

## Effect of Fruit Extract of *Prunus mume* on the Scavenging Activity of Reactive Oxygen Species and Melanin Production in B16F1 Cells

Hyeong-Joon Park, Moon-Moo Kim and Yunghee Oh\*

Department of Chemistry, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received April 12, 2012 / Revised July 13, 2012 / Accepted July 17, 2012

*Prunus mume* has been traditionally used as a medicinal food in Korea, Japan, and China. In particular, this fruit has been reported to have beneficial biological effects on gastritis and gastric ulcers. However, its action in relation to skin whitening has remained unclear. Accordingly, the effects of fruit extract of *P. mume* related to antioxidation and skin whitening were examined in this study. First, using the MTT assay, it was observed that fruit extract of *P. mume* below 0.1% has no cytotoxicity in B16-F1 cells as a result of cell viability. Second, the direct scavenging effects and the reducing power of the fruit extract of *P. mume* were evaluated in vitro on DPPH radicals, hydrogen peroxide, and superoxide. It exhibited high reducing power and scavenging activity on the aforementioned reactive oxygen species. Furthermore, we found that its protective effect against genomic DNA damage related to oxidative stress was increased in a dose-dependent manner. In addition, the fruit extract of *P. mume* had an inhibitory effect on melanin production induced by L-dopa. In addition, it reduced the expression level of NRF-2, SOD-1, and SOD-2 related to antioxidation in western blot analysis. These results suggest that fruit extract of *P. mume* could exert a whitening effect through inhibition of melanin production by its antioxidant effect.

**Key words** : Fruit extract of *Prunus mume*, Melanin, antioxidation, whitening effect

### 서 론

산소는 동식물의 생명 유지를 위하여 호흡과정에 필수불가결한 기체분자로 대사과정에서 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있다. 선행연구에서 이러한 생체의 일상적인 대사과정 중에서 전자전달계, peroxysome의 지방산 대사과정, 대식세포 등에서 hydroxyl radical, superoxide anion radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen과 같은 몸에 해로운 활성산소종이 발생된다고 보고되었다[18,20]. 대식세포 및 호중구 등은 자체적으로 활성산소를 만들어서 외부세균의 침입에 방어하기도 하지만 인체에서 활성산소종이 과잉으로 발생되면 부작용으로서 세포 구성성분인 지질, 단백질, 핵산, 당, DNA 분자 등에 산화적 손상을 일으켜 세포의 정상적인 대사를 저해하기도 한다[7,8,14,16] 이러한 활성산소들을 억제하기 위하여 생체내에 방어시스템으로 항산화제들이 존재한다.

항산화제란 활성산소의 생성을 억제하거나 그 활성도를 경감시키며 활성산소로 인해 손상된 조직들을 복원시키는 역할을 한다. 항산화제는 크게 효소 항산화제와 비효소 항산화제로 분류된다. 효소 항산화제에는 산소화합물의 독성을 제거하며 생체의 항상성 유지를 하며, superoxide dismutase, catalase 및 glutathione 등이 포함된다. 비효소계 항산화제는 몸

안에서는 생성되지 않고 외부에서 섭취해야 하며 우리가 일상 생활에 섭취하는 비타민 E, C, B6,  $\beta$ -carotene, selenium, N-acetylcysteine 등이 포함되며, 항산화 효소와 연쇄 반응을 일으켜 항산화 효과를 증가시킨다[21].

최근 합성 항산화제가 널리 알려져 있지만 고 용량 장기간 이용 시 암을 유발 할수 있는 부작용이 보고되고 있어 천연 항산화제에 대한 관심과 연구가 크게 부각되고 있는 실정이다 [13]. 이러한 맥락에서 안정성과 경제적 부담이 적은 천연 항산화제를 찾는 연구가 최근에 활발히 이루어지고 있으며, 본 연구에서는 천연항산화제로 안전성이 확보된 매실의 추출물에서 특이할 만한 항산화 효과를 관찰하여 어떤 종류의 활성산소종에 항산화 효능이 있는지 그리고 세포에서 항산화 효능 기전을 연구하였다.

