

황칠나무 잎 추출물의 세포 항산화 활성과 미백활성 측정

박수아¹, 박준², 박찬일², 지영종², 황윤찬², 김용현², 전소하¹, 이혜미¹, 하지훈¹, 김경진¹, 박수남^{1*}

¹서울과학기술대학교 정밀화학과 나노바이오화장품연구실, 화장품종합기술연구소

²서울과학기술대학교

Received: November 1, 2013 / Revised: December 7, 2013 / Accepted: December 9, 2013

Cellular Antioxidant Activity and Whitening Effects of *Dendropanax morbifera* Leaf Extracts. Park, Su Ah¹, Jun Park², Chan Il Park², Young Jong Jie², Yun Chan Hwang², Yong Hyun Kim², So Ha Jeon¹, Hye Mi Lee¹, Ji Hoon Ha¹, Kyeong Jin Kim¹, and Soo Nam Park^{1*}. ¹Department of Fine Chemistry, Nanobioscience laboratory, and Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Korea, ²Seoul Science High School, Seoul 110-521, Korea

In this study, we investigated the antioxidant activities on HaCaT and the whitening effects on B16F1 melanoma cells of *Dendropanax morbifera* leaf extract. In an antioxidative activity assay using HaCaT cells, the ethyl acetate (50 µg/ml) and aglycone fractions (25 µg/ml) of the *D. morbifera* leaf extract didn't exhibit any characteristics of cytotoxicity. When HaCaT cells were exposed to a single large dose (800 mJ/cm²) of UVB, the extracts protected the cells against UVB radiation. When HaCaT cells were treated with 10 mM H₂O₂ and 4 µM rose bengal, the ethyl acetate (6.25–50 µg/ml) and aglycone (6.25–25 µg/ml) fractions protected the cells against oxidative damage in a concentration dependent manner. When the whitening effects of *D. morbifera* leaf extract were tested in melanoma B16/F1 cells treated with the α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH), the extracts inhibited α-MSH-stimulated intra/extracellular melanogenesis in a concentration dependent manner. The inhibitory effects of the ethyl acetate and aglycone fractions of *D. morbifera* leaf extract were 21% and 44% at 25 µg/ml, respectively. Both are more effective than arbutin (15% at 25 µg/ml) which is known as a whitening agent. These results indicate that fractions of the *D. morbifera* leaf can function as cell protectants and natural antioxidants in biological systems, particularly skins exposed to UV radiation by quenching and/or scavenging ¹O₂ and other ROS, and protecting cells against ROS. In addition, fractions of the *D. morbifera* leaf can be applied to new whitening cosmetics because of their inhibitory effects on α-MSH stimulated melanogenesis in B16F1 melanoma cells.

Keywords: *Dendropanax morbifera*, antioxidant activity, HaCaT, B16F1 melanoma, α-MSH, melanogenesis

서론

최근 기능성 화장품 산업에서 연구가 가장 활발하게 진행되고 있는 분야는 피부 노화 방지와 미백 효능이라 할 수 있다. 피부가 노화하는 데 가장 큰 영향을 미치는 요인으로는 자외선을 꼽을 수 있다[24, 25]. 자외선으로 유도된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 피부의 광산화적 손상을 일으켜 피부노화를 가속화시킨다. ROS란 큰 산화력을 갖는 산소종으로서 superoxide anion radical (O₂^{·-}), hydroxyl

radical (·OH)과 같은 산소 중심의 라디칼뿐만 아니라 hydrogen peroxide (H₂O₂), singlet oxygen (¹O₂)와 같은 비라디칼 종 그리고 이들이 생체 성분과 반응하여 생성된 peroxy radical (ROO·), alkoxy radical (RO·) 등을 말한다 [3, 16, 17]. ROS는 반응성이 크기 때문에 세포막을 이루고 있는 인지질을 산화시켜 세포를 파괴할 뿐만 아니라, MMPs의 발현을 촉진시켜 콜라겐 및 엘라스틴 섬유 등을 분해시킨다. 콜라겐 및 엘라스틴 섬유가 분해되어 물리적 구조를 유지하지 못하면 피부는 탄력을 나타내지 못하고 결과적으로 주름이 생기게 된다. 이러한 자외선 및 ROS는 DNA 염기의 산화 및 사슬 절단 등을 통하여 피부노화를 가속화시킨다. 또한 ROS는 피부에서 멜라닌세포의 활성화를 통하여 멜라닌세포 증식과 멜라닌 합성을 증가시킨다고 보고되고

*Corresponding author

Tel: +82-2-970-6451, Fax: +82-2-972-9585

E-mail: snpark@seoultech.ac.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

있다[1, 10, 26]. 사람 피부에는, ROS와 같은 산화적 스트레스 환경으로부터 피부를 보호하는 항산화 방어망이 구축되어 있다. 그러나 ROS가 과도하게 생성되면 이러한 항산화 방어망은 붕괴되어 산화적 손상에 의한 피부 질환 및 노화를 야기시킬 수 있다[13-15, 22].

멜라닌은 사람의 피부색을 결정하는 주요 인자 중 하나로서 동식물계에 존재하는 생체 고분자물질이며 피부의 기저층에 존재하는 멜라닌 생성세포(melanocyte)에 의해 생합성되고 수지상 돌기를 통해 각질형성세포(keratinocyte)로 수송되어 melanin cap으로써 각질형성세포의 핵을 보호하고 각화과정에 의해 피부 바깥층으로 이동하여 떨어져 나간다[2, 19]. 멜라닌은 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2) 등의 일련의 효소반응에 의하여 생성되며, 이 중에서 멜라닌 생성에 있어 가장 중요한 역할을 하는 효소는 tyrosinase이다. 이는 멜라닌 생합성에서 초기단계를 촉매하는 속도조절 인자로서, 이 효소에 의해 tyrosine이 3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA), DOPA quinone으로 변환되어 붉은 계열의 eumelanin과 갈색 계열의 pheomelanin이 합성된다. 멜라닌은 각질형성세포로 이동되어 자외선 등에 의한 피부의 노화나 일광각화증을 억제하여 피부를 보호하는 긍정적인 기능을 가지고 있는 반면에, 과도하게 생성될 경우 피부에 색소가 침착되어 기미, 주근깨를 형성하며, 이와 같은 병변은 나아가 피부암의 원인이 되기도 한다[6, 9, 20, 21, 23].

