

SK-MEL-2 세포에서 靑蒿 추출물의 Melanin 생성, Tyrosinase 활성과 생성, MMP-1 및 MMP-9 생성 억제 효과

동신대학교 한의과대학 한방부인과교실
이은규, 김수현, 박경미, 양승정, 조성희

ABSTRACT

Inhibitory Effect of *Artemisiae Annuae Herba* Extracts on Melanin Synthesis, Tyrosinase Activities and Production Levels of Tyrosinase, MMP-1 and MMP-9 in SK-MEL-2 Cells

Eun-Kyu Lee, Soo-Hyeon Kim, Kyung-Mi Park,
Seung-Jeong Yang, Seong-Hee Cho
Dep. of Korean Gynecology and Obstetrics,
College of Korean Medicine, Dong-Shin University

Objectives: *Artemisiae Annuae Herba* is the dried aerial part of *Artemisia annua* L. (AAL). In Oriental medicine, *Artemisiae Annuae Herba* (AAH) is traditionally used to treat fever. AAH clears summerheat or damp-Heat, clears deficiency fevers, cools the blood and stops bleeding, stops malarial disorders and relieves heat, clears liver heat and brightens the eyes. Recently, there were many studies about effects of AAH on anti-oxidative, anti-inflammatory, anti-cancer, hair growth and plasma lipid composition. So, we expected AAH has an availability that can effect on skin whitening and elasticity.

Methods: The present study was designed to investigate the effects of AAH on skin whitening and elasticity in SK-MEL-2 cells. In this experiment, the effects of AAH on proliferation rates, melanin synthesis, tyrosinase activities and production levels of tyrosinase, MMP-1 and MMP-9 *in vitro* were examined.

Results: AAH did not affect viability of SK-MEL-2 cells and inhibited melanin synthesis induced by α -Melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) significantly. In addition, AAH also inhibited tyrosinase activity and lowered tyrosinase level in SK-MEL-2 cells. Finally, AAH inhibited productions of Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9).

Conclusions: These data suggest that AAH can be used to treat patients with skin diseases such as freckled face and also used as skin whitening agent.

Key Words: *Artemisiae Annuae Herba* (AAH), *Artemisia Annua* L. (AAL), Melanin, MMP, Tyrosinase

I. 서론

피부는 신체의 노화와 마찬가지로 연령의 증가에 따라 피부 기능이 저하되어 피부 탄력의 저하, 혈관의 확장, 주름 등 다양한 증상으로 나타난다.¹⁾ 그리고, 이러한 원인은 나이가 들어감에 따라 자연히 발생하는 시간 의존적인 내인적 노화와 자외선 노출 등 주위환경에 의해 유발되는 외인적 노화로 나눌 수 있다. 에스트로겐(estrogen)이 피부 진피층에 있는 섬유아세포를 자극하여 콜라겐(collagen) 합성을 증진시키며, 아울러 콜라겐 대사에 관여하는 분해효소인 기질금속단백질 분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)의 발현을 조절하여 콜라겐 분해를 억제한다. 따라서 나이가 들어감에 따라 에스트로겐의 생성이 감소되면 내분비성 노화가 촉진 되어 주름살이 급격히 늘어나게 된다²⁻⁴⁾.

양방에서는 피부 미백 및 주름 개선을 위하여 합성 비타민 유도체인 tretinoin이나 0.1% retinoic acid 연고 도포법, trichloroacetic acid(TCA)나 alphahydroxy acid(AHA)을 이용한 화학 박피술, 이산화탄소 혹은 에르븀(Erbium) 레이저를 이용한 레이저 박피술, 액체질소나 고체 이산화탄소를 이용한 냉동요법, 고주파 등이 시도 된다⁵⁾.

한의학계에서는 미소안면침, 정안침, 매선침 등과 같은 안면미용침술이 이루어지고 있고⁶⁾ 천연물에 대한 연구로는 강⁷⁾이 三白草가 피부노화 억제에 작용하는 효능을 연구하였고, 유 등⁸⁾은 엉겅퀴 추출물이, 석 등⁹⁾은 골담초 추출물이 피부미백에 미치는 효과를, 이¹⁰⁾는 白芍

藥이, 박 등¹¹⁾은 五倍子が, 양 등¹²⁾은 連翹가 피부미백 및 주름에 미치는 영향에 관한 연구결과를 보고하였다.

