

목단피 물 추출물의 항산화 및 Tyrosinase 억제효과

유진균¹ · 정미자² · 김대중¹ · 서동주¹ · 박정해³ · 김태우¹ · 최 먼^{1*}

¹강원대학교 식물생명공학전공

²강원대학교 BK21사업단(뉴트라슈티컬바이오)

³화진화장품 기술연구소

Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Effects of *Paeonia suffruticosa* Water Extract

Jin-Kyoun You¹, Mi Ja Chung², Dae-Jung Kim¹, Dong-Joo Seo¹,
Jeong-Hae Park³, Tae-Woo Kim¹, and Myeon Choe^{1*}

¹Dept. of Plant Biotechnology, Division of Biotechnology, School of Bioscience and Biotechnology, and

²The Nutraceutical Bio Brain Korea 21 Project Group, Kangwon National University,

Gangwon 200-701, Korea

³Hwajin Cosmetic R&D Center, Seoul 135-090, Korea

Abstract

Tyrosinase catalyzes melanin synthesis in skin melanocytes. The effects of *Paeonia suffruticosa* water extract (MDP) on antioxidant and tyrosinase activities have been studied in a cell-free system and mouse melanoma B16 cell. Radical scavenging activity of MDP was tested by DPPH assay and it showed high DPPH radical scavenging activity. The cellular tyrosinase activity was measured in mouse melanoma B16 cell by RT-PCR and enzyme activity. Treatment with MDP for 24 hr resulted in decreased tyrosinase mRNA level. Tyrosinase activity was decreased, compared with control, in cells exposed to MDP. Thus, *Paeonia suffruticosa* water extracts may be a candidate for cosmetic use.

Key words: *Paeonia suffruticosa*, antioxidant activity, tyrosinase activity, mouse melanoma B16 cell

서 론

최근 외모에 대한 관심이 여성뿐만 아니라 남성들에게도 증가하고 있고 외모가 하나의 사회적 경쟁력이라는 인식이 증가됨에 따라 화장품업계의 관심이 남성화장품과 먹을수록 피부가 고와지는 미용식품으로까지 확대되었다.

미용식품은 건강기능성 식품이나 의약품으로 분류돼 엄격한 면에서 화장품은 아니지만 이너뷰티(Inner Beauty)가 화장품 업계와 소비자들에게 깊이 인식되면서 넓은 범주의 화장품으로 인식되고 있다. 이너뷰티의 개념이 주목되면서 화장품업계에서는 식품에 대한 관심을 가지기 시작하였고, 식품영양업계는 화장품에 대한 관심이 증가하여 공동연구들이 활발하게 이루어지고 있다.

먹을 수도 있고 바를 수도 있는 화장품은 먹을 수 있는 천연소재 추출물이여야 할 것이고, 과잉 생성된 활성산소종에 의한 산화적 스트레스가 피부노화의 주요 원인이므로 이들 활성산소종을 제거할 수 있는 항산화 기능을 가지고 있어야 할 것이다(1). 그리고 미백효과, 주름개선 효과 등의 특수

기능을 가져야 할 것이다.

피부는 자외선의 영향을 받기 쉬운 기관이다. 자외선의 영향으로 피부에 활성산소가 생성되고 이에 따라 생성된 활성산소종은 피부 세포를 손상시키며 손상 받은 세포는 식세포에 의해 제거된다. 자외선을 받으면 피부에서 색소침착이 증가되는데, 이와 같이 색소침착이 증가하는 것은 자외선 흡수에 의한 피부 세포의 손상을 억제할 목적으로 melanin 생성이 증가된 결과이다. 자외선에 의한 피부의 노화가 진행되면 melanin 증식이 항시적으로 되고 그 결과 기미가 생성된다(2). 이 melanin 생성에 있어서 가장 중요한 역할을 하는 효소가 바로 tyrosinase이며 melanosome 내에 tyrosine을 산화시켜 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)를 만드는 tyrosine hydroxylase로 DOPA를 산화시켜 dopachrome을 만드는 DOPA oxidase로 작용하여 최종적으로 melanin polymer를 합성하게 된다. 따라서 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase활성 억제 실험은 유용한 일차 평가법으로 인정되고 있다(3,4).