매실나무(*Prunus mume*)는 장미과 과수로 원산지는 중국, 일본, 한국에서 주로 재배 되었다. 매실은 나관중의 '삼국지연의'에 나올 정도로 옛날부터 식용 또는 약용으로 사용되어 왔는데 최초로 언급된 기록은 6세기까지 거슬러 올라간다. 국내에서는 삼국시대부터 매화나무가 심어졌으며 한의학이 도입되고부터 약용으로 이용 되었다고 한다. 본초강목, 신농본초경, 명의별록 등의 각종 한의서에 매실은 만성기침, 위염, 만성 설사, 혈뇨, 구토, 치질등 치료한 기록이 전해진다[1]. 매실은 또한 유기산과 무기질이 많이 포함 되어 있어 어릴적엔 malic acid가 풍부하고 성숙하면서 citric acid가 증가한다. 그리고 oxalic acid, succinic acid, fumaric acid 등 이러한 산들도 포함

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1517, Fax : +82-51-890-2620  
E-mail : yhoh@deu.ac.kr

되어 있는데 이러한 유기산들은 식욕촉진 및 위액분비를 증가하여 소화 활동과 피로회복을 도와주는 효과가 있다고 알려져 있다[3]. 뿐만 아니라, 매실은 rutin이라는 물질을 함유하고 있어 혈관계 질환의 치료와 모세혈관 강화, 항염증 효과에 도움을 주며, 항산화 효능을 발휘한다고 보고되고 있다[10].

본 연구에서는 매실추출물의 항산화 효능을 연구하기 위하여 melanoma 세포인 B16-F1을 사용하였으며, 동시에 항산화 효능으로 미백효과를 나타낼 수 있는지 그 가능성을 연구하고자 피부색소인 멜라닌 생성에 대한 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시료의 제조

세포배양을 위한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Trypsin-EDTA, penicillin / streptomycin / amphotericin (각각 10,000 U/ml, 10,000 µg/ml 및 2,500 µg/ml), fetal bovine serum (FBS) 시약은 Gibco BRL, Life Technologies (Paisley, Scotland)로 부터 구입하였다. B16F1 cell line은 ATCC (American Type Culture Collection, USA)로부터 구입하였다. MTT reagent, gelatin, agarose 와 기타시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하였다.

### 시료의 제조

매실추출물은 하기와 같은 방법으로 추출하여 얻을 수 있다. 먼저, 매실을 흐르는 물에 깨끗이 세척한 다음 완전히 자연 건조시킨다. 세척·건조된 상기 매실과 설탕을 1:1의 중량 %비로 장독속에 1 kg씩 6층으로 교대로 혼합하여 35일 동안 통풍이 잘되는 그늘에서 숙성시켜 추출한다. 상기 추출물을 여과한 후, 여과된 여액을 동결건조하여 분말 형태의 매실추출물을 얻는다. 분말형태의 매실추출물을 시험농도로 희석하여 본 연구에 사용하였다.

### DPPH radical assay

Brand-Williams [12] 실험방법을 변형하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 매실추출물의 소거능력을 측정하였다. 시험농도의 매실추출물을 DPPH 용액을 가하여 10 sec 동안 잘 혼합한 다음, 실온에서 20 min 동안 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 함량은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

### Hydrogen Peroxide Scavenging Assay

Choi 등[4]의 실험방법을 변형하여 Hydrogen peroxide에 대한 소거활성을 측정하였다. 80 µl의 매실추출물, 20 µl의 10 mM Hydrogen peroxide 및 100 µl의 0.01 M 인산완충용액

(pH 5.0)을 37°C에서 5 min 동안 반응시켰다. 그 후, 15 µl의 1.25 mM ABTS 및 30 µl의 peroxidase 37°C에서 10 min 동안 반응시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 항산화 활성은 시료 첨가 전후의 흡광도 비를 % 값으로 환산하였다.

### Superoxide anion 라디칼 소거능 측정

Superoxide anion 라디칼 소거능은 Fidovich [6]의 방법에 의해 정하였다. 각 시료 용액 0.1 ml와 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 0.6 ml에 0.4 mM xanthine과 0.24 mM nitro bluetetrazolium (NBT)를 녹인 기질액 1 ml를 첨가하고 xanthineoxidase (0.049 U/ml) 1 ml를 가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 1 N-HCl 1 ml를 가하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액 중에 생성된 superoxide anion radical의 양을 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 환원력 Assay

Oyaizu [19]의 방법에 따라 측정하였다. 매실추출물 1 ml에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충용액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1 ml씩 차례로 가하여 교반한 후 50°C의 수욕상에서 20 min 동안 반응시켰다. 여기에 10% TCA 용액 1 ml를 가하여 13,500× g에서 15 min 동안 원심분리하여 얻은 상등액 1 ml에 증류수 및 ferric chloride 각 1 ml를 가하여 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 0.01% vitamin C를 사용하였다. 시료의 환원력은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

### In vitro 지질과산화에 대한 항산화 활성(TBARS)

매실추출물을 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1%의 농도가 되게 linolenic acid emulsion과 30 min 동안 혼합한 후 0.8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 0.8 mM FeSO<sub>4</sub>를 혼합한 용액을 5 hr 동안 반응시킨 후 0.4% TBA를 첨가하고 95°C에서 2 hr 동안 반응시켜 실온에서 10 min 동안 반응시켰다. 그 다음, 15:1 비율의 n-butanol : pyridine 용액을 500 µl 첨가하고 1,000× g에서 10 min 동안 원심분리하여 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며 지질과산화 정도는 시료 첨가 전후의 흡광도 비를 %값으로 환산하였다.

