

모링가 추출물에 대한 화장품약리활성 검증

김 소 라 · 유 단 희 · 염 현 지 · 오 민 정 · 이 진 영[†]

호서대학교 화장품생명공학부
(2018년 4월 17일 접수, 2018년 5월 28일 수정, 2018년 7월 11일 채택)

Studies on Cosmeceutical Activity of Extracts of *Moringa oleifera* Extract

So Ra Kim, Dan Hee Yoo, Hyeon Ji Yeom, Min Jeong Oh, and Jin Young Lee[†]

Department of Cosmetic and Biotechnology, Hoseo University, Chungnam 31499, Korea
(Received April 17, 2018; Revised May 28, 2018; Accepted July 11; 2018)

요 약: 본 연구에서는 화장품 천연소재로서 모링가 에탄올 추출물의 이용 가능성을 확인하였다. Tyrosinase와 elastase 저해활성을 측정할 결과 각각 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 47%, 39%의 활성을 나타내었다. 모링가 에탄올 추출물에 대한 collagenase 저해활성을 측정할 결과 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 31%의 활성을 확인하였다. 세포 생존율을 MTT 분석법으로 확인한 결과 대식 세포(Raw264.7)와 멜라노마 세포(B16F10)의 농도 구간이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때 각각 94.2%, 94.8%의 생존율을 보였다. 항염증 활성을 확인하기 위해 griess 분석에 의하여 대식 세포에 lipopolysaccharides (LPS)를 처리하였다. 그 결과 모링가 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 NO 발현 억제효과를 확인하였다. Western blot을 통한 단백질 발현 억제 효과를 측정하기 위해 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 모링가 에탄올 추출물과 β -actin을 사용하였다. 그 결과, iNOS, COX-2, MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 단백질 발현양이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 85.8%, 57.5%, 80.7%, 30%, 29.9%, 23.6%로 억제됨을 확인하였다. 따라서 미백 및 항염증 효과가 우수함을 확인하였고, 모링가 에탄올 추출물의 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다.

Abstract: The purpose of this study was to investigate the role of the *Moringa oleifera* (*M. oleifera*) extract as a cosmetic additive. The tyrosinase and elastase inhibitory effects showed 47% and 39% at 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration, respectively. Also, the collagenase inhibition effect was 31% at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. A cell viability test, measured on macrophage cell (RAW 264.7) and melanoma cell (B16F10) by ethanol extract of *M. oleifera*, showed 94.2% and 94.8% at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration, respectively. In order to confirm anti-inflammatory activity, we examined the inhibitory effects on the production of lipopolysaccharides (LPS)-induced NO in RAW 264.7 cells by Griess assay. As a result, the *M. oleifera* extract showed a concentration-dependent inhibition of NO production. The protein expression inhibitory effects of *M. oleifera* extract were measured by western blot at 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration and the β -actin. Results showed that the expression inhibition rates of the iNOS, COX-2, MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase protein were decreased by 85.8%, 57.5%, 80.7%, 30%, 29.9%, 23.6% at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration, respectively. It was concluded that *M. oleifera* extracts had the anti-inflammatory and whitening effects and thus could be applied for cosmetics as a natural ingredient.

Keywords: *Moringa oleifera*, anti-inflammatory, whitening

[†] 주 저자 (e-mail: jylee@hoseo.edu)
call: 041)540-9552

1. 서 론

최근 웰빙·자연주의 열풍이 확산되면서 친환경적인 제품에 대한 인식이 증대되어 소비자들의 화장품 선택이 까다로워지고 있다. 소비자의 다양한 사회활동과 정보활동으로 생활양식과 가치관이 변화되면서 원하는 화장품의 역할과 기능도 기존과는 다르게 변화되고 있다. 이처럼 현재의 화장품은 미적추구 뿐만 아니라 물론 피부보호와 노화예방, 신체 및 정신적 건강까지도 추구하는 패러다임을 양산하고 있다[1,2].

