

제주산 식물을 이용한 미백 기능성화장품 원료에 대한 검색

이 선 주[†] · 부 희 정 · 이 정 아 · 정 덕 상

제주대학교 자연과학대학 화학과
(2005년 2월 28일 접수, 2005년 3월 5일 채택)

Screening of Plants in Jeju for Whitening Materials in Cosmeceutical

Sunjoo Lee[†], Hee-Jung Bu, Jung-A Lee, and Duk Sang Jung

Department of Chemistry, Cheju National University, Ara-1, Jeju 690-756, Korea
(Received February 28, 2005; Accepted March 5, 2005)

요약: 제주에서 자생하는 식물들의 미백활성을 B16F10 세포에서의 멜라닌 생성 억제, mushroom tyrosinase 활성 억제 실험을 통하여 확인하였다. 본 실험에서 우리는 개민들레 줄기, 까마중, 미국미역취, 돌외, 주목의 메탄올 추출물에서 B16F10 세포에서의 멜라닌 생성 저해 효과를 확인하였다. 그러나 이들의 tyrosinase 활성은 없었다.

Abstract: Methanol extract of plants in Jeju were investigated for biological properties related to whitening cosmeceuticals such as melanin contents on melanoma cell, mushroom tyrosinase activity inhibition. We found that extracts of leaves of *Hypochoeris radicata*, *Solanum nigrum*, *Solidago serotica*, *Gynostemma pentaphyllum* and *Taxus cuspidata* inhibit melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. However they have no tyrosinase inhibitory activity.

Keywords: melanin contents, MTT, tyrosinase inhibition.

1. 서 론

인간의 미에 대한 욕구는 과거에서부터 기인하지만 삶에 대한 여유를 갖고자 하는 현대인들에게 있어서 이 욕구는 필수적이라 할 수 있다. 국내에서는 화장품법이 분리되어 시행된 이후로 기능성 화장품에 대한 많은 관심과 함께 연구 개발이 활발히 이루어지고 있다. 특히, 동양에서는 희고 고운 피부가 미의 상징으로 여겨져 기능성 미백화장품에 대한 연구가 집중되고 있고, 폭발적인 시장 성장을 하고 있다[1].

인간의 피부 색깔은 환경, 인종, 성별 등의 요인과 멜라닌(melanin), 카로틴 및 헤모글로빈 양과 같은 여러 가지 요인에 의해 결정되지만 피부의 과색소 침착과 관련된 주요한 원인은 표피 내 멜라닌색소의 이상적 증가에 기인한다. 멜라닌은 표피층의 기저층에 있는 멜라닌형성세포(melanocyte)내의 멜라노솜(melanosome)에서 티로신(2-tyrosin)으로부터 생합성되며 주변 각질형성세포(kera-

tinocyte)로 전이되어 피부색을 나타낸다[2]. 멜라닌은 자외선으로부터 피부가 손상되는 것을 방지하는 중요한 역할[3,4]을 하지만 비정상적으로 과잉 생산되는 경우는 기미나 주근깨 등의 미용상 문제를 일으키고, 반대로 너무 적게 생산되면 백반증과 같은 피부 병변이 유발된다. Melanocyte는 자외선, 피부의 염증반응, 호르몬 이상, 유전질환, 화학적 자극 등에 의해 활성화되고, 증식 및 분화하여 멜라닌 색소를 과다하게 만들어 결국 피부 색소 침착을 일으키게 된다. 특히 자외선에 대한 자극은 최근 환경오염에 따른 오존층의 파괴와 여가 활동에 대한 욕구가 많아지면서 더욱 많아지게 되었고, 그에 따라서 미백 효능이 좋으면서 피부에 안전한 미백제 개발에 많은 관심이 집중되고 있다.