靑蒿(*Artemisiae Annuae Herba*)는 국화과(菊花科: Compositae)에 속한 개똥쑥 또는 개사철쑥의 지상부로, 性味가 苦辛寒하고 肝·膽 二經에 들어가 清熱涼血 除蒸 絕癰하는 효능이 있다. 주요 성분으로는 artemisinin, arteanuin B, scopoletin, coumarin, eupatin 이 알려져 있다¹³⁾. 최근에는 靑蒿의 항산화 및 항암 효과¹⁴⁾, 항염 및 상처치유 작용¹⁵⁾, 育毛 작용¹⁶⁾, 혈청 지질 조성 개선 작용¹⁷⁾, 기능성 성분 중 artemisinin의 항말라리아¹⁸⁾ 작용이 입증 되었다. 주요 성분 중 scopoletin은 멜라닌 합성 조절과 광노화 개선 효과¹⁹⁾가 있음에도 불구하고 靑蒿가 피부 미백이나 항노화에 작용하는 효과에 관한 연구는 전무한 실정이다. 이에 기존 연구 결과를 바탕으로 靑蒿가 피부 미백 및 탄력 유지에 도움을 줄 수 있을 것이라 사료되어 본 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 靑蒿의 피부 미백 효과를 *in vitro*에서 알아보기 위하여 인간 유래 melanoma(악성 흑색종) 세포주인 SK-MEL-2 세포에 靑蒿를 처리하고 세포독성, 멜라닌 생성량, tyrosinase activity 및 tyrosinase의 발현량에 미치는 영향을 살펴보고, 탄력 유지에 미치는 영향을 살펴보기 위해 Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 및 Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)에 미치는 영향을 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

인간 유래 melanoma 세포주인 SK-MEL-2 세포는 한국세포주은행(서울, 한국)에서 냉동된 상태로 구매하여 사용하였으며, 2주 이상 계대 배양하여 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 靑蒿는 개똥쭉(*Artemisia annua* L.)의 지상부로 동신대학교 부속 광주한방병원을 통하여 구입 정제하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

멜라닌 세포의 자극을 위하여 사용된 α -Melanocyte-stimulating hormone(α -MSH)와 tyrosinase 활성 측정을 위한 tyrosinase 및 L-DOPA는 Sigma(Sigma-Aldrich, USA)로부터 구매하여 사용하였으며, MMP-1 및 MMP-9에 대한 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit는 AB cam 사(AB cam, UK)의 제품을 사용하였다. 흡광도 측정을 위해 사용된 기기는 Micro-plate reader(Bio-rad, CA)이며, 시료의 조제를 위하여 원심 분리기(Vision, 한국), 감압농축기(EYELA, Japan), 동결건조기(삼원, 한국)가 사용되었다.

2. 방법

1) 약물의 준비

건조되고 세절된 상태로 구입된 靑蒿 50 g을 70% 에탄올 1,000 ml에 침지시키고 15분간 초음파로 진탕해준 다음, 상온에서 24시간 추출하였으며, 모아진 추출액을 원심분리하여 찌꺼기는 버리고

상층액을 모은 다음, 와트만지(Watman paper)를 이용하여 2회 반복 여과 하였다. 여과가 끝난 추출액은 감압농축기(EYELA, Japan)를 이용하여 감압 농축된 다음 동결 건조 되었다. 최종적으로 얻어진 동결 건조 분말(*Artemisiae Annuae Herba*, AAH)은 4.2 g으로 수율은 8.4%였으며, 실험에 사용될 때까지 냉동 보관 되었다.

2) 세포 배양

인간 유래 melanoma 세포주인 SK-MEL-2 세포의 생육 배지로는 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 배지에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)와 penicillin-streptomycin(100 units/ml, 100 μ g/ μ l, Sigma, USA)를 첨가하여 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 유지되었다.

3) 세포 증식률에 미치는 영향

AAH가 SK-MEL-2 세포의 증식률에 미치는 영향을 MTT assay를 이용하여 확인하였다. 간략히 정리하면, 24-well plate에 5×10^5 cell/well의 농도로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 환경에서 overnight incubation을 시행하였다. 다음날, 0~400 μ g/ml 농도의 AAH를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간의 배양이 끝난 후 배양액을 제거하고 인산완충액으로 가볍게 씻어낸 다음, 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT)를 처리하고 다시 4시간을 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 각 well에 생성된 formazan결정을 dimethylsulfoxide에 녹인 다음 Microplate reader(Bio-rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Melanin 생성량 측정

Melanin 생성량 측정은 Pintus 등²⁰⁾의 방법에 따라 수행되었다. 간략히 정리하면, 24-well plate에 5×10^5 cell/well의 농도로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 환경에서 overnight incubation을 시행하였으며, 다음날, 0~200 µg/ml 농도의 AAH와 10 nM의 α-MSH를 처리하고 24시간을 배양하였다. 배양이 끝난 후, Microplate reader (Bio-rad, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 생성 억제 효과는 α-MSH 만을 처리한 군의 흡광도에 대한 비율(%)로 나타내었다.

5) Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성의 측정은 Yagi 등²¹⁾의 방법에 따라 측정하였다. Tyrosinase 활성 측정을 위하여 0~200 µg/ml 농도의 AAH(200 µl)와 함께 175 mM phosphate buffer(pH 6.8) 200 µl에 1 mM L-DOPA 100 µl 및 mushroom tyrosinase(96 U/ml) 100 µl를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome은 475 nm파장에서 측정하였다. Tyrosinase 활성은 다음에 제시한 공식에 의하여 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase activity (\%)} = \frac{(A-B)-(C-D)}{(A-B)} \times 100$$

A : AAH가 없이 L-DOPA와 tyrosinase를 첨가하고 2분 동안 배양한 후의 측정값

B : AAH가 없이 L-DOPA와 tyrosinase를 첨가하고 배양전의 측정값

C : AAH와 L-DOPA, tyrosinase를 모두 첨가하고 2분 동안 배양한 후의 측정값

D : AAH와 L-DOPA 및 tyrosinase를 모두 첨가하고 배양전의 측정값

6) Western blot analysis

SK-MEL-2 세포 내에서 tyrosinase의 생성량을 측정하기 위하여 western blot

analysis를 시행하였다. 먼저 100 mm dish (SPL, 한국)에 5×10^6 cell/well의 농도로 세포를 분주하고 overnight incubation을 시행하였다. 다음 날, 0~200 µg/ml 농도의 AAH와 10 nM의 α-MSH를 처리하고 24시간을 배양한 다음 배양액을 제거하고, 세포를 수거하였다. 수거된 세포는 3,000 rpm에서 5분간 원심분리된 다음 cell lysis buffer(Intron, 한국)을 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Bicinchoninic acid(BCA)법을 이용해 정량된 다음 40 µg의 단백질을 SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 polyvinylidene fluoride membrane으로 옮긴 다음 anti-human tyrosinase antibody(1: 1,000, AB cam, UK)와 함께 overnight incubation을 시행하였다. 다음 날, membrane을 간단히 수세하고 horseradish conjugated anti-Rabbit IgG(1: 10,000, Santa Cruz, USA)와 함께 실온에서 2시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 간단히 수세하고, SuperSignal West-Femto(Pierce, USA)를 이용하여 발색하여 chemiluminescence method(ECL kit, Amersham, UK)를 이용하여 분석하였다.

7) MMP-1 및 MMP-9 생성 농도 측정

SK-MEL-2 세포의 MMP-1 및 MMP-9 생성량은 각각의 ELISA kit(AB cam, UK)를 이용하여 측정되었다. 간단히 정리하면, 24-well plate에 5×10^5 cell/well의 농도로 분주하고 37°C, 5% CO₂ 환경에서 overnight incubation을 시행하였으며, 다음날, 0~200 µg/ml 농도의 AAH와 10 nM의 α-MSH를 처리하고 24시간을 배양하였다. 배양이 끝난 후, 배양액을 조심스럽게 수거하여 3,000 rpm에서 5분간

원심분리 한 후 상층액을 얻어 MMP-1 과 MMP-9의 농도를 측정하였으며, 모든 실험 과정은 제조사에서 제시한 가이드라인에 따라 수행되었다. 실험과정을 간단히 소개하면, 먼저 100 μ l의 배양액을 kit에 포함되어 있는 96-well plate에 분주하고 overnight incubation을 시행한 다음, wash buffer로 간단히 수세하고, 100 μ l의 Biotinylated MMP-1 또는 MMP-9 detection antibody를 분주하고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간의 반응이 끝나고 간단히 수세해준 다음, 100 μ l의 HRP-Streptavidin solution을 넣고 45분간 반응시킨 후, 반응액을 제거하였다. 마지막으로 100 μ l의 TMB one-step substrate reagent를 넣고 실온에서 30분간 반응시킨 후, 50 μ l의 stop solution을 넣은 다음, Microplate reader(Bio-rad, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 통계 처리

실험 자료에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 SAS(The SAS System for Windows, ver. 6.12, SAS Institute, USA)를 이용하였다. 실험 성적은 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었으며, 각 실험군 간 평균의 차이를 검정할 때에는 Student's *t*-test로 검정하여 *p*-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 성 적

1. 세포 증식률에 미치는 영향

AAH의 독성을 확인하고 향후 연구에 사용할 적정 농도를 알아보기 위해 AAH

를 SK-MEL-2 세포에 처리하고 세포 증식률에 미치는 영향을 살펴본 결과 최고농도 400 μ g/ml까지 특별한 세포 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1).

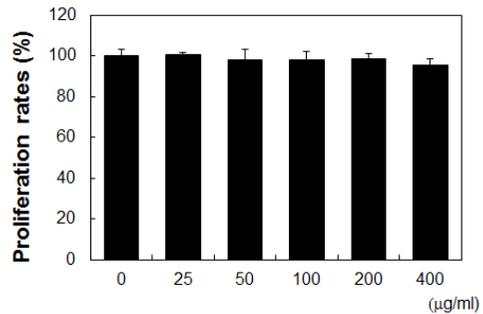


Fig. 1. Effects of AAH on proliferation rates in SK-MEL-2 cells.

The effects of AAH on proliferation rates were measured using MTT method.

