

## Antioxidative Activities and Whitening Effects of Ethyl Acetate Fractions from The Immature Seeds of *Abeliophyllum distichum*

Tae Won Jang and Jae Ho Park\*

Department of Medicinal Plant Science, Jungwon University, 85, Mummu-ro, Goesan-eup, Goesan-gun, Chungcheongbuk-do 28024, Korea

Received September 12, 2016 / Revised April 17, 2017 / Accepted May 16, 2017

*Abeliophyllum distichum* Nakai is deciduous shrubs of flowering plant in Oleaceae. It is important plant resources and consists of one species in the world. Also the endemic plant of *A. distichum* has been protected and designed endangered plant in Korea. For this reason, study on the immature seeds of *A. distichum* (ADS) hasn't progressed. In the present study, we evaluated the antioxidant activity and inhibitory effects on proteins and mRNA levels were related in the whitening effect in B16F10 cells. ADS was effective for reaction oxygen species (ROS). ROS causes various diseases such as aging, inflammation, cancer, and etc. Antioxidant properties were evaluated DPPH, ABTS radical scavenging activity and Reducing power. Plants were known that contained phenolic compounds were related in antioxidant activity. Phenolic compounds were phytochemicals commonly named natural polyphenols. These are secondary metabolites of plants involved in the defense against different types of stresses. In results, ADS suppressed the expression and transcription of Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, and Microphthalmia-associated transcription factor (MITF). Tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1), tyrosinase-related protein 1 (TRP-2) are known to play an important role in melanin biosynthesis. MITF regulated the expression and transcription of Tyrosinase, TRP-1, and TRP-2. In conclusion, ADS was effective in both antioxidant activities and whitening effects. Also, they were associated with the content of phenolic compounds. We suggested that ADS can be use antioxidants and skin-whitening functional cosmetics material derived from natural plant resources.

**Key words** : Antioxidant, B16F10 cells, MITF, phenolic compounds, tyrosinase

### 서 론

천연에서 유래하는 페놀류 화합물인 식물화학물질(phytochemicals)는 식물의 2차 대사산물에 의해 생성되며, 다양한 스트레스 환경, 자외선, 병원균의 침입, 척박한 토양, 온도, 가뭄 등 많은 요건과 연관되어 있다[36]. 식물화학물질은 항산화, 항암효과를 포함한 다양한 작용을 통해 인간의 건강에 유익한 도움을 준다[3]. 식물화학물질에 의한 항산화 활성은 체내에서 생성되는 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)의 소거활성과 연관이 있으며, 활성산소종은 대부분의 전자 운반 과정에서 불안정하게 환원되거나 cytokine 등 다양한 작용의 자극에 의해 생성된다. 정상적인 경우에는 체내에 존재하는 항산화 시스템에 의해 활성 산소종이 제거되지만 이 시스템의 기능이 약화되거나 문제가 발생하여 세포는 산화적 손상을 입게 된다. 활성산소는 세균을 죽이는 살균의 생체 방어 작용을 하기

도 하지만 일반적으로 생체 내에서 산화를 일으켜 질병을 초래하는 작용을 하며[29], 활성산소종에 의한 산화는 곧 노화에 직접적인 영향을 미치고 노화는 성인병 질환에 관여하게 되며 그 결과 여러 질병에 원인이 된다는 보고도 있다[27]. 세포는 활성산소에 대항하기 위한 항산화 체계를 갖고 있으나, 과도한 활성산소에 의한 산화-환원 항상성의 변화는 세포의 보호 체계의 균형을 무너뜨려, 세포는 oxidative stress에 노출되게 된다[38]. 이러한 oxidative stress로 인한 활성산소의 강한 반응성이 체내의 당, 지질, 단백질과 DNA까지도 비가역적인 변형과 파괴를 유래하여 여러 가지 질병을 유발 하는 것으로 알려져 있다[13].

피부는 진피와 표피로 구성되어 있으며, 표피는 다양한 물리적, 화학적 및 기계적 자극에 대한 방어와 체내 수분의 과도한 발산을 막는 방어 및 보호기능을 한다[6, 12, 22]. 피부에 발생하는 손상은 자외선이나 건조한 기후와 같은 환경적 요인과 더불어 스트레스, 질병과 같은 원인에 의해 악화하고 있다[39]. 또한 구조적인 변화와 생리적인 기능이 감소하는 내인성 노화와 자외선 노출에 의한 광노화에 의해 노화가 진행된다[6, 37]. 피부는 자외선에 의한 광노화가 진행되면서 피부 세포 손상에 대한 방어작용으로 멜라닌색소를 생성한다. 멜라닌은 검은색을 띠는 고분자 물질로 다양한 원인에 의해 생성 및 합성되지만, 특히 자외선에 의해 생성이 촉진되고, 피부 표피

#### \*Corresponding author

Tel : +82-43-830-8614, Fax : +82-43-830-8679

E-mail : [parkjh@jwu.ac.kr](mailto:parkjh@jwu.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.

증으로 이동하고 축적되어 피부의 색소 침착에 원인이 된다. 이러한 멜라닌의 과다생성 및 축적은 주근깨, 기미, 홍반, 노화와 피부암을 유발에 관여한다[23, 40]. 피부 색소의 형성은 자외선에 노출된 인체에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 과다하게 생성되고, 이로 인한 산화적 스트레스에서 기인한다는 메커니즘이 밝혀지면서, 이를 제거하는 항산화 물질이 멜라닌의 형성 억제에도 효과적이라는 결과가 보고되었다[8]. 특히 피부에서 활성산소종은 collagen과 elastin 등의 변형에 의한 주름생성, 멜라닌 생성 촉진 등과 더불어 피부의 노화를 가속화 한다[9, 34]. 멜라닌 생성의 촉진은 tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) 그리고 tyrosinase-related protein 2 (TRP-2)에 의해 조절된다. Tyrosinase는 수산화 반응을 촉진하여 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환하며, DOPA는 DOPA-quinone으로 전환된다. TRP-1은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)을 carboxylated indole-quinone으로 산화시킨다[14]. 또한 TRP-2는 DOPA-chrome tautomerase로 작용하여 DOPA-chrome을 DHICA로 전환한다[32]. 멜라닌 생합성에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 이 효소들과 더불어, 멜라닌세포의 성장과 분화에 중요한 전사인자인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 멜라닌 생성 작용에 중요한 인자이다[1]. MITF의 발현 증가는 tyrosinase의 발현을 유발하고 멜라닌 생성을 증가시킨다[16]. 따라서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 MITF의 활성 억제 효과는 멜라닌 생성을 저해시키고 미백효과를 증진하는데 중요한 역할을 한다[7].