도시의 산업화로 인해 의·식·주의 생활수준이 향상됨에 있어 이에 따른 환경오염, 유전적 영향 등에 의해 발생하는 생물학적, 화학적 유해인자들에 대한 노출 또한 심화되고 있다. 이로 인해 다양한 연령층에서 면역조절 이상으로 유발되는 염증 반응, 알러지 및 아토피 질환과 같은 염증성 질환의 발생이 크게 증가하고 있다[3]. 염증 반응은 체내에 여러 가지 형태의 이물질이 외부로부터 침입하였거나 조직이 감염되어 생긴 물리적, 화학적 자극에 의한 피부 손상을 방어하기 위해 반응하는 현상을 말한다. 하지만 이러한 생체 방어에 이상이 생겨 과잉반응이 일어나게 되면 염증 조직 주위에 있는 정상 조직을 손상시켜 염증 질환을 일으킨다[4]. 염증 반응이 일어날 때 자극에 의해 생성되는 염증 매개체로 tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β 등과 같은 염증 유도 사이토카인(proinflammatory cytokines)의 과잉 발현을 유도하고[5], inducible nitric synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 암호화하는 유전자의 발현을 자극시켜 prostaglandin E2 (PEG2) 및 nitric oxide (NO) 등의 염증 인자를 생성시킨다[6]. 일반적인 NO는 박테리아를 사멸시킬 뿐만 아니라 종양을 제거하는 중요한 역할을 하지만 NO의 과잉형성은 염증을 유발해 유전자를 변형시키거나 신경과 조직의 손상을 일으킨다[7].

피부노화는 크게 내인성 노화(intrinsic aging)와 외인성 노화(extrinsic aging)로 구분된다. 내인성 노화에는 해부학적 요인과 유전적 요인이 있고, 외인성 노화에는 환경적 요인으로 광노화가 주된 요인이다. 자외선은 표피와 진피를 통과하며, 교원질(collagen) 및 탄력섬유(elastin fiber) 등의 기질 단백질이 손상되어 피부내의 탄력섬유의 변성과 교원질 양의 부족에 따라 주름이 유발되고 기미, 주근깨 및 검버섯이 증가하는 현

상을 보인다[8-10]. 피부에는 강한 자외선으로부터 신체를 지켜주기 위한 멜라닌을 형성하게 되는데 이는 자외선이 체내로 흡수되는 것을 막아 인체 내부가 손상되는 것을 지켜주고 자외선으로 인한 피부조직의 유전자변형을 막아 피부암의 발생을 억제한다. 멜라닌은 인체의 피부색을 결정하는 색소로서 내형질세망(endoplasmic reticulum)이나 골지체(golgi apparatus)에서 생성되는데, 피부 표피층의 melanocyte에서 생성되며 크게 짙은색의 eumelanin과 옅은색의 pheomelanin으로 구성되어있다. 이러한 멜라닌의 전구물질은 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase라는 효소에 의해 산화과정을 거치게 되고, DOPA, DOPA quinone으로 전환된 후 eumelanin과 pheomelanin으로 합성된다[11,12]. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 endothelin-1 (ET-1), ET-3, α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), cKit ligand에 의해 자극되어 생성이 증가될 수 있으며, 활성화 또는 인산화되어 핵안으로 들어가 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MC1R 등의 색소 형성을 담당하는 여러 유전자의 발현을 촉진하여 색소를 형성하게 된다[13].

본 연구 소재인 모링가(*Moringa oleifera*)는 모링가과(moringaceae)에 속하며 높이가 5~10 m에 이르는 나무로 아시아, 아라비아, 아프리카 등에서 재배된다. 열대 및 아열대 기후 지역에 분포하는 다년생 식물로 14종이 있는 것으로 알려져 있으며, 가장 많이 재배되고 있는 것은 drum stick으로 불리는 *M. oleifera*종이다[14]. 모링가의 꽃, 뿌리, 잎, 씨, 열매에는 다른 식물들에 비해 비타민, 아미노산, 플라보노이드 등과 같은 phytochemical이 풍부하다고 알려져 있다. 모링가의 다양한 부위들 중 잎은 단백질, β -카로틴, 칼슘, 비타민 C 등이 풍부해 항산화제로 이용되며, 염증 및 감염성 질환을 포함한 다양한 질환의 치료에 민간요법으로 사용되고 있다[15,16]. 모링가잎 추출물의 항당뇨, 알코올 대사 및 간 보호 활성에 대한 연구[17], 모링가 종자 복합물의 아토피 피부염 개선 식품소재로써 활용에 관한 연구[18]를 통해 기능성 식품으로의 가능성을 보였으며, 각질형성세포에서의 염증발현에 대한 부위별 모링가 추출물의 억제효과가 있다는 연구[19]에서도 모링가의 뿌리의 항노화, 항염증의 효과에 대한 선행연구가 진행되어져 왔다.

이에 본 연구는 다양한 약리성분과 효능, 효과를 가지고 있는 모링가 추출물을 이용하여 B16F10 melanoma

세포 및 RAW 264.7 세포에서의 독성 및 항염증, *in vitro* 미백활성을 검증하여 기능성 화장품 소재로서의 응용 가능성을 살펴보고자 한다.

