

Effect of *Ulmus macrocarpa* Ethanolic Extracts on Anti-oxidant Activity and Melanin Synthesis in B16F1 Cells

Eun-Jeong Kwon¹, Hye-Jung Park¹, Moon-Moo Kim¹, Kyeong Rok Lee², Il Hong², Do Gyeong Lee² and Yunghee Oh^{1*}

¹Department of Chemistry, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

²AMI cosmetics Mapo-gu, Seoul 121-888, Korea

Received May 23, 2014 / Revised June 28, 2014 / Accepted July 21, 2014

Melanin plays a key role in the protection of skin from ultraviolet light that generates reactive oxygen species (ROS), such as superoxide, hydroxyl radical, singlet oxygen and hydrogen peroxide. However, the ROS leading to the oxidation of lipids, proteins and DNA are involved in the overproduction of melanin that is known to cause melasma, age spots and freckles. Among the herb medicines, *Ulmus macrocarpa* used in this study was reported to contain flavonoids as a main component. The aim of this study is to investigate the whitening and anti-oxidant effects of *Ulmus macrocarpa* ethanolic extracts (UMEE) in B16F1 cells. UMEE below 3.12 µg/ml did not show cytotoxicity. In an anti-oxidant experiment, UMEE showed not only high reducing power and scavenging activity on DPPH, but it was also observed that UMEE exhibit an inhibitory effect on lipid peroxidation. UMEE did not display an inhibitory effect on tyrosinase activity *in vitro*. However, UMEE inhibited melanin synthesis in B16F1 cells. In addition, UMEE reduced the expression levels of tyrosinase and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2), which are key enzymes in melanogenesis. These results indicate that UMEE exert a whitening effect through the inhibition of both tyrosinase and TRP-2 expressions as well as anti-oxidant activity, suggesting that UMEE could have the functional potential for a whitening effect on the skin.

Key words : B16F1, TRP-2, tyrosinase, *Ulmus macrocarpa* ethanolic extracts (UMEE), whitening

서 론

Melanin은 신체의 눈동자, 머리카락 또는 피부색등을 결정 짓는 색소로서 자외선과 같은 외부로부터의 자극으로부터 세포를 보호하는 과정에서 합성된다. 자외선에 의해 피부가 자극을 받으면 표피의 melanocyte에 존재하는 melanocortin 1 receptor (MC1R)와 뇌하수체에서 분비되는 α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH)과 결합하여 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA) 경로에 의해 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현이 증가된다[1, 4, 12]. 그로 인해 melanin 합성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase, tyrosinase related protein-1, -2 (TRP-1, -2) 활성이 증가되고 melanin 합성이 유발된다[14]. 특히 tyrosinase는 melanin 합성 mechanism에서 초기속도를 결정하는 단계에 관여하는 촉매효소로서 tyrosin이 3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA)로 전환되고 DOPA가 dopaquinone으로 전환하는 과정에 작용하여 melanin 합성에 중요한 역할을 한다[8, 16]. 이러한 과정 중에 우리 피부는 자외선으로부터 발생할 수 있는 피부암 등 각종 피부 질환으로부터 보호된다. 하지만 이 과정이 과도하게 발생할 경우 색소 침착 등으로 인한 기미, 주근깨를 유발하는 등 부작용을 야기한다[10]. Melanin은 활성 산소종(ROS, reactive oxygen species)에 의한 산화반응에 의해서도 합성된다고 알려져 있다[2]. 활성 산소종은 체내 호흡과정 중에 생기는 산물로서 과도하게 생성될 경우 melanin 합성뿐만 아니라 산화적 스트레스를 유발하여 세포손상 및 기관손상을 야기시켜 암, 당뇨, 혈관계질환, 관절염 등과 같은 각종 질병을 유발한다[18]. 대표적인 항산화제로 알려진 vitamin C는 미백에도 탁월한 효과가 있는 물질로서 tyrosinase의 활성부위에 결합하여 활성을 억제한다. 비슷한 효과를 나타내는 albutin도 미백제로서 잘 알려진 물질이다. 하지만 이런 물질들은 안정성의 문제로 인해 현재 사용에 제한을 두고 있다. 유백피(*Ulmus macrocarpa*)는 느릅나무의 껍질로서 관절염을 억제하는 천연물로 잘 알려진 한약재이지만 피부미백효과에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구는 위와 같은 효과를 가지고 있는 유백피의 피부 미백효과 및 항산화 효과에 대하여 연구하고자 한다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1517, Fax : +82-51-890-2620

E-mail : yhoh@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

재료 및 시료의 제조

세포배양을 위한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Trypsin-EDTA, penicillin (10,000 U/ml) / streptomycin (10,000 µg/ml) / amphotericin (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, agarose와 기타시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하였다.