미선나무(*Abeliophyllum distichum*)는 종자의 형태가 부채를 닮아 미선(尾扇)나무로 불리는 관목이며 우리나라에서 자생하는 한국 특산식물이다. 또한 세계적으로 1속 1종의 희귀식물이며, 현재 환경부는 미선나무를 보호 야생 식물로 지정하고 있다[33]. 최근 천연물 기반의 화장품 원료에 대한 관심이 증가하고 있지만, 한국특산식물인 미선나무에 대한 연구는 미비하다. 특히 미성숙 종자는 선행연구에서 성숙종자에 비해 높은 항산화활성을 나타내어 식물 자원으로서의 가치가 보다 높다고 할 수 있다. 본 연구에서 미선나무 미성숙 종자의 항산화활성 및 미백활성을 평가하여, 미백 기능성 화장품 및 항산화 식품소재로서의 가치를 평가하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구에 사용된 미선나무 미성숙 종자는 충북 괴산군 괴산읍 충민로기곡길 78 성불산자연휴양림 미선향 테마파크에서 인공증식 재배지로부터 채취 및 건조하였으며, 중원대학교 생약자원개발학과에서 동정된 시료를 사용하였다(voucher number: Park1001(ANH)). 본 실험에 사용된 Dulbecco's

modified Eagle's medium (DMEM), 10% (v/v) fetal bovine serum, penicillin/streptomycin, trypsin은 Hyclone (Laboratories Inc., Logan, UT, USA) 제품을 사용하였다. HPLC grade의 methanol, petroleum ether, ethyl acetate 및 dimethylsulfoxide (DMSO)는 SK chemicals (Seoul, Korea) 제품을 사용하였고, 나머지 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 기타 시약 및 기기는 별도 표기하였다. 모든 항체는 Santa-Cruz (Dallas, Texas, USA)의 제품을 사용하였다.

### Ethyl acetate 분획

미선나무 미성숙 종자(*Abeliophyllum distichum*)의 ethyl acetate 분획물은 분쇄한 건조시료 400 g을 80% methanol 3 l로 7일간 침지하여, Whatman filter paper (GE Healthcare Life Sciences, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, England)로 여과하였다. Methanol 추출물을 40°C 이하의 중탕에서 감압 환류 냉각장치(N-1110S, EYELA, Koishikawa Bunkyo-ku, Tokyo, Japan)로 농축한 후 분별 깔때기를 이용하여 petroleum ether, ethyl acetate 순으로 3회 용매분획하였다. 이 중 ethyl acetate 분획물을 감압 환류 냉각장치로 농축하여 실험 전까지 -27°C에 보관하였고, dimethylsulfoxide (DMSO)에 4,000 ppm으로 용해하여 시료(ADIS-EA)로 사용하였다.

항산화 활성을 나타내는 성분들은 주로 페놀성 화합물로, 에탄올이나 에틸아세테이트 등의 유기 용매 또는 수용성 에탄올 용액 등에 쉽게 용해된다. 본 실험에서는 메탄올 추출물 및 페트롤리움 에테르, 에틸아세테이트, 물 분획실험 결과 에틸아세테이트 분획물에서 항산화 활성 및 추출 수율이 효율적으로 나타나 이 분획물을 실험재료로 사용하였다.

### DPPH 라디칼 소거활성

DPPH를 이용한 전자 공여능은 Bondet 방법[5]을 참고하여 측정하였다. DPPH solution은 300  $\mu$ M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 를 515 nm에서 흡광도 값이 1.00이 되도록 ethanol을 이용하여 희석 준비하였다. 각 농도별 추출물(0.32, 1.6, 8, 40, 200  $\mu$ g/ml) 40  $\mu$ l에 DPPH solution 760  $\mu$ l를 첨가한 후 37°C에서 20분 반응시켜 UV/Visible spectrophotometer (Human Cop, Xma-3000PC, Korea) 를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

소거활성(%) =  $\{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$

### ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼 소거 활성 능력은 Van den Berg의 방법[41]을 참고하여 측정하였다. ABTS solution은 7.4 mM 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium

salt와 2.6 mM potassium persulfate를 혼합하여 24시간 ABTS radical을 형성시킨 후 증류수를 이용하여 734 nm에서 흡광도 값이 0.70이 되도록 희석하였다. 각 농도 별 추출물 40 µl에 ABTS solution 760 µl를 첨가한 후 37°C에서 20분 반응시켜 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{소거활성(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

#### 환원력

환원력은 Oyaizu의 방법[30]을 참고하여 측정하였다. 각 농도별 추출물 100 µl에 0.2 M potassium phosphate buffer (pH6.6) 250 µl과 1% potassium hexacyanoferrate (III) 250 µl을 혼합한 후, 50°C에서 20분 반응시킨 후 찬물로 냉각하여, trichloroacetic acid (TCA) 250 µl를 첨가하였다. 위 반응액을 2,000 g에서 5분간 원심 분리하여 상등액 400 µl에 증류수 400 µl와 0.10% ferric chloride 16 µl를 첨가하여 혼합한 후, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 총 페놀 함량 분석

총 페놀 함량은 Folin-Denis 방법[2]을 참고하여 측정하였다. 추출물 50 µl와 증류수 950 µl, folin (folin-ciocalteu 시약) 500 µl를 혼합한 후, 20% sodium carbonate 2.5 ml를 넣어 40분간 실온에서 반응시켰다. 반응 후 상등액을 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선에서 양을 환산하였다. 표준품은 tannic acid를 사용하였고, 정량 직선방정식을 사용하였다.

