

Whitening and Antioxidant Effects of a Mixture of *Poria cocos*, *Glycyrrhiza uralensis*, and *Ulmus macrocarpa* Extracts

Eun-Jeong Kwon^{1†}, Hye-Jung Park^{1†}, Hyang Nam¹, Su-Gyeng Lee¹, Su-gyoung Hong¹, 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 June 27, 2014 / Revised August 11, 2014 / Accepted August 12, 2014

Reactive oxygen species (ROS) are known to lead to oxidation of lipids, proteins, and DNA and cause skin damage. Moreover, ROS promote melanogenesis, which causes melasma, age spots, and freckle. The main compounds of the herbal medicines *Poria cocos*, *Glycyrrhiza uralensis*, and *Ulmus macrocarpa* were reported to be parchymic acid, glabridin, and flavonoids, respectively. The aim of this study was to investigate the whitening and antioxidant effects of a mixture of *P. cocos*, *G. uralensis*, and *U. macrocarpa* extracts (PGUE) in B16F1 cells to develop whitening cosmetics. PGUE inhibited DPPH radicals and lipid peroxidation, in addition to high reduction power, compared with *Glycyrrhiza uralensis* ethyl-acetate extracts (GUEE). Furthermore, PGUE exhibited a protective effect against DNA oxidation induced by the hydroxyl radicals. In addition to its antioxidant activity, the inhibitory activity of PGUE against tyrosinase, which is associated with melanogenesis, was greater than that of arbutin used as a positive control. Moreover, PGUE exerted an inhibitory effect on melanin synthesis in live melanoma cells and reduced the expression levels of superoxide dismutase-1 (SOD-1) and tyrosinase related protein-1 (TRP-1). These results indicate that PGUE has skin whitening and antioxidant effects, suggesting that this mixture can be used as the main ingredient in the development of effective whitening cosmetics.

Key words : Antioxidant, B16F1, melanin, PGUE, TRP-1 (tyrosinase related protein-1)

서 론

세포내 에너지를 생산하는 과정에서 필요한 산소 중 일부는 미토콘드리아와 세포질에서의 대사과정에서 활성산소로 전환되며 이 활성산소는 인체내 항산화 효소의 작용 및 기전에 의해 조절되어 균형을 유지하고 있다[9]. 하지만 항산화 효소의 불균형과 활성 산소의 급격한 증가로 인해 생성되는 활성 산소종(ROS, reactive oxygen species)은 free radical로서 세포 및 조직과 강한 산화반응을 하여 산화적 스트레스를 야기시킨다[8]. 그로 인해 생체는 암, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 관절염 등 각종 질병에 노출된다[20]. 뿐만 아니라 이러한 생체 내 산화반응은 melanin 합성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다[7]. Melanin은 인체의 머리카락, 동공, 피부색 등을 결정하는 고분자 물질로서 생체내 피부 속에 존재한다. 그러나 과도한 melanin 합성은 색소 침착 및 기미 주근깨 등을 야기시키며

피부노화에 관여한다고 보고되어 있다[15]. Melanin 합성에는 tyrosinase의 촉매작용에 의해 tyrosine이 hydroxyl과 결합되어 DOPA (3,4-dihydroxy phenylalanine)로 합성되는 효소작용뿐만 아니라[13] tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2) 및 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)등 과 같은 단백질들이 관여하는 세포내 신호전달 기전을 통한 합성이 있다[1]. 현재까지 가장 잘 알려진 미백제로는 arbutin, , vitamin C 등이 있다. Arbutin과 vitamin C는 tyrosinase의 활성부위에 결합하여 tyrosine에서 3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA) quinone (DOPAquinone)으로 산화하는 과정을 억제한다[2]. 그러나 현재 피부안정성 등의 이유로 사용에 제한을 두고 있는 실정이다. 따라서 천연 한방 소재를 이용한 미백제의 연구가 증가하고 있다. 백복령(*Poria cocos*)은 Parchymic acid와 무기물 당성분을 다량 함유하고 있으며 혈액순환에 도움이 된다고 알려져 있다[4]. 감초(*Glycyrrhiza uralensis*)는 glabridin성분을 가지고 있으며 항염 살균작용과 미백기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[6]. 유백피(*Ulmus macrocarpa*)는 플라보노이드와 사포닌 성분을 함유하고 있어 항염 및 진정효과가 있다고 알려져 있다[14]. 생김새는 관상 또는 판상으로 바깥면은 흑갈색으로 반점이 있고 코르크층이 있다. 껍질은 거칠고 얇은 갈색이며, 섬유상 가는 무늬가 뚜렷하고 질은 단단하며 흑황색의 가루가 있다. 다른 이름으로 영유(零榆), 유피(榆皮), 유근피(楡根

[†]Authors contributed equally.