따라서 피부노화를 지연 또는 억제시키기 위해서 자외선을 차단하거나 피부에서의 ROS의 생성 및 생성된 ROS를 효율적으로 제거하여 ROS로부터 세포 및 조직을 보호할 수 있는 항산화제 개발과 함께 밝고 아름다운 피부를 유지하기 위한 새로운 미백제 개발이 최근 절실히 요구되고 있는 실정이다[8, 12, 18].

황칠나무(*Dendropanax morbifera*)는 우리나라의 남부 해안 지역과 제주도 등에서 자생하는 쌍떡잎식물이며 두릅나무과의 상록교목으로, 뿌리와 잎의 줄기는 거풍습, 황멸매, 풍습비통, 편두통, 월경불순에 효능이 있다고 알려져 왔다[11]. 또 황칠나무에는 sesquiterpene에 속하는 β -selinene가 가장 많이 함유되어 있고, capnellane-8-one가 다음으로 많이 함유되어 있다고 알려져 있다[7].

황칠나무 추출물의 항산화 활성 및 항암 활성 등의 생리활성은 일부 제한적으로 보고되고 있으며, 건강기능성 보조식품 및 식품첨가제 등 식품에 이용되고 있다. 현재까지, 황칠나무에 대한 항산화능 평가는 1,1-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성에 대한 것이 있고[5], 아직은 미흡한 실정으로, 피부 노화 과정에 깊이 관여하는 활성산소인 H_2O_2 나 1O_2 으로 유도된 세포손상에 대한 항산화 작용에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 또한 황칠나무 잎 추출물

의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획으로 멜라닌 생합성 저해활성 측정은 아직 연구가 되지 않았다. 본 논문의 저자는 이전 실험에서 황칠나무 잎 추출물이 플라보노이드 성분(orientin, vitexin, rutin)을 함유하고 있는 것을 확인하였고, 따라서 본 연구에서는 황칠나무 잎 추출물의 활성 분획을 추출하여 피부노화의 큰 원인인 활성산소에 의한 세포손상에 대한 보호 작용을 평가하였으며 melanoma 세포를 이용한 멜라닌 생합성 저해효능 평가를 통해 항노화 화장품·기능성 화장품 소재로서 응용가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

기기 및 시약

증감제로 사용된 rose-bengal, dihydroxyphenylalanine (DOPA), 알부틴 (arbutin)은 Sigma (USA), H_2O_2 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. 에탄올, 에틸아세테이트(EtOAc), 헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 자외선 조사에 사용한 CL-1000 Ultraviolet Crosslinker는 UVP사(USA) 제품을 사용하였다. UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)의 Cary 50, 본 연구에서 사용한 황칠(*D. morbifera*) 나무 잎은 2012년 6월경에 충북 제천시 화산동에 있는 제천약초에서 구매하여 사용하였다.

황칠나무 잎의 추출 및 용매 분획

실험에 사용한 황칠나무 잎은 Fig. 1과 같은 방법으로 추출/분획을 하여 사용하였다. 건조시킨 황칠나무 잎 100 g을 잘게 자른 후 50% 에탄올 1 L를 이용하여 하루 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 여액을 감압 건조하여 이를 실험에 사

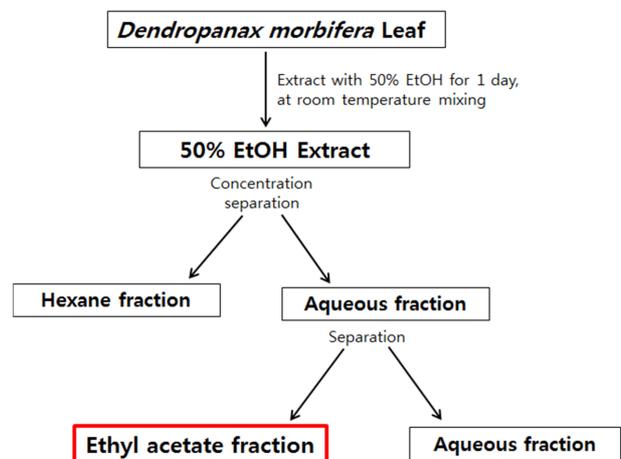


Fig. 1. Scheme for preparation of the fractions obtained from *D. morbifera* leaf.

용하였다. 또한 50% 에탄올 추출물은 감압 농축한 후 물과 헥산(n-hexane)을 이용하여 엽록소, 지질 등의 비극성 성분을 제거하였으며, 이후 에틸아세테이트로 3회 반복 처리한 분획을 감압, 농축하여 유기용매를 완전히 제거하였다.

에틸아세테이트 분획(Ethyle acetate fraction of *D. morbifera* leaf, DM EA)으로부터 아글리콘(aglycone) 제조 : 에틸아세테이트분획에서 얻은 시료의 일부는 산 가수분해 반응을 이용해서 당을 제거시킨 후 얻은 아글리콘(aglycone fraction of *D. morbifera* leaf, DM Agly)을 실험에 사용하였다. 실험 방법은 에틸아세테이트 가용분 일정량에 5% H₂SO₄-50% 아세톤 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류, 냉각시킨다. 환류시킨 용액을 5% KOH-MeOH 용액으로 중화 적정한다. 중화 적정 후 다시 에틸아세테이트 층을 분획하고 감압, 농축하여 유기용매를 완전히 제거하였고, 이를 실험에 사용하였다.

세포 보호 효과 측정

세포 배양: 사람 각질형성 세포주인 HaCaT 세포는 Dr. Fusenig (German Cancer Research Center, DKFZ)로부터 분양받아 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)는 10% fetal bovine serum (PAA, Austria), 1% penicillin-streptomycin (PAA, Austria)을 혼합하여 사용하였고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포 독성 평가: HaCaT 세포를 96 well plate에서 24 h 동안 37°C, 5% CO₂ 조건으로 항온 배양한 후, 각 농도 별로 황칠나무 잎 추출물을 처리한다. 24 h 배양한 세포를 PBS로 세척하고 MTT 용액(2 µg/ml)을 첨가하여 3 h 동안 반응시킨 후, 생성된 formazan을 DMSO에 녹여 570 nm에서 측정하였다.