### Hydroxyl radical에 의한 DNA 산화적 손상 분석

Genomic DNA는 약간 변형된 표준 과정에 따라 B16F1 세포로부터 추출하였다 [15]. Fenton반응에 의하여 발생된 hydroxyl radical에 노출된 DNA 산화는 기존에 실험된 방법에 따라 수행되었다[17]. 먼저 100 µl의 DNA 용액에 시험농도의 매실추출물, 200 µM FeSO<sub>4</sub>, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 50 µg/ml genomic DNA를 첨가하였다. 반응 혼합물을 30 min 동안 상온에서 반응시킨 후 130 mM EDTA를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 1 µg의 DNA를 포함하는 20 µl의 반응혼합물을 1% agarose gel

에서 100 V로 30 min 동안 전기영동 하였다. Gel은 1 mg/ml ethidium bromide로 염색하여 물로 세척하여 UV로 LAS3000® image analyzer (Fuji Film Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

**세포배양**

B16F1 세포는 5% CO<sub>2</sub> 및 37°C에서 95% 이상의 습도를 유지한 배양기에서 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine and 100 µg/ml penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다.

**MTT assay**

Hansen [9]의 방법에 따라 B16F1 세포에 대한 매실추출물의 세포독성을 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하여 측정하였다.

**B16F1에서 Melanin 생성 측정**

6-well plate에 3×10<sup>5</sup> cells/well로 세포를 분주하였고, 매실추출물을 처리하고 1시간후에 L-dopa로 melanin 생성을 자극 후 48시간 동안 세포를 배양 하였다. 세포를 수집하여 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 침전한 후, 1 ml homogenization buffer (50 mM Sodium phosphate pH 6.5, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF)로 용해시켰다. 여기서 얻은 pellet에 1 N NaOH (10% DMSO) 200 µl를 첨가하고 vortex 후 405 nm에서 흡광도를 측정 하였다. melanin 표준품(Sigma, USA)으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 멜라닌 양을 산출하여 었다. 멜라닌은 단위세포(10<sup>4</sup> cells)에서의 멜라닌 생성량을 비교하였다.

**Western blot analysis**

B16F1 세포에 용출 완충용액(50 mM Tris - HCl, pH 7.5, 0.4% Nonidet P-40, 120 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 80 µg/ml leupeptin, 3 mM NaF and 1 mM DTT)을 첨가하여 4°C에서 30 min 동안 처리하였다. 10 µg의 세포용출액을 10% Tris - HCl gel에서 전기영동 후 단백질을 전기적으로 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 그 다음 10% skim milk를 nitrocellulose membrane에 전처리하고 목적 단백질에 대한 1차 항체(anti-Nrf2, anti-SOD-1, anti-SOD -2, anti-beta-actin)를 처리한 다음 2차 항체를 처리 후, chemiluminescent ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 목적단백질을 검출하였다. Western blot의 band는 LAS3000® image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

**통계처리**

각 실험은 3회 이상 반복실험을 통하여 그 결과를 얻어 각각

의 시료농도에 대해 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료농도군에 대한 유의차 검정은 대조군과 비교하여 Student's ttest 한 후 p<0.05 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다.

**결 과**

**세포성장에 대한 매실추출물의 효과**

이 세포 독성에 미치는 농도를 조사하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. B16F1세포에 대한 매실의 세포 독성을 측정 한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 매실의 1% 이하의 농도에서 비교하였을 때 어떠한 독성효과도 없는 것으로 나타났다.