시료의 제조

유백피 주정추출물(*Ulmus macrocarpa*, UMEE)은 하기와 같은 방법으로 추출하였다. 먼저, 유백피를 흐르는 물에 깨끗이 세척한 다음 완전히 자연 건조시켰다. 세척·건조된 상기 유백피를 주정에 3일간 추출하고 여과한 후, 여과된 여액을 감압 농축하여 분말 형태의 유백피 주정추출물을 얻는다. 제조된 분말형태의 시료들을 시험농도로 희석하여 본 연구에 사용하였다.

MTT assay

Hansen [18]의 방법에 따라 B16F1 세포에 대한 UMEE의 세포독성을 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하여 측정하였다.

DPPH free radical scavenging activity

Brand-Williams [7] 실험방법을 변형하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 UMEE의 소거능력을 측정하였다. 각 시료를 시험농도로 처리하고 10초 동안 잘 혼합한 다음, 실온에서 20분 동안 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH free radical 함량은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

환원력 Assay

Oyaizu [11]의 방법에 따라 측정하였다. UMEE 1 ml에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충용액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1 ml씩 차례로 가하여 교반 한 후 50°C의 수용상에서 20분 동안 반응시켰다. 여기에 10% TCA 용액 1 ml를 가하여 13,500× g에서 15분 동안 원심 분리하여 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)

UMEE를 시험농도가 되게 linolenic acid emulsion과 30분 동안 혼합한 후 0.8 mM H₂O₂ 및 0.8 mM FeSO₄를 혼합한 용액을 5시간 동안 반응 시킨 후 0.4% TBA를 첨가하고 95°C에서 2시간 동안 반응시켜 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그 다음, 15:1 비율의 n-butanol : pyridine 용액을 500 µl 첨가하고 1,000× g에서 10분 동안 원심 분리하여 상등액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며 지질과산화 정도는 시료 첨가 전후의 흡광도 비를 % 값으로 환산하였다.

In vitro tyrosinase 활성 측정

시험관에 0.1 M 인산염완충액(pH 6.5) 220 µl와 시료액 20 µl 그리고 mushroom tyrosinase (1500 U/ml)액 20 µl를 순서대로 넣는다. 이 용액에 1.5 mM tyrosine 액 40 µl를 넣고 37°C에서 10~15분 동안 반응시킨다. 그리고 이것을 ELISA reader (ELISA processor II, Behring, Germany)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

B16F1에서 melanin 생성 측정

6-well plate에 3×10⁵ cells/well로 세포를 분주하였고, 시료를 처리하고 1시간 후에 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 phenyl methyl sulfonyl fluoride)로 용해시켰다. 여기서 얻은 pellet에 1N 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 melanin 양을 산출하였다. Melanin은 단위세포(10⁴ cells)에서의 melanin 생성량을 비교하였다.

세포배양

B16F1 세포는 5% CO₂ 및 37°C에서 95% 이상의 습도를 유지한 배양기에서 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine 과 100 µg/ml penicillin-streptomycin을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 배양하였다.

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 MgCl₂, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 80 µg/ml leupeptin, 3 mM NaF and 1 mM DTT)을 첨가하여 4°C에서 30분 동안 처리하였다. 10 µg의 세포용출액을 10% Tris - HCl gel에서 전기영동 후 단백질을 전기적으로 nitrocellulose membrane으로 전이 시켰다. 그 다음 10% skim milk를 nitrocellulose mem-

brane에 전 처리하고 목적 단백질에 대한 1차 항체(anti-tyrosinase, anti-TRP -2, anti-beta-actin (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA))를 처리한 다음 2차 항체를 처리 후, chemiluminescent ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA)를 사용하여 목적단백질을 검출하였다. Western blot의 band는 LAS3000 @image analyzer (Fuji film Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

통계처리

각 실험은 3회 이상 반복실험을 통하여 그 결과를 얻어 각각의 시료농도에 대해 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료농도군에 대한 유의차 검정은 대조군과 비교하여 Student's *t* test 한 후 $p < 0.05$ 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다.