아무것도 처리를 하지 않은 비조사군을 대조군으로 하여 100% 기준으로 잡아 상대적인 세포 생존율을 구하였다.

UVB 조사: 96 well plate에 1 × 10⁴ cells/well로 부착시킨 HaCaT 세포를 24 h 동안 배양하였다. 정상배지 혹은 농도 별 황칠나무 잎 추출물이 함유된 배지에 UVB Crosslinker를 이용하여 UVB 800 mJ/cm²를 조사한 후, 적정 시간 동안 배양하였다.

H₂O₂ 처리: 96 well plate에 1 × 10⁴ cells/well로 부착시킨 HaCaT 세포에 정상배지 혹은 농도 별 황칠나무 잎 추출물이 함유된 배지를 넣고 30 min 배양 후, 10 mM H₂O₂를 함유한 배지를 처리하여 30 min 동안 배양하였다.

Rose bengal 처리: 96 well plate에 1 × 10⁴ cells/well로 부착시킨 HaCaT 세포에 정상배지 혹은 농도 별 황칠나무 잎 추출물이 함유된 배지를 넣고 30 min 배양 후, 4 µM rose bengal를 함유한 배지를 처리하여 15 min 광조사하였다.

세포 생존율 측정: 세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) assay로 측정하였다. 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용하여 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 방법으로 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다.

HaCaT 세포를 96 well plate에서 24 h 동안 37°C, 5% CO₂ 조건으로 항온 배양한 후, 각 농도별로 황칠나무 잎 추출물을 처리한 세포에 800 mJ/cm² UVB, 10 mM H₂O₂, 4 µM rose bengal을 처리하였다. 시료 처리 후, 24 h 동안 배양한 세포를 PBS로 세척하고 MTT 용액(2 µg/ml)을 첨가하여 3 h 동안 반응시킨 후, 생성된 formazan을 DMSO에 녹여 570 nm에서 측정하였다.

아무것도 처리를 하지 않은 비조사군을 음성대조군으로 하여 100% 기준으로 잡아 상대적인 세포 생존율을 구하였다. 시료를 처리하지 않은 조사군을 양성대조군으로 하였으며, 세포의 생존율은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

멜라닌 생합성 저해능 측정

세포배양: B16F1은 쥐의 melanoma 세포주로 경희대학교 피부생명공학센터에서 얻어 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (PAA, Austria), 1% penicillin-streptomycin (PAA, Austria)를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포 독성 평가: 세포 독성 평가는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) assay를 이용하여 측정하였다. B16 melanoma 세포를 96 well plate에서 24 h 동안 37°C, 5% CO₂ 조건으로 항온 배양한 후, 각 농도 별로 황칠나무 잎 추출물과 비교물질로서 알부민을 처리하였다. 시료 처리 72 h 후 MTT 용액(2 µg/ml)을 첨가하여 3 h 동안 반응시킨 다음 생성된 formazan을 DMSO에 녹여 ELISA를 이용하여 570 nm에서 측정하였다.

세포의 형태학적 관찰: B16 melanoma 세포를 6 well plate에 1 × 10⁵ cells/well 씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건으로 항온 배양하였다. 24 h 후 세포가 부착한 것을 확인하고 배지를 교환한 후에 α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH, Sigma, USA, 200 nM)와 황칠나무 잎 추출물을 농도별로 처리하여 72 h 동안 배양하였다. 세포의 수지상 돌기의 변화와 멜라닌 배출정도를 위상차도립현미경을 이용하여 관찰하였다.

멜라닌 함량 측정: 멜라닌 함량은 Hosoi 등의 방법[4]을

변형하여 사용하였다. B16 melanoma 세포를 6 well plate에 1×10^5 cells/well 씩 분주하고 37°C, 5% CO₂ 조건으로 항은 배양하였다. 24 h 후 세포가 부착한 것을 확인하고 PBS로 1회 세척 후 phenol red가 들어있지 않은 DMEM으로 교환하였다. α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH, Sigma, USA, 200 nM)와 황칠나무 잎 추출물을 농도별로 처리하여 72 h 동안 배양하였다. 세포 밖으로 배출된 멜라닌은 배양한 후에 각 세포배양 상층액 100 μ l를 96-well에 넣고 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 내 멜라닌 함량은 남은 세포배양 상층액을 제거하고 1% triton X-100 용액으로 세포를 수확하여 원심분리하여 상층액은 단백질 함량을 측정하고, pellet은 건조시켜 10% DMSO를 함유한 1 N NaOH 용액 100 μ l에 용해하여 96-well plate에 옮긴 후 ELISA를 사용하여 405 nm에서 측정하였다. 멜라닌 함량은 멜라닌 표준품으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 산출 하였으며, 단백질 함량은 DC protein assay kit (Bio Rad, USA)를 이용하여 측정 후 보정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5% 유의수준에서 Student's t-test를 행하였다.

결과 및 고찰

황칠나무 잎 추출물의 세포 독성 평가

황칠나무 잎 추출물의 세포 독성에 미치는 농도를 조사하고, 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해 MTT assay를 시행하였다. 황칠나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획의 세포 독성을 측정한 결과, 50 μ g/ml 농도 이하의 세포 생존율

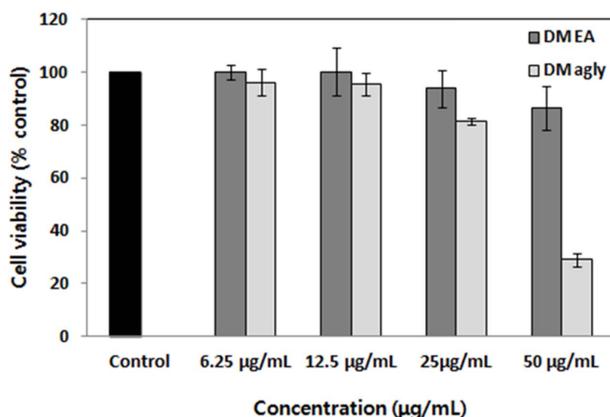


Fig. 2. HaCaT cell viability of the fractions of *D. morbifera* leaf extracts by MTT assay. DM EA; ethyle acetate fraction of *D. morbifera* leaf, DM agly; aglycone fraction of *D. morbifera* leaf.