기능성 미백화장품에서는 과다하게 생성되는 멜라닌 색소의 억제 및 자외선 차단을 통한 색소 침착 억제 그리고, 생성된 멜라닌 색소의 환원작용을 통하여 미백효과를 유도한다. 멜라닌 생성을 억제하는 물질로 hydroquinone, resorcinol 등의 페놀 유도체나, L-ascrobic acid와 그 유도체 및 kojic acid, arbutin, lactic acid, gluco-

[†] 주 저자 (e-mail: sunjoo@cheju.ac.kr)

samin, tunicamycin 등이 개발되었으나, 피부자극성이나 안정성에 문제가 있어 극히 제한된 양만 사용되고 있다 [5,6,7]. 본 실험에서는 멜라닌 생성 억제 효과를 갖는 천연 식물의 검색을 위하여 청정지역인 제주도에서 자생하는 18종의 식물을 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 최종 멜라닌 합성 억제 효과와 MTT법을 이용하여 세포 독성을 확인하였다. 그리고 mushroom tyrosinase 활성 억제 효과를 측정하여 멜라닌 합성과 멜라닌 생성 초기에 관여하는 tyrosinase 억제 효과와의 관계를 확인하였다.

2. 실험방법

2.1. 시료추출

실험에 사용된 각각의 시료들은 제주도에 자생하는 식물들로서, 직접 채집하여 동정한 후 깨끗이 씻어 이물질을 제거하여 통풍이 잘되는 그늘진 곳에서 건조하였다. 잘 건조된 시료들은 잘게 파쇄하여 건조 시료 1 kg을 80% 메탄올 2 L에 넣고 3개월 이상 암냉소에 보관하였다. 추출된 용액은 감압 여과하여 잔사를 제거하고 농축하여 메탄올 추출물을 얻었고, 각각의 시료는 냉장 보관하여 사용하였다.

2.2. 세포 및 시약

B16F10 melanoma cell은 KCLB (Korean cell line bank)로부터 분양 받았고, HaCaT cell은 제주대학교 의과대학 생화학 실험실에서 협조를 얻어 100 units/mL penicillin-streptomycin 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. 배지는 3일에 한 번 새 배지로 교환하였으며, 4~7일에 한 번씩 계대 배양하였다. tyrosinase, 2-tyrosin, 합성 멜라닌 그리고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Sigma (USA)사의 것을 구입하여 사용하였다.

2.3. Tyrosinase 활성도 실험

Tyrosinase 저해 활성 측정은 dopachrome 방법을 이용하여 UV/Vis 분광광도계로 측정하였다[8]. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 450 µL, 시험시료 25 µL, mushroom tyrosinase (1500 U/mL~2000 U/mL)액 25 µL, 1 mM tyrosinase액 30 µL를 섞어서 37°C에서 15 min 반응시켰다. 그리고 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. 세포의 Viability 측정(MTT Assay)

세포의 증식과 독성에 대한 평가는 Mosmann의 방법을 변형한 MTT 정량법을 이용하여 측정하였다[9]. B16F10

Table 1. Effect of Plant Extracts on Melanin Contents of Melanocyte

Plants	Inhibitor effect (%)
arbutin	47.25
<i>Solanum nigrum</i> L	96.40
<i>Aster ageratoides</i> Turcz	-39.24
Trunks of <i>Hypochoeris radicata</i> L	50.00
Root of <i>Hypochoeris radicata</i> L	-36.01
<i>Elsholtzia splendens</i> Nakai	-28.96
<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	77.83
<i>Solidago serotica</i> Ait	38.78
<i>Amaranthus mangostanns</i> L.	1.95
<i>Chrysanthemum boreale</i>	1.77
<i>Vicia angustifolia</i> var. <i>segetilis</i>	-3.2
<i>Pyrrosia lingua</i> (Thunb.) Farwell	-1.25
Root of <i>Pyrrosia lingua</i> (Thunb.) Farwell	0.62
<i>Lespedeza bicolor</i>	-46.19
<i>Potentilla chinensis</i> Ser.	6.22
<i>Artemisia quinta</i>	7.63
<i>Ardisia japonica</i> Blume	3.81
<i>Taxus cuspidata</i>	74.38
<i>Humulus japonicus</i>	10.83