*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.

皮)가 있다. 본 연구는 위와 같은 효과를 가진 세 가지 한방약 용식물의 추출물의 단독 및 혼합물의 tyrosinase 활성조절과 melanin 생성 및 항산화 메커니즘을 연구하고자 한다.

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, agarose와 기타시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

시료의 제조

유용성 감초추출물(GUEE), 백복령 주정추출물, 유백피 주정추출물 내지 세가지 혼합물(PGUE)는 하기와 같은 방법으로 추출하여 얻을 수 있다. 먼저, 백복령, 유백피를 흐르는 물에 깨끗이 세척한 다음 완전히 자연 건조시킨다. 세척·건조된 상기 백복령, 유백피를 주정에 3일간 추출한다. 상기 추출물을 여과한 후, 여과된 여액을 감압 농축하여 분말 형태의 백복령, 유백피 주정추출물을 얻는다. 감초 추출물의 경우 감초 뿌리를 무수 에탄올로 추출하여 얻은 추출물을 다시 ethyl acetate로 추출한 다음 추출액을 감압농축하여 건조한 유용성 추출물을 분말형태로 만든다. 제조된 분말형태의 시료들을 혼합하여 시험농도로 희석하여 본 연구에 사용하였다.

MTT assay

Hansen [10]의 방법에 따라 B16F1 세포에 대한 GUEE 및 PGUE의 세포독성을 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하여 측정하였다.

DPPH radical assay

Brand-Williams [12] 실험방법을 변형하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 GUEE 및 PGUE의 소거능력을 측정하였다. 각 시료를 시험농도로 처리하고 10 sec 동안 잘 혼합한 다음, 실온에서 20분 동안 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 함량은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

환원력 Assay

Oyaizu [19]의 방법에 따라 측정하였다. GUEE 및 PGUE를 각각 1 ml에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충용액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1 ml씩 차례로 가하여 교반한 후 50°C

의 수욕상에서 20분 동안 반응시켰다. 여기에 10% TCA 용액 1 ml를 가하여 13,500× g에서 15분 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)

GUEE 및 PGUE를 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1%의 농도가 되게 linolenic acid emulsion과 30분 동안 혼합한 후 0.8 mM H₂O₂ 및 0.8 mM FeSO₄를 혼합한 용액을 5시간 동안 반응시킨 후 0.4% TBA를 첨가하고 95°C에서 2시간 동안 반응시킨 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 그 다음, 15:1 비율의 n-butanol : pyridine 용액을 500 µl 첨가하고 1,000× g에서 10분 동안 원심분리하여 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 머쉬롭타이로시나제(1,500 U/ml)액 20 µl를 순서대로 넣는다. 이 용액에 15 mM 타이로신 액 40 µl를 넣고 37°C에서 10~15분 동안 반응시킨다. 그리고 이것을 ELISA reader를 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 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 산출하였다. 멜라닌은 단위세포(10⁴ cells)에서의 멜라닌 생성량을 비교하였다.

세포배양

B16F1 세포는 5% CO₂ 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.

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 전이시켰다. 그 다음 10% skim milk를 nitrocellulose membrane에 전처리하고 목적 단백질에 대한 1차 항체(anti-tyrosinase, anti-TRP -1, anti-TRP -2, anti-SOD -1, 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 각각의 시료농도에 대해 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료 농도군에 대한 유의차 검정은 대조군과 비교하여 Student's t test 한 후 p<0.05 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다.

결 과

세포성장애 대한 PGUE의 효과

이 세포 독성에 미치는 농도를 조사하기 위하여 MTT assay 를 수행하였다. B16F1세포에 대한 각 시료의 세포 독성을 측정 한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 GUEE 및 PGUE는 3.12 µg/ml 이하의 농도에서 대조군과 비교하였을 때 어떠한 독성 효과도 없는 것으로 나타났다.

