

정공피 추출물의 항산화 활성 및 미백효과에 관한 연구

김태혁¹ · 유진균¹ · 김정미¹ · 백종미¹ · 김현숙² · 박정해³ · 최 먼^{1,2*}

¹강원대학교 생명건강공학과

²강원대학교 웰빙특산물산업화지역혁신센터

³화진화장품 기술연구소

Antioxidant and Whitening Effects of *Sorbus commixta* HEDL Cortex Extract

Tae-Hyuk Kim¹, Jin-Kyoun You¹, Jeong-Mi Kim¹, Jong-Mi Baek¹, Hyun-Sook Kim²,
Jeong-Hae Park³, and Myeon Choe^{1,2*}

¹Dept. of Bio-Health Technology, and ²Well-being Bioproducts RIC Center,

Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

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

Abstract

This study was performed to assess the antioxidant activities and whitening effects of *Sorbus commixta* HEDL cortex on melanin synthesis. The whitening effects of *Sorbus commixta* HEDL cortex water extracts were examined by *in vitro* mushroom tyrosinase assay and B16BL6 melanoma cells. We assessed inhibitory effects of *Sorbus commixta* HEDL cortex water extracts on expression of melanogenic enzyme proteins including tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) and tyrosinase-related protein 2 (TRP-2) in B16BL6 cells. Inhibitory effects of *Sorbus commixta* HEDL cortex onto free radical generation were determined by measuring DPPH and hydroxyl radical scavenging activities. Our results indicated that *Sorbus commixta* HEDL cortex water extracts effectively inhibited free radical generation. In DPPH radical scavenging activity, *Sorbus commixta* HEDL cortex water extracts had a potent anti-oxidant activity in a dose-dependent manner. They significantly inhibited tyrosinase activity *in vitro* and in B16BL6 melanoma cells. Also, *Sorbus commixta* HEDL cortex suppressed the expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in B16BL6 melanoma cells. These results show that *Sorbus commixta* HEDL cortex inhibited melanin production on the melanogenesis. The underlying mechanism of *Sorbus commixta* HEDL cortex on whitening activity may be due to the inhibition of tyrosinase activity and tyrosinase, TRP-1, TRP-2 expression. We suggest that *Sorbus commixta* HEDL cortex may be contain new natural active ingredients for antioxidant and whitening cosmetics.

Key words: whitening, melanin, tyrosinase, tyrosinase-related protein

서 론

최근 급속한 산업화에 따른 환경오염과 오존층의 파괴는 자외선의 조사량을 증가시키고 있다. 피부는 자외선의 영향을 받기 쉬운 기관으로 계속적으로 자외선에 노출되면 피부 광노화가 촉진되고 색소 침착, 즉 기미, 주근깨, 홍반, 검버섯 등이 생성된다(1). 피부의 색소 침착은 멜라닌 색소 증가에 의해 나타나는데, 멜라닌의 생합성 과정에 작용하는 주요 효소는 tyrosinase로 polyphenol oxidase의 일종이며 구리를 함유한 효소로써 색소 세포에서 tyrosine을 L-3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)으로 변환하고 효소적 산화반응에 의한 단계를 거쳐 dopaquinone으로 변환시킨다. 이때 생성된 dopaquinone은 자발적 반응에 의해서 dopachrome으로 전환되며 이들은 tyrosinase-related protein-2(TRP-

2, DOPA chrome tautomerase)에 의해 축매 되어 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid(DHICA)로 전환된다(2,3). 이렇게 생성된 DHICA는 tyrosinase-related protein-2(TRP-1, DHICA oxidase)의 축매과정에 의해 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid(IQCA)로 전환되어 최종적으로 멜라닌으로 합성된다. 따라서 피부 미백제의 개발에 있어서 멜라닌 생성을 억제하는 경로와 이미 생성된 멜라닌의 분해를 촉진하는 단계에 관여하는 효소의 활성 조절이 중요시 되고 있고, 이에 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 활성 억제효과의 검증은 유용한 일차 평가방법으로 인정되고 있다(4).

현재까지 미백 기능성을 갖는 물질에 관한 연구는 tyrosinase의 활성을 억제하는 수준에서 대부분 이루어져 왔으며, 이러한 tyrosinase 저해제로 많이 알려진 물질로는 hydroquinone, ascorbic acid, kojic acid, azelaic acid, arbutin

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

등이 있지만 안정성과 경제성 등의 문제로 사용이 제한되고 있다(5). 따라서 최근 화장품 업계에서는 안전성을 고려하여 천연 소재로부터 미백 효과가 강화된 기능성 화장품에 대한 요구가 높아지고 있다. 천연물을 원료로 한 미백 기능성 소재로는 신선초(6), 마황(7), 연잎과 연꽃수술(8), 닭의장풀(9), 백강잠(10), 당귀(11), 쇠비름(12), 제비꽃(13), 복분자(14), 교맥(15), 노루궁뎅이 버섯(16), 대나무와 산삼(17), 백부자(18) 등이 있으며 이외에도 많은 연구가 진행되었다.