시료농도 : 100 µg/mL

cell과 HaCaT cell (5×10^4 cells/mL)을 각각 96 well plate에 200 µL 넣고 cell을 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 전 배양(overnight)시켰고, 부착된 cell에 시료를 처리한 후 4일간 다시 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. 배양된 세포에 MTT (50 mg/mL) 시약을 처리(0.1 mg)하여 4 h 동안 항온기에 두어 formazan을 형성시키고, 형성된 formazan은 DMSO로 녹인 후 540 nm에서 흡광도 ELISA reader로 측정하여 대조군과 비교하였다.

2.5. 멜라닌 양 측정

시료의 멜라닌 생성 억제 정도는 B16F10 melanoma cell을 이용하여 최종 생성되는 멜라닌 생성 억제 정도를 Gordon PR 방법을 수정하여 측정하였다[10]. B16F10 melanoma cells (1.0×10^5 cells/mL)을 culture plate에 전종(3 mL)하여 전 배양하고, 4일간 시료를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. Plate의 배지 제거 후 세포를 수확하여 세포 수를 2.0×10^5 cells/mL로 조정하고 1 N NaOH 200 µL를 넣고 95°C에서 5 min간 멜라닌을 녹인 후에 450 nm에서 ELISA reader로 측정하여 대조군과 비교하였다. 합성 멜라닌을 이용하여 standard

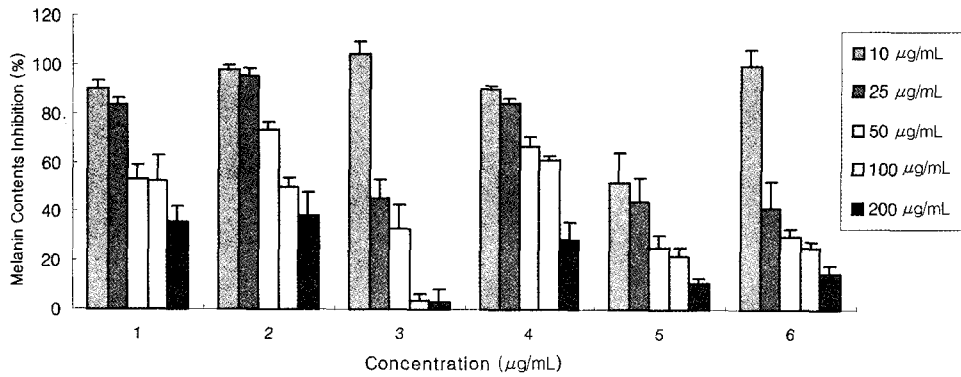


Figure 1. Effect of plant extracts on melanin contents of B16F10 melanoma cells.
 1: Arbutin, 2: Trunks of *Hypochoeris radicata* L, 3: *Solanum nigrum* L.,
 4: *Solidago serotica* Ait., 5: *Gynostemma pentaphyllum*, 6: *Taxus cuspidata*

