

삼릉 에탄올추출물의 *in vitro* 피부 미백 유효성

고 주 영, 김 영 철*

계명대학교 대학원 공중보건학과

Effectiveness of *Scirpi rhizoma* Ethanol Extract on Skin Whitening Using *in vitro* Test

Ju-Young Ko and Young-Chul Kim*

Department of Public Health, Graduate School, Keimyung University

ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate the effectiveness of *Scirpi rhizoma* ethanol extract (SREE) on skin whitening using *in vitro* test. In the antioxidative activities, it was found that SREE contains 38.9 mg/g of polyphenol and 74.5 mg/g of flavonoid in total. In the electron donating ability, SREE showed a dose-dependent response, showing a high antioxidative capacity of 86.1% at 1000 ppm. It was found that the maximum permissible level of SREE to Melan-a cells was over 200 ppm, showing a quite low toxicity of SREE against Melan-a cells. Both in the inhibitory measurement for tyrosinase activity and melanogenesis using Melan-a cells, SREE presented a dose-dependent response with excellent efficacy.

Key words : *Scirpi rhizoma*, polyphenolic compound, tyrosinase activity, Melan-a cell, melanin content

서 론

평균수명의 연장과 삶의 질 향상으로 인해 피부 건강과 미용에 대한 관심은 날로 증가하고 있다. 과량의 자외선 노출은 활성산소의 생성을 촉진시켜 체내 항산화물질을 고갈시키고 멜라닌 생성의 자동산화 반응을 가속화시킨다. 과량의 활성산소는 각질형성세포에 작용하여 사이토카인을 분비시키고 신호전달 경로에서 DNA 손상 및 활성화에 관여하여 멜라닌세포에 직·간접적으로 영향을 미침으로써 멜라닌세포의 증식과 멜라닌 합성을 증가시킨다 (Yamakoshi *et al.*, 2003; Debacq-Chainiaux *et al.*,

2005).

멜라닌은 검은색과 갈색계열의 eumelanin과 노란색과 붉은계열의 pheomelanin으로 구분되며 (Ito and Wakamatsu, 2003), 멜라닌 합성과정에서 tyrosinase는 중요한 촉매 역할을 담당한다. 구리함유 당단백질인 tyrosinase는 멜라노솜에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA (L-3,4-dihydroxy-phenylalanine)를 만드는 tyrosine hydroxylase 활성화와 DOPA를 산화시켜 DOPAchrome을 만드는 DOPA oxidase 활성을 지니고 있다 (Kim *et al.*, 2005; Jirawattanapong *et al.*, 2009). 따라서 tyrosinase 활성을 억제하여 멜라닌 합성과 색소침착을 줄일 수 있으며 tyrosinase 활성을 억제하는 방법으로는 tyrosinase의 구리이온을 킬레이트화 시키는 경쟁적 저해와 구리이온에 킬레이션이 약하거나 없는 비경쟁적 저해가 있다. 또한 tyrosinase 활성은 tyrosinase mRNA 전사조절에 의해서

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-53-580-5931 Fax: +82-53-588-5233
E-mail: yckim@kmu.ac.kr

조절될 수 있다(Ando *et al.*, 2007).

멜라닌 생성 억제 물질의 연구 방법으로는 tyrosinase 활성저해시험, 배양 멜라닌세포를 이용한 시험, 실험동물에서의 생체시험, 사람피부를 대상으로 한 시험 등이 실시되고 있으며, 이 중 멜라닌 합성의 주효소인 tyrosinase 활성저해시험이 멜라닌 종합체 억제제 개발의 초기 단계에서 주로 채택되고 있다(Laskin and Piccinini, 1986). 코직산, 비타민 유도체, 알부틴, BHT(dibutylated hydroxytoluene) 등 합성항산화제는 가격도 저렴하고 항산화능으로 인하여 우수한 미백 효과를 나타내지만 과다 사용시 질병을 유발하는 등 안전성에 문제점이 있는 것으로 보고되고 있어 사용량을 규제하고 있다(Waldrop, 1980). 이에 따라 화장품업계에서는 천연물로부터 세포독성이 낮고 멜라닌 생합성 저해활성이 높은 항산화제 및 피부 미백제의 소재 발굴에 관심을 가지고 있으며, 최근 들어 phenolic acid, 비타민 E, flavonoids, carotenoid 등 많은 항산화성 물질이 천연식물에서 발견됨에 따라 천연물질을 이용한 미백제 및 항산화제 탐색이 활발히 진행되고 있다. 국내에서 항노화 작용과 미백효과를 가지는 천연자원으로 감초(한영숙 등, 2003), 초피와 산초나무잎(정창호, 2005), 우슬(정재훈, 2008), 들쭉나무(김영희, 2009) 등이 보고되었다.