정공피(*Sorbus commixta* HEDL cortex)는 울릉도나 한반도 전역의 고산지대에서 자생하는 마가목 또는 당마가목의 동속 근연식물의 수피를 채취하여 말린 것으로 민간이나 한방에서 해소, 기관지염, 폐결핵, 수종, 위염, 신체 허약 등을 치료하고(19), 주요 성분으로는 beturine, lupheol, β -sitosterol, acuparin, dihydrocinnamic aldehyde, sorbic acid, parasorboside 등이 알려져 있다(7,20). 정공피에 대한 연구로는 메탄올 추출물의 (1,3) β -glucan synthase 억제 작용에 의한 항진균 효과(21), 에탄올 추출물의 항산화 효과(22) 등이 이루어진바 있으나, 미백 효과에 대한 과학적 검토는 전무한 실정이다.

멜라닌 세포에 의한 멜라닌 합성에 있어 가장 중심적인 요소는 TRPs라 통칭되는 tyrosinase, TRP-1과 TRP-2 등의 효소활성을 지닌 단백질의 발현과 활성화이다. 본 연구에서는 정공피 추출물을 이용하여 멜라닌 생성 및 활성산소 억제 작용을 통한 미백효과와 피부 노화억제에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

정공피 물 추출물의 제조

실험에 사용한 정공피는 춘천시 소재의 약재상에서 구매하였다. 시료는 완전히 건조하여 무게 당 10.7배의 증류수를 가하여 60°C에서 24시간 동안 교반하면서 유효성분을 추출하였다. 이를 실온에서 방냉한 뒤 감압 농축기(SB-1000, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하였고, 동결건조기(FD 8508, IIShin, Yangju, Korea)를 이용하여 -70°C에서 건조한 시료를 냉동보관하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

DPPH 라디칼 소거작용

DPPH 라디칼 소거작용은 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) 라디칼에 대한 환원력을 측정하였다(23). 정공피 물 추출물과 에탄올에 1.5×10^{-4} M DPPH를 녹여 여과한 용액을 1:3 비율로 혼합한 뒤 37°C에서 30분간 방치한 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거작용은 대조구에 대한 시료 첨가구의 흡광도를 비교하여 $(1 - \text{시료의 흡광도}/\text{대조구의 흡광도}) \times 100$ 에 의하여 산출하였다(24).

Hydroxy 라디칼 소거작용

Hydroxy 라디칼 소거활성은 Chung 등(25)의 방법을 이

용하여 측정하였다. 정공피 물 추출물을 농도별로 희석한 후 각 추출물 100 μ L, 100 mM sodium phosphate(pH 7.4) 250 μ L, 1 mM EDTA 100 μ L, 36 mM deoxyribose 100 μ L, 1 mM FeCl₃·6H₂O 100 μ L, 1 mM L-ascorbic acid 100 μ L, 10 mM H₂O₂ 100 μ L, 증류수 150 μ L를 첨가하여 38°C water bath에서 1시간 방치한 후 1% thiobarbituric acid 1 mL, 10% trichloroacetic acid 1 mL를 첨가하여 100°C에서 10분간 끓인 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, $(1 - \text{시료의 흡광도}/\text{대조구의 흡광도}) \times 100$ 에 의하여 산출하였다.

세포주 및 세포배양

Mouse B16BL6 melanoma 세포주는 한국 세포주은행(Seoul National University, Seoul, Korea)에서 분양하여 사용하였다. B16BL6 세포를 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% 항생제가 첨가된 minimum essential medium(MEM) 배지에서 37°C로 유지되는 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포 생존율

배양이 끝난 세포의 생존율은 Chung 등(26)이 사용한 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 환원 방법을 이용하여 측정하였다. Mouse melanoma B16BL6 세포를 96-well plates에 1×10^6 cells/mL 농도로 100 μ L 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 FBS와 항생제가 첨가되지 않은 배지에 정공피 물 추출물을 각 농도별로 제조한 후 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 DMEM의 10분의 1에 해당하는 MTT 용액(5 mg/mL)을 가하고 4시간 더 배양하여 MTT를 환원시킨 후 상층액을 제거하였다. 그런 다음 암 조건에서 30분간 건조한 후 DMSO를 100 μ L 분주하여 1시간 동안 혼합한 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Mushroom tyrosinase의 억제 활성

Melanin 생성에 중요한 역할을 하는 효소인 tyrosinase의 억제 활성은 mushroom tyrosinase를 효소원으로 하여 기질인 L-DOPA와의 반응으로 생성된 L-dopaquinone의 흡광도를 측정하였다. 시험관에 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8) 0.2 mL, 5 mM L-DOPA solution 0.2 mL 및 농도별로 희석한 정공피 물 추출물 0.5 mL을 혼합액에 tyrosinase(250 U/mL) 0.1 mL를 첨가하여 35°C에서 2분간 반응시킨 다음 475 nm에서 흡광도를 측정한 후 $(1 - \text{시료의 흡광도}/\text{대조구의 흡광도}) \times 100$ 에 의하여 억제율을 계산하였다(27).

