

새삼, 실새삼 및 갯실새삼 추출물이 Clone M-3 세포주의 Melanin 생합성 및 Tyrosinase 활성에 미치는 영향과 세포독성 및 항산화효과

장수진 · 석귀덕*

대구가톨릭대학교 약학대학

(Received December 11, 2006; Revised December 15, 2006)

Inhibitory Effects on Melanin Biosynthesis and Tyrosinase Activity, Cytotoxicity in Clone M-3 and Antioxidant Activity by *Cuscuta japonica*, *C. australis*, and *C. chinensis* Extracts

Soo-Jin Chang and Kui-Duk Suk*

College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyongsan 712-702, Korea

Abstract — Water extracts, ethanol extracts, and juice of *Cuscuta japonica*, *C. australis*, and *C. chinensis* were prepared, and their cytotoxicity, antioxidant activity, and inhibitory effects on tyrosinase activity and melanin biosynthesis were estimated by using melanoma Clone M-3. From this study, the following conclusions were attained. Extracts of *Cuscuta japonica*, *C. australis*, and *C. chinensis* showed noticeable cytotoxicity except ethanol extracts from the stem of *C. australis*. A maximal cytotoxicity was observed with the ethanol extract from the seed of *C. australis* (87.39%). While the ethanol extract from the seed of *C. japonica* (91.88%) showed the most pronounced inhibitory effect on melanin biosynthesis, the water extract from the stem of *C. japonica* (1.05%) possessed very little inhibitory effect. The most inhibitory effect on tyrosinase activity was observed with the water extract from the stem of *C. australis* (76.67%). However, the water extract from the stem of *C. japonica* showed a very poor effect on the inhibition of tyrosinase activity. All the preparations, except extracts from the seed of *C. australis* were able to remove reactive oxygen species (ROS) in a dose-dependent manner. The juice of *C. japonica* demonstrated the strongest activity (59.02%).

Keywords □ *Cuscuta japonica*, *C. australis*, *C. chinensis*, melanoma, whitening effects, antioxidant activity

피부는 외부로부터 표피(epidermis), 진피(dermis), 피하지방층(subcutis, panniculus adiposus)의 3개층으로 구성되어 있으며 이중 표피는 우리 몸을 싸는 최외층에 해당하고 각질형성세포(keratinocyte)와 멜라닌 세포(melanocyte), 면역반응에 관여하는 랑게르한스 세포(Langerhans cell), 부정형 세포 및 머켈(merkel cell) 세포로 구성된다. 멜라닌 세포는 신경릉(neural crest)에서 유래되며 멜라닌을 포함하는 멜라닌 소체(melanosom)라 불리는 소기관(organelle)을 합성 분비하는 수지상 세포(dendritic cell)로 표피에서는 기저층에 산재한다. 인간의 피부 멜라닌에는 2가지 중요한 종류가 있으며 이는 피부나 모발의 갈색

및 검은색의 근원이 되는 eumelanin과 모발에 황색 내지는 적갈색의 옅은 색조를 주는 pheomelanin으로 분류된다. 멜라닌 세포의 수는 민족과 피부 색에 관계없이 일정하며 민족간의 피부색을 결정하는 것은 이 세포가 계속적으로 생산하는 멜라닌소체(melanosom), 즉 색소 과립의 수와 크기에 의해 결정된다. 그러나 그 기능에는 많은 차이가 있어서 검은 피부는 흰 피부보다 세포의 활동성이 증가되어 있으며 자외선에 의한 반응도 더 크게 일어난다.¹⁾

멜라닌 형성에는 tyrosinase를 포함하여 TRP-1(DHICA oxidase)와 TRP-2(dopachrome tautomerase)와 같은 효소들이 관여하며 구조가 유사하여 tyrosinase gene family라고 불린다. 이 중 tyrosinase는 활성 부위 안에 한 쌍의 구리이온을 함유하는 산화 효소로서 분자량은 66.7 KDa 정도로 알려져 있으며 유전자는 염색체 11q14-21에 위치하고 있고 5개의 exon으로 이루어져 있다.

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로

(전화) 053-850-3614 (팩스) 053-850-3614

(E-mail) kdsuk@cu.ac.kr

3가지 이상의 기능을 하며, 특히 멜라닌의 생합성 과정 중 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)로 전환 시키는 tyrosine hydroxylase의 기능과 DOPA를 dopaquinone으로 산화시키는 dopa oxidase의 기능 및 5,6-dihydroxyindol을 melano-chrome으로의 전환시키는 DHI oxidase의 기능 등 3가지 반응에 대한 촉매작용을 한다.²⁾ Tyrosinase 또한 천연에서 얻을 수 있는 polyphenol oxidase(PPO)로도 잘 알려져 있다.³⁾

자유라디칼은 노화와 질병의 원인 중의 하나이다. 자유라디칼은 적어도 한 쌍의 짝을 짓지 않은 전자를 포함하는 것을 말하며, 원자 및 분자는 기본적으로 어떤 물질과 전자를 공유하여 안정화되려고 하며, 생체 내에 수많은 자유라디칼 등 활성산소종을 생성하게 한다.^{4,5)} 이들 활성산소종은 각종 성인병과 노화, 특히 피부노화의 원인으로 큰 관심의 대상이 되고 있으며, 피부 면역 기능을 억제시켜 피부염증을 유발시키고, 탄력감소, 주름살 및 기미, 주근깨 등의 피부 노화를 가속화시킨다.⁶⁻⁸⁾ 따라서 자유라디칼을 제거할 수 있는 항산화제의 투여가 필요하며, 자외선 및 활성산소에 의한 결합조직 손상을 예방하고, 피부세포를 보호하기 위해서는 생체 내 뿐만 아니라 피부에서 활성산소종의 과잉 생성을 억제하고, 생성된 활성산소를 효율적으로 제거할 수 있는 항산화 방어 시스템이 필요하다