**DPPH radical, hydrogen peroxide, superoxide anion 및 reducing power에 대한 매실추출물의 효과**

생체 내 산화적 스트레스와 관련되어 있는 DPPH radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide의 소거능력 및 환원력에 대하여 매실추출물의 효과를 조사하였다. DPPH radical 소거법은 항산화 물질에 의한 DPPH radical의 탈색 정도를 지표로 하여 산화억제 정도를 예측할 수 있다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이 매실추출물은 농도가 증가함에 따라 DPPH radical에 대한 소거능이 비례하여 증가하는 것으로 나타났다. Fig. 2B에서는 매실추출물을 처리했을 때 1%의 농도에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 소거능이 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. Fig. 2C에서는 양성 대조군인 superoxide dismutase (SOD)의 superoxide anion 소거능을 관찰 할 수 있었고, 매실추출물의 경우에는 0.125% 이상의 농도에서 superoxide anion 소거능이 관찰되었다. Fig. 2D에서 보는 바와 같이 매실추출물의 환원력은 농도에 따라서 증가하는 것으로 나타났다. 매실추출물이 1% 농도에서는 양성대조군으로 사용된 0.01%의 vitamin C와 환원력이 유사한 것으로 나타났다.

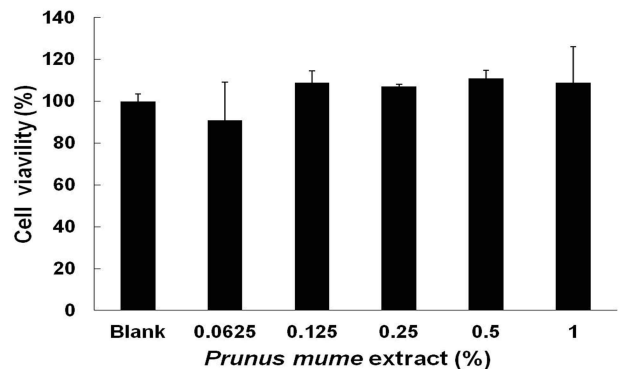


Fig. 1. Effect of fruit extract of *Prunus mume* on viability of melanoma cells. B16F1 cells were treated with Fruit extract of *P. mume* at 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1%. Cell viability was determined by MTT assay after 24 hr. Data are given as means of values±SD from three independent experiments.