Mouse B16BL6 melanoma에서 tyrosinase 활성 억제

정공피 물 추출물에 대하여 B-16 melanoma를 이용하여 미백효과를 측정하였다. 세포를 24-well plates에 1×10^5 cells/mL로 분주한 뒤 24시간 동안 배양하였고, FBS와 항생제가 첨가되지 않은 배지에 정공피 물 추출물을 각 농도별로 처리하여 24시간 동안 더 배양하였다. 시료를 처리한 배지를 제거한 뒤 phosphate-buffer saline(PBS, pH 6.8)으로 세척

하였고, 1% Triton X-100이 함유된 PBS를 각 well에 첨가한 뒤 cell scraper로 well에 부착되어 있는 세포를 부유시켜 1.5 mL 튜브에 모아 -70°C에서 급속 냉동시킨 후 해동시켰으며, 이와 같은 방법을 3번 반복하여 세포막을 파괴하였다. 10,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 tyrosinase 활성 측정을 위한 효소원과 단백질 측정을 위한 시료로 사용하였다. Bio-Rad protein kit(Hercules, CA, USA)로 단백질을 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 동안 배양한 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

B-16 mouse melanoma 세포를 6-well plates에 1×10^6 cells/mL로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 정공피 물 추출물을 처리하여 24시간 동안 더 배양하였다. 정공피 물 추출물이 함유된 배지를 제거한 후 QIAzol lysis buffer(QIAGEN, Hilden, Germany)를 각 wells에 500 µL씩 분주하여 세포를 lysis 한 후 -70°C에 보관하였다. 시료를 실온에서 녹여 chloroform 200 µL를 분주하여 15초간 섞은 후 12,000×g에서 15분간 원심분리 하여 상층액을 isopropanol 500 µL 들어 있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 12,000×g에서 10분간 원심분리 하여 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 원심분리 하여 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. Nuclease free water를 40 µL씩 분주하여 녹인 후 RNA 5 µL에 0.1% DEPC를 955 µL 첨가하여 260 nm에서 흡광도를 측정하였고 total RNA 양을 정량하였다.

Oligo(dT)₁₅ primer(500 µg/mL) 1 µL, dNTP mix(10 mM) 1 µL, 추출한 RNA 2 µg와 RNase free water로 11 µL을 맞추고 65°C에서 5분간 반응시킨 후 5배 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 Table 1과 같다.

Table 1. PCR primer sequences

Gene	Primer	Sequence ¹⁾
Tyrosinase	Forward	GGCCAGCTTTCAGGCAGAGGT
	Reverse	TGGTGCTTCATGGGCAAATC
TRP-1	Forward	GCTGCAGGAGCCTTCTTTCTC
	Reverse	AAGACGCTGCACTGCTGGTCT
TRP-2	Forward	GGATGACCGTGAGCAATGGCC
	Reverse	CGGTTGTGACCAATGGGTGCC
GAPDH	Forward	ACCACAGTCCATGCCATCAC
	Reverse	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

¹⁾Primers are shown 5→3.

RT-PCR 반응

Tyrosinase의 mRNA 발현량을 측정하기 위하여 합성된 RT-PCR을 실시하였다. PCR tube에 Go Tag Green Master (Promega, Madison, USA) 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. Tyrosinase는 94°C에서 4분(1 cycle), 94°C에서 30초, 62°C에서 30초 그리고 72°C에서 30초(21 cycles), 72°C에서 5분(1 cycle)이었고, GAPDH는 94°C에서 4분(1 cycle), 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 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 전기영동한 후 자외선 광으로 유전자 발현 정도를 알아보았다. 그 밴드의 강도를 SigmaGel(Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) 소프트웨어에 의해 분석 정량하였다.

통계처리

실험에서 얻어진 결과의 통계적 유의성은 GraphPad In-Stat(GraphPad InStat Version 3.00, 2003) 통계 package를 이용하여 평균±표준편차로 표시하였고, 대조군과 처리군 간의 평균치의 통계적 유의성을 Tukey-Kramer multiple comparisons test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

DPPH 라디칼 소거작용

정공피 물 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 정공피 물 추출물의 50, 100, 250, 500, 1000 ppm로 처리했을 때 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거 활성이 유의적으로 증가되었으며, 1000 ppm 농도에서