새삼류는 메꽃과(Convolvulaceae)에 속하는 일년생 기생성 덩굴식물로서 새삼(*Cuscuta japonica* Choisy)과 실새삼(*C. australis* R.Be) 2종이 우리나라에서 토사자의 기원식물로 쓰이고 있다. 우리나라의 여러 곳에서 자라며 특히 산기슭, 길옆, 밭두렁 등에 많으며 주로 콩과 식물 및 국화과 식물에 기생한다. 토사자는 대한약전 외 한약(생약) 규격집에 수재되어 있으며 이상의 기원 식물의 잘 익은 씨앗(종자)을 말린 것이다.⁹⁻¹¹⁾

중국에서는 중국 약전에 갯실새삼(*C. chinensis* Lam.)을 토사자의 기원 식물로 기재하고 있다. 성분으로는 수지배당체와 당류 등을 포함하며, 갯실새삼에서 coumarin 및 flavon 류 및 p-coumaric acid, caffeic acid, arbutin, chlorogenic acid, cuscutoside A, (+)-epipinoresinol, (+)-pinoresinol-4'-D-β-D-flucopyranoside, (+)-pinoresinol, astragaln, quercetin, hyperoside 등이, 실새삼에서 β-carotene, γ-carotene, α-carotene-5,6-epoxide, taraxanthin 및 lutein이 보고되었다.¹²⁾

토사자의 약리작용에 대한 연구는 토사자가 간기능에 미치는 영향,¹³⁾ mouse 뇌 신경전달물질에 대한 연구,¹⁴⁾ 면역체계에 대한 연구,¹⁵⁾ 고지혈증에 미치는 영향¹⁶⁾ 및 미백효과를 보기 위해 mushroom tyrosinase에 대한 억제효과를 조사한 연구¹⁷⁾는 있으나 세포를 이용하여 새삼 실새삼 및 갯실새삼의 미백작용을 조사한 연구는 없는 실정이다.

피부에 대해서는 천금요방 및 천금약방에 외용 도포시 여드름이나 기미를 제거하는데 탁월한 효과가 있다는 기록이 있으며,¹⁸⁾ 동의보감본초에 토사자 묘(苗)의 즙을 기미, 여드름, 및 반점에

사용한다고 기록되어 있다.¹⁹⁾ 현재 단방이나 복방으로 기미, 주근깨, 여드름 및 잡티 제거와 피부를 윤たく하게 할 목적으로 백책 등으로 많이 사용되고 있다.²⁰⁾ 또한 민간에서는 새삼 줄기의 녹즙을 안면에 바르고, 마사지를 계속하여 여드름 및 주근깨와 잔주름에 대한 치료효과를 기대하며 사용하기도 한다.²¹⁾

재료 및 방법

시료의 조제

본 실험에 사용한 새삼, 실새삼은 줄기와 종자로 분류하여 건조하고 분말로 만들었다. 중국토사는 종자만을 구입하여 건조 후 분말로 만들었다. 분말로 된 새삼, 실새삼 및 중국토사를 각각 50 g 취하여 증류수 500 ml로 90°C에서 24시간 추출한 후 여과하고 300 ml의 증류수로 2회 더 추출한 뒤 여액을 합하여 rotary vacuum evaporator로 60°C 수욕상에서 감압 농축하여 동결 건조시킨 것을 냉동보관하였다. 따로 새삼, 실새삼 및 중국토사를 각각 50 g 취하여 에탄올 500 ml로 실온에서 24시간동안 1회 추출하고 300 ml의 에탄올로 2회 더 추출한 뒤 그 여액을 합하여 rotary vacuum evaporator로 감압농축하여 동결건조시킨 것을 냉동보관하였다. 새삼과 실새삼의 줄기는 각각 건조하지 않은 상태로 단편화한 후 면 거즈에 싸서 즙을 내어 원심분리한 후 상정액을 취하여 건조하지 않고 그대로 냉동보관 하였다. 조제된 시료는 사용 전 여과 멸균한 후 각 농도에 맞게 phosphate buffered saline(PBS)에 녹여 실험에 사용하였다.^{22,23)}

Melanoma Clone M-3의 배양

본 실험에 사용한 Clone M-3는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank; KCLB)에서 분양받은 mouse melanoma 세포이다. Clone M-3는 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone사, Canada)이 포함된 RPMI medium 1640 (Gibco사, U.S.A.)에 penicillin/streptomycin(Gibco사, U.S.A.) 100 µg/ml을 첨가하여 성장배지로 사용하고 37°C, 5% CO₂의 조건을 갖춘 CO₂ incubator(Forma Scientific 사, U.S.A.)에서 배양하였다. 세포가 증식하여 밀생상태를 이루면 배양액을 제거하고 PBS로 2회 세척하고 Trypsin/0.02% EDTA를 이용하여 세포를 flask 바닥으로부터 분리시킨 후 세포부유액을 conical tube에 모아 1200×g로 10분간 원심분리하였다. 상정액을 제거하고 성장배지를 넣어 세포부유액을 만들어 1:3으로 계대배양하였다. 일부는 냉동배지에 분산하여 냉동 후 액체질소 tank에 보관하였으며 본 실험에는 2~10세대 사이의 세포를 사용하였다.