#### 비타민 C 함량

비타민 C 함량은 Jagota and Dani의 방법[18]을 참고하여 측정하였다. 건조시료 0.5 g에 증류수 10 ml 첨가 후, 4500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 추출하였다. 추출물을 여과한 후, 여과액 200 µl와 trichloroacetic acid (TCA) 800 µl를 혼합하여 3,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 상등액 500 µl, 증류수 1.5 ml와 Folin (folin-ciocalteu 시약) 200 µl을 혼합하여 10분간 상온에서 반응시킨 후, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선에서 양을 환산하였다. 표준품은 L-ascorbic acid를 사용하였고, 정량 직선방정식을 사용하였다.

#### 세포배양

본 연구에 사용된 멜라노마(B16F10) 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 실험하였다. 세포는 1% penicillin/streptomycin (Hyclone, Logan, UT, USA) 및 10% fetal bovine serum (Hyclone,

Logan, UT, USA)이 포함된 DMEM (Hyclone, Logan, UT, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 배양하였다.

#### Western blot

B16 F10 세포를 6-well plate에 1.0×10<sup>5</sup> cell/well로 분주하여, 24시간 배양한 후 농도 별로 시료 및 멜라닌 생성을 촉진하기 위해 α-MSH를 처리하였다. 시료 처리 48시간 후 PBS로 두 번 세척한 후, protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 포함한 RIPA buffer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)로 용해한 후 얼음에서 30분간 정치시켰다. 세포 용해액을 4°C, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하고, 상층액은 Bradford 시약(Bio-Rad, Hercules, California, USA)을 이용하여 단백질 정량을 실시하였다. 세포 용해액은 2× Lamilae buffer와 혼합하여 95°C에서 5분간 가열 후 각 20 µg 단백질량에 해당하는 시료를 10% SDS-PAGE에서 전기영동하여 분리하였다. 전기영동된 단백질은 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) 막에 옮겨 상온에서 1시간 동안 blocking (5% skim milk in TBST) 하였다. 1차 항체를 1:2,000으로 희석하여 4°C에서 overnight 처리하였다. 이후 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고, 2차 항체 1:1,000으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 이후 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA)로 반응하였다. 단백질 밴드는 FluorChem E (Cell biosciences, Santa Clara, CA, USA)로 촬영하여 확인하였다.

#### Total RNA 추출 및 cDNA 합성

B16 F10 세포를 6-well plate에 1.0×10<sup>5</sup> cell/well로 분주하여, 24시간 배양한 후 농도 별로 시료 및 멜라닌 생성을 촉진하기 위해 α-MSH를 처리했다. 시료 처리 48시간 후 PBS로 두 번 세척한 후, NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Plus (Macherey-Nagel, Duren, Germany)를 이용하여 total RNA를 얻었다. 모든 과정은 4°C에서 진행되었으며, Quantus fluorometer RNA system (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 정량하였으며, cDNA 합성을 위해 1 µg의 total RNA를 사용하여 ReverTra Ace -α- (Toyobo, Osaka, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

#### RT-PCR

cDNA상의 타겟 유전자를 증폭시키기 위하여 Quick Taq<sup>®</sup> HS DyeMix (Toyobo, Osaka, Japan) 및 primer와 합성한 cDNA를 반응시켜 PCR을 수행하였다. PCR의 조건은 다음과 같다. 94°C로 2분간 denaturation을 시킨 후, 94°C에서 30초간 denaturation 후 55°C에서 30초간 annealing, 68°C에서 1분간 extension을 35 cycle 반복하였고 마지막 단계로 72°C에서 10분간 extension하였다. House keeping gene으로 β-actin을 사

용하였고 2% agarose gel (Affymetrix, Cleveland, OH, USA) 로 UV 상에서 band를 확인하였다. 각 primer의 서열은 다음과 같다. Tyrosinase forward 5'-GAGAAGCGAGTCTTGAT TAG-3', reverse 5'-TGGTGCTTCATGGGCAAATC-3', TRP-1 forward 5'-GCTGCAGGAGCCTTCTTTCTC-3', reverse 5'-AAGACGCTGCACTGCTGGTCT-3', TRP-2 forward 5'-CCT GTCTCCAGAAGTTTG-3', reverse 5'-CGTCTGAAAAG AGTGGAGG-3', MITF forward 5'-AGCGTGTATTTTCCCC ACAG-3', reverse 5'-TAGCTCCTAATGCGGTCGT-3',  $\beta$ -actin forward 5'-ATGAGAAGGAGATCACTGC-3', reverse 5'-CTGCGCAAGTTAGTTTTGT-3'.

**통계학적 분석**

모든 실험 결과는 3번 이상 수행하였으며, 통계분석은 SPSS 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences, International Business Machines Corp. Armonk, NY, USA)을 이용하였고, 실험에 대한 분산분석은 t-test를 실시하여  $p < 0.05$  수준에서 각 실험의 유의성을 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**DPPH 라디칼 소거활성**

항산화 활성의 기작은 유리기와 반응하는 것으로, 유리기 소거작용은 활성라디칼(free radical)에 전자를 공여하여 식물 중의 항산화 효과나 인체에서 노화를 억제하는 척도로 사용된다. DPPH 라디칼 소거 활성은 수소 공여체의 활성을 측정하는 방법으로 페놀성 화합물, 방향족 아민류 및 아스코르빈산 등에 의해 수소나 전자를 받아 환원되어 보라색이 탈색 되는 원리를 이용한 방법이며, 항산화 물질을 탐색하기 위해 많이 이용되고 있다[35]. ADS의 DPPH 라디칼 소거활성을 평가한

결과(Table 1), 각 추출물 농도 200, 40, 8, 1.6 0.32  $\mu\text{g}/\text{m}$ 에서 각각  $86.0 \pm 12.18\%$ ,  $77.60 \pm 2.04\%$ ,  $41.52 \pm 0.55\%$ ,  $10.81 \pm 3.99\%$ ,  $2.80 \pm 1.41\%$ 의 소거활성을 나타냈으며, 농도의존적으로 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 강력한 항산화제로 알려진 L-ascorbic acid [31]와 비교하여  $\text{IC}_{50}$  (inhibitory concentration)값은  $12.31 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 L-ascorbic acid의  $5.08 \mu\text{g}/\text{ml}$ 보다 낮은 활성을 나타냈다. 이를 통해 비교적 상당한 DPPH 라디칼 소거활성을 확인하였다.