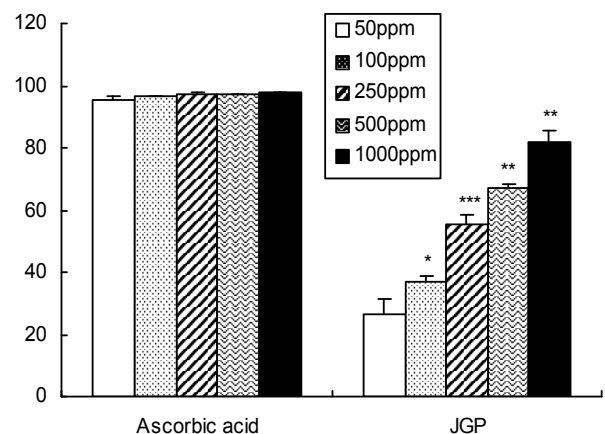


Fig. 1. Effect of *Sorbus commixta* HEDL cortex water extract on DPPH radical scavenging activity. JGP: *Sorbus commixta* HEDL cortex water extract. Results were expressed as % control and data were mean±SD. Significant differences were compared with control at *p<0.05 vs. control, **p<0.01 vs. control, ***p<0.001 vs. control.

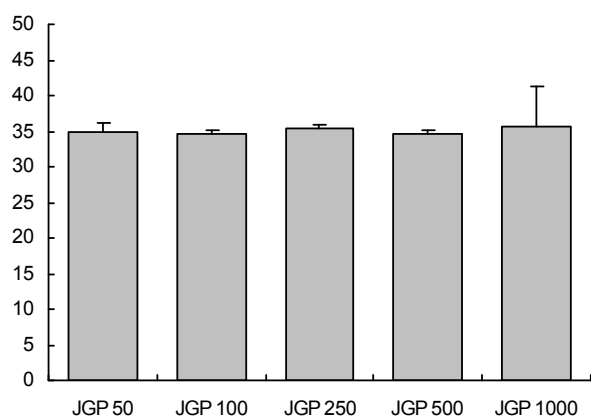


Fig. 2. Effect of *Sorbus commixta* HEDL cortex water extract on hydroxy radical scavenging activity. JGP: *Sorbus commixta* HEDL cortex water extract. Results were expressed as % control and data were mean \pm SD.

82.1%로 가장 높은 DPPH 라디칼 소거능을 보였다.

Choe 등(28)은 7종의 한약재 물 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 알아본 결과 산수유와 목단피 물 추출물은 양성 대조군으로 사용한 ascorbic acid와 유사한 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었으나 1,000 ppm의 백복령과 숙지황 물 추출물은 50% 이하의 DPPH 라디칼 소거능을 보였다고 보고하여 본 실험에 사용한 정공피의 물 추출물이 백복령과 숙지황에 비하여 높은 DPPH 라디칼 소거능을 나타내었다.

Hydroxy 라디칼 소거작용

Hydroxyl 라디칼은 DNA의 핵산과 결합함으로써 DNA 손상을 일으키므로 돌연변이와 암을 유발하는 것으로 알려져 있고 지질 산화를 일으켜 세포막을 손상시키므로 세포독성을 유발하는 것으로 알려져 있다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 정공피 물 추출물의 hydroxy 라디칼 소거 활성은 50~1,000 ppm 각 농도별로 처리하였을 때 모든 농도에서 34% 이상의 소거능을 보였으나 농도에 따른 유의적인 차이는 없었다.

Shin 등(29)은 hydroxy 라디칼 소거 작용이 물 추출물에서보다 에탄올 추출물에서 월등히 높았고, 생마늘과 찢마늘 열수 추출물 20,000 ppm 농도에서 각각 10.22%와 11.09%의 활성을 나타내었으며, 흑마늘은 같은 농도에서 45.33% hydroxy 라디칼 소거작용을 나타내었으나 1,000 ppm 농도에서는 소거활성이 나타나지 않았다고 보고하여 본 실험에서 사용된 정공피 물 추출물이 일반 마늘 및 흑마늘보다 높은 hydroxy 라디칼 소거작용을 나타내었다.

세포 생존율

정공피 물 추출물이 mouse melanoma B16BL6 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시료를 다양한 농도로 처리하고 배양한 후에 MTT 방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다. Fig. 3과 같이 B16BL6 세포에 대하여 정공피 물 추출물을 각 농도별(100, 250, 500, 1000, 3000 ppm)로

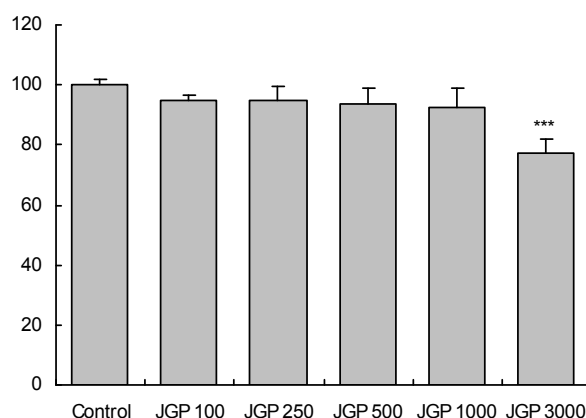


Fig. 3. Effect of *Sorbus commixta* HEDL cortex water extract on the viability of B16BL6 cells. JGP: *Sorbus commixta* HEDL cortex water extract. The cells were cultured in the presence of various concentrations of samples for 72 hr. Results were expressed as % control and data were mean \pm SD. Significant differences were compared with control at ***p<0.001 vs. control.