MTT assay

96-well cell culture plate에 대수 증식기의 Clone M-3 세포를 2×10⁴ cell 씩 각 well에 첨가하고 1개의 well에는 세포 부

유액 대신 배지만 넣어 흡광도 측정 시 blank로 사용하였다. 시료용액은 원하는 농도의 10배 용액으로 만들어 PBS로 희석하여 20 µl/well씩 첨가하였고 세포부유액을 넣은 well 중 마지막 well에는 시료대신 PBS를 첨가하여 100% 생존군으로 하였다. 검체 투여가 끝난 plate를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후 2 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) 용액 50 µl/well을 넣고 다시 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 3000 rpm에서 30분간 원심분리 후 배지를 제거하고 Dimethyl sulfoxide(DMSO) 150 µl/well 을 첨가하고 15분간 실온에서 진탕하여 살아있는 세포가 MTT와 반응하여 생성된 보라색의 불용성 formazan을 용해시키고 균일하게 만든 후 ELISA reader[Biotek Instruments 사(U.S.A.)의 ELx808]로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군과 실험군의 세포 생존율은 실험군의 평균 OD₅₄₀ 값을 구하여 대조군의 평균 OD₅₄₀ 값에 대한 백분율로 나타내었다.²⁴⁻²⁶⁾

Melanin contents 측정

Melanin 양 측정법은 Hosoi 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 96-well cell culture plate에 대수 증식기의 Clone M-3 세포를 1×10⁵ cell/well씩 첨가하고 1개의 well에는 세포 부유액 대신 배지만 넣어 흡광도 측정 시 blank로 사용하였다. 시료용액은 원하는 농도의 10배 용액으로 만들어 PBS로 희석하여 20 µl/well씩 첨가하였고 세포부유액을 넣은 well 중 마지막 well에는 시료 대신 PBS를 첨가하여 100% melanin 생성군(Control)으로 하였다. 검체 투여가 끝난 plate를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 배양 종료 후 3000 rpm에서 30분간 원심분리하고 배지를 제거한 뒤 PBS로 2회 세척하여 준비한 세포 침전물에 10% DMSO가 첨가된 1N NaOH 용액을 200 µl/well 씩 첨가하고 80°C에서 1시간 동안 용해하였다. ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하고 실험군의 평균 OD₄₀₅ 값을 구하여 대조군의 평균 OD₄₀₅ 값에 대한 백분율로 나타내었다.²⁷⁻³⁰⁾

Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성도는 Matinez-Esparza 등의 방법에 의하여 측정하였다. 96-well cell culture plate에 대수 증식기의 Clone M-3 세포를 1×10⁵ cell/well 씩 첨가하고 1개의 well에는 세포부유액 대신 배지만 넣어 흡광도 측정 시 blank로 사용하였다. 시료용액은 원하는 농도의 10배 용액으로 만들어 PBS로 희석하여 20 µl/well씩 첨가하였고 세포부유액을 넣은 마지막 well에는 시료대신 PBS를 첨가하여 100% tyrosinase 활성군(Control)으로 하였다. 검체 투여가 끝난 plate를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였고 종료 후 3000 rpm에서 20분간 원심분리하고 배지를 제거한 뒤 PBS로 2회 세척하여 준비한 세포 침전물에 100 µl/well의 세포용해액(1% Triton X-100, 10 mM sodium

phosphate, 0.1 mM phenylmethylsulfonylfluoride)을 가하였다. 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고 3000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 효소용액으로 사용하였다. 100 mM sodium phosphate(pH 7.0) 용액 100 µl에 시료인 효소용액 50 µl를 가하고 37°C에서 5분간 보온한 후 100 mM catechol 50 µl를 넣은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험군의 평균 OD₄₀₅ 값을 구하여 대조군의 평균 OD₄₀₅ 값에 대한 백분율로 나타내었다.^{31,32)}

DPPH radical 제거활성 측정

시료를 각 농도별로 조제한 용액 100 µl(control : 99.5% ethanol)에 0.1 mM DPPH(99.5% ethanol)용액 950 µl와 0.1 M sodium acetate buffer 950 µl를 가하였다. 30초 동안 진탕하고 30분간 실온에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 항산화 활성은 각 농도의 실험군의 OD₅₁₇ 값을 구하여 대조군의 OD₅₁₇ 값에 대한 백분율로 나타내었다.³³⁻³⁷⁾

결과 및 고찰

MTT assay

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT)는 세포 내로 흡수된 후 mitochondria의 succinate dehydrogenase에 의해 보라색의 formazan을 형성하는데 이 물질의 세포 내 축적은 mitochondria의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하므로 세포의 생존을 측정하는 방법으로 이용되고 있다.

Clone M-3의 성장 및 생존에 대한 새삼, 실새삼 및 중국토사의 영향을 확인하기 위하여 10~200 µg/ml의 농도로 48시간 처리한 결과, IC₅₀은 새삼 줄기 에탄올추출물(121 µg/ml), 실새삼 종자 에탄올추출물(102 µg/ml), 새삼 종자 에탄올추출물(101 µg/ml), 갯실새삼 종자 에탄올추출물(111 µg/ml)로, 항암 효과의 기준이 되는 수치인 230 µg/ml에 비하여 낮은 농도로 나타나 실새삼 줄기를 제외한 시료 들의 에탄올 추출물 들이 높은 세포독성을 가짐을 알 수 있었다³⁸⁾ (Table I).