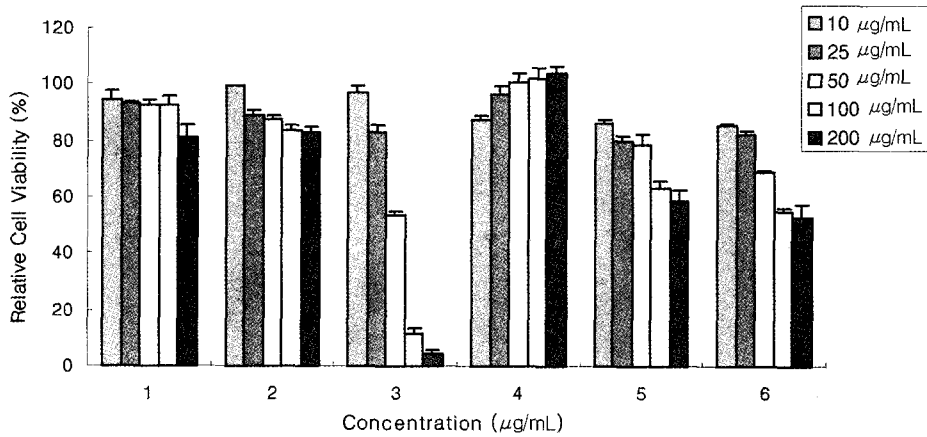


Figure 2. Effect of plant extracts on proliferation of B16F10 melanoma cells.
 1: Arbutin, 2: Trunks of *Hypochoeris radicata* L, 3: *Solanum nigrum* L.,
 4: *Solidago serotica* Ait., 5: *Gynostemma pentaphyllum*, 6: *Taxus cuspidata*

solution을 만들고 시료와 standard solution을 96 well plate에 넣고 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 농도는 합성 멜라닌으로 작성된 표준 농도 곡선으로부터 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 멜라닌 형성에 미치는 영향

멜라닌 최종 산물인 멜라닌 양을 B16F10 melanoma 세포에 시료를 처리하여 저해 정도를 측정함으로써 미백효과를 확인하였다. Melanoma 세포를 이용한 멜라닌양의 측정은 천연물의 미백효과를 *in vitro*에서 확인할 때 가장 정확한 방법이다. 본 실험에 사용된 제주 자생 식물의 최종 멜라닌 생성 억제 정도를 측정한 결과 시료 처리

농도(100 µg/mL)에서 까마중(96.41%), 개민들레 줄기(50.00%), 돌외(77.83%), 미국미역취(38.78%), 주목(74.38%)이 대조군으로 사용된 arbutin (47.25%)보다 우수하거나 비슷한 효과를 보였다(Table 1). 그리고 효능이 좋은 5개의 시료에 대해서는 농도별 멜라닌 생성 억제 효과를 측정하였다(Figure 1).

3.2. B16F10 Melanoma 세포 증식에 미치는 효과

B16F10 melanoma 세포에 멜라닌 생성 억제 효과를 보인 개민들레 줄기, 까마중, 미국미역취, 돌외, 주목의 메탄올 추출물을 6개의 농도로 처리하여 농도에 따른 세포 증식에 미치는 효과를 측정하였다. 높은 농도(300 µg/mL)로 처리한 경우에는 까마중 추출물이 대조군인 arbutin