결 과

DPPH free radical에 대한 UMEE의 효과

DPPH radical에 대한 UMEE의 소거능을 조사하기 위해 DPPH free radical scavenging assay를 수행 하였다. DPPH radical소거법은 항산화 물질에 의한 DPPH radical의 탈색 정도를 지표로 하여 산화억제 정도를 예측할 수 있다. 각 농도 별로 소거능을 조사한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 UMEE의 농도가 증가함에 따라 비례하여 DPPH free radical 소거능이 증가되는 것으로 나타났으며 31.2 µg/ml 에서는 약 50%의 DPPH free radical 소거효과가 있는 것으로 나타났다.

Reducing power에 대한 UMEE의 효과

UMEE의 환원력을 조사한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 농도에 비례하여 환원력이 증가하는 것으로 나타났다. UMEE

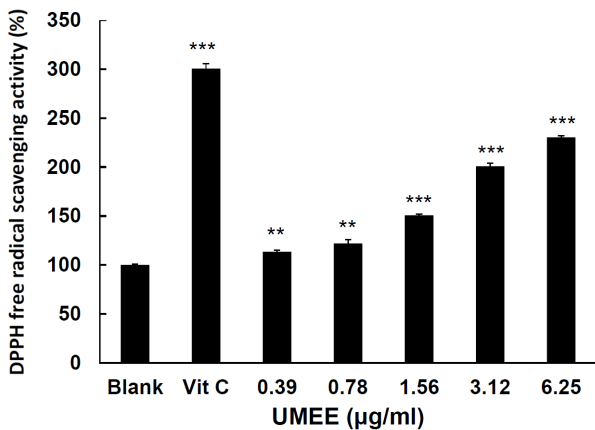


Fig. 1. DPPH radical Scavenging effect of UMEE. Vitamin C (Vit C) at 100 µg/ml was used as a positive control. Data are given as means of values ± SD from three independent experiments (**, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$).

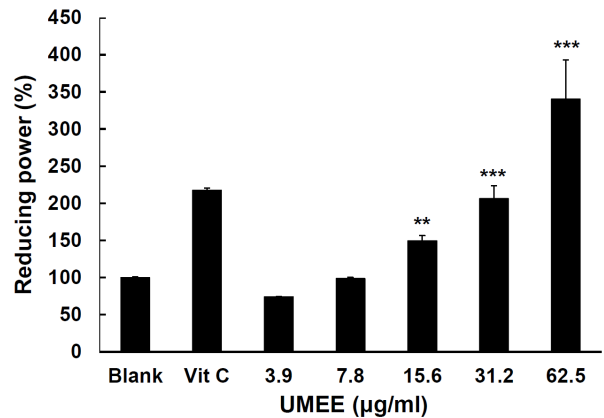


Fig. 2. Reducing power of UMEE. Vitamin C (Vit C) at 10 µg/ml was used as a positive control. Data are given as means of values ± SD from three independent experiments (**, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$).

는 62.5 µg/ml 농도에서 350%의 환원력을 나타내어 양성대조군으로 사용된 10 µg/ml의 vitamin C보다 환원력이 우수한 것으로 나타났다.

Lipid peroxidation에 대한 UMEE의 효과

UMEE의 ·OH radical에 의한 지질과산화 억제효과를 조사하기 위해 TBARS를 수행하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 Blank군과 비교하여 양성 대조군으로 사용된 vitamin E는 1,000 µg/ml의 농도에서 지질과산화화를 20% 억제하였으나 UMEE는 vitamin E보다 16배 낮은 농도인 62.5 µg/ml 농도에서 10%의 지질과산화 억제효과를 나타내었다.