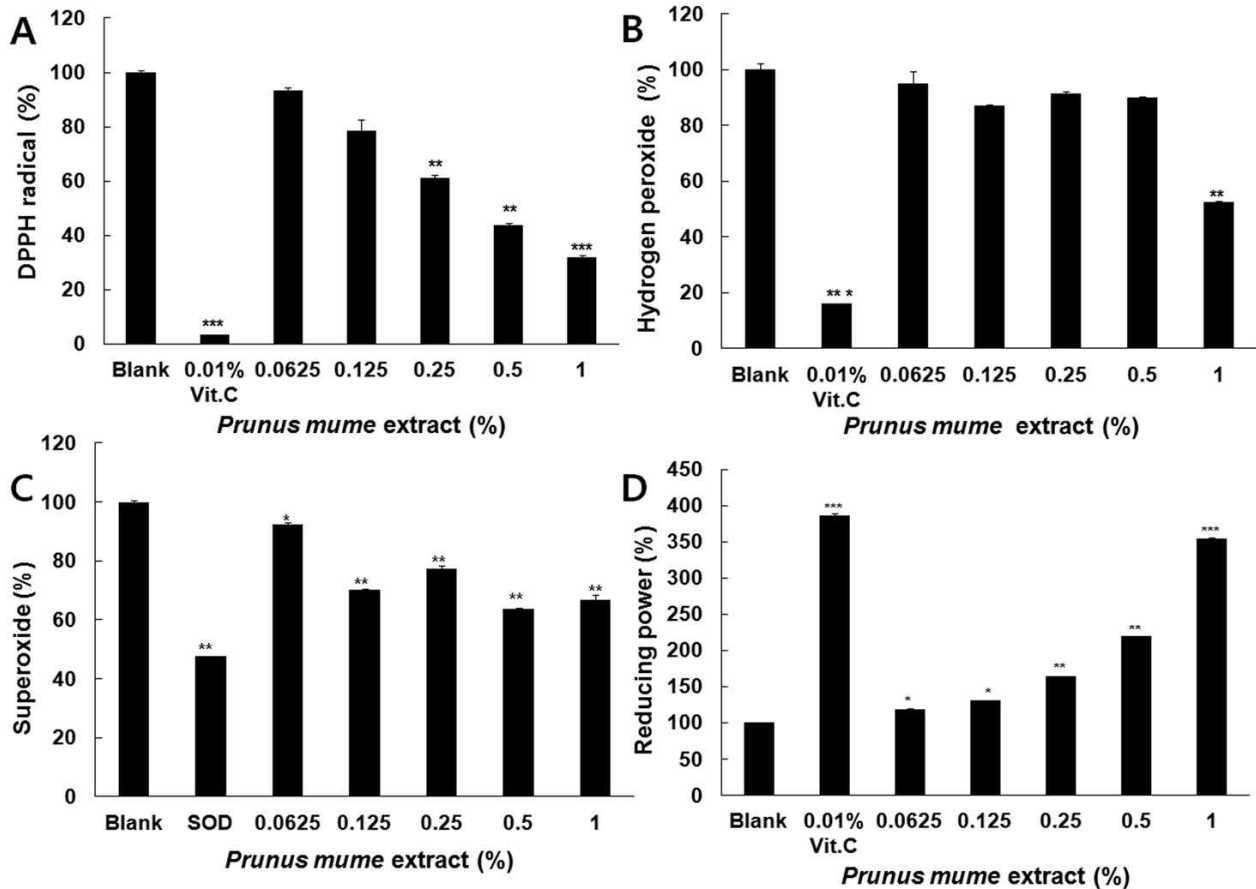


Fig. 2. Scavenging activities of fruit extract of *Prunus mume* on DPPH radical, hydrogen peroxide, superoxide and reducing power. DPPH radical (A), hydrogen peroxide (B) superoxide (C) and reducing power (D) were evaluated in the presence of *P. mume* extract. After fruit extract of *P. mume* at the indicated concentrations was reacted with each radical, the optical density of each reaction mixture was measured at a specific wavelength with spectrophotometer. Data are given as means of values±SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001) using Student's t test

Hydroxyl radical에 의한 genomic DNA 산화에 대한 매실추출물의 보호효과

B16F1 세포로부터 분리한 genomic DNA를 이용하여 Fenton 반응에 의하여 발생된 hydroxyl radical에 의한 DNA의 산화적 손상에 대한 매실추출물의 항산화 효과를 조사하였다. 본 실험에서 매실의 존재 및 부재의 조건에서 DNA 전기영동을 이용하여 200 μM Fe(II) 및 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 사용한 Fenton반응에 의하여 발생된 hydroxyl radical에 노출된 DNA의 산화적 손상을 조사하였다. 30 min 반응 후 대조군의 genomic DNA는 Fig. 3에서 보여지는 바와 같이 분해되는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 매실추출물을 첨가한 군에서는 농도에 따라 DNA의 산화적 손상에 대한 보호효과가 증가하였으며, 0.25% 이상의 농도에서는 genomic DNA의 산화적 손상이 완전히 억제되는 것으로 관찰 되었다.

*In vitro* 지질과산화(TBARS)에 대한 매실추출물의 효과

*In vitro*에서 지질과산화에 대한 매실추출물의 항산화 효과를 조사하기 위하여 linolenic acid를 Fenton반응으로 발생시킨 hydroxyl radical에 노출시켰다. 먼저 hydroxyl radical에 의한 지질과산화를 확인하기 위하여 기존에 알려진 친유성 항산화제인 vitamin E의 지질과산화에 대한 억제효과를 관찰한 결과, Fig. 4에서 보여지는 바와 같이 지질과산화 억제효과를 관찰 할 수 있었으나, 매실추출물은 지질과산화에 대한 억제효과가 없는 것으로 나타났다.

세포 내 melanin 생성에 대한 매실추출물의 효과

Melanoma 세포에서 tyrosinase가 tyrosine을 기질로 하여 DOPA를 DOPA quinone으로 산화시킴으로써 melanin이 합성된다. B16F1 세포에서 매실추출물의 멜라닌 생성 억제효과를 알아보기 위하여 B16F1 세포에 각 농도별로 처리하고 세포

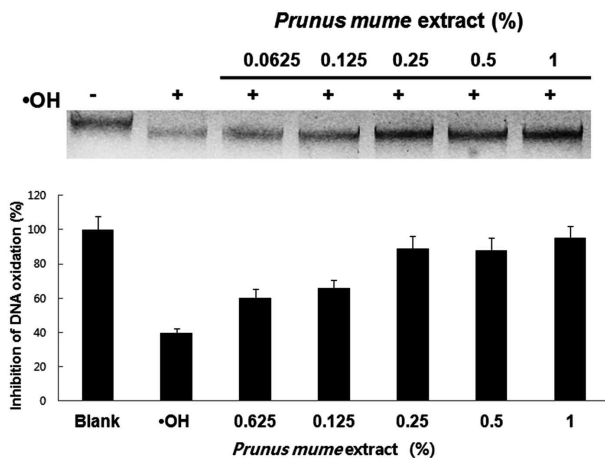


Fig. 3. Protective effect of fruit extract of *Prunus mume* on DNA oxidative damage induced by hydroxyl radical. Genomic DNA purified from B16-F1 cells was pre-treated with fruit extract of *P. mume* for 1 hr before exposed to •OH using Fenton reaction. After 30 min, reaction mixture containing about 1 µg of DNA was electrophoresed on a 1% agarose gel for 30 min at 100 V and visualized by UV light after stained with 1 mg/ml ethidium bromide.