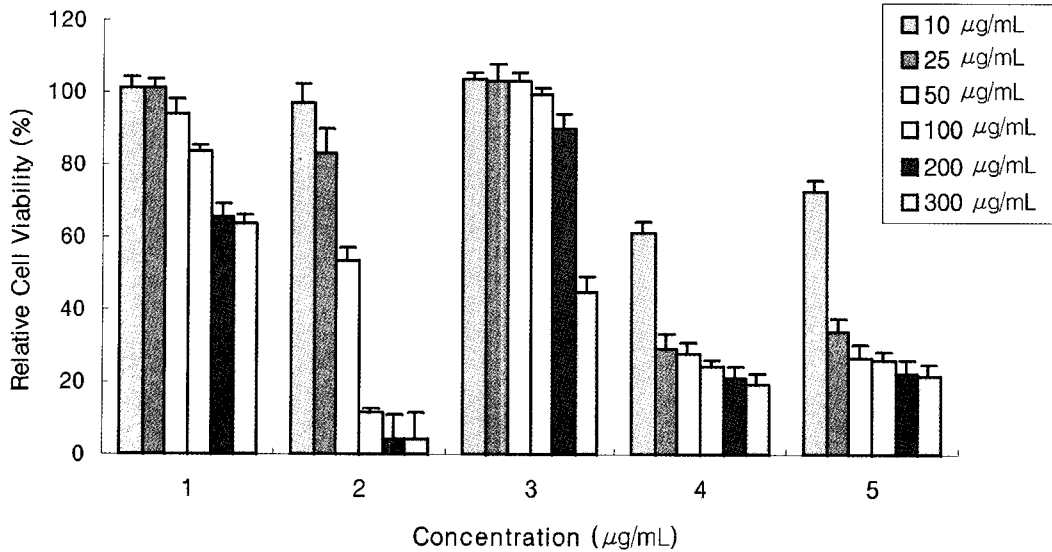


Figure 3. Effect of plant extracts on proliferation of HaCa T cells.
 1: Trunks of *Hypochoeris radicata* L, 2: *Solanum nigrum* L.,
 3: *Solidago serotica* Ait., 4: *Gynostenmma pentaphyllum*, 5: *Taxus cuspidata*

(18.86%)에 비해 가장 강한 독성(95.58%)을 보였고, 미국 미역취 추출물인 경우 고농도에서도 세포 증식 억제를 보이지 않았다. 그리고 개민들레 줄기 추출물인 경우도 농도별 세포 증식 억제도가 크지 않음을 확인할 수 있었으며, 까마중 추출물을 제외하고는 고농도에서 50% 이상의 세포 증식 억제를 하지 않음을 확인하였다(Figure 2).

3.3. HaCaT 세포 증식에 미치는 효과

멜라닌은 피부 표피세포의 기저층에 있는 melanocyte에서 만들어져 keratinocyte로 옮겨져 피부 각질층으로 올라와 피부색으로 표현되게 된다. 따라서 미백 효능이 있는 소재가 keratinocyte에 대한 독성이 없어야 한다. 이를 확인하기 위하여 인간 표피에서 분리해낸 keratinocyte인 HaCaT세포를 이용하여 농도별로 처리한 시료의 독성을 확인하였다. 그 결과 고농도(300 µg/mL)로 처리한 경우 개민들레 줄기(36.53%)를 제외하고 모두 50% 이상의 세포 독성을 보였고, 미국미역취와 개민들레 줄기인 경우 농도(10 µg/mL)는 오히려 세포 증식을 시키고 있음을 확인하였다(Figure 3).

3.4. Tyrosinase 활성 억제 효과

Tyrosinase는 멜라닌 생성 초기 단계에 관여하는 효소로서, 미백관련 효능을 검증 시 그 활성 억제 정도를 측정하여 평가한다. 본 실험에서도 멜라닌 생성 억제 효과를 보인 개민들레 줄기, 까마중, 미국미역취, 돌외, 주목 추출물의 mushroom tyrosinase 효소활성 억제 정도를 측정하여 멜라닌 생성 억제 효과가 tyrosinase 활성을 억제

Table 2. Effect of Plant Extracts on Mushroom Tyrosinase Activity

Plants	Inhibiton effect (%)
Arbutin	73.13
Trunks of <i>Hypochoeris radicata</i> L	0.65
<i>Solanum nigrum</i> L.	-12.94
<i>Solidago serotica</i> Ait.	0.65
<i>Gynostenmma pentaphyllum</i>	-0.46
<i>Taxus cuspidata</i>	-34.92

시료농도: 150 µg/mL

하여 나타난 결과인지를 확인하고자 하였다. 시료농도 150 µg/mL로 처리한 결과 tyrosinase 활성 억제를 시키는 시료는 없었으며, 오히려 주목(-34.92%), 까마중(-12.94%) 그리고 돌외(-0.46%)인 경우는 tyrosinase 활성을 증가시키고 있음을 확인할 수가 있었다(Table 2).