목단피는 오래전부터 미백효과가 있는 것으로 알려져 있

*Corresponding author. E-mail: mchoe@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-8645, Fax: 82-33-250-7451

고, Lee 등(5)은 천연물로부터 미백효과 기능성 화장품 개발을 위하여 문헌 등에서 미백효과가 있는 것으로 알려진 전통 한약들의 MeOH 추출물에 대하여 tyrosinase 활성 억제 효과를 실험한 결과 목단피의 ethyl acetate 분획물이 가장 강한 억제효과를 나타내었다고 보고하였다. 목단피는 모란의 근피로, 외면은 암갈색-암적색이고 가로로 작은 타원형의 결뿌리 자국이 있으며 세로주름이 있다(6). 목단피 에탄올 추출물 분획물은 인슐린 민감성을 향상시키고, α-glyco-amylase 활성을 현저히 감소시키는 항당뇨 소재로 보고되어(7) 있으나 목단피 추출물의 다양한 기능성을 검토한 연구는 많지 않다.

이에 본 연구에서는 한약 재료로 알려져 있는 목단피 물 추출물이 항산화 기능을 가지고 있어 피부의 산화적 스트레스를 감소시킬 수 있는지, 그리고 tyrosinase 활성억제 작용에 의해 melanin 함량을 감소시켜 미백효과를 가진 천연소재 및 먹으면서 피부가 고와지는 먹는 화장품 소재로 사용가능한 한지에 대한 가능성을 알아보았다.

재료 및 방법

시료추출

목단피를 건조한 뒤 무게 당 10.7배의 증류수를 가하여 60°C에서 24시간 교반하면서 유효성분을 추출한 뒤 감압 농축하여 동결 건조한 것을 시료로 사용하였다.

DPPH free radical 소거작용

목단피 물 추출물과 에탄올에 1.5×10^{-4} M DPPH(2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl)를 녹여 여과한 용액을 1:3 비율로 혼합한 뒤 37°C에서 30분간 방치한 후 532 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 식에 의해 계산하였다(8).

$$[1 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})] \times 100$$

Tyrosinase 활성 억제작용

Tyrosinase 효소 활성 저해 효과 측정은 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8) 0.2 mL, 5 mM L-DOPA solution 0.2 mL 및 목단피 물 추출물 0.5 mL의 혼합액에 tyrosinase(250 U/mL) 0.1 mL를 첨가하여 35°C에서 2분간 반응시킨 다음 475 nm에서 측정한 후 다음과 같은 방법으로 억제율을 계산하였다(3).

$$(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}} \times 100$$

세포 배양

마우스 melanoma(B16) 세포를 한국세포주은행에서 분양 받은 뒤 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% 항생제가 첨가된 minimum essential medium(MEM)을 배양액으로 하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포 생존율

배양이 끝난 세포 생존율은 Chung 등(9)이 사용한 3-[4,5-

dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 환원 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 mouse melanoma(B16) 세포를 96-well plates에 1×10^6 cells/mL 농도로 150 μL씩 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 FBS와 항생제가 첨가되지 않은 배지에 목단피 물 추출물을 농도별로 제조한 후 세포에 처리하였고, 처리 후 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 MEM의 10분의 1에 해당하는 MTT 용액(5 mg/mL)을 가하여 주고 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시킨 후 상층액을 제거하였다. 그런 다음 암 조건에서 30분간 건조한 후 DMSO를 100 μL씩 분주하여 1시간 동안 shaking 한 후 570 nm에서 흡광 측정하였다.

세포내 tyrosinase 활성 측정

세포를 24-well plates에 1×10^5 cells/mL으로 분주한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 FBS와 항생제가 첨가되지 않은 배지에 목단피 물 추출물을 농도별로 제조하여 세포에 처리하였고 24시간 동안 더 배양하였다.

시료 처리 배지를 제거한 뒤 pH 6.8의 phosphate-buffer saline(PBS)으로 세척하였고, 1% Triton X-100가 함유된 PBS를 wells에 첨가한 뒤 cell scraper로 wells에 붙어 있는 세포를 떼어내어 1.5 mL 튜브에 모아 -70°C에 급속 냉동시킨 후 해동시켰으며 이와 같은 방법을 3번 반복하여 세포막을 파괴하였다. 10,000×g에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 tyrosinase 활성 측정을 위한 효소원과 단백질 측정을 위한 시료로 사용하였다. Bio-Rad protein kit으로 단백질 정량을 하였으며, tyrosinase 활성 측정은 10 mM L-dopa 200 μL와 0.1 M PBS(pH 6.8) 500 μL, tyrosinase 효소원(세포로부터 얻은 상층액) 300 μL를 첨가한 후 35°C에서 1시간 incubation 후 475 nm에서 흡광 측정하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