삼릉(*Scirpi rhizoma*)은 흑삼릉과(Sparganiaceae)의 흑삼릉(*Sparganium stoloniferum* Hamilton)의 덩이뿌리를 말린 약재로서 근경부분을 약용한다. 삼릉의 약리작용은 혈소판 응고, 혈전 제거, 어혈을 풀어 피의 순환을 돕는 것으로 알려져 있다(장위동, 1995). 장위동(1995)은 삼릉으로부터 methyl benzoate 외 20여종의 지방산을 분리 보고하였고, 삼릉의 생리활성에 대한 연구로는 항산화 효과와 항균 활성이 보고되었으며(김정균 등, 2003), B16 melanoma 세포주 실험에서 삼릉의 tyrosinase 활성저해 효능이 보고된 바 있다(이범천 등, 2005). Melan-a 세포는 C57BL/6 마우스의 정상 표피 멜라닌에서 파생된 세포로 B16 melanoma 세포의 하위계통과 연결되는 공통유전자를 가진 영속성이 있는 세포주로 검은 멜라닌 색소를 함유하고 빠른 속도로 증식하는 특성을 지니고 있다. 또한 장기간 계대가 가능하고 tyrosinase 효소량이 풍부하여 멜라닌 합성이 활발해 미백 시험에 많이 이용되고 있다(Bennett *et al.*, 1987; Sheffield *et al.*, 2002). 이에 본 연구는 삼릉

에탄올추출물에 대하여 *in vitro* 실험으로 항산화능을 알아보고, Melan-a 세포주를 사용하여 tyrosinase 활성 저해능과 멜라닌 생성 억제능을 기존의 합성 미백제인 알부틴과 비교 확인하여 삼릉의 미백효과를 알아봄으로써 천연 미백소재로서의 사용 가능성을 알아보았다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-phenyl-alanine), DMSO (dimethyl sulfoxide), BHT (2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol), DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl), arbutin, tyrosinase mushroom, tannic acid, L-tyrosine, ascorbic acid, folin-ciocalteu's phenol reagent, di(ethylene glycol) reagent는 Sigma 사(USA), rutin은 ACROS 사(USA)의 제품을 사용하였다. 세포주 관찰은 inverted microscope(CKX41, Olympus, Japan)를 사용하였다.

2. 시료

한국 식물추출물 은행에서 분양 받은 삼릉 에탄올추출물(PBC-203A)을 실험에 사용하였다.

3. 총 페놀성 화합물 함량

삼릉 에탄올추출물의 총 폴리페놀 함량 분석은 Folin-Denis법(1912)에 의해 비색 정량하였다. 시료 1 mL에 folin-reagent 1 mL를 가하여 3분간 정치한 후 10% Na₂CO₃ 1 mL를 혼합하고 1시간 실온에서 방치하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량곡선은 tannic acid를 이용하여 작성하였다.

4. 총 플라보노이드 함량

삼릉 에탄올추출물의 총 플라보노이드 함량은 Davis 변법(AOAC, 1995)을 이용하였다. 시료 용액 2 mL에 di(ethylene glycol) reagent 10 mL 및 1N NaOH 1 mL를 가하고 잘 혼합한 후 37°C 항온수조에서 1시간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량곡선은 rutin을 이용하여 작성하였다.

5. 전자공여능

삼릉 에탄올추출물에 대한 전자공여능은 Blois (1958)의 방법으로 측정하였다. 삼릉 에탄올추출물을 100, 500, 1000 ppm의 농도로 DMSO에 녹여 조제하고 1 mL를 test tube에 취하여 4×10^{-4} M의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 용액 4 mL를 가하여 60°C 항온수조에서 10초간 진탕하고 실온에 20분 동안 방치한 후에 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물 무 첨가구에는 시료 대신 ethanol 1 mL를 첨가하여 동일하게 실험하고 추출물 첨가구에 대한 흡광도의 감소비율로 전자공여능을 나타내었다. 양성대조군으로 합성 항산화제인 BHT (dibutylated hydroxytoluene)를 동일한 방법으로 실험하였으며, 다음 식으로 전자공여능(%)을 구하였다.

전자공여능(%)

$$= \left(1 - \frac{\text{추출물 첨가구의 흡광도}}{\text{추출물 무 첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

6. 세포주 및 세포배양

C57BL/6 마우스에서 유래한 immortalized cell line 인 Melan-a 세포는 Dr. Bennett (Cancer Research Center, London, England)으로부터 분양 받아 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% PS (penicillin/streptomycin), 200 nM TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)가 함유된 RPMI-1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다.

7. MTT assay

MTT assay법은 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 시약이 세포내로 흡수된 후 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase에 의해 formazan을 형성하는데 이 물질의 세포내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하는 것으로써 세포의 성장율을 측정하는 대표적인 방법이다.

Melan-a 세포를 10% FBS, 1% P/S, 200 nM TPA가 함유된 RPMI-1640 배지에서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 동안 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. Melan-a 세포를 96-well plate에 적정 세포수 (0.5×10^4 cells/well)로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음 삼릉 에탄올추출물

을 농도별 (50, 100, 150, 200 ppm)로 희석시켜 200 µL씩 넣은 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. MTT가 0.5 mg/mL 함유된 배지를 200 µL씩 넣은 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 3시간 배양하였다. Plate를 1000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포가 바닥에 가라앉게 한 다음 배지를 버리고 DMSO를 200 µL씩 넣고 plate shaker에서 15분간 cell을 녹여 낸 다음 ELISA reader로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포성장률은 다음 식에 의해 산출하였다.