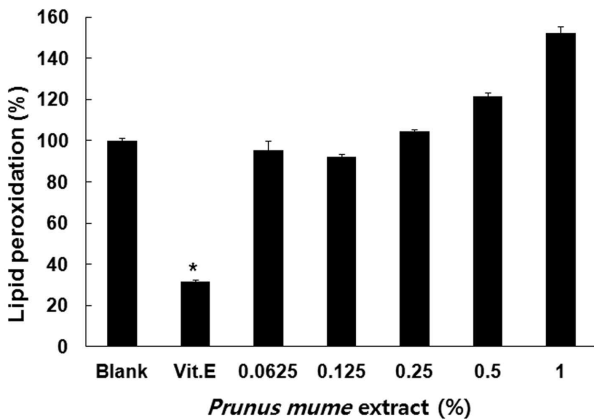


Fig. 4. Effect of fruit extract of *Prunus mume* on lipid peroxidation *in vitro*. Vitamin E as a positive control was investigated at 1,000 µg/ml. To test antioxidant effect of fruit extract of *P. mume* on lipid peroxidation, linoleic acid was treated with *P. mume* extract for 30 min. Lipid peroxidation was induced by fenton reaction. Data are given as means of values±SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (\* $p < 0.05$ ) using Student's t test.

내 melanin 함량을 조사한 결과 Fig. 5에서 나타난 바와 같이 매실추출물은 양성대조군으로 사용된 0.1% 농도의 arbutin보다 melanin 생성 억제효과가 우수한 것으로 나타났으며, 0.1%농도의 vitamin C에 비하여 melanin 생성 억제효과가 낮았다.

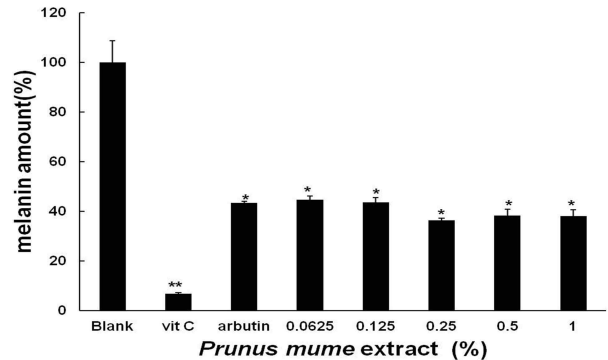


Fig. 5. Inhibitory effect of fruit extract of *Prunus mume* on melanin production in B16-F1 cells stimulated by L-DOPA. The cells were treated with fruit extract of *P. mume* at 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1% for 24 hr. Melanin production was measured by calculating with absorbance at 490 nm. Vitamin C and arbutin were used as positive controls. Data are given as means of values±SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) using Student's t test.

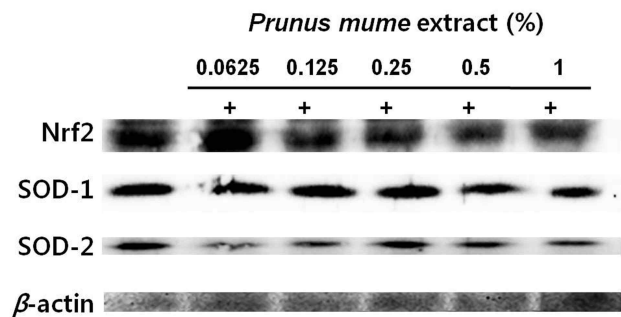


Fig. 6. Effect of fruit extract of *Prunus mume* on protein expressions of Nrf2, SOD-1 and SOD-2 in B16F1 cells. Cells were treated with fruit extract of *P. mume* at 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1%. Western blot analysis of cell lysates was performed using antibodies as indicated.

B16F1 세포에서 항산화 효과와 관련된 단백질의 발현에 대한 매실추출물의 효과

매실이 항산화 효소의 발현을 조절하는데 가장 중요한 전사인자인 Nrf2와 진 항산화 효소 중에서 가장 중요한 Superoxide dismutase (SOD)인 SOD-1과 SOD-2의 단백질 발현을 조사하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 매실추출물은 대조군에 비하여 0.5% 이상의 농도에서 Nrf2, SOD-1 및 SOD-2의 단백질 발현이 감소되는 것으로 관찰되었다.