**ABTS 라디칼 소거활성**

ABTS 라디칼 소거활성은 라디칼을 생성하는 ABTS가 존재 시, hydrogen peroxide와 metmyoglobin의 빠른 항산화 반응에 의해 myoglobin radical을 감소시키는 기전으로 소거활성을 나타낸다. ADS의 ABTS 라디칼 소거활성을 평가한 결과 (Table 2), 각 추출물 농도 200, 40, 8, 1.6 0.32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각  $98.64 \pm 0.72\%$ ,  $97.03 \pm 0.69\%$ ,  $90.98 \pm 0.27\%$ ,  $23.40 \pm 0.78\%$ ,  $2.62 \pm 2.62\%$ 의 활성을 나타냈으며, 농도의존적으로 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 특히 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서  $90.98 \pm 0.27\%$ 의 활성은 L-ascorbic acid ( $23.85 \pm 1.93\%$ )와 비교하여 우수한 라디칼 소거능을 보였다. L-ascorbic acid ( $10.49 \mu\text{g}/\text{ml}$ )와 비교하여  $\text{IC}_{50}$ 값은  $3.74 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 매우 뛰어난 소거활성을 보였다.

**환원력 평가**

환원력 평가는 시료의 환원력에 따라 노란색의 실험 용액이 청색 또는 녹색으로 전환되는 원리를 이용한 것이다. 항산화제와 같은 환원제는  $\text{Fe}^{3+}$ /ferricyanide complex를 환원시켜 ferrous 형태로 전환하고, Perl's Prussian blue의 형성을 700 nm에서 측정하는 원리이다[11]. 환원력은 L-ascorbic acid (100.00)와 상대적인 값으로 비교하여 표현하였다. ADS의 환원력을 평가한 결과(Table 3), 각 추출물 농도 200, 40, 8, 1.6

Table 1. DPPH radical scavenging activity (%) of ethyl acetate fractions from the immature seeds of *Abeliophyllum distichum* (ADS)

Sample	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )					$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
	200	40	8	1.6	0.32	
ADS	$86.0 \pm 12.18\%$ *	$77.60 \pm 2.04\%$ *	$41.52 \pm 0.55\%$ *	$10.81 \pm 3.99\%$ *	$2.80 \pm 1.41\%$	12.31
LAA	$93.47 \pm 0.06\%$	$88.23 \pm 0.05\%$	$76.51 \pm 0.11\%$	$20.88 \pm 0.05\%$	$5.32 \pm 0.49\%$	5.08

Results are expressed as mean  $\pm$  SD for each group from three independent experiments. Comparing with same concentration of L-ascorbic acid respectively ( $p < 0.05$ ). LAA : L-ascorbic acid.

Table 2. ABTS radical scavenging activity (%) of ethyl acetate fractions from the immature seeds of *Abeliophyllum distichum* (ADS)

Sample	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )					$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
	200	40	8	1.6	0.32	
ADS	$98.64 \pm 0.72\%$	$97.03 \pm 0.69\%$ *	$90.98 \pm 0.27\%$ *	$23.40 \pm 0.78\%$ *	$2.62 \pm 2.62\%$	3.74
LAA	$96.32 \pm 2.89\%$	$93.04 \pm 1.29\%$	$23.85 \pm 1.93\%$	$9.28 \pm 3.20\%$	$5.14 \pm 2.74\%$	10.49

Results are expressed as mean  $\pm$  SD for each group from three independent experiments. Comparing with same concentration of L-ascorbic acid respectively ( $p < 0.05$ ). LAA : L-ascorbic acid.

Table 3. Reducing Power of ethyl acetate fractions from the immature seeds of *Abeliophyllum distichum* (ADS)

Sample	Concentration (µg/ml) (relative value of L-ascorbic acid as control)					
	Control 200	200	40	8	1.6	0.32
ADS	100±0.00	85.26±0.00*	69.76±0.01*	38.01±0.01*	2.95±0.00*	1.40±0.00*

Results are expressed as mean ± SD for each group from three independent experiments. Comparing with same concentration of L-ascorbic acid respectively (\*p<0.05). LAA : L-ascorbic acid.

Table 4. Total phenolic content and Vitamin C content of ethyl acetate fractions from the immature seeds of *Abeliophyllum distichum* (ADS)

Sample	Total phenolic content (mg/g TAE)	Vitamin C content (mg/g)
ADIS-EA	17.03±0.30	5.35±0.19

Results are expressed as mean ± SD for each group from three independent experiments

0.32 µg/ml에서 각각 85.26±0.00, 69.76±0.01, 38.01±0.01, 2.95±0.00, 1.40±0.00의 활성을 나타냈으며, 농도의존적으로 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 200 µg/ml에서 L-ascorbic acid (100.00)에 비해 85.26±0.00의 환원력을 나타냈다. 이 결과를 통해 L-ascorbic acid에 준하는 환원력을 확인하였다.

**총 페놀 화합물 함량 및 비타민 C 함량 분석**

식물에서 확인되는 페놀류 화합물의 항산화 활성은 그 구조적인 특징과 관련성이 높는데, 이들은 금속 킬레이트제, 환원제, 활성산소의 소거제, 사슬전단 항산화제(chain breaking antioxidants)등으로서의 역할에 기인하는 것으로 알려져 있다. 총 페놀성 화합물은 다양한 구조와 분자량을 가진 2차 대

사산물로서 항산화 활성과 항암 및 항균 작용을 하는 생리활성물질로 알려져 있으며[10], 보고 된 대부분의 천연 항산화제 등의 생리활성 물질은 식물 유래로서 주로 폴리페놀 화합물인 것으로 알려져 있다[17]. ADS의 총 페놀 화합물 함량 및 비타민 C 함량을 분석한 결과(Table 4), 총 페놀 화합물은 17.03±0.30 mg/g으로 나타났다. 총 페놀 함량은 농도 별로 희석한 tannic acid의 표준곡선을 통해 함량을 계산하였다. 비타민 C 함량은 5.35±0.19 mg/g으로 나타났다. 페놀류 화합물은 한 분자 내에 2개 이상의 페놀성 수산기가 효소 단백질과 같은 거대 분자들과 결합하는 성질이 있기 때문에 항산화 작용, 항암 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다[20].