세포성장률(%)

$$= \left(\frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무 첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

8. 세포의 형태 관찰

세포의 형태 변화를 관찰하기 위해 배양된 Melan-a 세포를 새 배지로 교환 후 도립현미경을 이용하여 200배율에서 관찰하였다.

9. Melanin assay

Melan-a 세포를 10% FBS, 1% P/S, TPA 200 nM가 함유된 RPMI-1640 배지에 풀어 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 동안 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. Melan-a 세포를 96-well plate에 적정세포수 (2×10^4 cells/well)로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음 삼릉 에탄올추출물을 농도별 (50, 100, 150, 200 ppm)로 희석시켜 200 µL씩 넣어 1차 물질을 처리하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양한 후 다시 2차 물질을 처리하고 72시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 1N NaOH 용액으로 멜라닌을 용해시키고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 정량은 다음 식에 의해 산출하였다.

멜라닌 양(%)

$$= \left(\frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무 첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

10. Intra-cellular tyrosinase 활성 저해능

Melan-a 세포를 10% FBS와 1% P/S, 200 nM TPA가 함유된 RPMI-1640 배지에 풀어 37°C, 5% CO₂

incubator에서 72시간 동안 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. Melan-a 세포를 둥근 60φ cell culture dish에 적정세포수 (4×10^5 cells/well)로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 다음 삼릉 에탄올추출물을 농도별 (50, 100, 150, 200 ppm)로 희석시켜 5 mL씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. 그 후 얼음 위에 얹은 채로 1% triton X-100을 200 μL 넣어 용해하고 e-tube에 옮겨 얼음에 고정시킨 후 10분 간격으로 vortex하면서 1시간 동안 방치한 다음 4°C 14000 rpm에서 20분간 원심분리한 상층액을 tyrosinase 활성 측정 용액으로 사용하였고 protein assay 용액 (Bio Rad, USA)으로 흡광도를 측정, 동량의 단백질 양을 계산하였다. 단백질 40 μg을 포함한 cell extract와 시험물질을 총 100 μL가 되게 섞은 후 L-DOPA를 100 μL씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에 넣어 490 nm에서 10분 간격으로 1시간 동안 흡광도의 변화를 측정하였다.

11. Cell-extracted tyrosinase 활성 저해능

Melan-a 세포를 10% FBS와 1% P/S, 200 nM TPA가 함유된 RPMI-1640 배지에 풀어 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 동안 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. Melan-a 세포를 둥근 60φ cell culture dish에 적정세포수 (4×10^5 cells/well)로 분주하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양한 다음 PBS로 세척 후 1% triton X-100 용액을 200 μL씩 넣어 용해하고 e-tube에 옮겨 얼음에 고정시킨 후 10분 간격으로 vortex하면서 1시간 동안 방치하였다. 4°C 14000 rpm에서 20분간 원심분리한 상층액을 취한 후 50 μL, 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) 49 μL, 삼릉 에탄올추출물을 농도별 (50, 100, 150, 200 ppm)로 1 μL를 섞은 후 1시간 동안 방치하였다. 여기에 L-DOPA를 100 μL씩 첨가하고 37°C, 5% CO₂ incubator에 넣어 490 nm에서 10분 간격으로 1시간 동안 흡광도의 변화를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 총 페놀화합물 함량

폴리페놀 화합물은 활성산소의 생성을 억제하

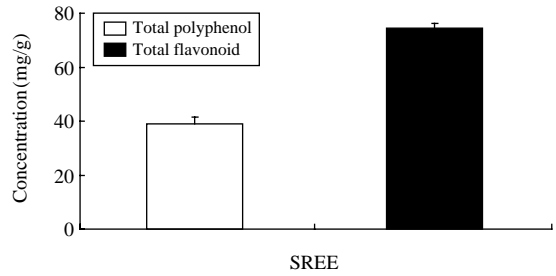


Fig. 1. Total polyphenol and flavonoid contents of *Scirpi rhizoma* ethanol extract. Values are the means \pm SD of 3 replicates. SREE: *Scirpi rhizoma* ethanol extract.

나 제거시켜서 산화에 의한 세포손상을 방지하는 것으로 알려져 있다 (Rocha-Guzman *et al.*, 2009). 삼릉 에탄올추출물의 총 페놀화합물 함량은 tannic acid를 이용한 표준 곡선에 따라 계산한 결과 38.9 mg/g으로 확인되었다 (Fig. 1). 김정균 등 (2003)은 삼릉 물추출물과 메탄올추출물의 총 폴리페놀 함량이 각각 1.6 mg/100 g, 3.4 mg/100 g이라고 보고하였다. 본 연구에서 삼릉 에탄올추출물의 총 폴리페놀 함량이 기존에 보고된 물추출물과 메탄올추출물보다 현저하게 높은 이유는 분석방법이나 추출 용매에 따른 유효성분의 용출 그리고 시료의 차이와 관련이 있는 것으로 보여진다.