In vitro tyrosinase 활성억제에 대한 UMEE의 효과

Tyrosinase는 인체내의 melanin 생합성 경로에서 가장 중

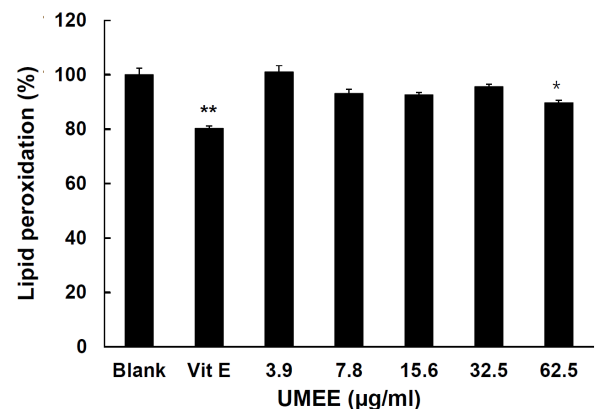


Fig. 3. Inhibitory effect of UMEE on lipid peroxidation. Lipid peroxidation was determined by TBARS. Vitamin E (Vit E) at 1,000 µg/ml was used as a positive control. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. (**, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$).

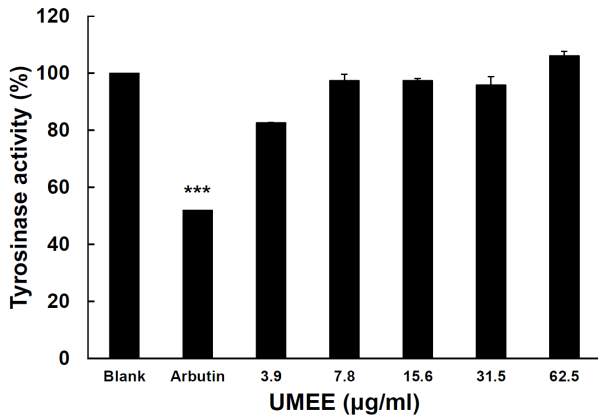


Fig. 4. Effect of UMEE on tyrosinase activity. Arbutin at 2,000 μg/ml was used as a positive control. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments.

요한 초기 속도결정단계에 관여하는 효소로서 많은 미백 성분 이 효소를 억제하는 작용기전을 가지고 있다. 이 시험은 *In vitro*에서 tyrosinase의 활성을 저해하는 정도를 평가할 수 있다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 양성 대조군으로 사용된 2,000 μg/ml의 arbutin과 비교하여 UMEE는 직접적인 tyrosinase의 활성억제효과는 없는 것으로 나타났다.

B16F1에서 세포성장 및 melanin 생성 조절에 대한 UMEE의 효과

B16F1 cell에 대한 UMEE의 세포독성을 조사하기 위해 MTT assay를 수행 하였다. Fig. 5A에서 보는 바와 같이 UMEE는 대조군과 비교하였을 때 3.12 μg/ml 이하에서 어떠한 독성도 나타나지 않았다. 다음 실험으로 DOPA자극을 통한 melanin 생성조절효과를 조사하기 위해 B16F1 세포를 사용하여 melanin 함량을 측정 하였다. Fig 5B에서 보는 바와 같이 양성 대조군으로 사용된 2,000 μg/ml의 arbutin은 melanin 합성효과가 우수한 것으로 나타났다. 그러나 UMEE는 세포 밖으로 분비된 melanin 생성 억제효과는 없는 것으로 나타났다. 하지만 세포 내 melanin 생성량을 측정하기 위해 1N NaOH를 이용하여 세포 내 melanin을 측정한 결과 Fig 5C에서 UMEE는 2,000 μg/ml의 arbutin 보다 훨씬 낮은 농도에서 melanin 합성을 유의성 있게 저해하는 것으로 나타났다(** $p < 0.001$).

B16F1 세포에서 미백효과와 관련된 단백질의 발현에 대한 UMEE의 효과

Melanin 생성의 중요한 효소인 tyrosinase와 melanin 합성 신호전달기전에 중요한 tyrosinase related protein-2 (TRP-2)의 단백질 발현을 조사하였다. Melanin 합성을 촉진시키기 위하여 B16F1세포에 melanin stimulating hormone (α-MSH)으로 자극하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 UMEE는 0.78