2. 실험방법

2.1. 시료 추출

본 실험에 사용된 모링가는 전라남도 장흥군 일대에 서 잎 부분을 채취하여 사용하였다. 모링가를 건조시킨 후 파쇄하여 70% 에탄올을 시료 중량의 10배로 가하여 상온에서 24 h 침지하였다. 상등액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출을 하였으며, 시료 추출물은 여과지(Whatman No.2)를 사용하여 여과하였다. EYELA evaporator로 감압농축을 실시하여 용매를 완전히 제거한 후 동결 건조하여 -20 °C에서 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

2.2. 기기 및 시약

주름 억제 활성측정에 사용된 N-succinyl-L-ala-ala-p-nitroanilide, elastase, collagenase, 4-phenylazobenzyl oxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg 등의 시약은 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였고, 미백 활성 억제 측정에 사용된 시약은 L-3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (L-DOPA), mushroom tyrosinase 등은 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였다.

항염증 측정 실험에 사용된 시약인 lipopolysaccharide (LPS), griess reagent 등은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 단백질 발현 효과 측정에 사용된 1차 항체인 β -actin, iNOS, COX-2, MITF, TRP-1, TRP-2와 2차 항체인 anti-mouse, anti-rabbit, anti-goat은 Santacruz (CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포 배양 및 세포 독성 측정에 사용된 세포주로 대식세포인 RAW 264.7과 마우스 흑색 세포종인 B16F10는 ATCC (USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양을 위해 dulbecco's modified eagle medium (DMEM), penicillin/streptomycin, trypsin, phosphate buffered saline (PBS), fetal bovine serum (FBS)은 thermo scientific hyclone (USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 측정에 사용된 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 BioShop (Canada)에서 구입하여 사용하였으며, 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma (St.

Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

실험에는 vortex (Scientific Industries, INC, USA), autoclave (JS Research Inc, Korea), freeze drier (ILShin BioBase Co. Korea), microplate reader (Tecan, Austria), pH meter (Mettler-Toledo AG, Switzerland), rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), CO₂ incubator (Vision Scientific, Korea), microscope (Olympus, Japan), micro centrifuge (gyrozen, Korea), digital shaker (Deihan Scientific, Korea), UV/VIS spectrophotometer (Hitachi, Japan), centrifuge (Hanil Science Industrial Co. Korea), Mini-Protean tetra cell (Bio-Rad, USA), Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, USA), Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM System (Davinch-K Co, Korea)의 기기를 사용하였다.

2.3. Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법[20]에 따라 실험을 진행하였다. 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 80 μ L에 10 mM L-DOPA (Sigma, USA)를 녹인 기질 액 40 μ L와 시료용액 40 μ L의 혼합액에 200 U/mL mushroom tyrosinase (Sigma, USA) 40 μ L를 첨가하여 37 °C에서 10 min간 반응시킨다. 반응 후 생성된 DOPA chrome을 492 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{효소활성 저해(\%)} = (1 - \text{시료첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

2.4. Elastase 저해활성 측정

Elastase 저해활성 측정은 Cannell 등의 방법[21]에 따라 실험을 진행하였다. 기질로 N-succinyl-(L-Ala)₃-p-nitroanilide (Sigma, USA)를 사용하여 37 °C에서 30 min간 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 445 nm에서 측정하였다. 시험용액을 일정 농도가 되도록 희석한 후 40 μ L씩 96-well plate에 취하고, 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (2.5 U/mL) 40 μ L를 가한다. 기질은 50 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 N-succinyl-(L-ala)₃-p-nitroanilide (0.5 mg/mL)을 80 μ L 첨가하여 30 min간 반응시킨 후 p-nitroanilide의 생성량을 445 nm에서 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의

흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{효소활성 저해(\%)} = (1 - \text{시료첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

2.5. Collagenase 저해활성 측정

Collagenase 저해활성 측정은 Wünsch E와 Heindrich HG의 방법[22]에 따라 실험을 진행하였다. 반응구는 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.5)에 4 mM CaCl₂를 첨가하여, 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/mL) (Sigma, USA)를 녹인 기질 액 125 μ L와 시료용액 50 μ L의 혼합액에 collagenase (0.2 mg/mL) (Sigma, USA) 75 μ L를 첨가하여 실온에서 20 min간 방치한다. 그 후 6% citric acid 250 μ L를 넣어 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5 mL를 첨가하여 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. Collagenase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{효소활성 저해(\%)} = (1 - \text{시료첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

2.6. 세포주 및 세포 배양

본 실험에 이용한 대식세포인 RAW 264.7과 멜라노마세포인 B16F10의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37 °C의 온도와 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