2. 총 플라보노이드 함량

플라보노이드는 식물로부터 분리된 페놀성 물질로서 항산화, 항염, 항바이러스 효능을 가진 생리활성 물질로 보고되어져 있다 (Seyoum *et al.*, 2006). 삼릉 에탄올추출물의 플라보노이드 함량은 rutin으로 표준 곡선을 구하여 계산한 결과 74.5 mg/g으로 확인되었다 (Fig. 1). Ryu (1999)는 플라보노이드는 유리의 형성을 억제하며 -OH기가 많은 플라보노이드는 LDL (low density lipoprotein)에 대한 항산화 활성이 높다고 보고한 바 있다.

3. 전자공여능

생체 내·외에서 산화를 방지하기 위해 수많은 항산화 물질들이 개발되어 이용되어 왔는데 특히 페놀계 합성 항산화제인 BHT는 항산화능이 뛰어나고 가격이 저렴해 지금까지 널리 이용되어져 왔

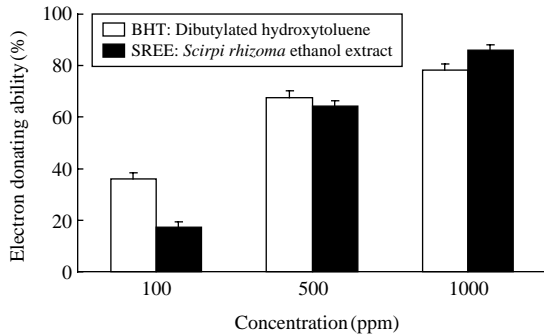


Fig. 2. Electron donating abilities of *Scirpi rhizoma* ethanol extract. Values are the means \pm SD of 3 replicates.

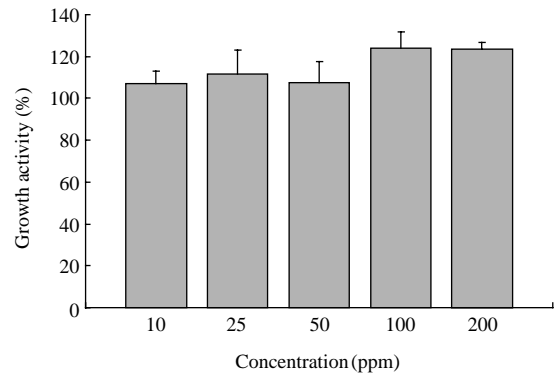


Fig. 3. Growth activities of Melan-a cells treated with various concentrations of *Scirpi rhizoma* ethanol extract. Values are the means \pm SD of 4 replicates.

다(조희숙, 2007). 반면, 천연 항산화제는 합성 항산화제에 비해 안전성은 인정되나, 항산화능의 제한으로 적용범위가 한정되어져 왔다. DPPH는 산화방지 물질로부터 전자 또는 수소를 제공 받으면 자유라디칼 반응을 일으키지 않으면서 흡광도를 변화시키기 때문에 이 원리를 이용한 DPPH법은 천연물의 수용성 혹은 유기용매 추출물의 항산화 활성 측정법으로 널리 사용되고 있다(Lee *et al.*, 2007). Blois (1958)는 항산화능이 있는 추출물에 DPPH 용액을 첨가하면 곧바로 DPPH의 색이 소실되는 것을 관찰하였는데 이는 추출물에 전자공여능이 강한 물질이 존재하기 때문인 것으로 추정하였다. Kang 등(1996)은 전자공여능이 phenolic acids와 플라보노이드 및 기타 페놀성 물질에 대한 항산화작용의 지표이며 환원력이 큰 것일수록 전자공여능이 높다고 보고하였다. 전자공여능은 양성대조군인 BHT와 삼릉 에탄올추출물은 모든 농도에서 농도의존성 정적(+) 양-반응 관계를 보였다. 1000 ppm에서 BHT와 삼릉 에탄올추출물은 각각 약 78.3%, 86.1%로 나타나(Fig. 2) 삼릉 에탄올추출물의 우수한 항산화능을 확인하였다.

4. MTT assay

삼릉 에탄올추출물의 세포주 실험을 위한 농도 범위결정을 위해 MTT assay를 실시한 결과, 삼릉 에탄올추출물은 측정농도 모두에서 세포생장률이 100% 이상으로 나타나(Fig. 3) 삼릉 에탄올추출물의 Melan-a 세포에 대한 최대허용농도는 200 ppm 이상인 것으로 확인되었다. 이범천 등(2005)은 B16

melanoma 세포에 대한 삼릉 에탄올추출물의 세포 독성을 측정한 결과 125 ppm 이하 농도로 처리 시 세포생존율이 90% 이상이었다고 보고한 바 있다.