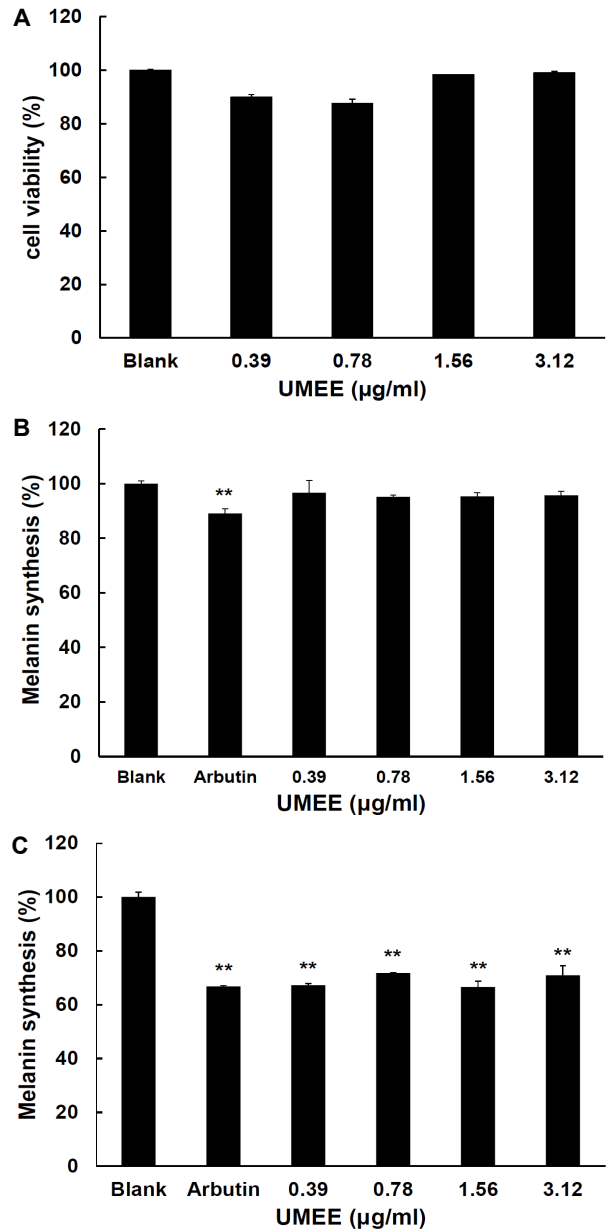


Fig. 5. Effect of UMEE on cell viability and melanin synthesis in B16F1. The cells were treated with UMEE at 0.39, 0.78, 1.56 and 3.12 μg/ml. Cell viability was determined by MTT assay after 24 hr. The amount of extracellular melanine (B) and intracellular melanin (C) were analyzed in B16F1 cells treated with UMEE. Arbutin at 2,000 μg/ml was used as a positive control. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. (** $p < 0.01$).

μg/ml 농도에서 melanin 합성에 관여하는 2가지 중요한 효소인 tyrosinase와 TRP-2의 단백질의 발현수준을 감소시키는 것으로 나타났다. 특히, TRP-2의 단백질 발현수준이 tyrosinase 발현수준보다 현저하게 감소되는 것이 관찰되었다.

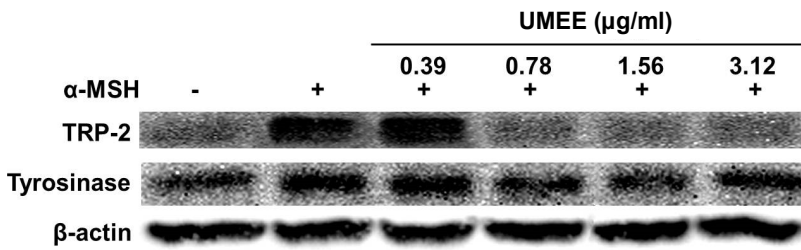


Fig. 6. Effect of UMEE on expressions of TRP-2 and tyrosinase in B16F1 cells. The cells were treated with UMEE at 0.39, 0.78, 1.56, 3.12 and 6.25 µg/ml. Western blot analysis of cell lysates was performed using antibodies as indicated. The expression level of β-actin was used as a control for normalization of target proteins.