**Tyrosinase 단백질 발현 및 mRNA 수준 억제 활성**

피부 미백 관련된 단백질인 멜라닌은 합성과정 중 흑갈색의 유멜라닌(eumelanin)과 적갈색계통의 페오멜라닌(pheomelanin)으로 나뉜다. 멜라닌 생합성에서 tyrosinase의 작용을 통해 일어나는 초기 반응[15]은 기질인 tyrosin의 hydroxyl 작용기의 결합을 통해 DOPA로 전환하는 기작[21]으로 알려져 있으며, tyrosinase의 활성 저해는 멜라닌 생성과 합성에서 중요하다. ADS의 tyrosinase 단백질 발현을 분석한 결과(Fig. 1A), 무처리군에 비해 α-MSH처리군에서 급격한 발현양 증가를 보

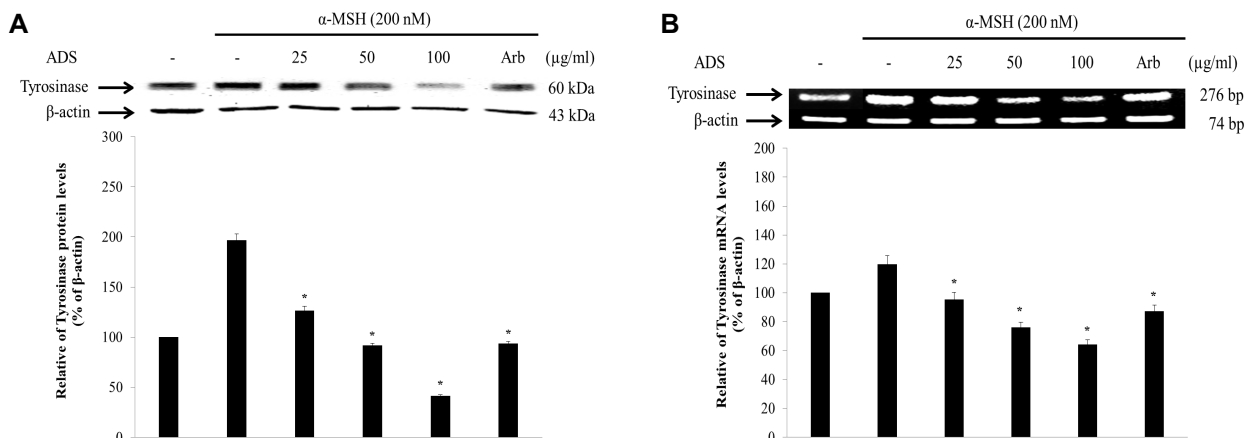


Fig. 1. Inhibitory effects on the tyrosinase expression of ethyl acetate fractions from the immature seeds of *Abeliophyllum distichum* (ADS). B16F10 cells were treated ADS (25, 50, 100 µg/ml) and arbutin 100 µg/ml with α-MSH for 48 hr. Total cell lysates were subjected to western blotting (A) or RT-PCR (B) to measure the levels of tyrosinase. Relative ratio was quantified after normalization to β-actin. Each value was then expressed to non-treated (NT) control group, which was set as 100%. Results are expressed as mean ± SD for each group from three independent experiments. \*, p<0.05 versus ADD-untreated group.

였으며, ADS 농도 별(25, 50, 100 µg/ml) 처리군에서 126.37±4.36%, 91.57±2.05%, 41.46±1.20%의 tyrosinase 단백질 발현 억제활성을 나타냈다. Tyrosinase의 mRNA 수준을 분석한 결과 (Fig. 1B), 무처리군에 비해 α-MSH처리군에서 mRNA의 증가를 보였으며 ADS 농도 별(25, 50, 100 µg/ml) 처리군에서 95.42±4.72%, 76.01±3.76%, 64.35±3.18%의 tyrosinase mRNA 저해 활성을 나타냈다.

**TRP-1, TRP-2 단백질 발현 및 mRNA 수준 억제 활성**

TRP-1과 TRP-2는 유멜라닌 합성에서 많은 관여를 하며 [32], MITF는 멜라닌 형성에 관여하는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등의 M-box sequences에 결합하여 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다[4].

ADS처리에 의한 TRP-1 단백질 발현을 분석한 결과(Fig. 2A), 무처리군에 비해 α-MSH처리군에서 급격한 발현양 증가를 보였으며, ADS 농도 별(25, 50, 100 µg/ml) 처리군에서 73.99±3.27%, 61.08±2.70%, 34.86±1.54%의 TRP-1 단백질 발현 억제활성을 나타냈다. TRP-1의 mRNA 수준을 분석한 결과 (Fig. 2B), 무처리군에 비해 α-MSH처리군에서 mRNA의 증가를 보였으며 ADS 농도 별(25, 50, 100 µg/ml) 처리군에서 148.68±6.08%, 142.34±5.82%, 111.25±7.14%의 TRP-1 저해 활성을 나타냈다.

ADS처리에 의한 TRP-2 단백질 발현을 분석한 결과(Fig. 3A), 무처리군에 비해 α-MSH처리군에서 급격한 발현양 증가를 보였으며, ADS 농도 별(25, 50, 100 µg/ml) 처리군에서 143.95±4.02%, 123.93±3.46%, 62.09±1.74%의 TRP-2 단백질 발현 억제활성을 나타냈다. TRP-2의 mRNA 수준을 분석한 결과 (Fig. 3B), 무처리군에 비해 α-MSH처리군에서 mRNA의 증가

를 보였으며 ADS 처리 농도 25 µg/ml에서는 193.10±8.58%로 α-MSH처리군의 190.61±8.47%과 유의적인 차이를 보이지 않았지만 50, 100 µg/ml ADS 처리군에서는 151.74±3.98%, 151.05±6.71%의 TRP-2 저해 활성을 나타냈다.