이 80% 이상이였다. 아글리콘 분획의 경우, 50 μ g/ml 농도에서 세포 생존율이 29%로 세포독성을 나타냈다. 따라서 본 연구에서는 황칠나무 잎 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위해 황칠나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 농도를 80% 이상의 세포생존율을 나타내는 최고 농도로 각각 50, 25 μ g/ml으로 설정하였다(Fig. 2).

자외선 조사에 따른 황칠나무 잎 추출물의 세포 보호 효과 UVB 조사선량에 따른 세포 생존율: UVB Crosslinker

를 이용하여 HaCaT 세포를 대상으로 UVB를 광량별 (600~900 mJ/cm²)로 조사하고 세포 생존율에 미치는 영향을 관찰하였다. 600 mJ/cm²의 UVB를 조사한 경우 세포 생존율은 78%를 나타내었고, 700 mJ/cm²인 경우 세포 생존율은 65%, 800 mJ/cm²은 50%, 그리고 900 mJ/cm²은 39%의 생존율을 나타내었다. 본 연구에서는 자외선으로부터 세포 보호 효과를 측정하기 위하여 자외선의 광량을 800 mJ/cm²로 설정하였다(Fig. 3A).

UVB로 유도된 세포 손상에 대한 황칠나무 잎 추출물의 보호 작용: HaCaT 세포에 황칠나무 잎 추출물을 농도

별로 처리한 후에 800 mJ/cm²의 UVB를 조사하였다. 24 h 동안 세포를 배양하고 세포의 생존율을 MTT assay로 측정하였다. 800 mJ/cm²의 UVB를 조사한 후 세포 생존율은 UVB를 조사하지 않은 대조군에 비하여 44%의 생존율을 나타내었다. 자외선 조사 전 HaCaT 세포에 12.5, 25 및 50 μ g/ml의 황칠나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획을 처리한 경우 세포 생존율은 54, 57 및 59%로 농도 의존적으로 자외선 조사에서 세포 사멸을 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 황칠나무 잎 추출물의 아글리콘 분획을 처리한 경우는, 동일한 농도에서 세포 생존율이 45, 53 및 22%로, 자외선에 대하여 세포 보호활성을 나타내었으나 50 μ g/ml의 농도에서는 UVB만 조사한 경우보다 세포 생존율이 더 낮게 나타났다. 이는 50 μ g/ml에서 황칠나무 잎 추출물의 아글리콘 분획 자체의 세포에 대한 독성을 반영한 결과로 보여진다(Fig. 2). 결과적으로, 자외선 조사 전에 황칠나무 잎 추출물을 처리하면, UVB로 유도된 라디칼 연쇄반응의 개시 단계를 차단시켜서 세포보호 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 3B).

H₂O₂ 처리에 따른 황칠나무 잎 추출물의 세포 보호 효과

H₂O₂ 농도별 처리에 따른 HaCaT 세포의 생존율: 자외선에 의해 발생되어 산화적 손상을 유발하는 활성산소인 H₂O₂를 HaCaT 세포를 대상으로 농도별로(1, 5, 10, 15, 20 mM) 처리하고 세포 생존율에 미치는 영향을 관찰하였다. 1 mM의 H₂O₂를 처리한 경우는 H₂O₂를 처리하지 않은 경우에 비해 89% 정도의 세포 생존율을 나타내었다. 5 mM인 경

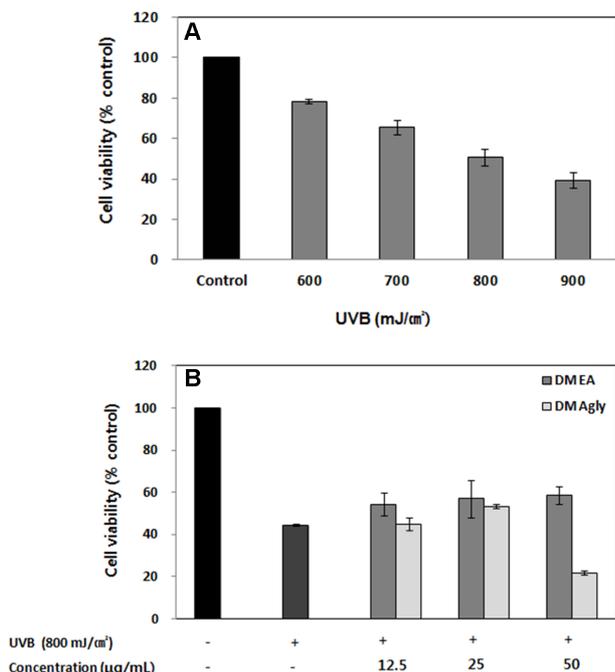


Fig. 3. (A) Viability of HaCaT cells exposed to different irradiation intensities of UVB irradiation. **(B)** Effect of the fractions of *D. morbifera* leaf extracts on UVB-induced cell damage in HaCaT cell system.

HaCaT cell were exposed to UVB 800 mJ/cm² and stained with MTT to show survival cells compared to non-irradiated group (DM EA; ethyle acetate fraction of *D. morbifera* leaf, DM agly; aglycone fraction of *D. morbifera* leaf).

우 세포 생존율은 75%를 나타내었고, 10 mM은 50%, 15 mM은 35% 그리고 20 mM에서는 16%의 생존율을 나타내었다 (Fig. 4A). 본 연구에서는 H₂O₂로부터 세포보호 효과를 측정하기 위하여 H₂O₂의 농도를 50% 정도의 세포 생존율을 나타낸 10 mM로 설정하였다.