5. 세포의 형태 변화

시료를 농도별로 처리한 Melan-a 세포를 형태학적으로 관찰한 결과, 시료를 처리하지 않은 정상군은 수지상 돌기의 발달과 함께 합성된 멜라닌이 검게 침착된 것이 확인 되었다. 반면, 양성대조군인 arbutin 150 ppm 처리군과 삼릉 에탄올추출물 200 ppm 처리군은 수지상 돌기와 합성된 멜라닌을 거의 확인할 수 없었다(Fig. 4). Nakazawa 등(1993)은 *in vitro*에서 멜라닌세포의 형태는 *in vivo*에서 관찰되는 것과 확실히 다르며 그 이유는 배양된 멜라닌세포의 과증식 때문이라고 하였으며, 멜라닌세포에서 수지상 돌기 길이가 몸체 길이의 두 배 이상 되는 돌기의 수와 길이를 관찰하였다고 보고하였다. 세포사멸은 자외선, 세포독성 유발물질, 성장인자의 결핍, 열 충격, 바이러스 감염 등으로 유도되며 사멸이 일어나는 세포는 크기가 축소되고 배양배지 속에 사멸소체들이 발견되었다는 보고도 있다(Vaux, 1993; 천현자 등, 2002).

6. Melanin assay

Melan-a 세포의 형태학적인 관찰에서 삼릉 에탄올추출물이 멜라닌 합성을 억제하여 멜라닌색소가 검

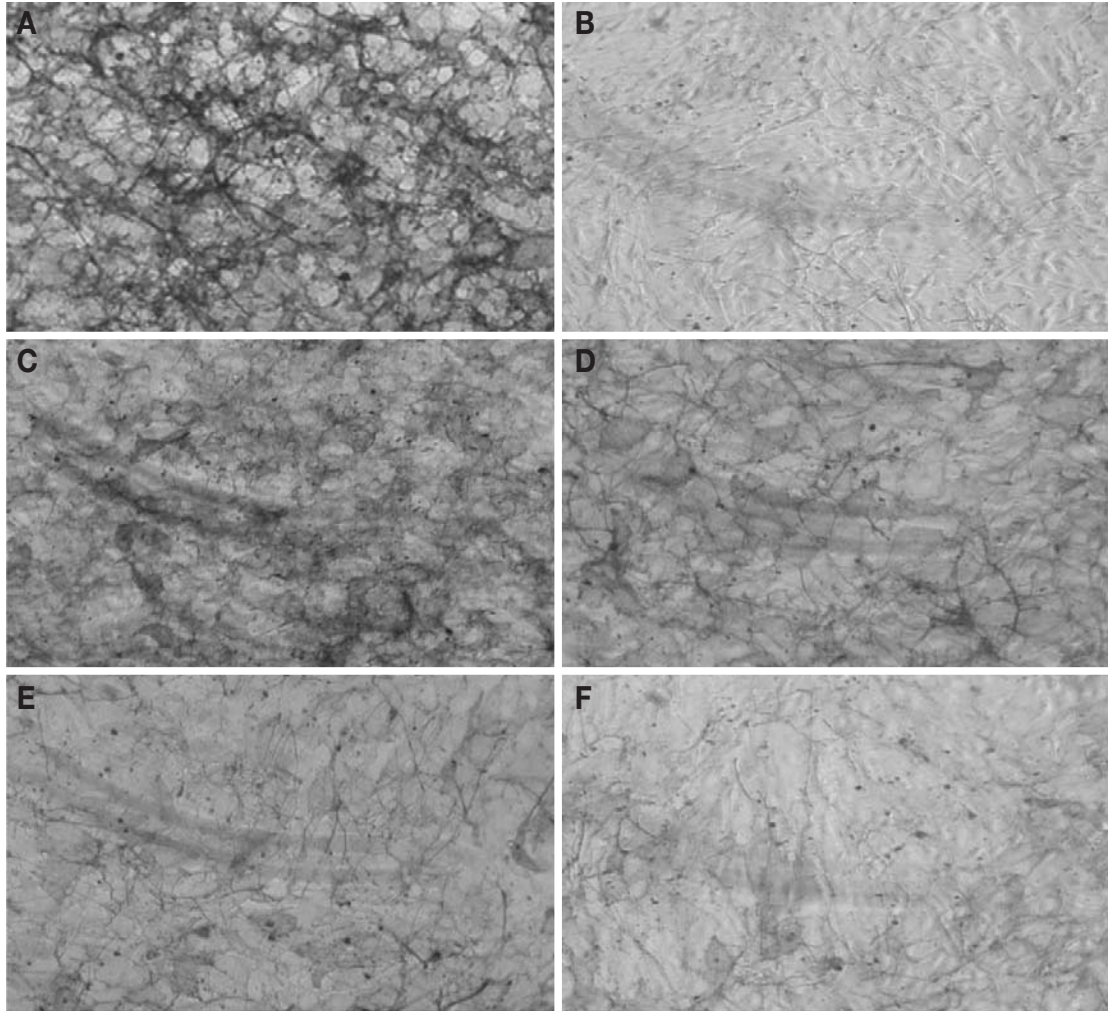


Fig. 4. Morphological observation on Melan-a cells treated with *Scirpi rhizoma* ethanol extract. $\times 200$. A: Non-treatment, B: Arbutin (150 ppm), C: SREE (50 ppm), D: SREE (100 ppm), E: SREE (150 ppm), F: SREE (200 ppm).