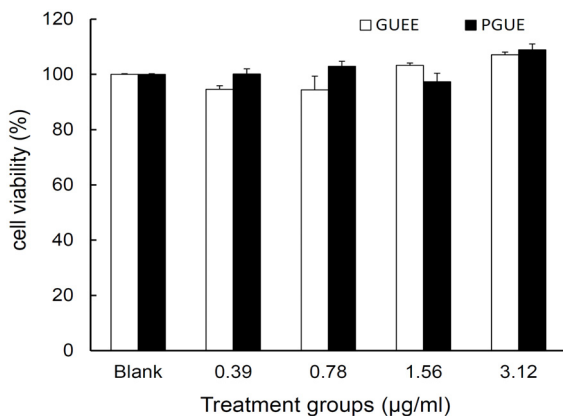


Fig. 1. Effect of GUEE and PGUE on viability in B16F1 cells. The cells were treated with GUEE and GUE at 0.39, 0.78, 1.56 and 3.12 µg/ml. Cell viability was determined by MTT assay after 24 hr. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test.

DPPH radical에 대한 PGUE의 효과

DPPH radical, lipid peroxidation의 소거능력에 대하여 GUEE 및 PGUE의 효과를 비교 조사하였다. DPPH radical소거법은 항산화 물질에 의한 DPPH radical의 탈색 정도를 지표로 하여 산화억제 정도를 예측할 수 있다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 각각 단독으로 처리한 그룹과 혼합용액을 처리한 그룹의 DPPH radical에 대한 소거능이 농도에 비례하여 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 이들 혼합물인 PGUE의 15.6 µg/ml 농도 이상에서 78%의 DPPH radical 소거능을 나타냈다. 이것은 양성대조군인 100 µg/ml의 vitamin C와 비교하였을 때 PGUE의 소거능이 10% 더 높다는 것을 확인할 수 있었다.

Lipid peroxidation에 대한 PCEE, GUEE, UMEE, PGUE의 효과

Fig. 3에서 보는 바와 같이 각 시료들을 처리했을 때 GUEE 은 유효성 있는 억제효과를 나타내지 않았으나 PGUE는 7.8 µg/ml 이상의 농도에서 지질과산화를 억제시켜 17%의 억제 효과를 나타내었으며 15.6 µg/ml의 농도에서는 양성대조군으로 사용된 1,000 µg/ml의 vitamin E와 유사한 20%의 지질과산화를 억제시켰다.

Reducing power에 대한 PGUE의 효과

Fig. 4에서 보는 바와 같이 GUEE와 PGUE의 환원력은 농도에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다. GUEE는 62.5 µg/ml 농도에서 150%의 환원력을 나타내었으며 PGUE는 62.5 µg/ml 농도에서 270%의 환원력을 나타내어 양성대조군으로 사용된 10 µg/ml의 vitamin C보다 환원력이 우수한 것으로 나타났다.

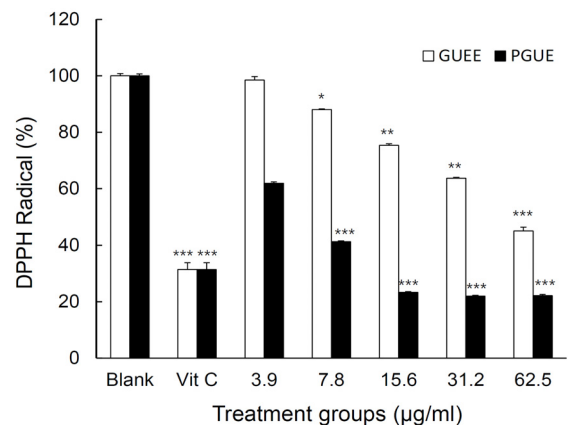


Fig. 2. DPPH radical Scavenging effect of GUEE and PGUE. Vitamin C (Vit C) at 100 µg/ml was used as a positive control. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

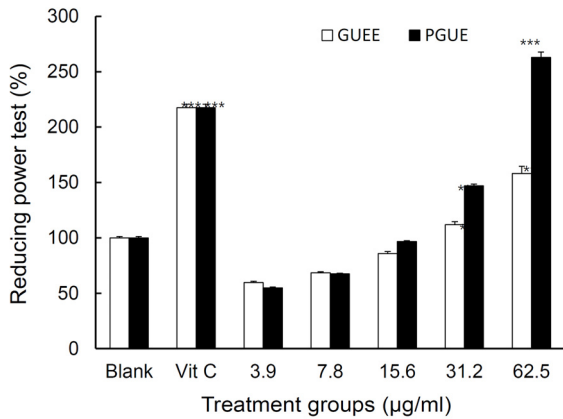


Fig. 3. Reducing power of GUEE and PGUE. Vitamin C (Vit C) at 10 µg/ml was used as a positive control. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