**MITF 단백질 발현 및 mRNA 수준 억제 활성**

Extracellular signal-regulated kinase (ERK), Akt 및 p38과 같은 phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs)는 MITF의 전사에 영향을 미치고, tyrosinase 및 tyrosinase 관련 단백질의 합성을 야기한다. 따라서 MITF의 전사 및 발현 조절은 멜라닌 생합성과 관련된 인자들과 연관성이 크다고 할 수 있다[19, 24, 26]. ADIS-EA의 microphthalmia-associated transcription factor (MITF) 단백질 발현을 분석한 결과(Fig. 4A), ADS처리에 의한 MITF 단백질 발현을 분석한 결과(Fig. 4A), 무처리군에 비해 α-MSH처리군에서 급격한 발현양 증가를 보였으며, ADS 농도 별(25, 50, 100 µg/ml) 처리군에서 234.46±6.46%, 221.03±82.13%, 82.13±2.26%의 MITF 단백질 발현 억제활성을 나타냈다. MITF의 mRNA 수준을 분석한 결과(Fig. 4B), 무처리군에 비해 α-MSH처리군에서 mRNA의 증가를 보였으며 ADS 농도 별(25, 50, 100 µg/ml) 처리군에서 70.53±3.57%, 32.92±1.67%, 27.37±1.39%의 MITF 저해 활성을 나타냈다.

Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 및 MITF의 활성 억제는 미백 활성과 연관성이 깊으며, 이를 위해 arbutin과 ascorbic acid와 같은 미백 원료를 화장품에 첨가하여 기능성을 증대시키고 있다[42]. 식물이 포함하고 있는 flavonoid와 isoflavonoid 화합물의 다양한 약리 작용[28]은 자유라디칼의 생성을 지연시키고 활성을 억제하는 항산화 효과[25]와 연관이 있다. 그러므

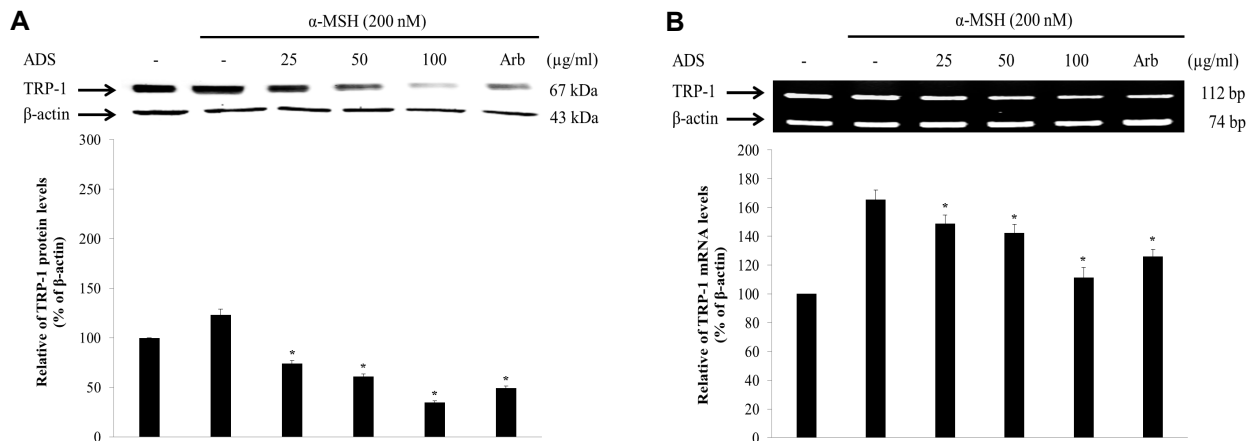


Fig. 2. Inhibitory effects on the tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) expression of ethyl acetate fractions from the immature seeds of *Abeliophyllum distichum* (ADS). B16F10 cells were treated ADS (25, 50, 100 µg/ml) and arbutin 100 µg/ml with α-MSH for 48 hr. Total cell lysates were subjected to western blotting (A) or RT-PCR (B) to measure the levels of TRP-1. Relative ratio was quantified after normalization to β-actin. Each value was then expressed to non-treated (NT) control group, which was set as 100%. Results are expressed as mean ± SD for each group from three independent experiments. \*, p<0.05 versus ADD-untreated group.

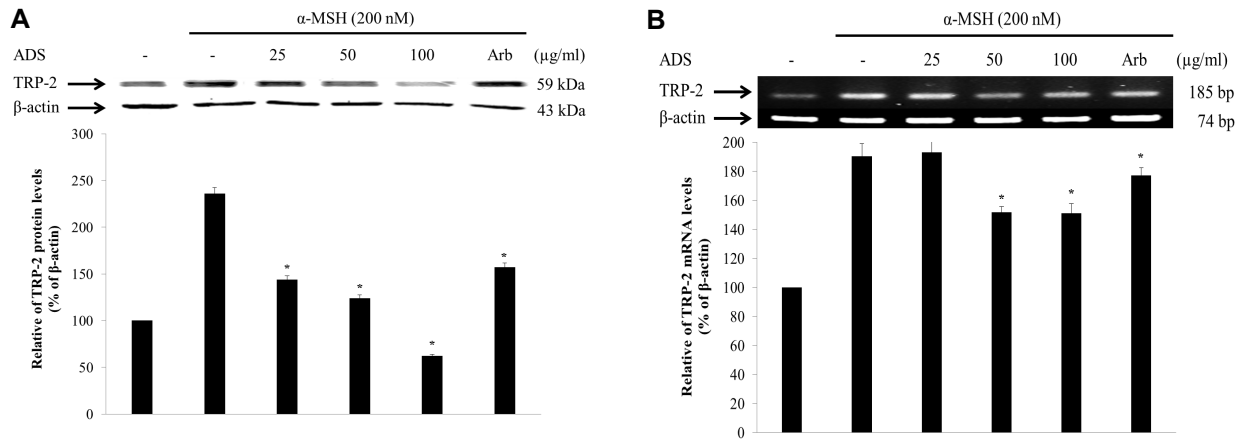


Fig. 3. Inhibitory effects on the tyrosinase-related protein 2 (TRP-2) expression of ethyl acetate fractions from the immature seeds of *Abeliophyllum distichum* (ADS). B16F10 cells were treated ADS (25, 50, 100 µg/ml) and arbutin 100 µg/ml with α-MSH for 48 hr. Total cell lysates were subjected to western blotting (A) or RT-PCR (B) to measure the levels of TRP-2. Relative ratio was quantified after normalization to β-actin. Each value was then expressed to non-treated (NT) control group, which was set as 100%. Results are expressed as mean ± SD for each group from three independent experiments. \*,  $p < 0.05$  versus ADD-untreated group.