게 침착하지 못한 결과로 판단되어 삼릉 에탄올추출물의 멜라닌 합성 저해능을 알아보았다. Melan-a 세포에 삼릉 에탄올추출물을 농도별로 처리 한 후 멜라닌의 양을 측정 한 결과, 시료를 처리하지 않은 정상군에 비해 양성대조군인 arbutin은 150 ppm에서 멜라닌 함량이 59.1% 감소하였고, 삼릉 에탄올추출물 처리군의 멜라닌 양은 농도의존성 부적(-) 양반응 관계를 보였으며 정상군에 비해 50, 100, 150, 200 ppm에서 각각 22.3%, 36.2%, 43.2%, 47.0% 감소하였다(Fig. 5). 최상윤 등(2007)은 Melan-a 세포에

도깨비부채 뿌리 메탄올추출물과 쇠고기 뿌리 메탄올추출물 100 ppm 처리시 각각 37.5%, 28.2%의 멜라닌 생성량을 감소시켰다고 보고 한 바 있다. 향후 삼릉 에탄올추출물의 멜라닌 합성을 억제하는 유효 지표성분 탐색연구가 필요하리라 생각된다.

7. Tyrosinase 활성 저해능

Tyrosinase 저해제는 미백을 위한 화장품의 주요 기능성성분으로서 임상적으로 피부암과 과색소 침

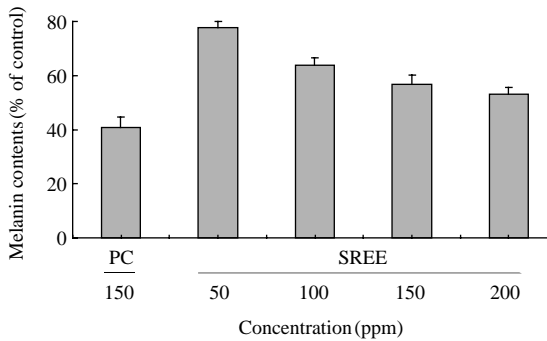


Fig. 5. Inhibitory effect of *Scirpi rhizoma* ethanol extract on melanin synthetic abilities in Melan-a cells. Values are the means \pm SD of 3 replicates. PC: Arbutin, SREE: *Scirpi rhizoma* ethanol extract.

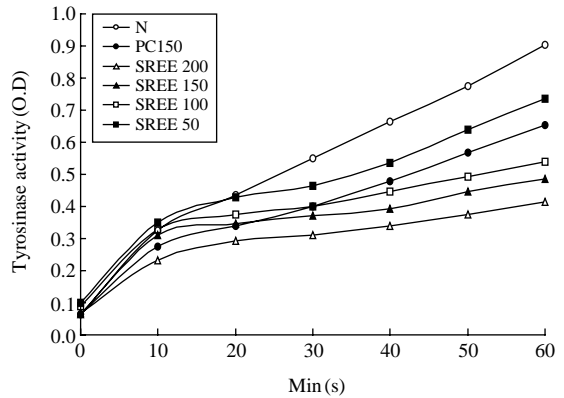


Fig. 7. Inhibitory effect of *Scirpi rhizoma* ethanol extract on cell-extracted tyrosinase activity in Melan-a cells. Values are the means of 3 replicates. PC: Arbutin, SREE: *Scirpi rhizoma* ethanol extract.

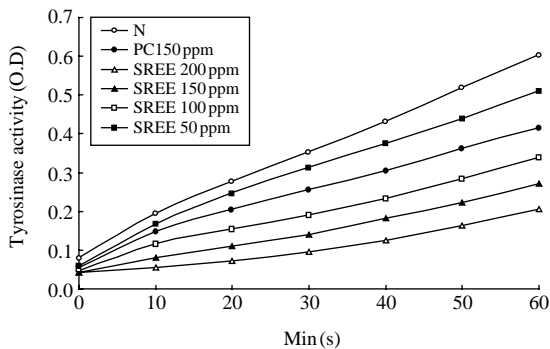


Fig. 6. Inhibitory effect of *Scirpi rhizoma* ethanol extract on intra-cellular tyrosinase activity in Melan-a cells. Values are the means of 3 replicates. PC: Arbutin, SREE: *Scirpi rhizoma* ethanol extract.