4. 결 론

제주도에서 자생하는 여러 가지 식물들의 기능성 미백 화장품 원료로서의 사용 가능성을 확인하기 위하여 mushroom tyrosinase와 melanin 세포를 이용하여 효능 측정을 하였다. Melanin 형성의 최종산물인 멜라닌 양을 측정함으로써 시료들의 미백효과를 전체적으로 확인할 수 있었고, MTT법을 이용하여 세포 증식 억제 효과가 없으면서 미백효능이 좋은 시료를 확인하고자 하였다. 그 결과 여

러 시료 중에서 개민들레 줄기, 까마중, 미국미역취, 돌외, 주목 추출물에서 좋은 멜라닌 생성 억제 효과를 확인할 수 있었다. 그러나 이들 시료 중 까마중은 고농도에서 높은 독성을 보였고, 돌외와 주목도 비교적 독성이 높게 나옴을 확인할 수 있었다. 반면 미국미역취인 경우 고농도(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 멜라닌 세포에서는 오히려 약간의 세포 증식을 시켰으며, HaCaT 세포에서도 비교적 낮은 세포 증식 억제(10.28%)를 보이면서 좋은 멜라닌 생성 억제 효과를 보였다. 그러나 멜라닌 생성 억제 효과는 tyrosinase 활성 억제 실험을 통해 이 효소의 억제에 의한 결과가 아님을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 유효성분들은 tyrosinase 활성이 아닌 TRP-1 또는 TRP-2 작용을 억제하거나 tyrosinase 유전자 발현에 관련된 다른 메커니즘을 통해 미백 효과를 보이는 것으로 추정할 수 있다.

제주도는 청정지역으로 한라산을 중심으로 다양하고 특이한 생태계를 형성하고 있다. 그러나 아직 제주도 천연 식물에 대한 연구는 비교적 많이 되어있지 않아 그에 대한 다양한 생리 활성 연구는 학술적, 경제적으로 중요한 자료로서 제공될 수 있을 것이라 판단된다. 특히 화장품산업과 같은 이미지 효과가 높은 분야에서 청정지역의 효능이 좋은 소재를 원료로 하여 상품화 한다면 그 효과가 더 커지리라 여겨진다. 현재 본 실험실에서는 제주도 자생식물들의 다양한 생리활성에 대한 연구가 진행되고 있으며, 특히 기능성 화장품 원료 개발을 위한 여러 가지 실험을 시행하고 있다. 본 연구에서 확인된 좋은 미백효과를 갖는 천연물 역시 현재 분리과정 중에 있으며 더 많은 연구를 진행 중에 있다.

감사의 말씀

본 연구는 2004년 아열대 식물 유전자 연구의 학술연구비, 2004년 과기부 과학재단지정 특수연구소재은행 아열대/열대 생물유전자은행의 연구비 일부지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. 이현호, 최근 미백화장품의 개발동향, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**, 43 (1997).
2. V. J. Hearing and T. M. Ekel, Mammalian tyrosinase, *Biochem. J.*, **157**, 549 (1976).
3. Y. Mishima, S. Hatta, and Y. Ohyama, Induction of melanogenesis suppression: cellular pharmacology and mode of differential action, *Pigment Cell Res.*, **1**, 367 (1998).
4. H. Matubara, Inhibitory effect of lichen metabolites and their synthetic analogues on melanin biosynthesis in cultured B-16 mouse melanoma cells, *Natural Product Sciences*, **4**, 3 (1998).
5. S. Ando, O. Ando, Y. Suemoto, and Y. Mishima, Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitor, *J. Invest. Dermatol.*, **100**, 15 (1993).
6. G. Imokawa and Y. Mishima, Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glycosylation inhibitors within malignant melanoma, *Cancer Res.*, **42**, 1994 (1982).
7. M. Masuda, T. Tejima, and T. Suzuki, Skin lighteners, *Cosmetics & Toiletries*, **111**, 65 (1996).
8. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assay *J. Immun. Methods*, **65**, 55 (1983).
9. K. Meada and M. Fukuda, *In vitro* effectiveness of whitening cosmetic components in human melanocyte, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**, 361 (1991).
10. P. R. Gordon, C. P. Mansur, and B. A. Gilchrest, Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J. Invest. Dermatol.*, **2**, 566 (1989).