H₂O₂로 유도된 세포 손상에 대한 황칠나무 잎 추출물의 보호 작용: 농도별 황칠나무 잎 추출물을 처리한 후에 HaCaT 세포에 10 mM H₂O₂를 함유한 배지를 처리한 후, 30 min 배양하여 PBS로 세척하였다. 24 h 배양한 세포의 생존율을 MTT assay를 통해 측정하였다. 10 mM H₂O₂를 처리한 세포 생존율은 H₂O₂를 처리하지 않은 대조군에 비하여 50%의 생존율을 나타내었다. H₂O₂ 처리 전 HaCaT 세포에 6.25, 12.5, 25 및 50 µg/ml의 황칠나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획을 처리한 경우 세포 생존율은 53, 53, 54 및 55%로, 황칠나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획이 H₂O₂ 처리에 의한 세포 손상에 대해 낮은 보호효과를 나타냄을 확인하였다. 또한 같은 농도로 황칠나무 잎 추출물의 아글리콘 분획을 처리한 경우 61, 63, 66 및 40%로 25 µg/ml 이하의 농도에서는 농도 의존적으로 우수한 세포 보호 효과를 갖는

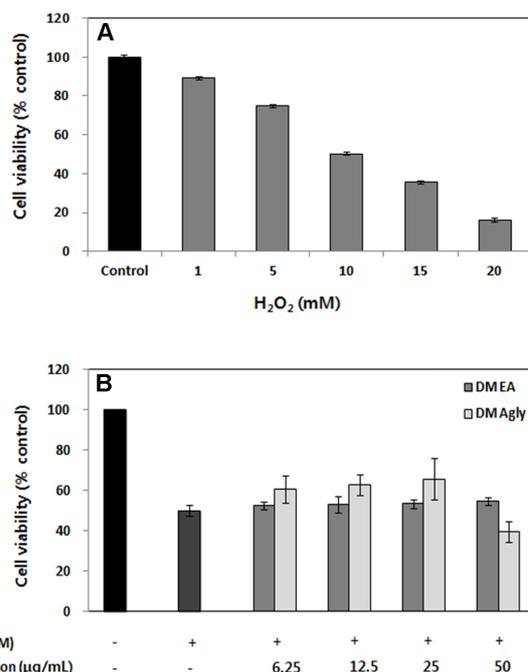


Fig. 4. (A) Cell viability on H₂O₂-induced cell damage in HaCaT cell system. **(B)** Cellular protective effect of the fractions of *D. morbifera* leaf extracts on H₂O₂-induced cell damage in HaCaT cell system.

HaCaT cells were treated with 10 mM H₂O₂ and stained with MTT to show survival cells compared to non-treated group (DM EA; ethyle acetate fraction of *D. morbifera* leaf, DM agly; aglycone fraction of *D. morbifera* leaf).

것으로 나타났다. 하지만 50 µg/ml의 농도에서는 과산화수소만 조사한 경우보다 세포 생존율이 더 낮게 나타났다. 이는 50 µg/ml에서 황칠나무 잎 추출물의 아글리콘 분획 자체의 세포에 대한 독성을 반영한 결과로 보여진다(Fig. 2). 결과적으로 황칠나무 잎 추출물이 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 4B).

¹O₂로 유도된 HaCaT 세포의 손상에 대한 세포보호 효과

Rose bengal 농도별 처리에 따른 HaCaT 세포의 생존율: HaCaT 세포를 대상으로, 광노화에 있어서 주요한 활성산소인 ¹O₂을 발생시키는 rose bengal을 농도별(1, 2, 3, 4, 5 µM)로 처리하고 세포 생존율을 측정하였다. 1 µM의 rose bengal을 처리한 경우는 rose bengal을 처리하지 않은 경우에 비해 89% 정도의 세포 생존율을 나타내었다. 2 µM인 경우 세포 생존율은 75%를 나타내었고, 3 µM은 59%, 4 µM은 50%, 5 µM은 37%의 생존율을 나타내었다(Fig. 5A). 본 연구에서는 ¹O₂로 유도된 세포 손상으로 부터 세포 보호 효과를 측정하기 위하여 rose bengal의 농도를 50%의 세포 생존

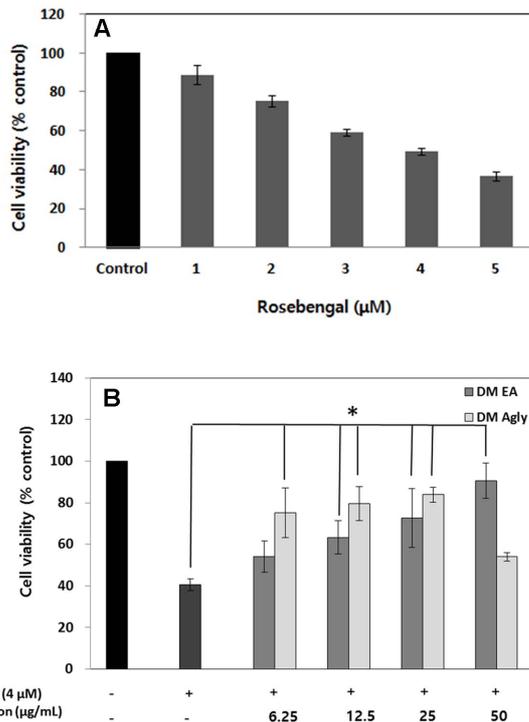


Fig. 5. Cell viability on ¹O₂-induced cell damage in HaCaT cell system. (B) Cellular protective effect of the fractions of *D. morbifera* leaf extracts on ¹O₂-induced cell damage in HaCaT cell system.

HaCaT cell was treated with 4 µM rose bengal and stained with MTT to show cell viability compared to non-treated group (DM EA; ethyle acetate fraction of *D. morbifera* leaf, DM agly; aglycone fraction of *D. morbifera* leaf (*p < 0.05).

을 나타낸 4 µM로 설정하였다.