2.7. MTT Assay에 의한 세포 독성 측정

MTT assays는 Carmichael의 방법[23]에 따라 실험을 진행하였다. 대식세포(RAW 264.7), 멜라노마세포(B16F10) 96-well plate에 1×10^5 cells/well을 180 μ L씩 분주하고, 시료를 농도별로 조절하여 20 μ L 첨가한 후 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24 h 배양하였다. 여기에 2.5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액을 40 μ L 첨가, 4 h 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 100 μ L를 가하여 실온에서 10 min간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포독성(\%)} = (1 - \text{시료첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

2.8. Nitric Oxide (NO) 생성 억제 활성 측정

RAW 264.7 cell로부터 생성된 NO의 양은 Green 등의 방법[24]에 따라 실험을 진행하였다. Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. 6-well plate에 RAW 264.7 cell을 2×10^5 cell/mL로 분주한 후 37 °C CO₂ incubator에서 24 h 배양한다. 이후 1X PBS로 2번 세척한 후 lipopolysaccharide (LPS) 20 μ g/mL를 normal을 제외하고 처리한 후 2 h 이후 농도별로 조절한 시료용액을 처리한다. 24 h 배양한 후 상등액을 얻어 동량의 griess 시약을 첨가하여 96-well plate에서 10 min 반응시킨 후 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. NO 억제 활성 측정은 시료 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{NO억제능(\%)} = (1 - \text{시료첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100$$

2.9. Western Blot을 통한 단백질의 발현 측정

염증인자인 iNOS, COX-2와 미백인자인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 인자들의 활성을 알아보기 위해 cell line (RAW 264.7, B16F10)을 100 mm tissue culture dish에 cell seeding 후 24 h 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 RAW 264.7세포에는 LPS를 1 μ g/mL의 농도로 2 h 처리하여 준 후 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24-48 h 배양한 후 PBS로 2번 세척해주었다. 또한 B16F10세포에는 배지를 제거한 후 α -MSH (100 nM)과 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24-48 h 배양한 후 PBS로 2회 세척한다. Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 mL에 complete mini 1 tab를 가한 100 μ L로 용해한 후 4 °C, 13,200 rpm에서 20 min간 원심 분리한 후 원심 분리하여 얻은 상층액을 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하였다. 20 μ L의 단백질을 10% SDS-PAGE상에서 전기영동 하여 분리한 후 분리된 단백질은 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮겨 blocking buffer (5% skim milk in TBST)을 제조하여 실온에서 1 h blocking을 실시하였다. 1차 항체를 희석하여 4 °C에서 over night 후 다시 10 min 간격으로 tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3회 세

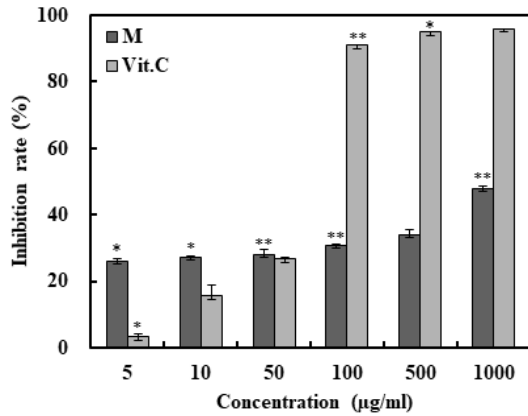


Figure 1. Inhibition rate of extracts from *M. oleifera* on tyrosinase. Each values represents mean ± SD of three individual experiments (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). M : *M. oleifera* extracted with 70% ethanol., Vit. C: ascorbic acid.

척한다. 2차 항체를 1:1,000로 희석하여 실온에서 2 h 반응한 후 3회 세척하여 Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM 기기를 사용해 밴드를 확인하였다.

2.10. 통계측정

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 결과 통계처리는 SPSS 10.0 (Evanston, IL, USA) software를 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(analysis of variance ANOVA)을 한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Turkey's HSD test에 의해 유의성을 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Tyrosinase 활성 억제

Tyrosinase는 melanin 생성에서 가장 중요한 역할을 하는 효소로서 아미노산 중 하나인 tyrosin을 산화시켜 L-3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (L-DOPA)을 생성한 후 다시 L-DOPA를 산화시켜 DOPA-quinone을 생성한다. 이렇게 생산된 DOPA-quinone은 자연 산화과정 및 TRP-1, TRP-2에 의하여 melanin을 형성한다. Melanin의 생성량은 tyrosinase에 의하여 생성되는 DOPA-quinone의 양에 비례하여 tyrosinase 활성저해 실험은 피부 미백제 개발에 있어 유용한 평가법이라 할 수 있다[25]. 모링가 에탄올 추출물의 tyrosinase 저해활성 측정 결과 추출물의 농도가 증가함에 따라 억제활성이 증가하는