2. 멜라닌 생성량에 미치는 영향

10 nM의 α -MSH를 처리한 대조군에서 아무것도 처리하지 않은 군에 비하여 4배 이상의 멜라닌 생성량의 증가가 관찰되었으며, 100 μ g/ml 이상의 AAH 처리는 α -MSH 처리에 의하여 증가되는 멜라닌 생성을 유의한 수준으로 억제하였다(Fig. 2).

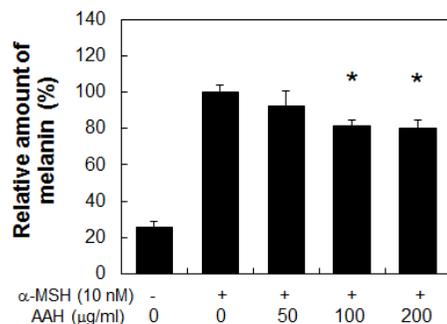


Fig. 2. Effects of AAH on melanin production in SK-MEL-2 cells.

α -MSH : α -Melanocyte-stimulating hormone, AAH : *Atremisiae Annuae Herba*

**P*<0.05 compared with CTL group (first graph).

3. Tyrosinase 활성도에 미치는 영향

아무것도 처리하지 않은 군을 100%로 했을 때 50, 100, 200 µg/ml 농도의 AAH를 처리한 결과 각각 92.1±5.7, 85.9±4.8, 78.1±9.6%로 모두에서 유의한 수준의 tyrosinase 활성 억제 효과가 나타났으며, AAH의 tyrosinase 활성 억제 효과는 농도 의존적이었다(Fig. 3).

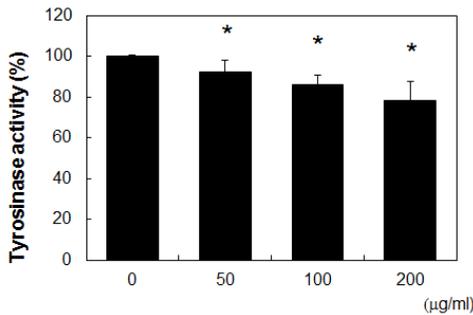


Fig. 3. Effects of AAH on tyrosinase activity in SK-MEL-2 cells.

The effects of AAH on tyrosinase activities were measured using spectrophotometric analysis. *P<0.05 compared with CTL group (first graph)

4. Tyrosinase 생성량에 미치는 영향

SK-MEL-2 세포 내에서 α-MSH의 자극에 의하여 증가되는 tyrosinase의 생성량에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 western blot 분석법을 사용하였다. 본 연구의 결과에서 AAH의 투여는 α-MSH의 자극에 의하여 증가되는 tyrosinase의 생성량을 농도 의존적으로 감소시키는 경향을 보였다(Fig. 4).

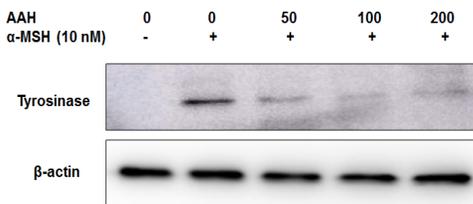


Fig. 4. Effects of AAH on amount of tyrosinase in SK-MEL-2.

Total amount of tyrosinase was measured

using western blot analysis.

α-MSH : α-Melanocyte-stimulating hormone.

AAH : *Atremisiae Annuae Herba*

5. MMP-1 생성량에 미치는 영향

콜라겐의 분해에 관여하는 MMP-1의 생성에 미치는 영향을 살펴본 결과 멜라닌세포 자극 호르몬에 의해 대폭 증가한 MMP-1의 생성량은 100 µg/ml 이상의 AAH 처리에 의해 유의한 수준으로 감소되었으며, 반응 양상은 농도 의존적이었다(Fig. 5).

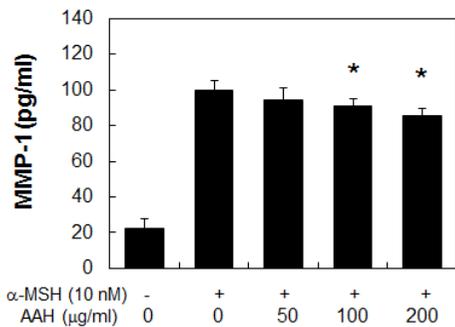


Fig. 5. Effects of AAH on MMP-1 production in SK-MEL-2 cells.

α-MSH : α-Melanocyte-stimulating hormone.

AAH : *Atremisiae Annuae Herba*

*P<0.05 compared with CTL group (first graph)

6. MMP-9 생성량에 미치는 영향

MMP-1과 함께 콜라겐의 분해에 관여하는 MMP-9의 생성에 미치는 영향을 살펴본 결과 α-MSH에 의해 대폭 증가한 MMP-1의 생성량은 200 µg/ml의 AAH 처리에 의해 유의한 수준으로 감소되었으며, 반응 양상은 농도 의존적이었다(Fig. 6).