Table I – Cytotoxicity of water, ethanol extracts and juice of *Cuscuta japonica*, *C. australis*, and *C. chinensis* in mouse melanoma Clone M-3

	IC ₅₀ ^{a)}		
	Water extract (µg/ml)	Ethanol extract (µg/ml)	Juice (mg/ml)
Stem of <i>C. japonica</i>	283	121	14.32
Seed of <i>C. japonica</i>	419	102	-
Stem of <i>C. australis</i>	707	499	5.21
Seed of <i>C. australis</i>	521	101	-
Seed of <i>C. chinensis</i>	519	111	-

^{a)}IC₅₀ Value represents the concentration of water, ethanol extracts and juice required for 50% inhibition of cell growth.

Melanin 생합성에 미치는 영향

Clone M-3의 melanin 생합성에 대한 새삼, 실새삼 및 갯실새삼의 영향을 확인하기 위하여 10~50 µg/ml의 농도로 48시간 처리하였다. 시료의 melanin 생성 억제정도는 실험에 적용한 최고 농도인 50 µg/ml의 농도에서 다음과 같이 나타났다. 물추출물의 경우 실새삼 줄기 물추출물(80.00%)>실새삼 종자 물추출물(32.50%)>갯실새삼 종자 물추출물(31.58%)>새삼 종자 물추출물(29.38%)>새삼 줄기 물추출물(1.05%)의 순으로 저해율을 보였다(Fig. 1). 에탄올 추출물의 경우는 새삼 종자 에탄올 추출물(91.88%)>실새삼 종자 에탄올 추출물(85.63%)>실새삼 줄기 에

탄올추출물(80.00%)>갯실새삼 종자 에탄올 추출물(71.05%)>갯실새삼 종자 에탄올 추출물(71.05%)>새삼 줄기 에탄올 추출

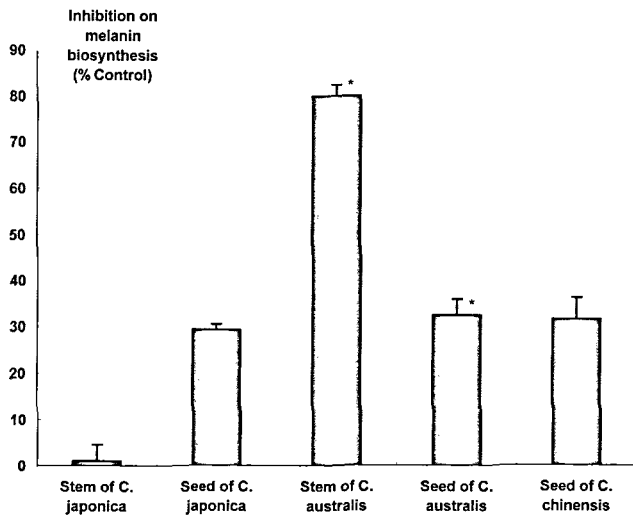


Fig. 1 – Effect of water extracts from *C. japonica*, *C. australis*, and *C. chinensis* on melanin biosynthesis in Clone M-3. Each value represents±SD for triplicate (50 µg/ml). * p <0.05, when compared to the control group.

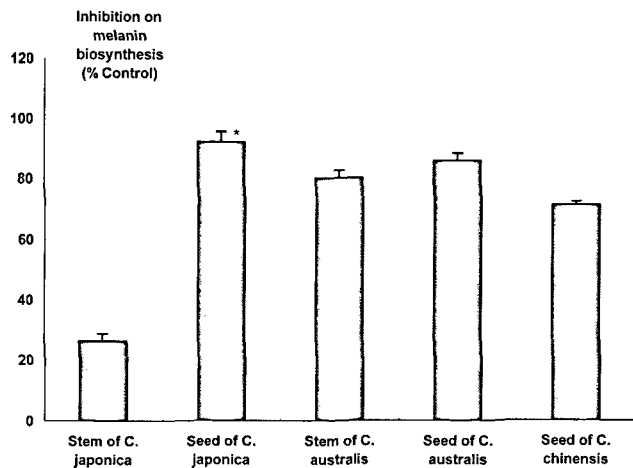


Fig. 2 – Effect of ethanol extracts from *C. japonica*, *C. australis*, and *C. chinensis* on melanin biosynthesis in Clone M-3. Each value represents±SD for triplicate (50 µg/ml). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, when compared to the control group.

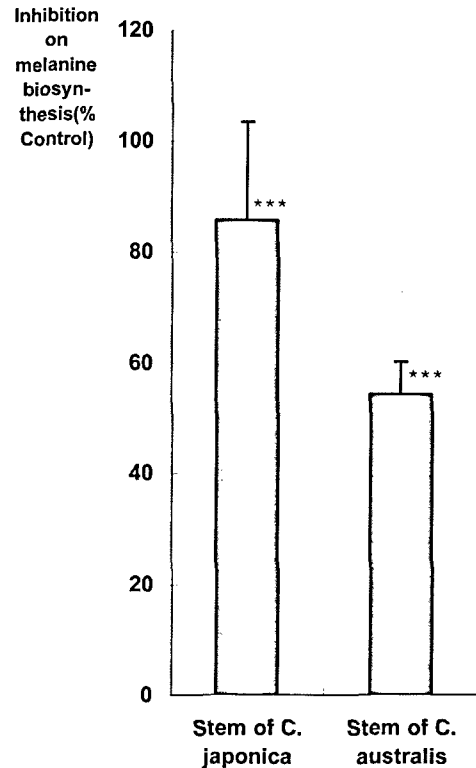


Fig. 3 – Effect of juice from *C. japonica* and *C. australis* on melanin biosynthesis in Clone M-3. Each value represents±SD for triplicate (6 mg/ml). *** p <0.001, when compared to the control group.