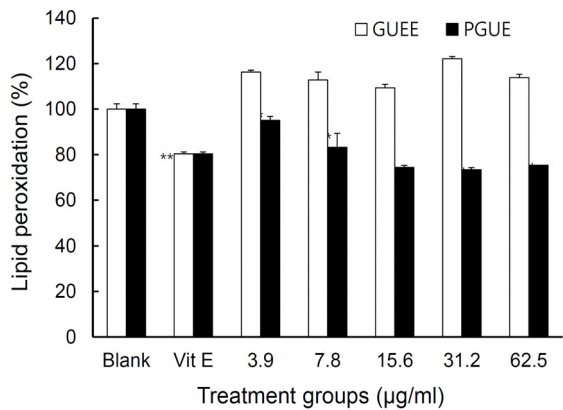


Fig. 4. Inhibitory effect of GUEE and PGUE on lipid peroxidation. Vitamin E (Vit E) at 1,000 µg/ml was used as a positive control. Lipid peroxidation was determined by TBARS. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Hydroxyl radical로부터의 DNA 산화에 대한 PGUE의 효과

B16F1 세포로부터 분리한 genomic DNA를 이용하여 F_2SO_4 와 H_2O_2 를 반응시켜 hydroxyl radical을 생성시키는 Fenton 반응에 의한 DNA의 산화적 손상에 대한 PGUE의 항산화 효과를 조사하였다. 대조군의 genomic DNA는 Fig. 5에서 보여지는 바와 같이 분해되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 PGUE를 첨가한 군에서는 농도에 따라 DNA의 산화적 손상에 대한 보호효과가 증가하였으며, 62.5 µg/ml에서는 130%의 높은 보호효과를 나타내었다.

In vitro tyrosinase 활성에 대한 PGUE의 효과

Tyrosinase는 인체내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요

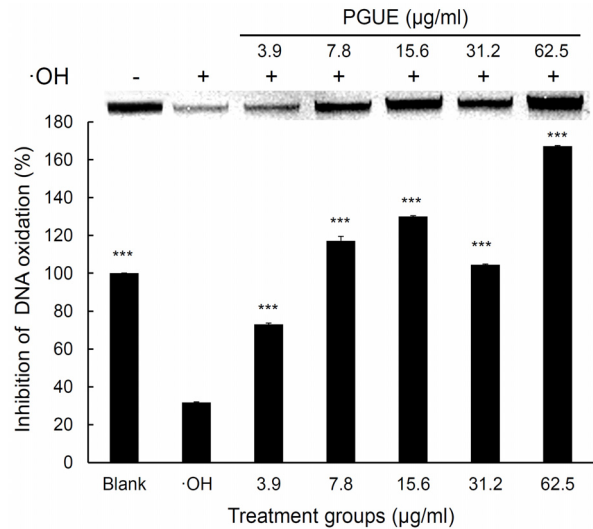


Fig. 5. Protective effect of PGUE on DNA oxidative damage induced by hydroxyl radical. Genomic DNA purified from HT1080 cells was pre-treated with PGUE for 1 hr and exposed to $OH\cdot$ using fenton reaction. After 30 min, reaction mixture containing 5 µg of DNA was electrophoresed on a 1% agarose gel for 30 min at 100 V and visualized by UV light after stained with 1 mg/ml ethidium bromide. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments (** $p < 0.001$).

한 초기 속도결정단계에 관여하는 효소로서 많은 미백 성분이 이 효소를 억제하는 작용기전을 가지고 있다. 이 시험은 *In vitro*에서 tyrosinase의 활성을 저해하는 정도를 평가할 수 있다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 PGUE의 tyrosinase 활성억제 효과는 시험농도가 증가함에 따라 비례하여 억제효능이 증가하는 것으로 나타났다. PGUE는 31.2 µg/ml농도에서 양성 대조군으로 사용된 2,000 µg/ml의 arbutin의 효능보다 tyrosinase 활성 억제효과가 더 우수한 것으로 나타났다. 따라서

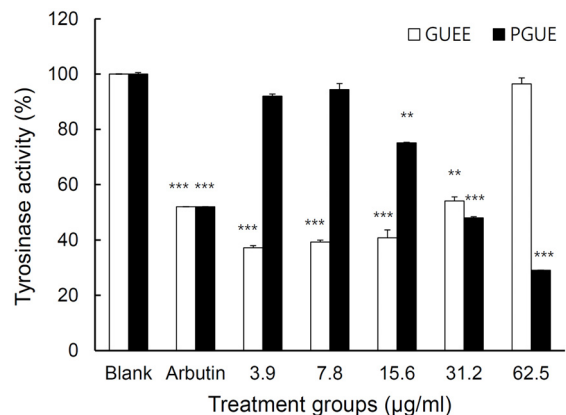


Fig. 6. Effect of GUEE and PGUE on tyrosinase activity. Arbutin 2,000 µg/ml was used as a positive control. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