Mouse melanoma(B16) 세포를 6-well plates에 1×10^6 cells/mL으로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 목단피 물 추출물을 처리하여 24시간 동안 더 배양하였다. 목단피 물 추출물이 함유된 배지를 제거한 후 QIAzol lysis buffer를 각 wells에 500 μL씩 분주하여 세포를 lysis한 후 -70°C에 보관하였다.

보관된 시료를 실온에서 녹인 후 chloroform 200 μL를 분주하여 15초간 섞었다. 그 후 12,000×g 15분간 원심분리하여 상층액을 isopropanol 500 μL이 들어 있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 12,000×g 10분간 원심분리 하였고, 그 상층액을 제거한 후 100% ethanol과 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 75:25로 섞어 만든 75% ethanol을 각 튜브에 1 mL씩 분주하여 12,000×g에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. Nuclease free water를 40 μL씩 분주하여 녹인 후 RNA 5 μL에 0.1% DEPC를 955 μL를 첨가하여 260 nm에서 흡광 측정하여 total RNA 양을 정량하였다.

Oligo(dT)₁₅ primer(500 µg/mL) 1 µL, dNTP mix(10 mM) 1 µL, 추출한 RNA(2 µg)와 RNase free water로 11 µL을 맞추고 65°C에서 5분간 반응시킨 후 5×first-stand 완충용액 4 µL, nuclease free water 1 µL, DTT(100 mM) 2 µL, SuperScript III reverse transcriptase 1 µL를 섞어 9 µL씩 각 PCR tube에 더한 후 42°C에서 50분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

실험에 사용한 primer sequence는 tyrosinase의 forward primer는 5'-GGCCAGCTTTCAGGCAGAGGT, reverse primer는 5'-TGGTGCYYCATGGGCAAATC를 사용하였으며, 내부 표준 유전자로 사용한 GAPDH의 primer sequence는 forward primer 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC이었고, reverse primer는 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA이었다.

PCR

Tyrosinase의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 PCR를 실시하였다. PCR tube에 Go Tag Green Master 10 µL, forward primer(15 µM)와 reverse primer(15 µM)를 각각 0.5 µL, nuclease free water 8 µL, 합성한 first-stand cDNA 1 µL를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR를 실행하였다. Tyrosinase PCR 조건은 94°C에서 4분(1 cycle), 94°C에서 30초, 62°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초(21 cycles), 72°C에서 5분(1 cycle)이었고, GAPDH PCR 조건은 94°C에서 4분(1 cycle), 94°C에서 30초, 55°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초(21 cycles), 72°C에서 5분(1 cycle)이었다. PCR 산물은 0.002% ethidium bromide가 첨가한 1.2% agarose gel에 100 V에서 30분간 전기영동 후 자외선광으로 유전자 발현 정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도를 SigmaGel(Jandel Scientific) 소프트웨어에 의해 분석 정량하였다.

통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 SPSS(statistical package for social sciences, Version 10.0, Chicago, USA) program을 이용하여 실험군당 평균±표준편차로 표시하였고, 각 농도의 평균차의 통계적 유의성을 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

목단피 물 추출물의 DPPH radical 소거작용

목단피 물 추출물을 이용하여 DPPH radical 소거작용을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 목단피 물 추출물을 1~100 ppm 첨가하였을 때 DPPH radical 소거작용이 농도 의존적으로 증가하고, 100 ppm 첨가 시 DPPH radical 소거활성은 81.3%였으나, positive control로 사용된 ascorbic acid보다는 낮은 소거작용을 나타내었다. 그러나 200, 500 그리고 1000 ppm 목단피 물 추출물을 첨가하였을 때 모두 95% 이상