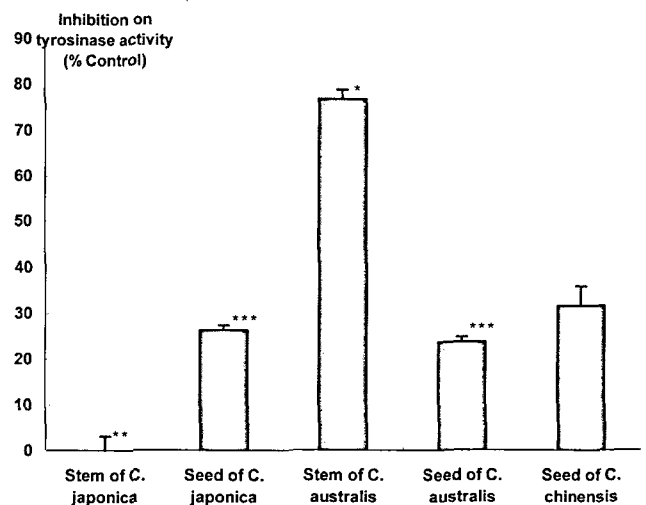


Fig. 4 – Effect of water extracts from *C. japonica*, *C. australis*, and *C. chinensis* on tyrosinase activity in Clone M-3. Each value represents±SD for triplicate (50 µg/ml). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, when compared to the control group.

물(26.25%)의 순으로 저해율을 보였다(Fig. 2). 즙의 경우 새삼즙이 6 mg/ml의 농도에서 85.00%로, 실새삼즙(58.29%) 보다 높은 저해율을 보였다(Fig. 3).

이상의 결과를 보면 새삼종자 에탄올추출물이 가장 높은 91.88%의 저해율을 나타냈고 새삼즙이 6 mg/ml의 농도에서 85.00%로, 실새삼즙보다 높은 저해율을 보였으며 새삼줄기 물추출물이 가장 낮은 1.05% 저해율을 나타냈다.

Tyrosinase 활성에 미치는 영향

Clone M-3의 tyrosinase 활성에 대한 새삼, 실새삼 및 갯실새삼의 영향을 확인하기 위하여 10~50 µg/ml의 농도로 48시간 처리하였다. 시료의 tyrosinase 활성저해율은 실험에 적용한 최고 농도인 50 µg/ml의 농도에서 다음과 같은 순서로 나타났다.

물추출물의 경우 실새삼줄기 물추출물(76.67%)>갯실새삼종자 물추출물(31.58%)>새삼 종자 물추출물 (26.32%)>실새삼종자 물추출물(23.69%)>새삼줄기 물추출물(0%)의 순이었다(Fig. 4). 에탄올 추출물의 경우는 실새삼줄기 에탄올추출물(73.33%)>새삼종자 에탄올 추출물(68.42%)>갯실새삼종자 에탄올추출물(57.90%)>실새삼종자 에탄올추출물(44.74%)>새삼줄기 에탄올추출물(34.21%)의 순으로 저해율을 보였다(Fig. 5) 즙의 경우 실새삼즙이 6 mg/ml의 농도에서 33.33%로, 실새삼즙(18.00%) 보다 높은 저해율을 보였다(Fig. 6).

이상의 결과를 보면 실새삼줄기 물추출물이 가장 높은 76.67%의 저해율을 보였고 새삼줄기 물추출물은 tyrosinase 활성을 저해하지 않았다.

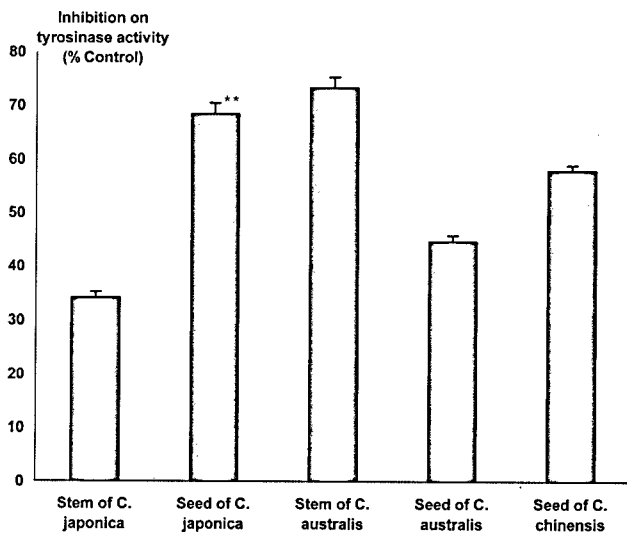


Fig. 5 – Effect of ethanol extracts from *C. japonica*, *C. australis*, and *C. chinensis* on tyrosinase activity in Clone M-3. Each value represents ±SD for triplicate (50 µg/ml) ***p* < 0.01 when compared to the control group.