¹O₂으로 유도된 세포 손상에 대한 황칠나무 잎 추출물의 보호 작용: HaCaT 세포에 황칠나무 잎 추출물을 농도별로 처리한 후에 4 µM의 rose bengal을 함유한 배지를 넣고 15 min 동안 광조사한 후 세포를 PBS로 세척하였다. 24 h 동안 세포를 배양하고 세포의 생존율을 MTT assay로 측정하였다. 4 µM rose bengal을 첨가한 경우는 rose bengal을 처리하지 않은 대조군 대비 세포 생존율 41%를 나타내었다. Rose bengal을 처리하기 전에 HaCaT 세포에 6.25, 12.5, 25 및 50 µg/ml의 황칠나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획을 처리한 경우 세포 생존율은 각각 54, 63, 72 및 91%를 나타내었으며, 50 µg/ml의 경우, 무처리군인 control과 비슷한 세포생존율을 나타내었다. 아글리콘 분획의 경우, 동일한 농도에서 75, 80, 84 및 54%의 세포 생존율을 보였다. 이는 50 µg/ml에서 황칠나무 잎 추출물의 아글리콘 분획 자체의 세포에 대한 독성을 반영한 결과로 보여진다(Fig. 2). 따라서 황칠나무 잎 추출물이 세포독성을 갖지 않는 농도에서 ¹O₂

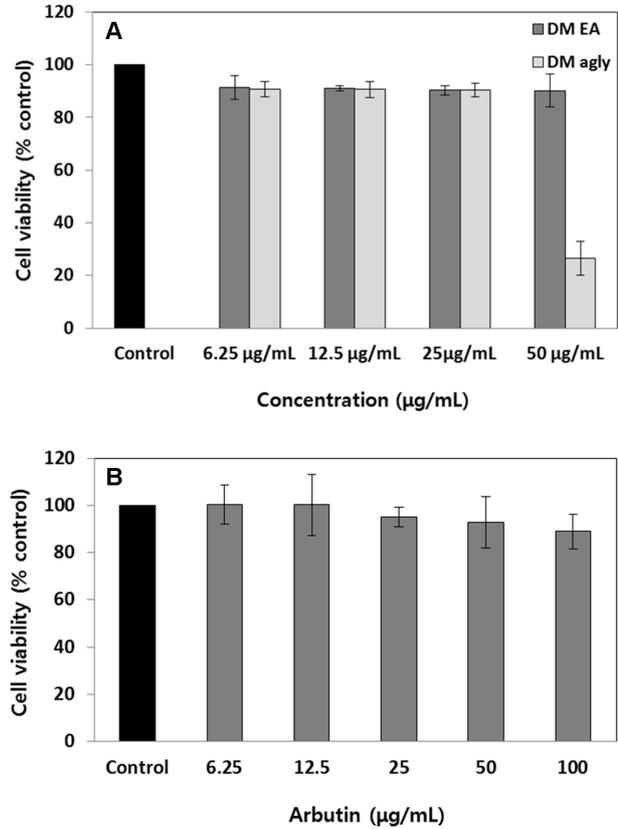


Fig. 6. B16F1 melanoma cell viability of the fractions of *D. morbifera* leaf extracts and arbutin as standard by MTT assay. DM EA; ethyle acetate fraction of *D. morbifera* leaf, DM agly; aglycone fraction of *D. morbifera* leaf.

으로 유도된 라디칼 연쇄반응의 개시 단계를 차단시키고, 세포 손상에 대하여 우수한 세포 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 5B).

황칠나무 잎 추출물의 멜라닌 생성 저해활성 측정

황칠나무 잎 추출물의 B16F1 melanoma 세포에 대한 독성 평가: 황칠나무 잎 추출물의 멜라닌 생성 저해능 측정을 위해 황칠나무 잎 추출물과 대조군으로 사용된 알부틴의 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 통하여 실험에 사용될 농도 범위를 결정하였다. 황칠나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획의 세포 독성을 측정된 결과, 50 µg/ml 농도 이하의 세포 생존율이 80% 이상이었다. 아글리콘 분획의 경우, 50 µg/ml 농도에서 세포 생존율이 56%로 세포독성을 나타냈다. 비교물질로 사용한 알부틴은 100 µg/ml 농도에서 거의 90%의 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 6). 따라서 본 연구에서는 황칠나무 잎 추출물의 미백활성을 측정하기 위해 황칠나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 농도를 80% 이상의 세포생존율을 나타내는 최고 농

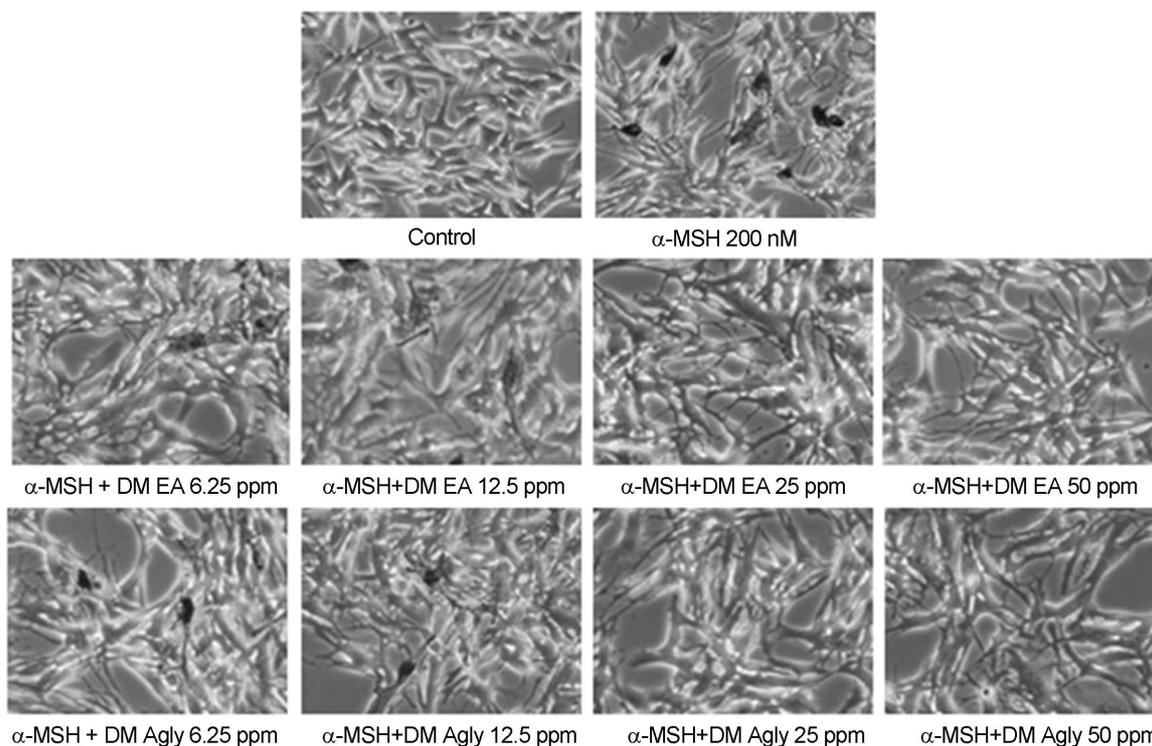


Fig. 7. Effect of *D. morbifera* leaf extracts on cellular morphology of cultured B16F1 melanoma cells under inverted phase contrast microscope using a digital camera.