처리하였을 때 100 ppm부터 1,000 ppm 농도까지 90% 이상의 B16BL6 세포의 생존율을 유지하였으며, 100 ppm 농도에서 최대 95%의 생존율을 나타내었다. 한편 정공피 물 추출물의 3,000 ppm 농도에서는 77.3% 세포 생존율로 나타내었다. 그러므로 정공피 물 추출물의 tyrosinase 활성 및 TRP-1, TRP-2 mRNA 발현에 대한 실험에서는 100, 250, 500, 1000 ppm 농도 범위에서 진행하였다.

Mushroom tyrosinase 활성 억제

멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 효소인 tyrosinase의 활성 억제 작용은 버섯 tyrosinase를 효소원으로 하여 기질인 L-DOPA와의 반응으로 생성된 L-dopaquinone의 흡광도를 측정하였다. *In vitro* 버섯 tyrosinase 억제 효능의 측정 결과, Fig. 4와 같이 정공피 물 추출물을 100, 250, 500, 1000

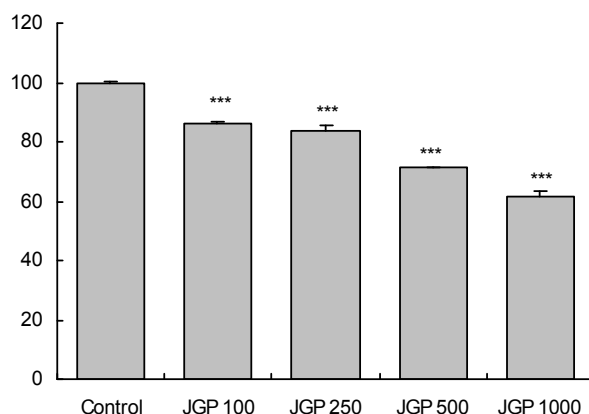


Fig. 4. Effect of *Sorbus commixta* HEDL cortex water extract on mushroom tyrosinase activity *in vitro*. JGP: *Sorbus commixta* HEDL cortex water extract. To test their direct effect on tyrosinase, human tyrosinase activity was measured in a cell free system. 100~1,000 ppm of samples were added to each well. Results are the averages of triplicate experiments \pm SD. Significant differences were compared with control at ***p<0.001 vs. control.

ppm 농도로 처리하였을 때 각각 86.1%, 83.7%, 71.2%, 61.8%로 농도 의존적으로 유의성 있게 억제하였고, 1,000 ppm에서는 61%로 가장 높은 억제 활성을 보였다. 멜라닌 생성을 억제하는 피부 미백제 개발에는 tyrosinase의 활성을 억제하는 것이 필수적이다. 결과적으로 정공피 물 추출물이 tyrosinase의 활성을 억제함으로써 멜라닌 생성을 억제할 것으로 사료된다.

Shin(30)의 연구결과 100 ppm에서 홍경천(81%), 인삼(87%), 갈근(90%), 오미자(80%), 연교(81%), 홍화씨(82%), 창출(86%)의 mushroom tyrosinase의 억제 활성을 보여 본 연구 결과와 유사하였고, 상지(26%), 느타리버섯(60%), 약쑥(52%) 추출물은 60% 이하의 억제 활성을 나타냈다고 보고하였다.

B16BL6 melanoma를 이용한 tyrosinase 활성 억제

세포독성이 없는 농도 범위에서 정공피 물 추출물의 B16-BL6 mouse melanoma의 세포내 tyrosinase 활성 저해 효과를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 정공피 물 추출물을 100, 250, 500, 1000 ppm 농도로 처리했을 때 각각 93.7%, 83.5%, 77.1%, 69.4%로 농도 의존적으로 유의하게 세포내 tyrosinase 활성 억제효과를 나타내었다.

Yoo 등(7)은 알부틴의 0.5% 농도에서 78.1%의 멜라닌 생성 억제율을 나타냈다고 보고하였고, No 등(15)은 교맥 에탄올 추출물 50, 100 µg/mL 농도에서 각각 대조군에 비해 81%, 50%로 tyrosinase의 활성이 감소하였다고 보고하였다. 한편, Park 등(9)은 신선초 추출물의 핵산 및 에틸아세트 분획물이 알부틴보다 낮은 농도에서 IC₅₀을 넘었다고 보고하였으며, 이는 멜라닌 생합성 과정의 upstream에 작용하는 tyrosinase 단백질의 활성을 저해함으로써 downstream으로의 진행을 저지하여 B16BL6 melanoma의 멜라닌 합성 억제 효과에 직접적으로 관여하기 때문이라고 보고하였다.