고찰

UV에 장시간 노출된 피부는 표피의 melanocyte에서 생성된 melanin에 의하여 기미, 주근깨 발생 등 피부 색소 침착이 일어나게 된다[17]. Melanocyte에 존재하는 MC1R은 뇌하수체 전엽에서 분비되는 α-MSH와 결합하여 tyrosinase, TRP-1, -2의 발현을 증가 시킨다[5]. Tyrosinase는 melanin 합성 단계 중에 반응초기 속도를 결정하는 효소로 작용하여 tyrosin이 DOPA로 전환할 때 관여하는 촉매효소이다[15]. 그래서 본 연구에서는 tyrosinase 효소활성에 대한 UMEE의 억제효과를 조사하였으나 유의성 있는 결과를 나타내지 못하였다. 반면 DOPA 합성에 의한 melanin 합성을 측정할 결과 세포 밖으로 분비된 melanin의 경우 효과를 나타내지 못하였으나 세포 내의 melanin 합성은 우수한 억제효과를 나타내었다. 이것은 UMEE가 세포 내 DOPA억제를 통하여 DOPAquinone의 합성을 억제하고 melanin 합성기전을 차단하여 melanin 합성 억제효과를 가질 수 있다는 긍정적인 가능성을 제시한다[6]. Melanin은 체내 호르몬 작용뿐만 아니라 ROS에 의해서도 합성된다. 특히 ·OH radical의 경우 tyrosin과 산화반응을 일으켜 tyrosin을 DOPA로 전환시킨다[13]. 호흡과 대사과정을 통해 생성되는 ROS는 체내에서 radical로 작용하여 세균 및 바이러스로부터 조직 및 기관을 보호하지만 과도하게 발생할 경우 세포 손상을 야기시키고 암, 당뇨, 관절염 등의 질병을 유발할 뿐만 아니라 노화를 촉진시킨다고 알려져 있다[3]. 따라서 본 연구에서 UMEE의 항산화 효과를 확인하기 위해 DPPH free radical scavenging assay, TBARS, 환원력 측정 실험을 수행하였다. 환원력 측정 실험에서 나타난 UMEE의 높은 환원력은 radical에 의한 tyrosin의 산화를 억제하여 산화를 통한 합성기전을 차단시켜 UMEE의 새로운 melanin 합성 억제효과 가능성을 제시한다[9]. DOPAquinone이 산화되어 생성된 DOPAchome은 TRP -2에 의하여 melanin으로 전환된다. 본 연구에서는 TRP-2가 관여하는 melanin합성 과정에서의 UMEE의 작용을 조사하기 위해 western blot을 수행하였다. 그 결과UMEE는 tyrosinase 및 TRP-2 단백질 발현을 억제시키는 것을 통하여 TRP-2에 의한 melanin 합성을 유익적으로 억제시킬 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 UMEE는 DOPA에서 DOPAquinone과 DOPAchome을 통한 melanin 합성기전을 억제시켜 미백효과를 나타낼 수 있을 것으로 사

료된다. 이러한 미백효과를 나타내는 유백피는 향후 미백기능성 화장품으로의 활용가치가 높을 것으로 기대된다.

감사의 글

중소기업청에서 지원하는 2013년도 산학연협력 기술개발사업(No.C0149500) 및 2014학년도 동의대학교 교내연구비에 의해 연구되었음(No. 2014AA269).

References

- Dumaz, N., Hayward, R., Martin, J., Ogilvie, L., Hedley, D., Curtin, J. A., Bastian, B. C., Springer, C. and Marais, R. 2006. In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res* **66**, 9483-9491.
- Hachinohe, M. and Matsumoto, H. 2005. Involvement of reactive oxygen species generated from melanin synthesis pathway in phytotoxicity of L-Dopa. *J Chem Ecol* **31**, 237-246.
- Halliwell, B. 1991. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J med* **91**, S14-S22.
- Hauser, J. E., Kadekaro, A. L., Kavanagh, R. J., Wakamatsu, K., Terzieva, S., Schwemberger, S., Babcock, G., Rao, M., Ito, S. and Abdel Malek, Z. A. 2006. Melanin content and MC1R function independently affect UVR induced DNA damage in cultured human melanocytes. *Pigment Cell Res* **19**, 303-314.
- Hunt, G., Donatien, P. D., Lunec, J., Todd, C., Kyne, S. and Thody, A. J. 1994. Cultured human melanocytes respond to MSH peptides and ACTH. *Pigment Cell Res* **7**, 217-221.
- Hwang, J. -H. and Lee, B. M. 2007. Inhibitory effects of plant extracts on tyrosinase, L-DOPA oxidation, and melanin synthesis. *J Toxicol Environ Health A* **70**, 393-407.
- 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.
- Korner, A. and Pawelek, J. 1982. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* **217**, 1163-1165.
- Korytowski, W. and Sarna, T. 1990. Bleaching of melanin pigments. Role of copper ions and hydrogen peroxide in