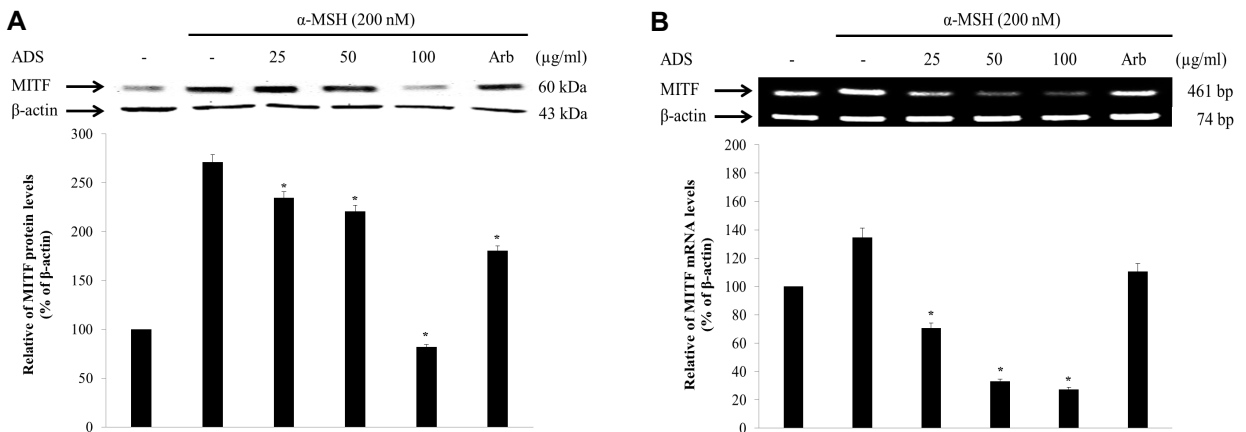


Fig. 4. Inhibitory effects on the microphthalmia-associated transcription factor (MITF) expression of ethyl acetate fractions from the immature seeds of *Abeliophyllum distichum* (ADS). B16F10 cells were treated ADS (25, 50, 100 µg/ml) and arbutin 100 µg/ml with α-MSH for 48 hr. Total cell lysates were subjected to Western blotting (A) or RT-PCR (B) to measure the levels of MITF. Relative ratio was quantified after normalization to β-actin. Each value was then expressed to non-treated (NT) control group, which was set as 100%. Results are expressed as mean ± SD for each group from three independent experiments. \*,  $p < 0.05$  versus ADD-untreated group.

로 ADS의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 및 MITF의 활성 억제 활성은 페놀류 화합물의 항산화 활성과 연관이 깊다고 보인다. 결론적으로, 본 연구를 통해 ADS의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 및 MITF 단백질 및 mRNA 수준의 저해 효과를 확인하였으며, 이러한 저해효과는 식물의 2차 대사산물인 페놀류 화합물의 항산화 활성과 깊은 상관관계가 있다고 보인다. 결론적으로, 천연 식물 추출물에서 유래한 화장품 및 의약제제의 원료로 높은 가치를 기대할 수 있을 것이다.

### 감사의 글

이 논문은 2016년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2016R1D1A1B03934869).

### References

1. Ahn, J. H., Jin, S. H. and Kang, H. Y. 2008. LPS induces melanogenesis through p38 MAPK activation in human melanocytes. *Arch. Dermatol. Res.* **300**, 325-329.

2. AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. pp.8-35, 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.
3. Asensi, M., Ortega, A., Mena, S., Feddi, F. and Estrela, J. M. 2011. Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **48**, 197-216.
4. Bentley, N. J., Eisen, T., Goding, C. R. 1994. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7996-8006.
5. Bondet, V., Brand-Williams, W. and Berset, C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *LWT - Food Sci. Technol.* **30**, 609-615.
6. Chung, J. H., Hanft, V. N. and Kang, S. 2003. Aging and photoaging. *J. Am. Acad. Dermatol.* **49**, 690-697.
7. Curto, E. V., Kwong, C., Hermersdörfer, H., Glatt, H., Santis, C., Virador, V., Hearing, V. J. and Dooley, T. P. 1999. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: *in vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 663-672.
8. Eberlein-Konig, B., Placzek, M. and Przybilla, B. 1998. Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and d- $\alpha$ -tocopherol (vitamin E). *J. Am. Dermatol.* **38**, 45-48.
9. Fantone, J. C. and Ward, P. A. 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am. J. Pathol.* **107**, 395-418.
10. Ferreres, F., Gomes, D., Valentano, P., Goncalves, R., Pio, R., Chagas, E. A., Seabra, R. and Andrade, P. 2009. Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: Variation of phenolics and antioxidative potential. *Food Chem.* **114**, 1109-1127.
11. Ferreira, I. C., Baptista, P., Vilas-Boas, M. and Barros, L. 2007. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chem.* **100**, 1511-1516.
12. Fisher, G. J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S. and Voorhees, J. J. 2002. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch. Dermatol.* **138**, 1462-1470.
13. Harold, E. S., Darrell, E. A., Evan, I. F. and John, A. M. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem.* **18**, 567-579.
14. Hearing, V. J. and Jimenez, M. 1987. Mammalian tyrosinase - the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.* **19**, 1141-1147.
15. Hearing, V. J. and Tsukamoto, K. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* **5**, 2902-2909.
16. Hemesath, T. J., Price, E. R., Takemoto, C., Badalian, T. and Fisher, D. E. 1998. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-kit signalling in melanocytes. *Nature* **391**, 298-301.
17. Huang, M. T., Ho, S. T. and Lee, C. Y. 1992. Phenolic compounds in food and their effects on health(II). pp.54-71, Antioxidants and cancer prevention. Am. Chem. Soc. Washington DC. USA.
18. Jagota, S. K. and Dani, H. M. 1982. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. *Anal. Biochem.* **127**, 178-182.
19. Jang, J. Y., Kim, H. N., Kim, Y. R., Choi, Y. H., Kim, B. W., Shin H. K. and Choi, B. T. 2012. Aqueous fraction from *Cuscuta japonica* seed suppresses melanin synthesis through inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in B16F10 cells. *J. Ethnopharmacol.* **141**, 338-344.
20. Jeong, H. J., Park, S. B., Kim, S. and Kim, H. K. 2007. Total polyphenol content and antioxidative activity of wild grape (*Vitis coignetiae*) extracts depending on ethanol concentrations. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 1491-1496.
21. 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 (TRP-1). *J. Biol. Chem.* **269**, 17993-18000.
22. Kim, B., Choi, Y. E. and Kim, H. S. 2014. Eruca sativa and its flavonoid components, quercetin and isorhamnetin, improve skin barrier function by activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\alpha$  and suppression of inflammatory cytokines. *Phytother. Res.* **28**, 1359-1366.
23. Kim, E. C., Ahn, S. Y., Hong, E. S., Li, G. H., Kim, E. K. and Row, K. H. 2005. Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect. *Kor. J. Ind. Eng. Chem.* **16**, 348-353.
24. Lee, M. S., Yoon, H. D., Kim, J. I., Choi, J. S., Byun, D. S. and Kim, H. R. 2012. Dioxinohydroeckol inhibits melanin synthesis through PI3K/Akt signalling pathway in  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone-treated B16F10 cells. *Exp. Dermatol.* **21**, 471-473.
25. Lee, S. Y., Hwang, E. J., Kim, G. H., Choi, Y. B., Lim, C. Y. and Kim, S. M. 2005. Antifungal and antioxidant activities of extracts from leaves and flowers of *Camellia japonica* L. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* **13**, 93-100.
26. Lin, Y. S., Chuang, M. T., Chen, C. H., Chien, M. Y. and Hou, W. C. 2012. Nicotinic acid hydroxamate down-regulated the melanin synthesis and tyrosinase activity through activating the MEK/ERK and AKT/GSK3 $\beta$  signaling pathways. *J. Agric. Food. Chem.* **60**, 4859-4864.
27. Marnett, L. 2000. Oxiradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**, 361-370.
28. Masaki, H., Sakaki, S., Atsumi, T. and Sakurai, H. 1995. Active oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 162-166.
29. Maxwell, S. R. 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* **49**, 345-361.
30. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* **44**, 307-315.
31. Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S. K. and Levine, M. 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.* **22**, 18-35.
32. Park, H. Y., Kosmadaki, M., Yaar, M. and Gilchrist, B. A.



2009. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell. Mol. Life. Sci.* **66**, 1493-1506.
33. Park, J. H. 2011. Antioxidant activities and inhibitory effect on oxidative DNA damage of extracts from *Abeliophylli distichi* folium. *Kor. J. Herbology* **26**, 95-99.
34. Park, S. N. 2003. Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **35**, 510-518.
35. Que, F., Mao, L. and Pan, X. 2006. Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Res. Int.* **39**, 581-587.
36. Quideau, S., Defieux, D., Douat-Casassus, C. and Pouysegu, L. 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50**, 586-621.
37. Seo, J. Y., Cho, K. H., Eun, H. C. and Chung, J. H. 2001. Skin aging from phenotype to mechanism. *Kor. J. Investig. Dermatol.* **8**, 187-194.
38. Shosuke, K., Yusuke, H. and Shinji, O. 2001. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res.* **488**, 65-76.
39. Sohn, E. S., Kim, S. W., Kang, J. S. and Lee, S. P. 2004. Technology trend and patent information analysis of cosmetic materials derived from natural products. *Appl. Chem.* **8**, 466-469.
40. Svobodova, A., Psotova, J. and Walterova, D. 2003. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage a review. *Biomed. Pap.* **147**, 137-145.
41. Van den Berg, R., Haenen, G. R., Van den Berg, H. and Bast, A. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* **66**, 511-517.
42. Yang, E. S., Hwang, J. S., Choi, H. C., Hong, R. H. and Kang, S. M. 2008. The effect of genistein on melanin synthesis and *in vivo* whitening. *Kor. J. Soc. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 72-81.

## 초록 : 미선나무 미성숙 종자의 항산화 및 미백 활성

장태원 · 박재호\*

(중원대학교 생약자원개발학과)

미선나무 미성숙 종자는 물푸레나무과의 관목으로 전세계적으로 1속 1종의 중요한 식물자원이다. 대한민국에서는 미선나무 자생지를 보존하고 멸종위기식물로 보호하고 있다. 이러한 이유로 미선나무 미성숙 종자에 대한 연구는 미비하다. 본 연구에서 미선나무 미성숙 종자의 항산화 활성과 미백 관련 단백질인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF의 단백질 발현 및 mRNA 수준의 발현 억제 활성을 확인하였다. 미선나무 미성숙 종자는 활성산소종에 효과가 뛰어났으며, 활성산소종은 노화, 염증, 암 등 다양한 질병을 야기시킨다. 항산화 활성은 DPPH, ABTS 라디칼 소거활성 및 환원력을 평가하였으며, 이러한 활성은 페놀류 화합물과 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 페놀류 화합물은 천연 폴리페놀이라고 불리는 파이토케미칼로서 다양한 환경적 요인에 의한 식물 방어 기작의 일환으로 생성되는 2차 대사산물이다. 페놀류 화합물은 노화, 항암을 포함한 많은 인간의 건강에 긍정적인 영향을 준다고 알려져 있다. 미선나무 미성숙 종자는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질 및 mRNA를 조절하였으며, 이러한 요인은 멜라닌 생합성에 중요한 역할을 한다. 또한 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 단백질 및 mRNA를 억제하였다. MITF는 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현과 전사에 연관된 인자로 알려져 있다. 미선나무 미성숙 종자의 미백활성, 페놀류 화합물, 항산화 활성 사이의 연관관계를 확인하였으며, 결론적으로 미선나무 미성숙 종자는 천연 식물 자원으로부터 얻을 수 있는 항산화제 및 피부 미백을 위한 기능성 화장품 원료로 사용될 수 있다.