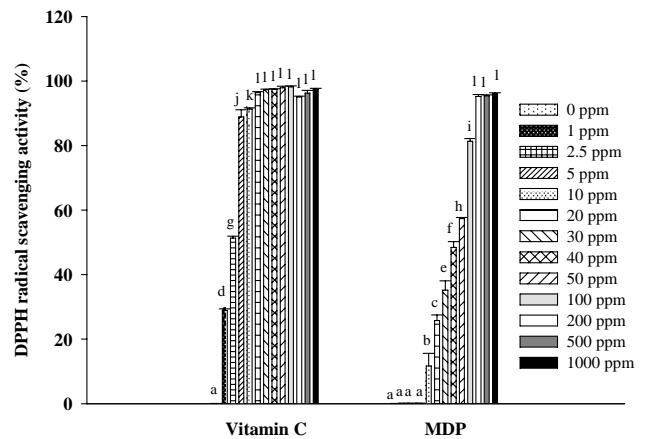


Fig. 1. Effect of *Paeonia suffruticosa* water extract on DPPH radical scavenging activity. MDP: *Paeonia suffruticosa* water extract. Results are from three experiments and are expressed as mean±SD (n=3). Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

의 소거활성을 보여 주었고, ascorbic acid와 비슷한 수준의 항산화 활성을 보였다.

잘 알려져 있는 한약재인 감초, 인삼 그리고 창출의 70% 에탄올 추출물의 100 µg/mL를 처리한 결과 DPPH 소거작용은 각각 80, 26 그리고 39%라는 보고(10)와 비교하면 목단피 물 추출물이 현저히 높았다.

목단피 물 추출물의 tyrosinase 활성 억제

Melanin 생성에 중요한 역할을 하는 효소인 tyrosinase의 억제활성 효과는 mushroom tyrosinase를 효소원으로 하여 기질인 L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA)과의 반응으로 생성된 L-dopaquinone의 흡광도를 측정하여 tyrosinase 활성억제를 알아본 결과 Fig. 2와 같다. 목단피 물 추출물을 25, 50 그리고 100 ppm 처리했을 때 tyrosinase 활성이 무처리군인 대조군과 비교하여 농도 의존적으로 유

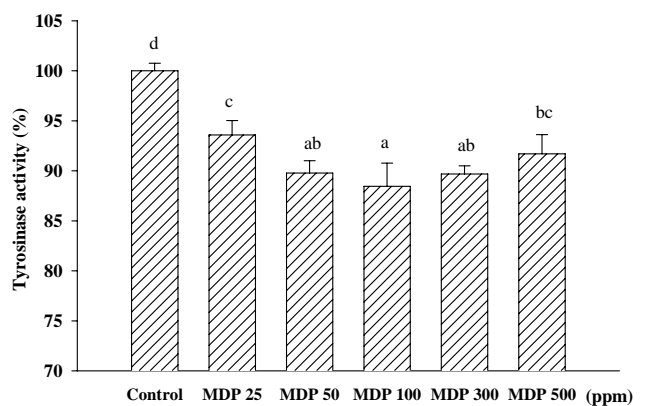


Fig. 2. Effect of *Paeonia suffruticosa* water extract on tyrosinase activity in a cell-free system. MDP: *Paeonia suffruticosa* water extract. Results are from three experiments and are expressed as mean±SD (n=3). Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

의적 억제를 나타내었다. 300 ppm과 500 ppm 목단피 물 추출물 처리군은 대조군보다는 tyrosinase 활성이 유의적으로 억제되었으나, 가장 높은 억제 효과를 나타낸 목단피 물 추출물 100 ppm 처리군과 비교하여 변화가 없거나 오히려 증가하였다. 이와 같이 고농도 목단피 물 추출물 처리가 오히려 tyrosinase 활성 억제가 낮은 것은 목단피 물 추출물이 고농도에서 독성이 있기 때문으로 생각된다(Fig. 3).

본 실험과 유사한 조건으로 실험한 Shin(10)의 연구 결과에서 홍경천, 인삼, 갈근, 오미자, 연교, 홍화씨, 창출은 본 실험결과와 유사하게 낮은 tyrosinase 활성억제를 보여 주었으나, 상지, 느티버섯 그리고 약쭈 추출물은 tyrosinase 활성을 40% 이상 억제시켰다.

