjai, T., Natsheh, F. M. : Plants used in cosmetics. *Phytotherapy Research*, **17**(9), 987-1000, 2003.
16. Kim, S. H., Kang, S. S., Kim, C. M. : Coumarin glycosides from the roots of *Angelica dahurica*. *Archives of Pharmacological Research*, **15**(1), 73-77, 1992.
17. Pae H. O., Oh, H. C., Yun, H. C., Oh, Y. G., Jang, G. S., hwang, S. I., Kwon, K. M., Lee, T. O., Chung, H. T. : Imperatorin, a furanocoumarin from *Angelica dahurica*, induces cytochrome c-dependent apoptosis in human promyelocytic leukaemia, HL-60 cells. *Pharmacology and Toxicology Journal*, **91**(1), 40-48, 2002.
18. Wang, N. H., Yoshiazaki, K., Baba, K. : Seven new bifuranocoumarins, dahuribirin A-G, from Japanese Bai Zh. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **49**(9), 1085-1088, 2001.
19. Jin, M. H., Jung, M. H., Lim, Y. H., Lee, S. H., Kang, S. J., Cho, W. G. : Promoting synthesis of collagen from *Angelica dahurica* root. *Korean Journal of Pharmacognosy*, **35**(4), 315-319, 2004.
20. Yang, S. L., Jang, S. M., Kim, N. W. : Antioxidative activity and physiological function of the *Angelica dahurica* root. *Journal of Food Science and Nutrition*, **36**(1), 20-26, 2007.
21. Kim, C. M., Kwon, Y. S., Chio, S. Y. : Antithrombotic effect of the BuOH soluble fraction of *Angelica dahurica* root. *Korean Journal of Pharmacognosy*, **26**, 74-77, 1995.
22. Bolognia, J. L., Murray, M. S., Pawelek, J. M. : Hairless pigmented guinea pigs : a new model for the study of mammalian pigmentation. *Pigment Cell Research*, **3**(3), 150-156, 1990.
23. Yoshida, M., Hirotsu, S., Nakahara, M., Uchiwa, H., Tomita, Y. : Histamine is involved in ultraviolet B-induced pigmentation of guinea pig skin. *Journal of Investigative Dermatology*, **118**(2), 255-260, 2002.
24. Choi, S. Y., Kim, S. H., Hwang, J. S., Lee, B. G., Kim, H. C., Kim, S. Y. : Benzylamide derivative compound attenuates the ultraviolet B-induced hyperpigmentation in the brownish guinea pig skin. *Biochemical Pharmacology*, **67**, 707-715, 2004.
25. Snell, R. S. : The effect of ultraviolet irradiation on melanogenesis. *Journal of Investigative Dermatology*, **40**, 127-132, 1963.
26. Park, E. Y., Lee, T. J., Kim, Y. C. : Effects of white tea water extract on skin whitening using in vivo test. *Journal of Korean Society of Cosmetology*, **15**(2), 602-610, 2009.
27. Clarys, P., Aleqaeters, K., Lambrecht, R., Barel, A. O. : Skin color measurements: comparison between three instruments: the chromameter, the dermaspectrometer and the mexameter. *Skin Research and Technology*, **6**(4), 230-238, 2000.
28. Kang, S. K., Park, J. S., Kim, K. R. : A study on the association of the facial skin erythema index and melanin index and the general factors, *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, **13**(2), 507-513, 2007.
29. Pathak, M. A., Fitzpatrick, T. B. : Preventive treatment of sunburn, dermatoheliosis, and skin cancer with sun protective agents. *Dermatology in general medicine*. New York McGraw-Hill. 1689-1717, 1993.
30. Masson, P. : Carcinoids (Argentaffin-cell tumors) and nerve hyperplasia of the appendicular mucosa. *American Journal of Pathology*, **4**(3), 181-211, 1928.
31. Agar, N., Young, A. R. : Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage?. *Mutation Research*, **571**(1), 121-132, 2005.
32. Kahn H. J., Baumil, R., Marks, A. : The value of immunohistochemical studies using antibody to S-100 protein in dermatopathology. *Journal of Investigative Dermatology*, **21**, 38-44, 1984.
33. Megumi, T., Haratake, A., Kaminaga, H., Nakahara, M., Komiya, A., Koishikawa, H., Uchiwa, H., Kawa, Y., Mizoguchi, M. : Pigmentation in intrinsically aged skin of A1 guinea pigs. *Pigment Cell Research*, **17**(6), 651-658, 2004.