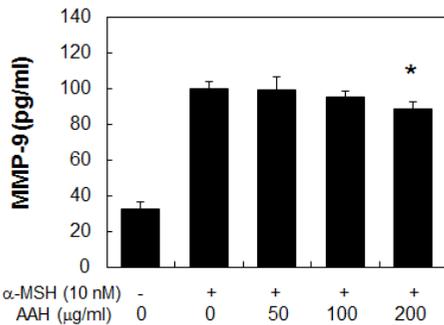


Fig. 6. Effects of AAH on MMP-9 production in SK-MEL-2 cells.

α-MSH : α-Melanocyte-stimulating hormone,
AAH : *Atremisiae Annuae Herba*

*P<0.05 compared with CTL group (first graph)

IV. 고찰

최근 세계적으로 평균수명이 연장되고 생활수준이 향상되면서 점차 웰빙, 즉 건강한 삶에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이는 자연스럽게 항노화에 대한 관심의 증가로 이어지고 있다. 또한 고령 인구의 사회활동이 활발해지면서 노화억제에 대한 관심이 높아지고 그에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다^{1,22)}.

피부는 연령 증가에 따른 변화가 뚜렷하게 나타나는 대표적인 장기로 피부 노화는 유전적인 프로그램에 의해 일어나는 내인성 노화와 자외선 노출, 열풍, 화학물질 등의 외적요인에 의한 외인성 노화로 구분된다. 내인성 노화에서는 피부의 기능 저하 및 위축성 변화, 피부 세포 수 및 피부의 두께가 감소하는 현상이 나타나며 외인성 노화 중 가장 대표적인 자외선 노출에 의한 광노화에서는 깊고 거친 주름과 피부가 변성되고 두꺼워진 탄력 섬유 등이 축적되는 탄력 섬유증 등이 나타난다^{23,24)}.

에스트로젠(estrogen)은 피부 진피층에

있는 섬유아세포를 자극하여 콜라겐(collagen) 합성을 증진시키며, 아울러 콜라겐 대사에 관여하는 분해효소인 기질금속단백질 분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)의 발현을 조절하여 콜라겐 분해를 억제한다. 따라서 나이가 들어감에 따라 에스트로젠의 생성이 감소되면 내분비성 노화가 촉진 되어 주름살이 급격히 늘어나게 된다²⁻⁴⁾. 또한 멜라닌(melanin)은 자외선 등 다양한 자극에 의하여 멜라닌 세포(melanocyte)에서 합성되며, 여러 자극으로부터 피부를 보호하는 역할을 하지만, 기미를 형성하기도 하고 피부색을 어둡게 만드는 등의 작용도 가지고 있다. 최근에 미용에 대한 관심이 높아지면서 자연스럽게 멜라닌의 순기능 보다는 멜라닌 과다에서 오는 역기능이 강조되었고, 멜라닌 생성을 억제하는 천연물은 피부 미백의 효능을 가진 화장품 원료로서 각광 받고 있다²⁵⁾.

양방에서는 피부 미백 및 주름 개선을 위하여 합성 비타민 유도체인 tretinoin 이나 0.1% retinoic acid 연고를 장기간 도포하는데, 진피의 교원질이 증가하여 증상이 호전된다. 또한 trichloroacetic acid(TCA)나 alphahydroxy acid(AHA)을 이용한 화학 박피술, 이산화탄소 혹은 에르븀 레이저를 이용한 레이저 박피술, 면봉으로 액체질소를 가볍게 도포하거나 고체 이산화탄소를 이용한 냉동요법, 고주파 등이 시도 된다⁵⁾.

한의학에서는 피부의 상태가 外因에 의한 질병 뿐만 아니라 인체의 각종 內因에 의해 영향을 받는 것으로 보고 있다. 특히 피부의 色澤 변화는 五臟의 氣血 盛衰를 표현하는 중요 인자로 인식되어 왔다²⁶⁾. 《黃帝內經·素問》〈至眞要

大論>에 “歲陽明在天, 燥淫所勝, 面塵, 身無膏澤, 足外反熱”이라 하여 처음 기록된 이래, 이후 역대 제가들에 의해서 색소 침착질환이 面黑, 雀斑, 黧黑斑, 肝斑 등으로 다양하게 표현되어 왔다²⁷⁾. 陰虛火動, 風熱, 憂思過多와 飲食失節로 인한 痰飲, 火熱損絡, 日歲熱毒을 病因으로 보았고, 實證에는 涼血活血, 祛風散火, 虛證에는 補益肝腎, 滋陰降火 등의 治法을 사용하였으며, 內服藥으로는 沖和順氣湯, 升麻白芷湯, 六味地黃湯, 外用藥으로는 玉容西施散, 紅玉散, 黃帝塗容金面方 등의 처방을 사용하였다²⁸⁾.