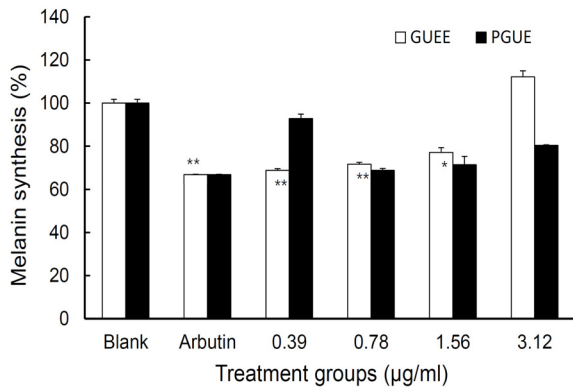


Fig. 7. Effect of GUEE and PGUE on melanin synthesis in B16F1. Arbutin 2,000 µg/ml was used as a positive control. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

PGUE는 각각 단독으로 처리한 군보다 tyrosinase 활성 억제에 대한 상승효과가 있는 것 나타났다.

B16F1에서 Melanin 합성에 대한 PGUE의 효과

DOPA 자극을 통한 melanin 생성 조절 효과를 조사하기 위해 B16F1 세포를 사용하여 melanin 함량을 측정 하였다. 세포 내에 melanin 생성량을 측정하기 위해 1N NaOH를 이용하여 세포내 melanin을 측정 한 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이, 본 실험에서 양성대조군을 사용된 2,000 µg/ml의 arbutin은 melanin 합성을 25% 억제 시켰다. PGUE의 경우 0.78 µg/ml 농도 이상에서 melanin 합성을 23% 억제 시켰다.

B16F1 세포에서 미백과 항산화 효과와 관련된 단백질의 발현에 대한 PGUE의 효과

Melanin 생성의 중요한 효소인 tyrosinase와 melanin 생성 신호 전달기전에 중요한 tyrosinase related protein-1 (TRP-1) tyrosinase related protein-2 (TRP-2)와 항산화 효소 중에서 가장 중요한 Superoxide dismutase (SOD)인 SOD-1의 단백질 발현을 조사하였다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 PGUE는 melanin 생성에 관련되어 있는 tyrosinase 발현에는 영향을 주지 않는 것으로 관찰되었다. 그러나 PGUE에 의한 항산화 효소인 SOD-1의 단백질 발현 감소는 PGUE의 항산화력에 기인된 것으로 나타났다. PGUE는 대조군에 비하여 3.12 µg/ml 농도에서 SOD-1의 발현을 감소시키며 뿐만 아니라 TRP-1의 단백질 발현은 0.39 µg/ml의 낮은 농도에서도 감소된다는 것을 확인할 수 있었다.

고 찰

색소 침착과 같은 피부 노화는 melanin 생성뿐만 아니라 자외선과 같은 외부 자극에 의해 체내에 축적되는 유해 활성산소종에 의해서도 진행된다[11]. 체내 제거기전에 의해 제거되지 못하는 유해 활성산소종은 세포질, DNA, 단백질 등에 손상을 주어 주름, 색소 침착 등을 유발한다[16]. 따라서 백복령, 감초, 유백피 추출물의 항산화 효과를 조사한 결과, DPPH radical 소거능력, 지질과산화 억제능력, 환원력 등은 눈에 띄게 뛰어나지 않았다. 하지만 백복령, 유백피, 감초 추출물의 혼합 용액은 백복령 및 감초, 유백피 단독 처리에 비해 항산화 효과