피부는 자외선에 노출되면 tyrosine에서 출발하여 일련에

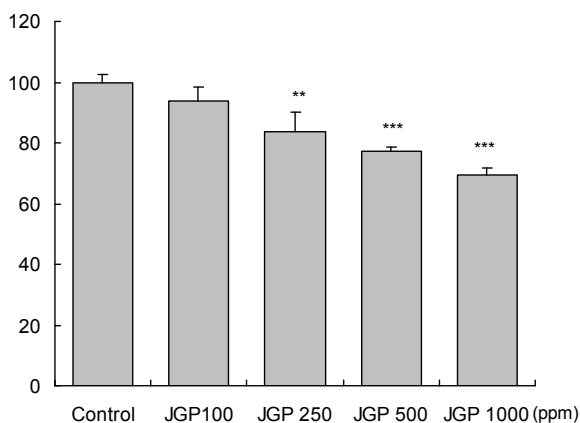


Fig. 5. Effect of *Sorbus commixta* HEDL cortex water extract on tyrosinase activity in B16BL6 cells. JGP: *Sorbus commixta* HEDL cortex water extract. Results are expressed as mean ± SD. Significant differences were compared with control at **p<0.01 vs. control, ***p<0.001 vs. control.

산화 중합 반응을 거쳐 생성된 melanin에 의해 기미, 노인성 홍반 등을 유발하며 피부 노화가 촉진된다(8). 이 과정에서 중요하게 작용하는 효소가 tyrosinase이며, tyrosinase 효소의 억제는 멜라닌 생합성을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 정공피 물 추출물은 tyrosinase 활성을 억제시킴으로서 피부 색소 침착 등을 방어할 수 있는 미백 기능성 화장품의 소재로 이용 가능할 것이라 사료된다.

Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA 발현에 미치는 영향

멜라닌 합성은 melanosome 내에 존재하는 tyrosinase의 작용을 통해 이루어진다(4). 따라서 tyrosinase 발현을 억제하면 멜라닌 합성을 억제할 수 있다. 본 연구에서는 정공피 물 추출물이 멜라닌 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 정공피 물 추출물은 100, 250, 500, 1,000 ppm 농도에서 tyrosinase 단백질 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였으며, 1,000 ppm 농도에서 현저한 감소를 보였다(Fig. 6). TRP-1은 TRP-2에 의해 생성

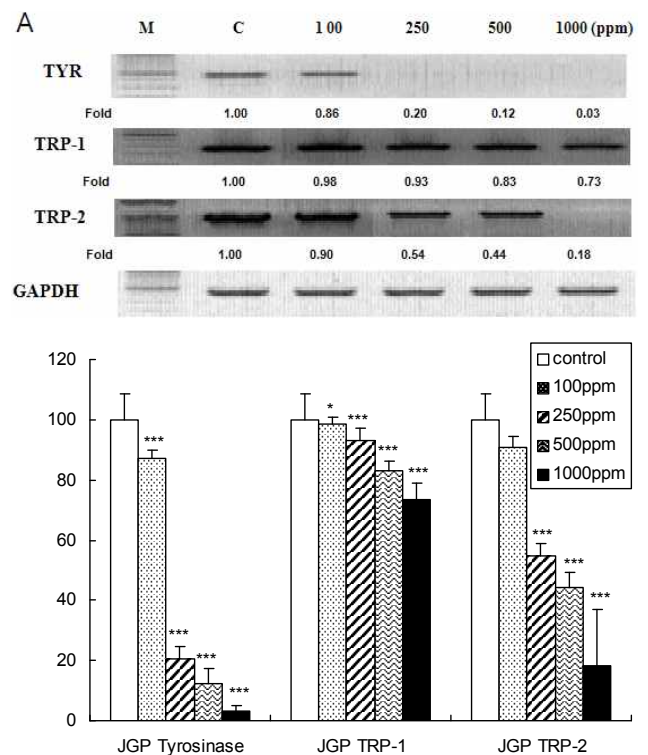


Fig. 6. Effect of *Sorbus commixta* HEDL cortex water extract on tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA expression in B16BL6 cells. JGP: *Sorbus commixta* HEDL cortex water extract. Cells were incubated with medium containing 0, 100, 250, 500 and 1,000 ppm JGP for 24 hr. The tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA levels 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. Results are expressed as mean ± SD. Significant differences were compared with control at *p<0.05 vs. control, ***p<0.001 vs. control.

된 DHICA를 산화시켜 IQCA를 생성하는데 이는 흑갈색을 나타낸다. 따라서 TRP-1 및 TRP-2 발현을 억제하면 미백 효과를 기대할 수 있다. 정공피 물 추출물은 TRP-1과 TRP-2 mRNA 발현을 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성 있게 억제하였으며, 1,000 ppm 농도에서 TRP-2 mRNA 발현이 현저하게 감소하였다.