착에 관련되는 피부병 치료에 유용하다(Yang *et al.*, 2008). 현재 사용되고 있는 tyrosinase 활성저해 측정의 유용한 평가방법으로는 효소반응계를 이용하는 것인데 이 방법은 대체적으로 수용성 물질을 조사한 것으로 20여종의 지방산을 포함하는 삼릉과 같은 지용성물질에 대한 연구는 미미한 실정이다. 지용성 저해제나 수용성인 tyrosinase 활성저해를 분석하기 위해 역미셀계를 도입하여 지용성물질과 수용성인 tyrosinase 효소를 단일상에 분리시키는 반응계에 관한 보고가 있다(Han *et al.*, 2000).

Melan-a 세포와 Melan-a 세포추출물에 삼릉 에탄올추출물을 처치하고 시간별로 측정된 tyrosinase 활

성 저해능은 농도의존성 정적(+) 반응을 보였으며 반응 60분에 양성대조군인 arbutin 150 ppm은 각각 31.2%, 27.7% 저해한 반면, 삼릉 에탄올추출물 150 ppm 처리군은 각각 55.2%, 46.0% 저해하여(Figs. 6, 7) 삼릉 에탄올추출물의 우수한 tyrosinase 활성 저해능을 확인하였다. 이범천 등(2005)은 B16 melanoma 세포에서 삼릉 에탄올추출물의 tyrosinase 활성 저해능을 측정된 결과 농도 의존적으로 tyrosinase 활성이 저해 되었으며 100 ppm에서 31%의 저해 효과가 있었다고 보고하였는데, 본 연구에서는 반응 60분에 삼릉 에탄올 추출물 100 ppm에서 40% 이상의 저해능을 보여 eumelanin 생성 초기 단계를 조절하는 tyrosinase 활성 저해율이 높은 것으로 확인되었다. 향후 멜라닌 생성의 속도조절단계 효소인 tyrosinase 발현을 조절하는 MITF, TRP-1, TRP-2에 대한 연구를 통해 추가적인 작용기전 규명이 필요할 것으로 생각한다.

결 론

항산화능 실험에서 삼릉 에탄올추출물의 총 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량을 측정된 결과 각각 38.9 mg/g, 74.5 mg/g으로 확인되었다. 전자공여능 측정에서 삼릉 에탄올추출물은 농도의존성 정적(+) 양-반응과 함께 1000 ppm에서 86.1%의 활성을

보여 BHT(78.3%)보다 우수한 항산화능을 보였다.

MTT assay에 의한 Melan-a 세포독성시험에서 삼릉 에탄올추출물의 최대허용농도는 200 ppm 이상으로서 세포독성이 약한 것으로 확인되었다. Melan-a 세포의 형태학적인 관찰 결과, 시료를 처리하지 않은 정상군에 비해 양성대조군인 arbutin 150 ppm과 삼릉 에탄올추출물 200 ppm 처리군은 수시상 돌기를 거의 나타내지 않았고 겹게 침착된 멜라닌을 거의 확인할 수 없어 삼릉 에탄올추출물이 멜라닌 합성 억제능을 가지고 있음을 확인하였다. 이에 삼릉 에탄올추출물의 농도에 따른 멜라닌 합성량을 확인한 결과, 농도의존성 부적(-) 양-반응 관계를 보였으며 양성대조군인 arbutin 150 ppm, 삼릉 에탄올추출물 150, 200 ppm 처리군은 시료를 처리하지 않은 정상군에 비해 각각 59.1%, 43.2%, 47.0% 감소하여 삼릉 에탄올추출물의 우수한 멜라닌합성 억제능을 확인하였다. Melan-a 세포와 Melan-a 세포 추출물에 삼릉 에탄올추출물을 처리하고 시간별로 tyrosinase 활성 저해능을 측정된 결과, 반응 60분에 양성대조군인 arbutin 150 ppm은 각각 31.2%, 27.7% 저해한 반면, 삼릉 에탄올추출물 150 ppm 처리군은 각각 55.2%, 46.0% 저해능을 보여 삼릉 에탄올추출물의 우수한 tyrosinase 활성 저해 효과를 확인하였다.