- autooxidation and photooxidation of synthetic dopa-melanin. *J Biol Chem* **265**, 12410-12416.
10. Lorincz, A. L. 1985. Disturbances of melanin pigmentation. *Dermatology. Philadelphia: WB Saunders*.
 11. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction--antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J Nutr* **44**, 307-315.
 12. Park, S. Y., Jin, M. L., Kim, Y. H., Kim, Y. and Lee, S. -J. 2011. Aromatic-turmerone inhibits α -MSH and IBMX-induced melanogenesis by inactivating CREB and MITF signaling pathways. *Arch Dermatol Res* **303**, 737-744.
 13. Seagle, B. L., Rezai, K. A., Gasyna, E. M., Kobori, Y., Rezaei, K. A. and Norris, J. R. 2005. Time-resolved detection of melanin free radicals quenching reactive oxygen species. *J Am Chem Soc* **127**, 11220-11221.
 14. Shibahara, S., Yasumoto, K. I., Amae, S., Udono, T., Watanabe, K. I., Saito, H. and Takeda, K. 2000. Regulation of pigment cell specific gene expression by MITF. *Pigment Cell Res* **13**, 98-102.
 15. Slominski, A., Moellmann, G., Kuklinska, E., Bomirski, A. and Pawelek, J. 1988. Positive regulation of melanin pigmentation by two key substrates of the melanogenic pathway, L-tyrosine and L-dopa. *J Cell Sci* **89**, 287-296.
 16. Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S. and Wortsman, J. 2004. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* **84**, 1155-1228.
 17. Tadokoro, T., Kobayashi, N., Zmudzka, B. Z., Ito, S., Wakamatsu, K., Yamaguchi, Y., Korossy, K. S., Miller, S. A., Beer, J. Z. and Hearing, V. J. 2003. UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin. *FASEB J* **17**, 1177-1179.
 18. Wiseman, H. and Halliwell, B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* **313**, 17-29.

초록 : B16F1세포에서 항산화 활성 및 멜라닌 합성에 대한 유백피 에탄올 추출물의 효능

권은정¹ · 박혜정¹ · 김문무¹ · 이경록² · 홍 일² · 이도경² · 오영희^{1*}

(¹동의대학교 화학과, ²주아미코스메틱)

멜라닌은 superoxide, hydroxyl radical, singlet oxygen, hydrogen peroxide와 같은 활성산소를 생성하는 자외선으로부터 피부를 보호하는 핵심적인 역할을 한다. 그러나 지질, 단백질, DNA 산화를 야기시키는 활성산소는 주근깨와 기미의 원인으로 알려진 melanin 과잉생산을 유도한다. 한약재중에서 본 연구에 사용된 유백피는 주요 성분으로 flavonoids를 함유하는 것으로 보고되었다. 본 연구의 목적은 B16F1에서의 유백피 에탄올 추출물의 미백효과 및 항산화 효과를 조사한 것이다. UMEE는 3.12 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 세포독성을 보여주지 않았다. 항산화 실험에서 UMEE는 높은 환원력과 DPPH 소거효과를 보여주었다. 더욱이 UMEE는 지질과산화 억제효과가 있는 것으로 관찰되었다. UMEE는 *in vitro*에서 tyrosinase활성에 대한 억제효과는 없었다. 그러나 UMEE는 melanogenesis에서 중요한 효소인 tyrosinase 및 tyrosinase related protein-2 (TRP-2)의 발현을 감소시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 UMEE가 항산화 활성뿐 만 아니라 tyrosinase 및 TRP-2의 발현억제를 통한 미백효과를 나타내어, 피부에 미백효과를 줄 수 있는 기능적인 잠재성을 가지고 있다는 것을 암시한다.