본 연구에서 사용된 靑蒿(*Artemisiae Annuae Herba*)의 기원은 국화과(菊花科 : Compositae)에 속한 1년생 또는 2년생 본초인 개똥쑥(黃花蒿) *Artemisia annua* L. 또는 개사철쑥(靑蒿) *A. apiacea* Hance의 지상부로, 우리나라 각지의 들판에 자생한다. 주요 성분으로는 정유 0.3%~0.5%를 함유하고 또한 camphene, isoartemisia keton, L-camphor, nopinene β-bourbonene 등을 함유한다. 性은 寒하고, 味는 苦辛하며 肝·膽으로 歸經하며, 淸熱解暑·除蒸·絶瘡, 治暑邪發熱, 陰虛發熱, 夜熱早涼, 骨蒸勞熱, 瘧疾寒熱, 濕熱黃疸 등의 효능이 있다. 淸熱解暑 효능이 있어 여름철에 暑熱로 인하여 外感한 경우나 瘧疾 등 證에 응용되어지고 除蒸작용으로 溫邪가 傷陰하여 발열하거나 또는 骨蒸勞熱 등에 寒熱을 막론하고, 熱이 陰分으로부터 발생하는 證에 모두 응용되어진다¹³⁾.

최근 연구 결과 항산화 및 항암 효과¹⁴⁾, 항염 및 상처치유 작용¹⁵⁾, 育毛 작용¹⁶⁾, 혈청 지질 조성 개선 작용¹⁷⁾, 기능성 성분 중 Artemisinin의 항말라리아¹⁸⁾ 효과

가 입증 되었다. 이러한 기존 연구 결과를 바탕으로 靑蒿가 피부 미백 및 탄력 유지에 도움을 줄 수 있을 것이라 사료되어 본 연구를 진행하였다.

靑蒿의 피부 미백 효과를 *in vitro*에서 알아보기 위하여 인간 유래 melanoma 세포주인 SK-MEL-2 세포에 靑蒿를 처리하고 세포독성, 멜라닌 생성량, tyrosinase activity 및 tyrosinase의 발현량에 미치는 영향을 살펴보고, 탄력 유지에 미치는 영향을 살펴보기 위해 Matrix metalloproteinase-1(MMP-1) 및 Matrix metalloproteinase-9(MMP-9)에 미치는 영향을 알아보았다.

결과를 살펴보면, AAH의 투여는 최고 농도 400 µg/ml까지 특별한 세포독성을 보이지 않았다. 천연물이 체내에서 도달할 수 있는 농도가 매우 낮다는 사실을 감안할 때, 이러한 결과는 비록 제한적이지만 생체 내에서 비교적 안전할 수 있음을 시사한다. 또한, 향후 실험에 진행될 적정 농도를 50, 100 및 200 µg/ml로 정하였다.

피부색은 멜라닌세포에서 생성하는 멜라닌색소의 양과 분포, 혈류에 영향을 받게 되며 멜라닌 수치는 안면 피부의 색소 침착 형태, 자외선에 대한 민감도 등을 파악하는 주요한 평가 지표가 된다²⁹⁾. 본 연구에 사용된 멜라닌세포 자극 호르몬(α-MSH)은 멜라닌세포를 자극하여 활성화 시키며 그 결과 멜라닌 합성을 촉진시키는 효과를 가지고 있다³⁰⁾.

결과를 살펴보면, α-MSH만을 처리한 군에서 멜라닌 생성이 큰 폭으로 증가되었음을 알 수 있으며, 이러한 증가를 AAH가 효과적으로 억제해 주었다. 이러한 결과는 AAH가 멜라닌세포에서 멜라

닌 생성 억제작용이 있음을 시사한다.

멜라닌은 멜라닌세포에서 생성되어 각질화세포에 저장되는데, 이때 멜라닌 소체의 형태로 전달된다. 멜라닌 소체는 멜라닌세포의 골지체 영역에서 형성되고, 멜라닌은 멜라닌소체 내에서 생성되게 된다. tyrosinase는 멜라닌소체 내에서 tyrosine을 DOPA로 전환시킴으로써 멜라닌 합성의 시작에 관여하게 된다³¹⁾. 본 연구의 결과에서 비록 투여 농도 내에서 50% 저해농도(50% inhibitory concentration, IC₅₀)를 산출할 수는 없었지만, AAH는 시험관 내에서 tyrosinase의 활성을 유의한 수준으로 저해하였다. 이러한 결과를 AAH가 tyrosinase 활성을 저해함으로써 멜라닌 생성을 억제했다는 증거로 해석할 수 있다.

시험관 내에서 AAH의 tyrosinase 저해 활성을 확인한 이후, 실제 세포 내에서 tyrosinase의 총량에는 어떤 영향을 미치는지 살펴보기 위하여 western blot analysis를 수행한 결과 AAH의 투여는 농도 의존적으로 α -MSH 처리에 의한 tyrosinase 생성 증가를 억제하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 AAH가 tyrosinase의 활성을 저해할 뿐만 아니라 세포 내에서 tyrosinase의 생성 역시 저해할 수 있는 증거로 이해된다.