### 고찰

유해 활성산소종은 효소의 활성의 억제와 가교 결합의 촉진, DNA, RNA, 효소 및 세포막과 세포 소기관의 손상을 일으켜 세포 사를 일으키는 요인이 되며 노화를 유발시키는 것으

로 보고되었다[2]. 이러한 활성산소 소거를 위해서 천연 항산화제로 이용될 수 있는데[23], 본 연구에서는 매실을 이용하여 DPPH radical, hydrogen peroxide 및 superoxide와 같은 유해 활성산소종 소거능력을 조사한 결과 특히 활성산소 중 DPPH radical에 대한 매실추출물의 소거능력과 환원능 사이에 연관성을 발견 하였다. 활성산소에 대한 소견효과 뿐만 아니라, 흑색종 암세포에서 분리한 genomic DNA를 Fenton 반응에 의하여 생성된 hydroxyl radical에 노출시킨 결과 매실추출물은 함량이 증가함에 따라 DNA 산화에 대한 보호효과가 비례하여 증가하였다. 이러한 항산화효과가 있는 농도에서 매실추출물은 세포에 대한 독성효과는 없는 것으로 확인 되었다. 따라서 매실추출물은 인체내에서 발생하는 활성산소종을 소거함으로써 DNA의 산화를 막아 여러 가지 질병을 예방하는 것을 유추해 볼 수 있다.

더욱이 이러한 매실추출물의 활성산소 소거기능과 관련하여 멜라닌 색소생성을 억제할 수 있는 미백 효과를 알아보기 위해 멜라닌을 생성하는 세포인 쥐 흑색종 세포 B16F1 세포를 사용하여 멜라닌 억제 연구를 진행하였다.

멜라닌이란 사람의 피부 속에 존재하는 색소로 정상적으로 표피에 존재하는 멜라닌은 태양광선으로 들어오는 자외선을 차단하는 역할을 하는데 국소적으로 과도하게 합성되거나, 노화 등에 의해 피부 생리 기능이 떨어지게 되며 이렇게 될 경우에는 피부에 주근깨, 기미 등 다양한 색소 침착을 유발하게 된다[11]. 피부 미백에 도움을 주는 소재로 활용되는 vitamin C 및 arbutin 등은 멜라닌이 합성되기 전 단계, 합성 중, 혹은 합성 이후 단계에 각각 작용하여 멜라닌 생성을 저해한다. 미백효과를 가진 화합물을 개발하기 위하여 tyrosinase 효소활성을 억제하는 물질들에 대한 다양한 연구들이 현재 진행되고 있다[24]. 본 연구에서는 매실추출물을 B16F1 세포에 각 농도 별로 처리하고 세포 내 tyrosinase 활성을 조사한 결과, 양성대조군인 vitamin C의 미백효과보다는 낮았으나 arbutin보다는 매실추출물의 미백효과가 우수한 것으로 나타났다.

이와 더불어 활성산소종에 대한 방어효소를 생성하는데 관여하는 중요한 전사인자인 Nrf2 [22] 와 조직에서 활성산소를 감소시키는 SOD-1과 SOD-2의[5] 발현 정도를 알아보기 위하여 단백질발현을 조사한 결과 매실을 처리한 세포군에서는 Nrf2, SOD-1과 SOD-2의 단백질 발현이 감소 되었다. 이러한 결과는 매실추출물의 항산화효과로 인하여 피드백 기전에 의하여 세포에서 항산화에 관여하는 효소발현이 감소된 것으로 유추해 볼 수 있다.

결론적으로 매실추출물은 활성산소종에 대한 소거효과 및 환원력 뿐만 아니라 Nrf2, SOD-1과 SOD-2의 발현 조절을 통하여 멜라닌 생성억제효과를 통하여 미백효과를 발휘할 수 있다고 판단된다.

## 감사의 글

이 논문은 2011학년도 동의대학교 교내연구비(2011AA099)에 의해 연구되었음.