B16F1 melanoma cells were treated with the fractions of *D. morbifera* leaf extracts in the presence of 200 nM α -MSH for 72 h (DM EA; ethyle acetate fraction of *D. morbifera* leaf, DM agly; aglycone fraction of *D. morbifera* leaf).

도로 각각 50, 25 μ g/ml로 설정하였으며, 비교물질인 알부틴은 100 μ g/ml로 설정하였다.

B16F1 melanoma 세포의 형태학적 관찰: 황칠나무 잎 추출물의 멜라닌 생성 저해활성을 측정하기 위해서, B16F1 melanoma 세포에 황칠나무 잎 추출물을 농도 별로 처리하고 72시간이 지난 후에 현미경으로 형태학적 변화를 비교 관찰하였다. 무처리군인 control에 비해서 α -MSH를 처리한 경우, 유의적으로 멜라닌 함량이 증가하였다. 황칠나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획(6.25~50 μ g/ml)과 아글리콘 분획(3.13~25 μ g/ml)을 처리한 경우, α -MSH만 처리하였을 때와 비교하여 멜라닌 함량이 감소하였음을 확인할 수 있었다 (Fig. 7).

멜라닌 생성 저해활성 측정: 황칠나무 잎 추출물의 미백 효과를 알아보기 위해 α -MSH로 자극된 B16 melanoma 세포에 황칠나무 잎 추출물을 처리하여 세포 내의 멜라닌 함량과 세포 밖으로 배출된 멜라닌 함량을 측정함으로써 멜라닌 생합성 저해활성을 평가하였다. 기능성 화장품의 미백제로 널리 알려진 알부틴이 비교물질로 사용되었다. 황칠나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획은 α -MSH만 처리하였을 때(+66% of control)와 비교하여 6.25, 12.5, 25 및

50 μ g/ml 농도에서 각각 13, 16, 21 및 34%의 세포 내 멜라닌 생합성 저해활성을 나타내었으며, 50 μ g/ml 농도에서 무처리군인 control과 비슷한 멜라닌 함량을 나타내었다, 세포 밖으로 배출된 멜라닌 함량 또한 세포 내 멜라닌 함량과 비슷한 경향성을 보였다(Fig. 8A). 아글리콘 분획의 경우 α -MSH만 처리하였을 때(+105% of control)와 비교하여 3.13, 6.25, 12.5 및 25 μ g/ml 농도에서 각각 1, 14, 24 및 44%의 멜라닌 생합성 저해활성을 나타내었으며, 25 μ g/ml 농도에서 무처리군인 control과 비슷한 멜라닌 함량을 나타내었다. 세포 밖으로 배출된 멜라닌 함량 또한 세포 내 멜라닌 함량과 비슷한 경향을 보였다(Fig. 8B). 비교물질로 사용된 알부틴은 α -MSH만 처리하였을 때 세포의 멜라닌 함량은 42% 증가하였고, α -MSH 단독 처리군과 비교하여 알부틴의 12.5, 25, 50 및 100 μ g/ml 농도에서 각각 14, 15, 18 및 20%의 멜라닌 생합성 저해활성을 나타내었다. 세포 밖으로 배출된 멜라닌 함량은 세포 내 멜라닌 함량 보다 다소 많았으며, 비슷한 경향성을 보였다(Fig. 8C). 황칠나무 잎 추출물과 알부틴은 모두 농도의존적으로 멜라닌 생합성 저해활성을 나타내었다. 25 μ g/ml에서 황칠나무 잎 추출물의 아글리콘 분획이 가장 우수한 멜라닌 생합성 저해활성(44%)을 나타내었

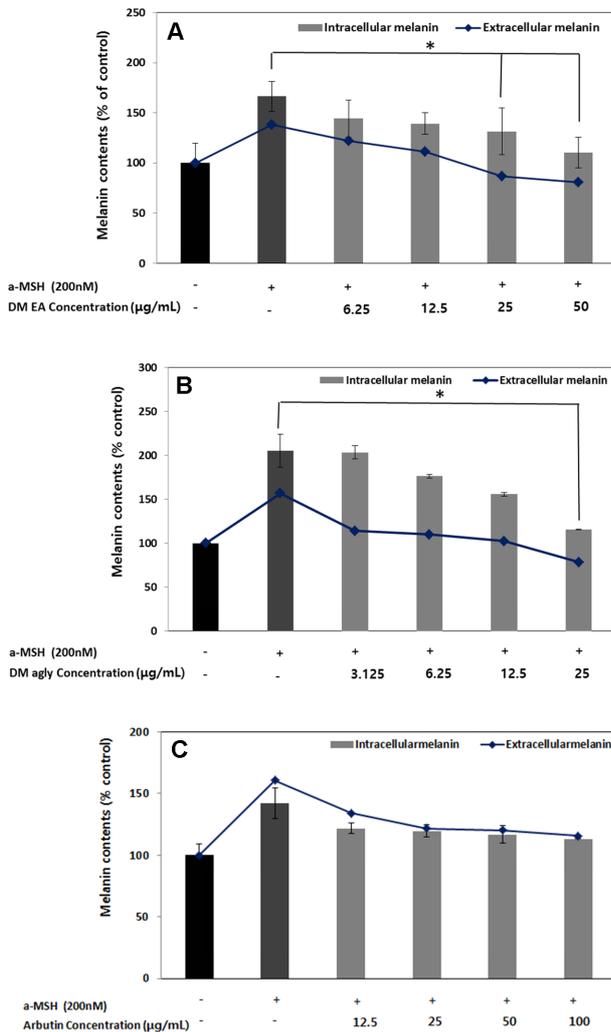


Fig. 8. Inhibitory effects of the fractions of *D. morbifera* leaf extracts and arbutin on intracellular/extracellular melanin contents stimulated by α -MSH in cultured B16F1 melanoma cells. DM EA; ethyle acetate fraction of *D. morbifera* leaf, DM agly; aglycone fraction of *D. morbifera* leaf (* $p < 0.05$).