MMP-1은 interstitial collagenase 또는 fibroblast collagenase라고도 불리며, 다양한 생리적 또는 병리적 환경에서 세포 외에 존재하는 콜라겐을 분해하는 역할을 한다³²⁾. 병리적 환경에는 대표적으로 관절염과 암세포의 전이가 포함된다. MMP-1은 주로 제 1형, 2형 및 제 3형 콜라겐을 주로 분해한다³³⁾. 본 연구의 결과에서 AAH는 α -MSH 처리에 의한 MMP-1의

증가를 농도 의존적으로 억제하였다. 이러한 결과는 AAH가 콜라겐의 분해를 억제함으로써 간접적으로 피부 탄력 유지에 도움을 줄 수 있음을 시사한다.

MMP-9은 Gelatinase B 또는 type V collagenase라고도 불리며 주요 기능은 gelatin types I과 V, 그리고 collagen type IV과 V를 분해하는 것으로 MMP-1에 비하여 더욱 다양한 생리적, 병리적 작용을 가진다³⁴⁾. 가장 대표적으로 류머티스성 관절염³⁵⁾과 혈관 질환 및 암의 전이와의 관련성³⁶⁾이 알려져 있다. 본 연구의 결과에서 200 μ g/ml의 AAH는 유의하게 MMP-9의 생성량을 감소시켰다. 이러한 결과는 MMP-1에 대한 결과와 같이 AAH가 피부 탄력 유지에 도움을 줄 수 있음을 시사한다.

이상을 정리하면, AAH는 멜라닌세포 내에서 tyrosinase의 생성을 억제하였고, tyrosinase의 활성을 저해함으로써 멜라닌 생성을 억제하는 효과를 보였으며, 피부의 탄력 유지에 중요한 역할을 하는 콜라겐을 분해하는 효소들인 MMP-1과 MMP-9의 생성을 억제하였다. 이 결과를 보면 AAH가 피부 미백 및 탄력 유지를 위한 內服藥 및 外用藥에 사용될 수 있고 향후 약침액이나 화장품 원료로서 활용될 가능성이 있으리라 사료된다.

V. 결 론

靑蒿(AAH) 추출물의 미백효과와 피부 탄력 유지에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 최고농도 400 μ g/ml까지 특별한 세포

독성을 나타내지 않았다.

2. 10 nM의 α -MSH를 처리한 대조군에서 아무것도 처리하지 않은 군에 비하여 4배 이상의 멜라닌 생성량의 증가가 관찰되었으며, 100 μ g/ml 이상의 AAH 처리는 α -MSH 처리에 의하여 증가되는 멜라닌 생성을 유의한 수준으로 억제하였다.
3. 아무것도 처리하지 않은 군을 100%로 했을 때 50, 100, 200 μ g/ml 농도의 AAH를 처리한 결과 각각 92.1 \pm 5.7, 85.9 \pm 4.8, 78.1 \pm 9.6%로 모두에서 유의한 수준의 tyrosinase 활성 억제가 나타났으며, AAH의 tyrosinase 활성 억제 효과는 농도 의존적이었다.
4. AAH의 투여는 α -MSH의 자극에 의하여 증가되는 tyrosinase의 생성량을 농도 의존적으로 감소시키는 경향을 보였다.
5. 멜라닌세포 자극 호르몬에 의해 대폭 증가한 MMP-1의 생성량은 100 μ g/ml 이상의 AAH 처리에 의해 유의한 수준으로 감소되었으며, 반응 양상은 농도 의존적이었다.
6. α -MSH에 의해 대폭 증가한 MMP-9의 생성량은 200 μ g/ml의 AAH 처리에 의해 유의한 수준으로 감소되었으며, 반응 양상은 농도 의존적이었다.

이상의 결과로부터 靑蒿가 피부 미백 및 탄력 유지 효능이 있음을 알 수 있다.

- Received : Apr 24, 2017
- Revised : Apr 26, 2017
- Accepted : May 22, 2017

Reference

1. Korean obstetrics & gynecology. Oriental obstetrics & gynecology(下). 2st rev. ed. Seoul:Euiseongdang. 2016:913.
2. Thornton MJ. The biological actions of estrogen on skin. Exp. Dermatol. 2002;11(6):487.
3. Shah MG, Maibach HI. Estrogen and skin. Am J. Clin. Dermatol. 2001;2(3):143.
4. Brincat MP. Hormone replacement therapy and the skin. Maturitas. 2000;35(2):107.
5. Textbook Compilation Committee of korean dermatological association. Textbook of dermatology. 4th rev. ed. Seoul: Yeomungak. 2001:134.
6. Cho SP, Lee KH. Eastern and Western Treatments for Improving Wrinkles and Treatment of Fine Wrinkles with Subcision. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. 2012;29(2):29-36.
7. Kang SR, Min KJ, Kim YC. The Inhibitory Effects of Saururus chinensis Water Extract on Skin Wrinkle in Hairless Mice. The Journal of The Korean Society of Cosmetology. 2009;15(4):1389-98.
8. Yoo YD, et al. Hypopigmentary Effect of Milk Thistle Extract Silymarin. Journal of the society of cosmetic scientists of Korea. 2009;35(2):151-8.
9. Seok JH, et al. Skin Whitening Effects of Caragana sinica Rehder Extract