## References

- Addis, P. B. and Hassel, C. A. 1992. Safety issues with antioxidants in foods. *ACS Publications* **30**, 346-376
- Bandyopadhyay, U., Das, D. and Banerjee, R. K. 1999. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Curr. Sci. Bangalore* **77**, 658-666.
- Cha, H., Hwang, J., Park, J., Park, Y. and Jo, J. 1999. Changes in chemical composition of Mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc) fruits during maturation. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* **6**, 481-487.
- Choi, C. W., Kim, S. C., Hwang, S. S., Choi, B. K., Ahn, H. J., Lee, M. Y., Park, S. H. and Kim, S. K. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* **163**, 1161-1168.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* **64**, 97-112.
- Fridovich, I. 1997. Superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* **272**, 18515.
- Halliwell, B., Murcia, M. A., Chirico, S. and Aruoma, O. I. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **35**, 7-20.
- Hamilton, R., Kalu, C., Prisk, E., Padley, F. and Pierce, H. 1997. Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chem* **60**, 193-199.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **119**, 203-210.
- Havsteen, B. 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol.* **32**, 1141.
- Hill, H. Z., Li, W., Xin, P. and Mitchell, D. L. 1997. Melanin: A two edged sword? *Pigment Cell Res.* **10**, 158-161.
- Imai, J., Ide, N., Nagae, S., Moriguchi, T., Matsuura, H. and Itakura, Y. 1994. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* **60**, 417-420.
- Larson, R. A. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**, 969-978.
- Lodovici, M., Guglielmi, F., Meoni, M. and Dolara, P. 2001. Effect of natural phenolic acids on DNA oxidation *in vitro* *Food Chem Toxicol.* **39**, 1205-1210.
- Maniatis, T. 1989 *Molecular cloning: a laboratory manual*. Sambrook, EF Fritsch, T. Maniatis. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

16. Meydani, S. N., Wu, D., Santos, M. S. and Hayek, M. G. 1995. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am J. Clin. Nutr.* **62**, 1462S-1476S.
17. Milne, L., Nicotera, P., Orrenius, S. and Burkitt, M. 1993. Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 102-109.
18. Nakayama, T., Niimi, T., Osawa, T. and Kawakishi, S. 1992. The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat. Res.* **281**, 77-80.
19. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine. *Japn. J. Nutr.* **44**, 307-315.
20. Proctor, P. Free radicals and human disease. 1992. In handbook of free radicals and antioxidants in medicine. Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL.
21. Sen, C. and Hanninen, O. 1994. Physiological antioxidants. *Exerc. Oxygen Toxicity Elsevier, Amsterdam, The Netherlands* 89-126.
22. Shen, G., Jeong, W. S., Hu, R. and Kong, A. N. T. 2005. Regulation of Nrf2, NF- $\kappa$ B, and AP-1 signaling pathways by chemopreventive agents. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 1648-1663.
23. Shim, J. H., Park, M. W., Kim, M. R., Lim, K. T. and Park, S. T. 2002. Screening of antioxidant in Fructus mune (Prunus mune Sieb. et Zucc.) extract. *Agric. Chem. Biotechnol.* **45**, 119-123.
24. Stefania, B., Emanuela, C. and Mauro, P. 2003. Review: innovative technology, chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* **16**, 101-110.

---

초록 : 매실추출물이 활성산소종 소거효과와 B16F1 세포에서 멜라닌 생성에 미치는 영향

박형준 · 김문무 · 오영희\*  
(동의대학교 화학과)

매실나무(*Carthamus tinctorius* L.)는 한국, 일본과 중국에서 전통적으로 약효가 있는 음식으로 사용되어 왔다. 특히 과일인 위염증 및 위궤양에 도움이 되는 생물학적 효과가 있다고 보고되었다. 그러나 피부미백과 관련된 효능에 대한 연구는 아직까지 미진하다. 따라서, 본 연구에서는 항산화 및 피부미백에 대한 매실추출물의 효능이 조사되었다. MTT assay를 이용한 세포생존에 대한 결과로 매실추출물은 0.1% 이하의 농도에서 세포독성이 없는 것으로 나타났다. 다음에 매실추출물의 환원력 뿐만 아니라 DPPH radical, hydrogen peroxide 및 superoxide에 대한 직접적인 소거효과가 *in vitro*에서 평가되었다. 그것은 이상의 활성산소종에 대한 소거효과를 발휘하게 하는 우수한 환원력을 가지고 있다. 더욱이 산화적 스트레스와 연관된 genomic DNA 손상에 대한 보호효과가 농도에 따라 증가하는 것이 관찰 되었다. 뿐만 아니라 L-dopa에 의하여 유발되는 멜라닌 생성에 대한 억제효과를 나타내었다. 그것은 또한 Western blot 분석에서 항산화와 관련된 NRF-2, SOD-1 및 SOD-2 발현수준을 감소시킨다는 것이 발견되었다. 이러한 결과들은 매실추출물이 항산화에 의한 멜라닌생성의 억제를 통하여 피부 미백효과를 발휘할 수 있다는 것을 암시한다.