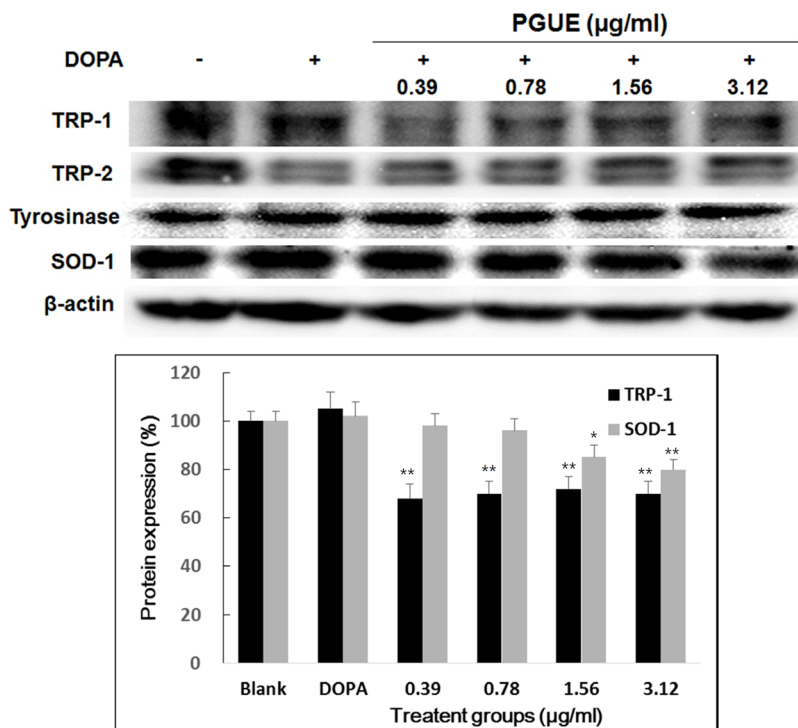


Fig. 8. Effect of PGUE on protein expressions of TRP-1, TRP-2, tyrosinase, SOD-1 in B16F1 cells. The cells were treated with PGUE at 0.39, 0.78, 1.56, and 3.12 µg/ml. Western blot analysis of cell lysates was performed using antibodies as indicated. The expression of β-actin was used as a control for normalization of target proteins. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

가 증가하는 것을 확인하였다. TBARS를 실시한 결과 각각의 단독 추출물은 눈에 띄는 산화억제능력을 나타내지 않았으나 혼합 용액의 경우 양성대조군으로 사용된 vitamin E와 유사한 지질과산화 억제능력을 보였다. 특히 DPPH radical 소거능과 환원력은 양성 대조군으로 사용된 vitamin C 보다 높은 효과를 나타내었다. 또한 OH radical에 의한 DNA 산화로부터의 보호능력을 확인한 결과 혼합용액의 농도가 증가할수록 DNA 산화를 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 OH radical를 이용한 지질과산화억제실험과 DNA oxidation에서의 OH radical로부터의 보호효과는 tyrosine을 OH radical로부터 보호하여 DOPA에서 DOPA quinone으로 산화되는 과정을 억제하여 과한 melanin 합성억제 효과를 기대할 수 있다. 이러한 결과는 B16F1 cell에 DOPA 자극하에서 백복령, 감초, 유백피의 혼합물을 처리하여 SOD-1 단백질 발현수준 조사결과와도 일치한다. 유해 활성산소 생성을 유도하는 외부의 자극 하에서 세포는 SOD-1 단백질 발현 수준을 높게 유지한다. 하지만 축적된 활성산소들과 외부자극이 효과적으로 제거되면 SOD-1의 단백질 발현은 다시 정상적인 수준으로 내려간다. 백복령, 감초, 유백피의 혼합물을 처리한 그룹의 SOD-1 단백질 발현을 확인한 결과 SOD-1의 단백질 발현이 농도에 따라 약간 낮게 조절됨을 확인할 수 있었다. 따라서 감초 단독 추출물과 백복령, 유백피, 감초 추출물 혼합용액의 미백기능 효과를 조사한 결과는 감초추출물을 단독으로 처리할 때 보다 혼합용액이 미백 기능 효과가 훨씬 뛰어나며 melanin 생성 초기 단계에 관여하는 단백질인 tyrosinase의 활성을 억제시키고 TRP-1를 유의성 있게 감소시켜 *in vitro*에서 미백 기능성 성분인 arbutin 보다 더 뛰어난 효과를 나타낸다. 또한 항산화 효과 역시 감초추출물 단독일 때는 미미하였으나 혼합용액은 vitamin C 보다도 뛰어난 효과를 나타내었다. 따라서 백복령, 유백피, 감초 추출물이 뛰어난 효과의 미백기능성 화장품으로의 개발이 기대된다. 사람의 피부색을 결정하는데 있어 멜라닌은 가장 근본적인 요인이다. 체내에서 멜라닌 합성은 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase (PKA)경로, Nitric oxide에 대한 cyclic guanosine monophosphate (cGMP)경로, protein kinase C (PKC), 그리고 p38 MAP kinase 경로와 같이 다양한 기전을 통해 이루어지며, 이 중에서도 자외선에 과도하게 노출되었을 때는 특히 cAMP/PKA 경로에 의해 멜라닌이 합성된다[1]. 과도한 멜라닌 합성은 흑색종, 검버섯, 주근깨, 기미 그리고 피부노화의 원인으로 잘 알려져 있다[3]. 일반적으로, melanin 합성 조절에 대한 연구는 tyrosine을 DOPA로 전환하는 tyrosinase의 활성조절에 초점이 맞춰져 있으며 실제로도 피부 미백제 개발에 있어서 tyrosinase의 활성억제 실험은 유용한 평가방법이 되고 있다. 감초 추출물의 tyrosinase 활성 억제 효과를 조사해본 결과, 물에 잘 녹지 않는 특성으로 인해 뿌렇게 변하여 흡광도에 영향을 주어 농도에 비례해서 증가하는 양상을 보였다. 하지만 백복령, 유백피, 감초 추출물