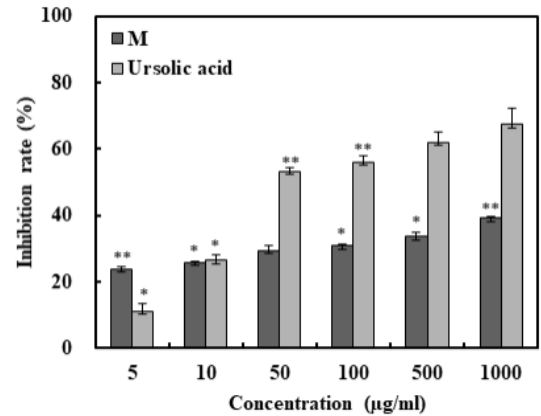


Figure 2. Inhibition rate of extracts from *M. oleifera* on elastase. Each values represents mean ± SD of three individual experiments (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). M : *M. oleifera* extracted with 70% ethanol, Ursolic acid

것을 확인할 수 있었고 1,000 µg/mL에서 47%의 효과를 나타내었다(Figure 1).

3.2. Elastase 활성 억제

Elastase는 진피 내의 피부 탄력을 유지하는 단백질로써 체내의 elastin을 분해하는 백혈구 과립 효소 중의 하나이다. 자외선 또는 피부 기질 단백질 분해효소로 인하여 elastin이 분해되고, collagen과의 그물망 구조가 붕괴되며 활성이 높아져 조직 파괴의 직접적인 원인으로 주름 및 피부 탄력성 손실 등을 유발한다. 이러한 비특이적 가수분해 효소인 elastase의 활성을 저해시킴으로써 피부의 주름 생성을 억제할 수 있다[26]. 모링가 에탄올 추출물의 elastase 저해활성 측정 결과 농도가 증가함에 따라 억제활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었고 100 µg/mL에서 30.8%의 억제 활성을 나타내었다(Figure 2).

3.3. Collagenase 활성 억제

콜라겐은 세포외 기질을 이루는 기질 단백질 중 하나로, 주로 피부의 섬유아세포에서 생성된다. 피부의 결합조직에는 collagen, elastin, fibrillin, fibronectin, integrin 등의 세포외 기질 단백질이 존재하는데, 그중 진피층의 90%를 차지하는 것은 콜라겐이다[27]. 콜라겐의 주된 기능에는 피부의 기계적 견고성, 세포 접착의 지탱, 세포 분할과 분화의 유도, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력 등이 알려져 있으며, 나이가 들어감

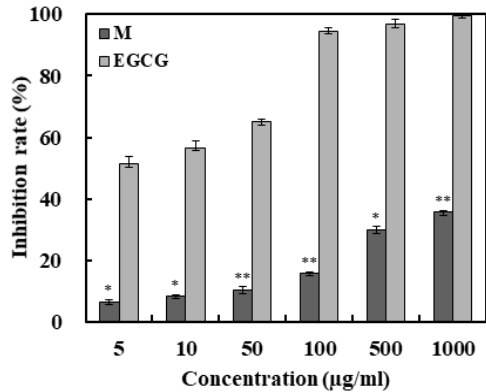


Figure 3. Inhibition rate of extracts from *M. oleifera* on collagenase. Each values represents mean ± SD of three individual experiments (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). M : *M. oleifera* extracted with 70% ethanol, EGCG : epigallocatechin-3-gallate.

에 따라 콜라겐이 감소하는 것과 더불어 자외선으로 인한 MMPs의 활성 증가로 인하여 피부의 주름생성을 촉진시킨다[28-31]. 모링가 에탄올 추출물의 collagenase 저해활성을 측정한 결과 농도가 증가함에 따라 collagenase 억제제를 확인할 수 있었고 500 µg/mL의 농도에서 31%의 활성을 나타내었다(Figure 3).

3.4. MTT 분석법을 이용한 세포 생존율

MTT assay는 세포 생존율을 측정하는 방법이다. 탈 수소 효소작용으로 생성된 담황색 기질인 MTT tetrazolium이 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan을 생성시킨 후 미토콘드리아의 호흡연쇄에 의해 환원시키는 효소능력을 이용하여 죽은 세포에는 반응하지 않는 MTT formazan의 생성량을 측정하는 검사법이다[32].