목단피 물 추출물이 세포독성에 미치는 영향

MTT assay는 살아 있는 세포에서 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질은 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 목단피 물 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보므로 세포독성을 알아보았다. 목단피 물 추출물을 100~3000 ppm 처리한 후 처리군의 세포 생존율을 무처리군과 비교한 결과 변화가 없거나 오히려 증가하였으나, 5,000 ppm과 10,000 ppm에서는 세포 생존율이 80.6%와 70.6%로 세포 독성이 있었다(Fig. 3). 따라서 목단피 물 추출물은 3000 ppm 까지 독성이 없는 것으로 나타났고, 이런 결과를 바탕으로 세포내 tyrosinase 활성억제를 알아보는 실험 농도를 0, 100, 300 그리고 500 ppm으로 결정하였다.

목단피 물 추출물 처리가 mouse melanoma(B16) 세포내 tyrosinase mRNA 발현에 미치는 영향

Mouse melanoma(B16) 세포에 목단피 물 추출물을 처리

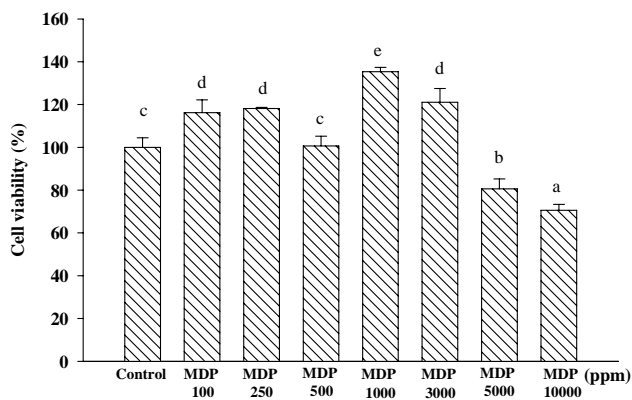


Fig. 3. Effect of *Paeonia suffruticosa* water extract on cell viability of mouse B16 melanoma cells. MDP: *Paeonia suffruticosa* water extract. Results are from three experiments and are expressed as mean±SD (n=3). Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

한 후 tyrosinase mRNA 발현정도를 알아본 결과는 Fig. 4와 같다. 목단피를 처리하지 않은 대조군에 비하여 300 ppm과 500 ppm의 목단피 물 추출물을 처리하였을 때 tyrosinase mRNA 발현이 현저히 감소하였다.

목단피 물 추출물의 cellular tyrosinase 활성 억제

목단피 물 추출물이 세포내(B16 melanoma) tyrosinase 활

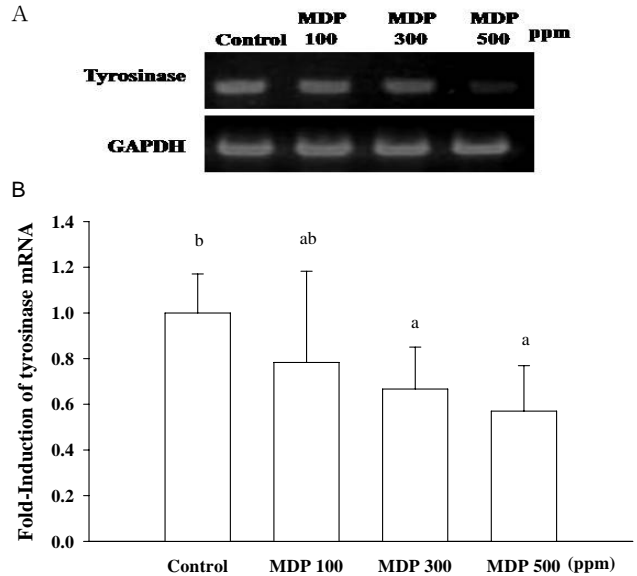


Fig. 4. Effect of *Paeonia suffruticosa* water extract on tyrosinase mRNA expression in mouse B16 melanoma cells (A, B). MDP: *Paeonia suffruticosa* water extract. Results are from three experiments and are expressed as mean±SD (n=3). Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test. Cells were incubated with medium containing 0, 100, 300 and 500 ppm MDP for 24 hr. The tyrosinase mRNA levels in each sample was normalized to the quantity of GAPDH. The fold induction of tyrosinase mRNA in treated cells was calculated as ratio of the corresponding mean value of the control cells.