DPPH radical 제거활성에 미치는 영향

새삼, 실새삼 및 갯실새삼의 영향을 확인하기 위하여 10~50 µg/ml의 농도로 48시간 처리하였다. DPPH radical 제거활성은 실험에 적용한 최고 농도인 50 µg/ml의 농도에서 다음과 같이 나타났다. 물추출물의 경우 새삼줄기 물추출물(37.57%)>갯실새삼

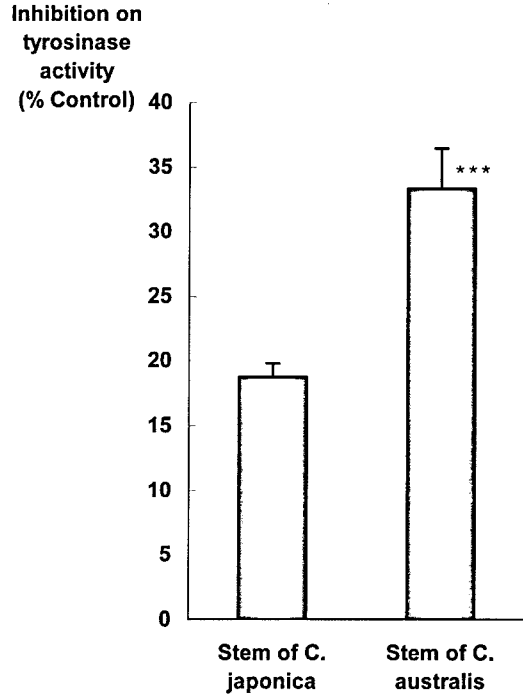


Fig. 6 – Effect of juice from *C. japonica* and *C. australis* on tyrosinase activity in Clone M-3. Each value represents ±SD for triplicate (6 mg/ml). ****p* < 0.001 when compared to the control group.

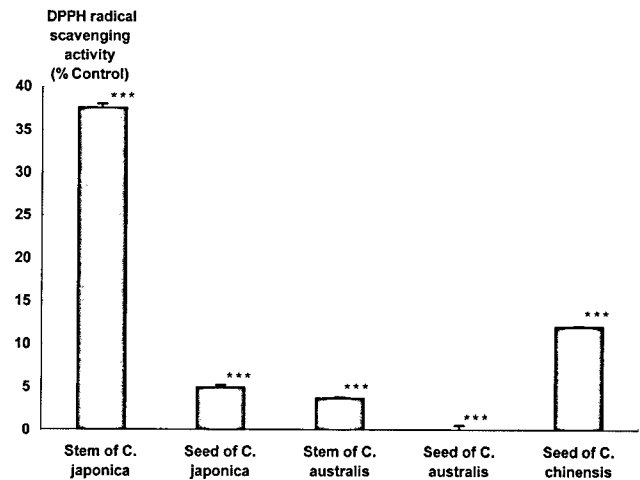


Fig. 7 – DPPH radical scavenging activity of water extracts from *C. japonica*, *C. australis*, and *C. chinensis*. Each value represents ±SD for triplicate (50 µg/ml). ****p* < 0.001 when compared to the control group.

종자 물추출물(12.06%)>새삼종자 물추출물(4.97%)>>실새삼줄기 물추출물(3.68%)>실새삼종자 물추출물(0%)의 순을 보였다(Fig. 7). 에탄올 추출물의 경우는 새삼줄기 에탄올추출물(42.54%)>갯실새삼종자 에탄올추출물(41.53%)>새삼종자 에탄올추출물(7.55%)>실새삼줄기 에탄올추출물(4.6%)>실새삼종자 에탄올추출물(0%)의 순을 보였다(Fig. 8). 즙의 경우 제거 새삼즙이 6 mg/ml의 농도에서 59.02%의 제거활성을 나타내어 47.15%인 실새

삼즙보다 높은 제거활성을 나타냈다(Fig. 9).

이상의 결과를 보면 새삼즙이 6 mg/ml의 농도에서 가장 높은 59.02%의 제거활성을 나타내어 47.15%인 실새삼즙보다 높은 제거활성을 나타냈으며, 새삼줄기의 에탄올추출물이 42.54%로 새삼즙 다음으로 높은 제거활성을 나타냈다. 실새삼종자의 물과 에탄올추출물은 모두 제거활성을 나타내지 않았다.

결 론

새삼, 실새삼 및 갯실새삼의 미백작용과 항산화작용을 규명하기 위하여 mouse melanoma Clone M-3의 생존율에 대한 영향을 측정하여 생체에 대한 안정성을 검증한 후 동일 세포의 melanin 생합성과 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정하여 미백효과를 검증하였고 DPPH free radical 제거능을 측정하여 항산화효과를 검증함으로써 피부 미백제로서의 효용 및 안전성을 확인하였고, 향후 개발 가능성을 알아보기 위하여 실험을 시행하여, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 시료의 세포생존율의 IC_{50} 은 새삼 줄기 에탄올추출물(121 μ g/ml), 새삼 종자 에탄올추출물(102 μ g/ml), 실새삼 종자 에탄올추출물(101 μ g/ml), 갯실새삼 종자 에탄올추출물(111 μ g/ml)로, 항암효과의 기준이 되는 수치인 230 μ g/ml에 비하여(Park *et al.*, 1993) 낮은 농도로 나타나 실새삼 줄기를 제외한 시료들의 에탄올 추출물들이 높은 세포독성을 가짐을 알 수 있었다.

2. 시료의 melanin 생성 억제정도는 실험에 적용한 최고농도인 50 μ g/ml의 농도에서 새삼종자 에탄올 추출물이 91.88%로 가장 높은 저해율을 나타냈으며 실새삼종자 에탄올 추출물이 85.63%, 실새삼 줄기 물추출물이 80.00%, 실새삼 줄기 에탄올추출물이 80.00%, 갯실새삼 종자 에탄올 추출물이 71.05%,를 나타냈다. 그러나 나머지 추출물들은 30%보다 낮은 저해율을 보였다.