모링가 에탄올 추출물에 의한 대식세포(RAW 264.7)와 멜라노마세포(B16F10)에서의 생존율을 MTT assay에 의해 확인하였다. 모링가 에탄올 추출물은 RAW 264.7 세포의 100 µg/mL의 농도에서 94.2%의 세포 생존율을 나타내었고(Figure 4). B16F10 세포의 100 µg/mL의 농도에서도 94.8%의 세포 생존율을 나타내었다(Figure 5). 이는 비교군인 Vit.C와 유사한 결과이다. 따라서 본 연구에서 RAW 264.7 세포와 B16F10 세포의 단백질 발현인자 측정을 확인하기 위해서 생존율이 100%에 가까운 농도인 25, 50, 100 µg/mL의 농도에서 실험을 진행하였다.

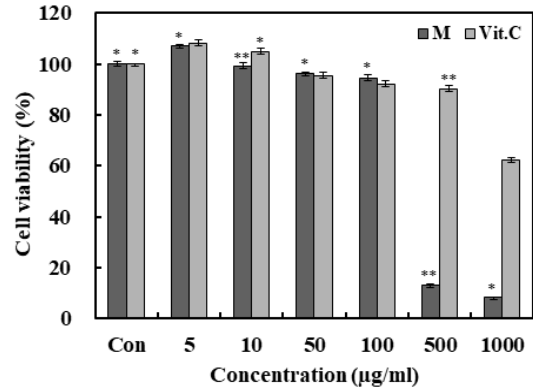


Figure 4. Cell viability of extracts from *M. oleifera* on macrophage cell (RAW 264.7). RAW 264.7 cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing 10% FBS, were treated with various concentrations of *M. oleifera* for 24 h and cell viability was measured by MTT reagent. Each values represents mean ± SD of three individual experiments (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). M : *M. oleifera* extracted with 70% ethanol, Vit. C: ascorbic acid.

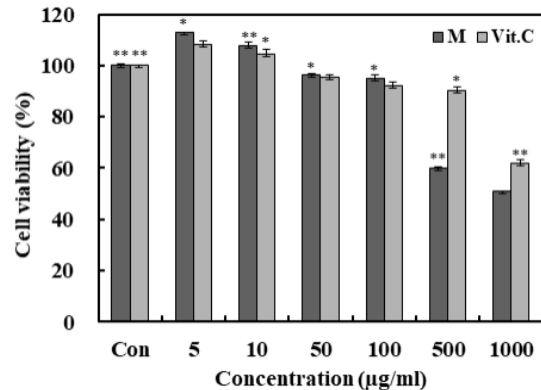


Figure 5. Cell viability of extracts from *M. oleifera* on melanoma cell (B16F10). B16F10 cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing 10% FBS, were treated with various concentrations of *M. oleifera* for 24 h and cell viability was measured by MTT reagent. Each values represents mean ± SD of three individual experiments (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). M : *M. oleifera* extracted with 70% ethanol/.

3.5. Nitric Oxide (NO) 활성 억제

Nitric oxide는 혈관 확장 등의 생체 신호를 전달하는 물질 중 하나로써 염증 반응에서도 중요한 인자로서 작용한다. 염증반응에서 NO는 iNOS에 의하여 생성된

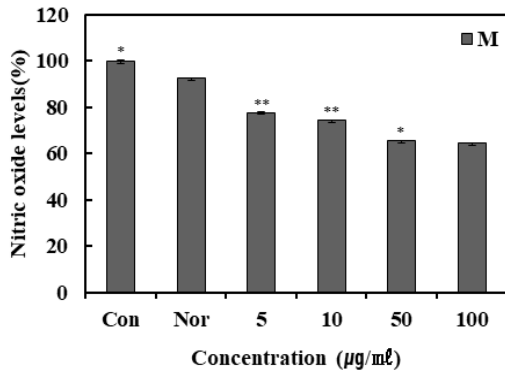


Figure 6. Inhibition rate of extract from *M. oleifera* on nitric oxide. RAW 264.7 cells were incubated with 1 µg/mL of LPS for 2 h and then treated with various concentrations (5, 10, 50 and 100 µg/mL) of extract from *M. oleifera* for 24 h. Data are represented as means ± SD (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). M : *M. oleifera* extracted with 70% ethanol.

다. NO 합성 효소에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 적은 양의 NO는 살균작용을 하거나 종양을 공격하지만, 고농도의 NO 생성은 림프구의 증식을 억제하고 정상 세포에 손상을 일으켜 염증 반응을 심화시켜 세포 자연사를 초래하는 것으로 알려져 있다[33-36]. NO assay는 macrophage에 LPS를 처리하여 자극시킨 후 추출물을 처리하여 NO의 생성 억제를 확인하는 실험이다.