최근 미백 물질의 탐색 방법으로 멜라닌 생성 기전에 관련된 단백질 발현을 조절하는 물질, melanosome 이동을 억제하는 물질, α -melanocyte 자극 호르몬(α -MSH) 길항제, N-glycosylation 억제와 같은 melanogenesis 기전을 방해하여 미백 효과를 나타내는 물질 연구도 많은 진전이 되고 있다(31-33). 본 결과와 유사한 연구에서 닭의장풀 추출물이 멜라닌 합성에 필수적인 tyrosinase, TRP-1의 발현 저해 및 TRP-2의 N-glycosylation 억제를 통해 미백 효과를 나타내었다고 하였고(6), 신선초 추출물은 endothelin-1 mRNA와 단백질 생성량을 감소시킴으로써 멜라닌 생성량을 감소시킨다고 보고하였다(9). 한편 Oh 등(10)은 백강잠 분획물이 tyrosinase의 활성 저하를 통하여 멜라닌의 유리와 생합성을 억제하였으며, 그 기전에 대한 유전자 연구에서는 멜라닌 형성에 관여하는 tyrosinase, TRP-1, protein kinase A, microphthalmia transcription factor(MITF)의 유전자 발현을 억제하였지만 extracellular regulated kinase(ERK)와 AKT의 유전자 발현에는 오히려 색소생성을 증가하는 방향으로 결과가 나왔다고 하였다. Zhang 등(12)은 쇠비름 알코올 추출물이 tyrosinase 발현을 억제하였지만 TRP-1과 TYP-2의 발현에는 변화가 거의 없었다고 하였다.

결과적으로 정공피 물 추출물이 멜라닌 형성에 관여하는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 유전자 발현을 억제함으로써 미백 작용을 하는 것으로 나타났고, 앞으로는 정공피의 미백 효과에 작용하는 유전자 발현에 대한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 정공피 물 추출물의 미백 효과를 확인하기 위하여 항산화 효능을 검증하였고, 멜라닌 생성의 첫 단계인 tyrosinase 활성, mouse melanoma B16BL6 세포 생존율 및 TRP-1, TRP-2 mRNA 발현 정도를 측정하였다. 정공피 물 추출물은 DPPH 및 hydroxy 라디칼 소거 작용을 통하여 높은 항산화 효능을 나타내었고, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 활성을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다. 이는 정공피 물 추출물이 직접적으로 B16BL6 melanoma 세포의 tyrosinase 단백질의 활성을 저해시킴으로써 멜라닌 생성을 억제하는데 효과적임을 의미한다. 결론적으로 정공피 추출물은 항산화 활성과 미백 효과가 우수하여 기능성 화장품의 천연 소재로서 활용 가능성이 매우 높은 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 (주)화진 화장품, 강원대학교 Nutraceutical Bio Brain Korea 21 및 강원웰빙특산물산업화학지역혁신센터의 일부 지원으로 수행한 연구 결과입니다.

문 헌

1. Ferguson CA, Kidson SH. 1997. The regulation of tyrosinase gene transcription. *Pigment Cell Res* 10: 127-138.
2. Hearing VJ, Tsukamoto K. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J* 5: 2902-2909.
3. Boissy RE, Sakai C, Zhao H, Kobayashi T, Hearing VJ. 1998. Human tyrosinase related protein-1 (TRP-1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1. *Exp Dermatol* 7: 198-204.
4. Mallick S, Singh SK, Sarkar C, Saha B, Bhadra R. 2005. Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related proteins *in vitro*. *Pigment Cell Res* 18: 25-33.
5. Han JY, Sung JH, Kim DJ, Jeong HS, Lee JS. 2008. Inhibitory effect of methanol extract and its fractions from grape seeds on mushroom tyrosinase. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1679-1683.
6. Park SH, Lee BY, Lee SH, Han CS, Kim JG, Kim KT, Kim KH, Kim YH. 2009. Whitening effect of dayflower (*Comelina communis* L.) extract by inhibition of N-linked glycosylation process and melanogenesis. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 35: 73-78.
7. Yoo YG, Joung MS, Choi JW, Kim JH. 2005. The study on the whitening effect of *Ephedra sinica* extract. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 31: 153-159.
8. Chang MS, Kim HM, Yang WM, Kim DR, Park EH, Ko EB, Choi MJ, Kim HY, Oh JH, Shim KJ, Yoon JW, Park SK. 2007. Inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* on tyrosinase activity and melanogenesis in clone M-3 melanocyte cells. *Kor J Herbology* 22: 87-94.
9. Park SH, Lee BY, Han CS, Kim JG, Kim KT, Kim KH, Kim YH. 2008. Whitening effect of *Angelica keiskei* Koidzumi extract by inhibition of endothelin-1 production and melanogenesis. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 34: 101-107.
10. Oh HC, Lim KS, Hwang CY, Youn IH, Kim NK. 2007. A study on the melanin synthesis inhibition and whitening effect of *Bombysis corpus*. *J Korean Oriental Med Ophthalmology Otolaryngology Dermatology* 20: 1-13.
11. Kim CH, Kwon MC, Han JG, Na CS, Kwak HG, Choi GP, Park UY, Lee HY. 2008. Skin-whitening and UV-protective effects of *Angelica gigas* Nakai extracts on ultra high pressure extraction process. *Korean J Medicinal Crop Sci* 16: 255-260.
12. Zhang R, Lee HJ, Yoon YG, Kim SM, Kim HS, Li SH, An SK. 2009. The melanin inhibition, anti-aging and anti-inflammation effects of *Portulaca oleracea* extracts on cells. *KSBB J* 24: 397-402.
13. Kim KM, Kim KS, Kwak YJ, Cho CW, Soh HA, Chung ES, Lee YC, Lee JH. 2009. Antioxidant activity and whitening effects of the fermented extract of *Viola mandshurica*. Proceedings of the Korean Society of Medical Crop Science. p 207-208.
14. Jeong HS, Kwon MC, Han JG, Ha JH, Jin L, Jeong MH,