- Fermented by *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7913. Journal of the society of cosmetic scientists of Korea. 2010; 36(3):207-13.
10. Lee JC, et al. Effects of *Paeoniae radix alba*(PRA) on Skin whitening and Elasticity using Melanoma cells. The journal of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2012;25(1):1-11.
 11. Park JM, Kim KJ. The Anti-wrinkle Effects and Whitening Effects of *Galla Rhois*. The journal of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2010;23(1):135-48.
 12. Yang SJ, Choi TB. Antioxidant Activity and Whitening Effect of *Forsythiae Fructus* Extracts. Korean journal of medicinal crop science. 2011;19(6): 472-7.
 13. National College of Oriental Medicine Collaborative Textbook Compilation Committee. Textbook of herbal medicine. Seoul:Yeongrimsa. 2013:274-5.
 14. Ryoo JH, et al. Antioxidant and Anticancer Activities of *Artemisia annua* L. and Determination of Functional Compounds. Journal of the Korean society of food science and nutrition. 2011;40(4):509-16.
 15. Lodhi S, Singhai AK. Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. on streptozotocin induced diabetic rats. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2013;6(4):253-9.
 16. Kim KS, et al. A Study on Hair-growth Activity of *Artemisia apiacea* Hance. The Journal of Pharmaceutical society of Korea. 1999;43(2):798-801.
 17. Lee JM. Effects of cheungho aqua-acupuncture at gansoo(BL 18) and illweul(GB 14) on plasma lipid composition in rat fed high fat diet. Korean Journal of Acupuncture. 2003; 20(3):91-9.
 18. Engeu PO, et al. Variations in antimalarial components of *Artemisia annua* Linn from three regions of Uganda. Afr Health Sci. 2015;15(3): 828-34.
 19. Kim DS. Effect of scopoletin on melanogenesis through cyclic AMP signaling pathway and photoaging improvement. Wonkwang university Professional Graduate School of Oriental Medicine. 2012.
 20. Pintus F, et al. Antityrosinase activity of *Euphorbia characias* extracts. PeerJ. 2015;13(3):1305.
 21. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. Planta Med. 1987;53(6): 515-7.
 22. Gwon NH, et al. Clinical Study on Facial Skin Furrow Measurement Changes after Miso Facial Rejuvenation Acupuncture. The journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2009;26(6):134.
 23. Han GH, et al. Histological Changes in the Skin with Innate Ageing. The Korean Journal of Dermatology. 1998; 36(6):971-80.
 24. Seong HC, et al. A Clinical Study on

- the Efficacy of Cosmetics Containing the Ascidian tunic in Reducing Wrinkles. *The Korean Journal of Dermatology*. 2008;46(7):896-902.
25. Gillbro JM, Olsson MJ. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents-existing and new approaches. *Int J Cosmet Sci*. 2011;33(3):210-21.
26. Yuananzhengzhongyixueyuan(原案徵中醫學院). Zhongyilinchuangshouce(中醫臨床手冊). Seoul:Seongbosa. 1983:1-4.
27. Hong WS. Jeonggyohwangjenaegyongsomun(精校黃帝內經素問). Seoul:Dongyangeuihak yeonguwonchulpanbu(東洋醫學研究員出版部). 1985:295-6.
28. Kim JH, Hong SW. The Effects of Baickbujasan Extract on the Skin Damage and Pigmentation Induced by Ultraviolet Irradiation. *The journal of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*. 2008;21(1):70-82.
29. Slominski A, et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Journals of the American Physiological Society*. 2004;84(4):1155-228.
30. Eves PC, MacNeil S, Haycock JW. alpha-Melanocyte stimulating hormone, inflammation and human melanoma. *Peptides*. 2006;27(2):444-52.
31. Textbook Compilation Committee of Korean dermatological association. *Textbook of dermatology*. 5th rev. ed. Seoul: Yeomungak. 2008:17-8.
32. Gross J, Lapierre CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1962;15(48):1014-22.
33. Fields GB. Biophysical studies of matrix metalloproteinase/triple-helix complexes. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2014;97:37-48.
34. Hibbs MS, Hoidal JR, Kang AH. Expression of a metalloproteinase that degrades native type V collagen and denatured collagens by cultured human alveolar macrophages. *J Clin Invest*. 1987;80(6):1644-50.
35. Gruber BL, et al. Markedly elevated serum MMP-9(gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996;78(2):161-71.
36. Morini M, et al. The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B(MMP-9) activity. *Int J Cancer*. 2000;87(3):336-42.