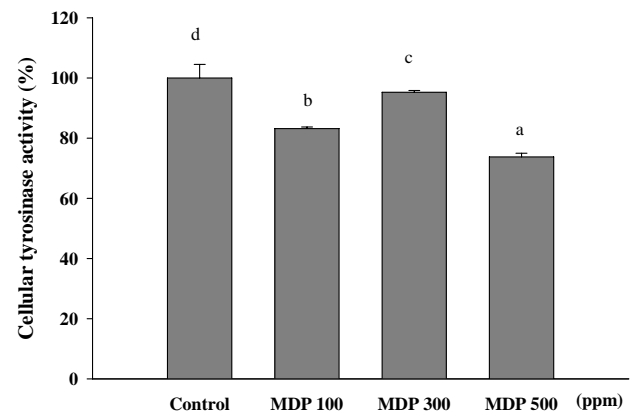


Fig. 5. Effect of *Paeonia suffruticosa* water extract on tyrosinase activity in mouse B16 melanoma cells. MDP: *Paeonia suffruticosa* water extract. Results are from three experiments and are expressed as mean±SD (n=3). Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

성도에 미치는 영향을 알아본 결과는 Fig. 5와 같다. 모든 처리군에서 무처리군인 대조군과 비교하여 현저하게 세포 내 tyrosinase 활성을 억제시켰고, 500 ppm 목단피 물 추출물의 처리군에서는 26.24% tyrosinase 활성이 감소하였다.

여성의 기미, 노인성 홍반 등의 생성과정은 tyrosine에서 출발하는 일련의 산화 중합반응이며, 이 과정에 tyrosinase가 중요한 역할을 한다. 따라서 tyrosinase 억제는 melanin 생합성을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다(11).

요 약

Tyrosinase는 피부의 melanocytes에서 멜라닌 생성을 촉진한다. 목단피의 미백효과를 알아보기 위하여 목단피 물 추출물의 항산화 능력과 tyrosinase 활성 억제에 미치는 영향을 세포 모델계와 a cell-free 모델계에서 알아보았다. MDP의 라디칼 소거작용은 DPPH assay로 알아보았고, MDP는 높은 DPPH 라디칼 소거작용을 보여주었다. 세포내 tyrosinase 활성은 RT-PCR, 효소활성을 마우스 B16 세포내에서 측정함으로써 알아보았다. 24시간 목단피 물 추출물을 투여한 세포내에서 tyrosinase mRNA와 효소활성이 무처리군과 비교하여 현저히 감소하였다. 이와 같은 결과들은 항산화력이 높고, tyrosinase를 효과적으로 억제할 수 있는 목단피 물 추출물을 이용하여 melanin 생합성을 억제할 수 있는 미백 화장품 개발에 활용할 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

감사의 글

본 연구는 (주) 화진화장품 지원과 강원대 Nutraceutical Bio Brain Korea 21 및 산업자원부 강원대학교 강원 웰빙

특산물 산업화 지역혁신센터(RIC) 일부 지원으로 수행한 연구결과입니다.

문 헌

1. Ryu SH, Jeon YS, Kwon MJ, Moon JW, Lee YS, Moon GS. 1997. Effect of kimchi extracts to reactive oxygen species in skin cell cytotoxicity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 814-821.
2. Shin JY. 2001. Screening of natural products that have activities against skin-aging. *Korea J Food Nutr* 14: 568-572.
3. Prota G. 1990. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J Invest Dermatol* 75: 122-128.
4. Pavel S, Muskiet FA. 1980. Euemlanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma, a preliminary report. *Cancer Detect Prev* 6: 311-318.
5. Lee SH, Park JS, Kim SY, Kim JJ, Chung SR. 1997. The screening of the inhibitory compounds on tyrosinase activity from the natural product. *Yakhak Hoeji* 41: 456-461.
6. 생약학연구회. 1995. 현대생약학. 학창사, 서울. p 25-40.
7. Park S, Jun DW, Park CH, Jang JS, Park SK, Ko BS, Kim BJ, Choi SB. 2004. Hypoglycemic effects of crude extracts of Moutan Radicis Cortex. *Korean J Food Sci Technol* 36: 472-477.
8. Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I. 2001. Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *J Nat Prod* 64: 892-895.
9. Chung MJ, Walker PA, Brown RW, Hogstrand C. 2005. ZINC-mediated gene expression offers protection against H₂O₂-induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 205: 225-236.
10. Shin JY. 2001. Screening of natural products that have activities against skin-aging. *Korean J Food Nutr* 14: 568-572.
11. Widlund HR, Fisher DE. 2003. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 22: 3035-3041.

(2008년 12월 22일 접수; 2009년 2월 27일 채택)