- Oh SH, Kim SS, Lee HY. 2009. Enhancement of immuno modulatory activities of *Rubus coreanus* Miquel extracts by nano-encapsulation process. Proceedings of the Korean Society of Medical Crop Science. p 209-210.
15. No ST, Kim DS, Lee SJ, Park DJ, Lee JC, Lim KS, Woo WH, Mun YJ. 2007. Study of skin depigmenting mechanism of the ethanol extract of *Fagopyrum esculentum*. *Korean J Oriental Physiology Pathology* 21: 1243-4249.
 16. Kim HS, Kim CH, Kwon MC, Lee HY. 2007. Whitening effect of aqueous extracts of *Hericium erinaceus* using ultrasonication process. Proceedings of the Korean Society of Medical Crop Science. p 155-156.
 17. Jeong JH, Kim YS. 2007. Whitening effects for extracts of bamboo and wild ginseng adventitious roots. Proceedings of the Korean Society of Medical Crop Science. p 209-210.
 18. Lee SB, Park DI, Kim H, Gil YG, Choi BT. 2008. Effects of aqueous extract from *Aconitum Koreanum* on the expression of tyrosinase-related proteins by ultraviolet B irradiation in guinea pig skin. *Korean J Oriental Physiology Pathology* 22: 346-349.
 19. Lee SM, Lee CG. 1999. Isolation and gas chromatographic analysis of lupenone and lupeol from *Sorbus* cortex. *Anal Sci Tech* 12: 136-141.
 20. Tripathi RK, Hearing VJ, Urabe K, Aroca P, Spritz RA. 1992. Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *J Biol Chem* 267: 23707-23712.
 21. You MJ, Kim BM, Lee JH, Lee YH, Chai KY, Baek SH. 2008. Inhibitory effect of *Sorbus* cortex extract on (1,3)- β -glucan synthase. *Korean J Oriental physiology Pathology* 22: 1196-1201.
 22. Choi SI, Lee YM, Heo TR. 2003. Screening of hyaluronidase and free radical scavenging activity in vitro of traditional herbal medicine extracts. *Kor J Biotechnol Bioeng* 18: 282-288.
 23. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
 24. Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I. 2001. Antioxidant principles form *Bauhinia terapotensis*. *J Nat Prod* 64: 892-895.
 25. Chung MJ, Sung NJ, Park CS, Kweon DK, Mantovani A, Moon TW, Lee SJ, Park KH. 2008. Antioxidative and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cells and in C57BL/6J mice. *Euro J Pharm* 578: 159-170.
 26. 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.
 27. Prota G. 1990. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J Invest Dermatol* 75: 122-128.
 28. Choe M, Kim DJ, Lee HJ, You JK, Seo DJ, Lee JH, Chung MJ. 2008. A study on the glucose-regulating enzymes and antioxidant activities of water extracts from medicinal herbs. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 542-547.
 29. Shin JH, Choi DJ, Lee SJ, Cha JY, Sung NJ. 2008. Antioxidant activity of black garlic (*Allium sativum* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 965-971.
 30. Shin JY. 2001. Screening of natural products that have activities against skin-aging. *Korean J Food Nutr* 14: 568-572.
 31. Seiberg M, Paine C, Sharlow E, Andrade-Gordon P, Costanzo M, Eisinger M, Shapiro SS. 2000. The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp Cell Res* 254: 25-32.
 32. Motogawa T. 2000. Inhibition of α -MSH induced melanogenesis by *Sophorae radix* extracts. *Fragrance J* 9: 38-42.
 33. Negroiu G, Branza-Nichita N, Petrescu AJ, Dwek RA, Petrescu SM. 1999. Protein specific N-glycosylation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 in B16 mouse melanoma cells. *Biochem J* 344: 659-665.

(2010년 7월 2일 접수; 2010년 8월 2일 채택)