이상의 실험 결과를 종합해 보면, 삼릉 에탄올추출물은 *in vitro* 시험에서 우수한 항산화능을 보였고 Melan-a 세포에 대한 독성이 낮은 것으로 확인되었으며 eumelanin의 생성을 억제하는 효능을 지닌 합성미백제인 arbutin에 비교할 때 멜라닌합성 억제능과 tyrosinase 활성 저해능이 대등한 것으로 확인되어 미백 기능성 화장품 천연소재로서 실용 가능성이 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- 김영희. 피부 미백 및 주름개선에 미치는 들쭉 성분의 효능 및 작용 기전, 박사학위논문 경희대학교 대학원 2009.
- 김정균, 강영미, 엄광식, 고영민, 김태영. 천연한약재(목통, 삼릉, 치자) 추출물의 항산화효과 및 항균활성효과, 농업생명과학연구 2003; 37(4): 69-75.
- 이범천, 김진화, 심관섭, 장영희, 표형배. 삼릉추출물의 멜라닌 생성 저해 효과, 대한화장품학회지 2005; 31(4): 305-310.
- 장위동. 삼릉화학성분의연구, 중국중약학지 1995; 20(8): 486-487.
- 정재훈. 수종의 한약재의 tyrosinase와 elastase 활성 억제 효과에 대한 실험적 연구, 석사학위논문 경원대학교 대학원 2008.
- 정창호. 초피와 산초 나뭇잎의 항산화 및 tyrosinase 저해 활성물질, 박사학위논문 경희대학교 대학원 2005.
- 조희숙. 한약재의 첨가가 양념돈육의 품질에 미치는 영향, 석사학위논문 경상대학교 대학원 2007.
- 천현자, 최원형, 백승화, 우연홍. Quercetin이 Melan-a 멜라닌 세포의 멜라닌합성에 미치는 영향, 생약학회지 2002; 33(3): 245-251.
- 최상윤, 김영찬, 김성수, 이영철, 노정해, 홍의도, 공연희, 조연옥. 미활용 식물 자원을 이용한 미백효능 평가 및 소재개발, 2007; 과천: 농림부.
- 한영숙, 정은선. 천연식물추출물의 항산화력과 미백작용의 상관관계 연구, 대한피부미용교육학술지 2003; 1(1): 11-22.
- Ando H, Kondoh H, Ichihashi M and Hearing VJ. Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase, J Invest Dermatol 2007; 127: 751-761.
- A.O.A.C. Association of official analytical Chemists Official methods of analysis (12th), Washington D.C.: AOAC international. 1995.
- Bennett D, Cooper B and Hart I. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth, Intl J Cancer 1987; 39(3): 414-418.
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical, Nature 1958; 181: 1199-1200.
- Debacq-Chainiaux F, Borlon C, Pascal T, Royer V, Eliaers F, Ninane N, Carrard G, Friguet B, Longueville FD, Boffe S, Remacle J and Toussaint O. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF- β_1 signaling pathway, J Cell Sci 2005; 118: 743-758.
- Folin O and Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents, J Biochem Chem 1912; 12: 239-249.
- Han DS, Shin YJ, Jung SW and Song HN. Tyrosinase reaction in organic solvent/surfactant/water reverse micelles, Korean J Food Sci Technol 2000; 32(2): 454-460.
- Ito S and Wakamatsu K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review, Pig Cell Res 2003; 16(5): 523-231.
- Jirawattanapong W, Saifah E and Patarapanich C. Synthesis of glabridin derivatives as tyrosinase inhibitors. Arch Pharmacol Res 2009; 32(5): 647-654.

- Kang YH, Park YK and Lee GD. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenol compounds, *Korean J Food Sci Technol* 1996; 28(2): 232-239.
- Kim KS, Kim JA, Eom SY, Lee SH, Min KR and Kim YS. Inhibitory effect of piperlonguminine on melanin production in melanoma B16 cell line by down regulation of tyrosinase expression, *Pig Cell Res* 2005; 19(1): 90-98.
- Laskin JD and Piccinini LA. Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma, *J Biochem Chem* 1986; 261: 16626-16635.
- Lee JM, Chang PS and Lee JH. Comparison of oxidative stability for the thermally oxidized vegetable oils using a DPPH method, *Korean J Food Sci Technol* 2007; 39(2): 133-137.
- Nakazawa K, Damour O and Collombel C. Modulation of normal human melanocyte dendricity by growth promoting agents, *Pig Cell Res* 1993; 6(6): 406-416.
- Rocha-Guzmán NE, González-Laredo JA, Conzalez-Laredo RF, Reynoso-Camacho R, Ramos-Gómez M, Garcia-Gasca T, Rodríguez-Muñoz ME, Guzmán-Maldonado SH, Medina-Torres L and Lujan-García BA. Antioxidant activity and genotoxic effect on HeLa cells of phenolic compounds from infusions of *Quercus resinosa* leaves, *Food Chem* 2009; 115(4): 1320-1325.
- Ryu BH. Antioxidative effect of flavonoids toward modification of human low density lipoprotein, *Korean J Food Sci Nutr* 1999; 12(3): 320-327.
- Seyoum A, Asres K and El-Fiky FK. Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids, *Phytochemistry* 2006; 67(18): 2058-2070.
- Sheffield MV, Yee H, Dorvault CC, Weilbaecher KN, Eltoum IA and Siegal GP. Comparison of five antibodies as markers in the diagnosis of melanoma in cytologic preparations, *Am J Clin Pathol* 2002; 118(6): 930-936.
- Vaux DL. Toward an understanding of the molecular mechanism of physiological cell death, *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90(3): 786-789.
- Waldrop M. Firm takes new approach to food additives, *Chem & Engine News* 1980; 55: 22-27.
- Yang B, Zhao M and Jiang Y. Optimization of tyrosinase inhibition activity of ultrasonic-extracted polysaccharides from longan fruit pericarp, *Food Chem* 2008; 110(2): 294-300.
- Yamakoshi J, Otsuka F, Sano A, Tokutake S, Saito M, Kikuchi M and Kubota Y. Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds, *Pig Cell Res* 2003; 16(6): 629-638.