3. 시료의 tyrosinase 활성저해율은 실험에 적용한 최고농도인 50 μ g/ml의 농도에서 실새삼줄기 물추출물이 76.67%, 실새삼줄기 에탄올추출물이 73.33%로 가장 높은 저해율을 나타냈으며, 새삼종자 에탄올 추출물이 68.42%, 갯실새삼종자 에탄올추출물이 57.90%를 나타냈으며 나머지 추출물은 45% 보다 낮은 저해율을 나타냈으며 새삼줄기 물추출물은 tyrosinase 활성을 전혀 저해하지 않았다. 한편 실새삼즙이 6 mg/ml의 농도에서 33.33%로, 실새삼즙(18.00%) 보다 높은 저해율을 보였다.

4. DPPH free radical 소거능은 실험에 적용한 최고농도인 50 μ g/ml의 농도에서 새삼줄기 에탄올추출물이 42.54%로 가장 높은 소거능을 나타냈으며 갯실새삼종자 에탄올추출물이 41.53%, 새삼줄기 물추출물이 37.57%였다. 그러나 나머지 추출물들은 12%보다 낮은 소거능을 나타냈으며 실새삼종자 물추출물, 실새삼종자 에탄올추출물은 소거능이 없었다. 한편 새삼즙이 6 mg/ml의 농도에서 가장 높은 59.02%로 실새삼즙(47.15%)보다 높은

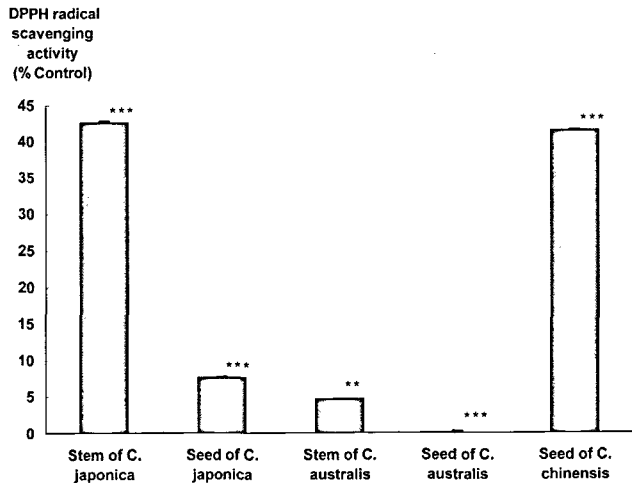


Fig. 8 – DPPH radical scavenging activity of ethanol extracts from *C. japonica*, *C. australis*, and *C. chinensis*. Each value represents \pm SD for triplicate (50 μ g/ml). ** p <0.01, *** p <0.001 when compared to the control group.

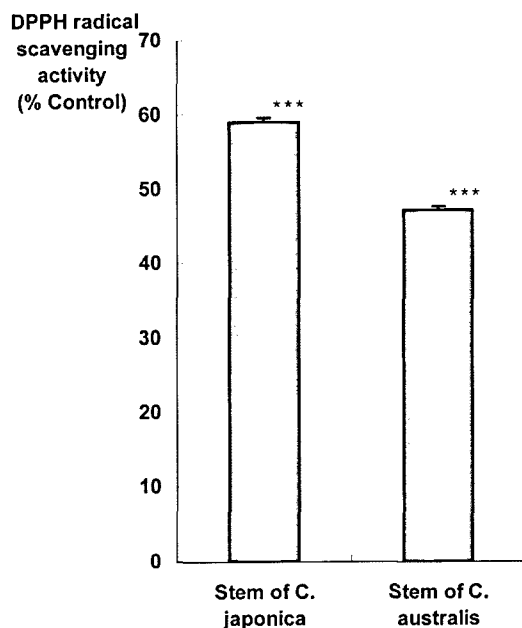


Fig. 9 – DPPH radical scavenging activity of juice from *C. japonica* and *C. australis*. Each value represents \pm SD for triplicate (6 mg/ml). *** p <0.001 when compared to the control group.

제거활성을 나타냈다.