으며, 비교물질인 알부틴(15%) 보다 2.93배 우수한 활성을 보였다. 황칠나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획(21%)은 알부틴 보다 1.4배 우수한 멜라닌 생합성 저해활성을 나타내었다.

요 약

본 연구에서는 황칠나무 잎 추출물의 HaCaT 세포에서의 항산화 활성과 B16F1 melanoma 세포에서의 미백활성을 측정하였다. HaCaT 세포를 이용한 실험에서, 황칠나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획과 아글리콘 분획은 각각 50 및

25 µg/ml의 농도 이하에서 독성을 나타내지 않았다. UVB 800 mJ/cm²를 HaCaT 세포에 조사하였을 때, 황칠나무 잎 추출물은 농도 의존적으로 자외선으로부터 세포를 보호하였다. 10 mM의 H₂O₂ 및 4 µM의 rose bengal을 HaCaT 세포에 처리하였을 때, 에틸아세테이트 분획(6.25~50 µg/ml) 및 아글리콘 분획(6.25~25 µg/ml)은 우수한 세포 보호 효과를 나타내었다. 황칠나무 잎 추출물의 B16F1 melanoma 세포에서의 미백활성을 측정한 결과, 미백제로 알려진 알부틴 보다 더 우수한 멜라닌 합성 저해 활성을 보였다. 이상의 결과들은 황칠나무 잎 추출물이 ROS에 대항하여 세포를 보호함으로써 생체계, 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 세포 보호제 및 천연항산화제로서 작용할 수 있음을 가르키며, α -MSH로 유도된 멜라닌 생합성 저해 효과로부터 황칠나무 잎 추출물이 새로운 미백 화장품의 원료로써 이용 가능성을 알 수 있다.

References

- Ahn YJ, Won BR, Kang MK, Kim JH, Park SN. 2009. Antioxidant activity and component analysis of fermented *Lavandula angustifolia* extracts. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **35**: 125-134.
- Ando H, Niki Y, Ito M, Akiyama K, Matsui MS, Yarosh DB, et al. 2012. Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. *J. Invest. Dermatol.* **132**: 1222-1229.
- Han SB, Gu HA, Kim SJ, Kim HJ, Kwon SS, Kim HS, et al. 2013. Comparative study on antioxidative activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts by country of origin. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **39**: 1-8.
- Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. 1985. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cell by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**: 1474-1478.
- Hyuna TK, Kim M, Lee H, Kim Y, Kim E, Kim J-S. 2013. Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of *Dendropanax morbifera* Léveille. *Food Chemistry* **141**: 1947-1955.
- Iwata M, Corn T, Iwata S, Everett MA, Fuller BB. 1990. The relationship between tyrosinase activity and skin color in human foreskins. *J. Invest. Dermatol.* **95**: 9-15.
- Jeong BS, Jo JS, Pyo BS, Hwang B. 1995. Studies on the distribution of *Dendropanax morbifera* and component analysis of the golden lacquer. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **10**: 393-400.
- Jo NR, Park MA, Chae KY, Park SA, Jeon SH, Ha JH, et al. 2012. Cellular protective and antioxidative activities of *Parthenocissus tricuspidata* stem extracts. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **38**: 225-236.
- Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishi-yama S. 1993. Pigment production in murine melanoma

- cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP), dopachrome tautomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* **100**: 126-132.
10. Kim AR, Park SA, Ha JH, Park SN. 2013. Antioxidative, and inhibitory activities on melanogenesis of *Vitex negundo* L. leaf extract. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 135-144.
 11. Kim HR, Chung HJ. 2000. Chemical characteristics of the leaves and the seeds of Korean *Dendropanax* (*Dendropanax morbifera* Lev.). *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **43**: 63-66.
 12. Packer L. 1994. Ultraviolet radiation (UVA, UVB) and skin antioxidants, In C. A. Rice-Evans and R. H. Burdon (ed), *Free radical damage and its control*, **239**: Elsevier Science, Amsterdam.
 13. Park SN. 2003. Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics (I). *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **14**: 657-665.
 14. Park SN. 1989. Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea.
 15. Park SN. 1997. Skin aging and antioxidant. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **23**: 75-132.
 16. Pillai S, Oresajo C, Hayward J. 2005. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation-a review. *Int. J. Cosmet. Science* **27**: 17-34.
 17. Rhie GE, Shin MH, Seo JY, Choi WW, Cho KH, Kim KH, et al. 2011. Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.* **117**: 1212-1217.
 18. Scharffetter-Kochanek K. 1997. Photoaging of the connective tissues of skin: Its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy. *Adv. Pharmacol.* **38**: 639-655.
 19. Seiberg M. 2001. Keratinocyte-melanocyte interaction during melanosome transfer. *Pigment. Cell Res.* **14**: 236-242.
 20. Seo EJ, Hong ES, Choi MH, Kim KS, Lee SJ. 2010. antioxidant and skin whitening effects of *Rhamnus yoshinoi* extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**: 750-754.
 21. Seo H, Seo GY, Ko SZ, Park YH. 2011. Inhibitory effects of ethanol extracts from *Polygoni multiflori* radix and *Cynanchi wilfordii* radix on melanogenesis in melanoma cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **40**: 1086-1091.
 22. Steinbeck MJ, Khan AU, Karmovsky MJ. 1992. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J. Biol. Chem.* **267**: 13425-13433.
 23. Weixiong L, Helene ZH. 1997. Induced melanin reduces mutations and cell killing in mouse melanoma. *Phytochem. Phytobiol.* **65**: 480-485.
 24. Won DH, Han SB, Hwang JP, Kim SJ, Park JN, Park SN. 2012. Antioxidative effect and tyrosinase inhibitory activity of *Lindera obtusiloba* Blume extracts. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **38**: 297-304.
 25. Yaar M, Gilchrist BA. 2007. Photoageing: mechanism, prevention and therapy. *Br. J. Dermatol.* **157**: 874-887.
 26. Yamakoshi J, Otsuka F, Sano A, Tokutake S, Saito M, Kikuchi M, et al. 2003. Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Pig. Cell Res.* **16**: 629-638.