모링가 에탄올 추출물에 대한 NO 저해활성을 측정 한 결과(Figure 6), LPS 처리군은 LPS 무처리군에 비해 높은 NO 발현량을 나타내었으며 모링가 추출물의 농도가 증가함에 따라 NO 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 특히 100 µg/mL의 농도에서 64.6%의 저해율을 나타내었으며, 모링가 추출물이 염증발현 억제에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

3.6. 대식세포(RAW 264.7)에서의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향

염증 반응은 세균 감염이나 화학적, 물리적 자극 등에 의하여 손상된 조직을 복구하기 위한 방어체제로, 염증반응에 의하여 다양한 면역세포가 모이게 된다. 그중 macrophage는 활성산소나 자외선 등의 자극에 활성화 되어 NO, prostaglandin E₂ (PGE₂), cytokines 등의 염증 매개 물질을 생성한다. iNOS는 macrophage에서 생성되는 효소로서 자외선이나 LPS 등의 외부자극을

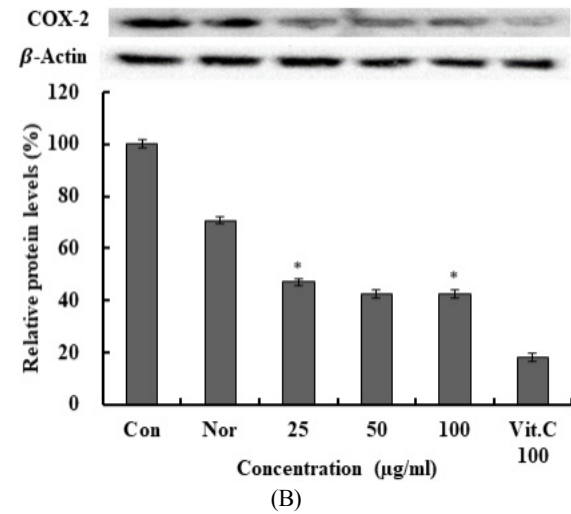
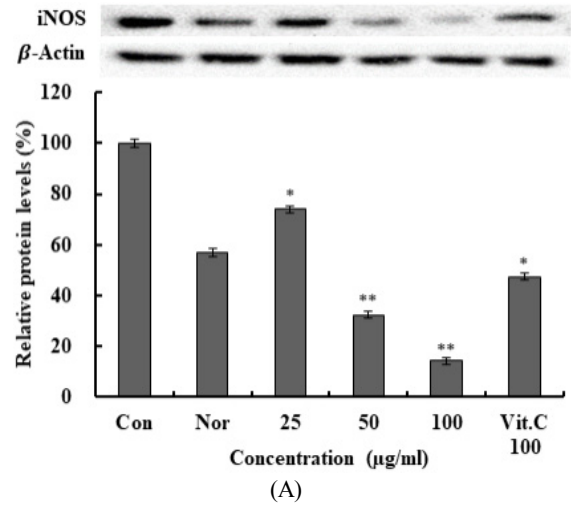


Figure 7. iNOS (A), COX-2 (B) proteins expression rate of *M. oleifera* extracts on macrophage cell (RAW 264.7). After RAW 264.7 cells (1×10^6 cells) were started in serum free medium for 1 h the cells were treated 25, 50 and 100 µg/mL of extracts from *M. oleifera* for 24 h. Con: control, in RAW 264.7 cells treated with LPS, Nor: normal, in RAW 264.7 cells not treated with LPS. Results are means ± S.D. of triplicate data (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

받았을 때 발현되어 nitric oxide를 생성하며, COX-2 또한 외부 자극에 반응하여 PGE₂를 생성하여 혈관확장, 발열 등의 반응을 유도한다[37-41]. 이러한 염증유발인자인 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 억제 효과를 측정하기 위해 western blot을 진행하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 β-actin을 사용하였다. RAW