혼합용액의 tyrosinase 저해 효과는 뛰어났으며 양성 대조군으로 사용된 arbutin 보다 더 높은 tyrosinase 저해 효과를 나타냈다. Arbutin은 L-tyrosine과 경쟁적으로 작용하는 저해제로서 tyrosinase 활성 부위의 작용을 막아 tyrosine에서 DOPA와 DOPA quinone으로의 진행을 막는다[2]. 하지만 백복령, 유백피, 감초 추출물 혼합용액은 tyrosinase의 활성을 저해하였음에도 불구하고 arbutin과 달리 melanin 합성 저해효과는 나타나지 않았다. 이에 대해 좀 더 정확한 기전을 조사하기 위하여 쥐의 melanoma cell인 B16F1 cells에서 백복령, 유백피, 감초 추출물 혼합용액의 tyrosinase와 함께 melanin 합성 단계에서 중요히 여겨지는 tyrosinase-related protein (TRP)-2;DOPACHrome oxidase, tyrosinase-related protein (TRP)-1; DHICA oxidase의 단백질 발현[5] 조절효과를 조사하였다. 먼저 DOPA 자극 하에서 백복령 추출물을 단독으로 B16F1 cell에 처리하여 tyrosinase의 단백질 발현 수준을 조사하였다. 그 결과 tyrosinase의 단백질 발현 수준은 일정하게 나타났다. 하지만 흥미롭게도 DOPA 자극 하에서 B16F1에서는 매우 낮은 수준의 TRP-1 단백질 발현을 나타냈다. 이는 체내 melanin이 항상성 있게 유지되기 위함으로 사료된다[17]. TRP-1은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)를 산화시켜 최종적으로 melanin을 생성하는 DHICA oxidase로 melanin 생성에 있어 매우 중요한 역할을 하는 단백질 중 하나이다[18]. 백복령, 감초, 유백피의 혼합물을 B16F1 cell에 처리한 결과 대조군과 비교하였을 때 TRP-1의 발현을 감소시켰음을 확인하였다. 이는 혼합물로서 작용하는 것이 체내 melanin합성의 항상성을 더 우수하게 유지시킬 수 있다는 것을 기대할 수 있다[17]. 우리의 결과는 백복령, 유백피, 감초 추출물 혼합용액의 tyrosinase 활성 저해효과는 tyrosinase의 단백질 발현 수준과는 관계없으나 체내 melanin합성의 항상성유지 및 효소의 활성조절에 관여한다고 나타낸다.

감사의 글

본 논문은 중소기업청에서 지원하는 2013년도 산학협력 기술개발사업(No.C0149500) 및 2014학년도 동의대학교 교내 연구비에 의해 연구되었음(2014AA267).

References

1. Ballotti, R. 2000. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* **13**, 60-69.
2. Battaini, G., Monzani, E., Casella, L., Santagostini, L. and Pagliarin, R. 2000. Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. *J Biol Inorg Chem* **5**, 262-268.
3. Chang, T. S., Ding, H. Y. and Lin, H. C. 2005. Identifying 6, 7, 4'-trihydroxyisoflavone as a potent tyrosinase inhibitor. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**, 1999-2001.