참고문헌

- 1) 김연주 : 화장품에 함유된 미백성분의 특성과 분석방법에 관한 연구. 성신여자대학교 석사학위논문 (1995).
- 2) 박경찬 : 멜라닌 세포의 특성과 멜라닌 형성. 대한화장품학회지 25(2), 45 (1999).
- 3) Mayer, A. M. : Polyphenol oxidase in plants-recent progress. *Phytochemistry* 26, 11 (1987).
- 4) Kim, J. D. and Kim, J. H. : Development of anti-oxidant tea for anti-aging. *Bull. Uosu. Nat'l. Univ.* 14, 401 (1999).
- 5) Cho, B. I. : Toxicity of oxygen free radical and clinical use of scavengers. *The Kon-kuk J. of Medical. Sciences* 3, 115 (1993).
- 6) Park, J. G., Hyun, J. W., Lim, K. H., Shin, J. E., Won, Y. J., Yi, Y. D., Shin, K. H., Chang, I. M. and Woo, W. S. : Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* 24(3), 223 (1993).
- 7) Kligman, L. H., Akin, F. J., Kligman, A. M. : Sunscreens promote the repair of ultraviolet radiation-induced dermal damage. *J. Invest. Dermatol.* 81, 98 (1993).
- 8) Plastow, S. R., Lovell, C. R. and Young, A. R. : UVB-induced collagen changes in the skin of the hairless albinomouse. *J. Invest. Dermatol.* 88, 145 (1987).
- 9) 김태정 : 한국자원식물 III, 서울대학교 출판부, 서울 p. 207 (1996).
- 10) 전태현 : 한국식물도감, 교육사, 서울 pp. 517-518 (1972).
- 11) 이창복 : 대한식물도감, 향문사, 서울 pp. 301-302 (1990).
- 12) 서울대학교 천연물과학연구소 문헌정보학연구실; 동양의약과학 대전 I, 학술편수관, p. 516 (2003).
- 13) 이명렬, 전성주 : 토사자 추출물이 실험적으로 유발된 가토의 간 장기능장애에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 18(1), 333 (1989).
- 14) 이재현 : 인삼 Total saponin 분획물 및 오미자, 구기자, 사상자, 토사자, 복분자 수침 Ext가 mouse 뇌의 신경전달물질에 미치는 영향. 서울대학교 석사학위 논문 (1985).
- 15) 김영중, 김미숙, 이나경, 이재현 : 오미자, 구기자, 사상자, 토사자, 복분자 수침액이 단백질결핍된 마우스의 면역체계에 미치는 영향. 한국생약학회지 16(1), 48 (1985).
- 16) 김은정 : 토사자의 고지혈증에 미치는 영향, 숙명여자대학교 석사학위논문 (1996).
- 17) 석귀덕, 이승자, 배정미 : 실새삼 추출물의 mushroom tyrosinase 활성 억제 효과, 생약학회지 35(4), 380 (2004).
- 18) 孫思邈 : 面藥, 千金要方, 9권.
- 19) 陳存仁 : 도설 한방의학대전 (중국과학대전), 講談社, 동경 p. 202 (1982).
- 20) 송정식 : 한방피부미용, 효림, 서울 pp. 188-189 (1993).
- 21) 석귀덕, 이성하, 김경신 : 새삼 추출물의 여드름유발균 *Propionibacterium acne* 증식 억제 효과. 생약학회지 35(4), 375 (2004).
- 22) Jeon, W. K., Park, K. J., Kim, S. Y. and Sung, H. J. : *In vitro* studies on the anticancer effect and topoisomerase I inhibition activity of *Caesalpinia sappan* L. extract. *Kor. J. Pharmacogn.* 30(1), 1 (1999).
- 23) Choi, W. Y., Nam, H. W. and Yoo, J. E. : Toxoplasmodicidal effect of HL-60 cells differentiated by dimethylsulfoxide. *Kor. J. Parasitol.* 26(4), 229 (1988).
- 24) Hong, S. H., Ahn, S. H., Jang, B. K. : Protective effects of Seok-Jeong on the toxicity of cadmium in neuronal cells. *Korean Pharm. Res.* 47(2), 85 (2003).
- 25) Yang, S. H., Lee, M. S. and Park, J. B. : Cytotoxicity effects of soluble extracts from periodontal dressing on human gingival fibroblast. *Korean J. Periodontal Res.* 24(3), 661 (1994).
- 26) Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. : Evaluation of Tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay, Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936 (1987).
- 27) Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. : Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and retinoic acid. *Cancer Res.* 45, 1474 (1985).
- 28) 최원형, 천현자, 이정호, 백승화 : 산수유 메탄올 추출물이 B16/F10 Melanoma 세포주의 멜라닌 생성에 미치는 영향. 생약학회지 34(1), 70 (2003).
- 29) 진무현, 김호정, 강상진, 강세훈, 김철환, 정민환 : 여로의 멜라닌 생성 억제 물질. 생약학회지 33(4), 399 (2002).
- 30) 김현진, 이진우, 김영일, 이무형 : 태반추출물이 SK30 인체 악성 흑색종 세포주의 tyrosinase, TRP-1과 TRP-2 발현에 미치는 영향. 대한피부과학회지 41(12), 1612 (2003).
- 31) Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J. A. and Garcia-Borrón, J. C. : Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* 255, 139 (1998).
- 32) Funasaka, Y., Chakraborty, A. K., Komoto, M., Ohashi, A. and Ichihashi, M. : The depigmenting effect of α -tocopherol ferulate on human melanoma cells. *British J. of Dermatology* 141, 20 (1999).
- 33) Raghavan, G., Subha, R., Madhvan, V., Shirwaikar, A., Rawat, A. K. S., Mehrotra, S. and Pushpangadan, P. : Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biol. Pharm. Bull.* 26(10), 1424 (2003).
- 34) 심관섭, 김진화, 박성민, 이범천, 윤여표, Yong He Zhang, 표형배 : 권백 추출물이 인간 피부 섬유아세포에서의 항산화와 Matrix Metall-oproteinase-1 발현저해효과. 약학회지 48(2), 165 (2004).
- 35) Kang, S. M. : Effect of inhibition of Ginkgo biloba extracts on induction of reactive oxygen species and release of inflammation mediator arachidonic acid from U937. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32(5), 1198 (2000).

- 36) Lee, E. S., Choi, J. S., Lee, K. H., Kim, K. W. and Kwon, Y. H. : Antioxidant effect of kombucha broth against senescence induced normal human diploid fibroblasts with oxygen free radicals. *Korean Pharm. Res.* **47**(2), 93 (2003).
- 37) Hatano, T., Edamatsu, R. and Mori, A. : Effects of the interaction of tannins with co-existing substances VI.; Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull* **37**, 2016 (1989).
- 38) Park, S. N. : Skin aging and reaction oxygen species. *J. Seoul National Univ of Technology* **50**, 329 (1999).