4. Chen, Y. Y. and Chang, H. M. 2004. Antiproliferative and differentiating effects of polysaccharide fraction from fu-ling (*Poria cocos*) on human leukemic U937 and HL-60 cells. *Food Chem Toxicol* **42**, 759-769.
5. Del Marmol, V., Ito, S., Jackson, I., Vachtenheim, J., Berr, P., Ghanem, G., Morandini, R., Wakamatsu, K. and Huez, G. 1993. TRP-1 expression correlates with eumelanogenesis in human pigment cells in culture. *FEBS Lett* **327**, 307-310.
6. Fukai, T., Satoh, K., Nomura, T. and Sakagami, H. 2003. Preliminary evaluation of antinephritis and radical scavenging activities of glabridin from *Glycyrrhiza glabra*. *Fitoterapia* **74**, 624-629.
7. Gan, E., Haberman, H. F. and Menon, I. A. 1974. Oxidation of NADH by melanin and melanoproteins. *Biochim Biophys Acta* **370**, 62-69.
8. Griendling, K. K. and FitzGerald, G. A. 2003. Oxidative stress and cardiovascular injury part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* **108**, 1912-1916.
9. Halliwell, B. and Gutteridge, J. 1989. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* **186**, 1-85.
10. 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.
11. Hoogduijn, M., Cemeli, E., Ross, K., Anderson, D., Thody, A. and Wood, J. 2004. Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H₂O₂-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca²⁺. *Exp Cell Res* **294**, 60-67.
12. 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.
13. Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Kobayashi, T., Urabe, K., Hearing, V. J., Lozano, J. A. and Garcia-Borron, J. C. 1994. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *J Biol Chem* **269**, 17993-18000.
14. Kim, H. -M., Shin, H. -Y., Choi, I. -Y., Lee, E. -H. and Lee, E. -J. 1998. Action of *Ulmii radices* Cortex Extract on Systemic and Local Anaphylaxis in Rats. *Gen Pharmacol* **31**, 483-488.
15. Lerner, A. B. 1955. Melanin pigmentation. *Am J med* **19**, 902-924.
16. Liang, F. -Q. and Godley, B. F. 2003. Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* **76**, 397-403.
17. Michard, Q., Commo, S., Belaidi, J. P., Alleaume, A. M., Michelet, J. F., Daronnat, E., Eilstein, J., Duche, D., Marrot, L. and Bernard, B. A. 2008. TRP-2 specifically decreases WM35 cell sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **44**, 1023-1031.
18. Olivares, C., Jimenez-Cervantes, C., LOZANO, J., Solano, F. and Garcia-Borron, J. 2001. The 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *Biochem J* **354**, 131-139.
19. Oyaizu, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J nutr* **44**, 307-315.
20. Valko, M., Rhodes, C., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**, 1-40.

초록 : 미백과 항산화에 미치는 백복령, 감초, 유백피 추출 혼합물의 영향

권은정^{1†} · 박혜정^{1†} · 남 향¹ · 이수경¹ · 홍수경¹ · 김문무¹ · 이경록² · 홍 일² · 이도경² · 오영희^{1*}
(¹동의대학교 화학과, ²주아미코스메틱)

활성산소는 피부손상을 일으키는 지질, 단백질, DNA의 산화를 유발시킨다. 더욱이활성산소는 기미, 검버섯, 주근깨를 생성하는 멜라닌생성과정을 촉진시킨다. 수많은 생약재중에서, 백복령, 감초, 유백피는 각각 *parchymic acid*, *glabridin* 및 *flavonoid* 를 함유하고 있다고 보고되어 있다. 본 연구의 목적은 기능성 미백화장품을 개발하기 위하여 B16F1 세포에서 백복령, 감초, 유백피 혼합추출물(PGUE)의 항산화 및 미백효과를 조사하는 것이다. PGUE는 높은 환원력 뿐만 아니라 DPPH radical 및 지질과산화 억제효과를 나타내었다. 항산화효과 뿐만 아니라 PGUE는 양성대조군으로 사용된 *arbutin*과 비교하여 *melanogenesis*와 관련 있는 *tyrosinase* 효소활성을 크게 감소 시켰다. 더욱이 PGUE는 살아있는 *melanome*세포에서 *melanin*합성을 억제하였다. 또한 PGUE는 *superoxide dismutase-1 (SOD-1)* 및 *tyrosinase related protein-1 (TRP-1)* 단백질 발현을 억제시킨다는 것이 발견되었다. 이러한 결과들은 PGUE가 피부에 대한 항산화효과 및 미백효과를 가지고 있다는 것을 나타내어, 기능성 미백화장품의 개발을 위한 유효한 성분으로 이용되어 질 수 있다는 것을 암시하고 있다.