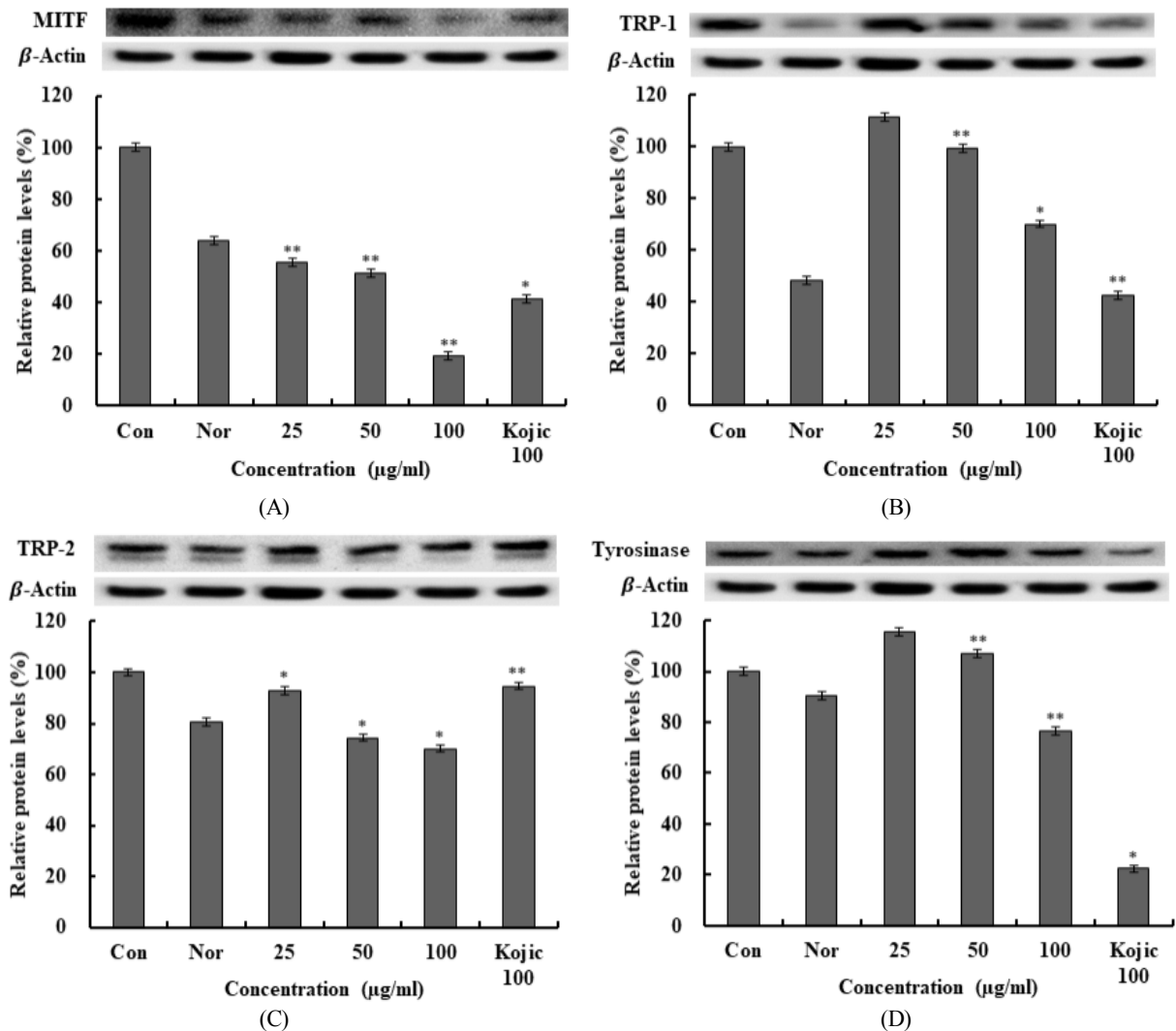


Figure 8. MITF (A), TRP-1 (B), TRP-2 (C), Tyrosinase (D) proteins expression rate of extract from *M. oleifera* on melanoma cell (B16F10). B16F10 cells were incubated for 24 h in DMEM medium containing 10% FBS were treated with various concentrations of *M. oleifera* for 24 h and then total protein was isolated. MITF protein level was determined by western blot. Con: control, in B16F10 cells treated with α -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α -MSH. Each values represents mean \pm SD of three individual experiments (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

264.7 세포에 모링가 에탄올 추출물을 25, 50, 100 μ g/mL의 농도별로 처리한 후 control은 LPS를 처리하여 과발현시키고, normal 부분에는 LPS를 처리하지 않는 구간으로 설정하였다. iNOS와 COX-2의 단백질의 발현은 대조군인 Vit.C와 비교하였을 때 iNOS가 100 μ g/mL의 농도에서 85.8%의 우수한 단백질 발현 억제를 보였고, COX-2는 Vit.C와 비교하였을 때 유의한 결과를 나타내었다(Figure 7).

3.7. 멜라노마세포(B16F10)에서의 MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase 단백질 발현에 미치는 영향

멜라닌 합성유전자 발현은 다양하고 복잡한 기전에 의해 조절된다. 피부 표피층에 있는 melanocyte와 keratinocyte의 상호작용이 매우 중요한데, keratinocyte에서 분비되는 다양한 물질이 멜라닌 합성 유전자 발현을 조절하게 된다[42].

따라서 미백 소재개발에서는 멜라닌 합성유전자 발현을 전체적으로 조절하는 MITF 발현 저해나 al-

pha-MSH/ACTH 수용체인 MC1R의 활성이나 발현을 억제하는 기전이 중요하며, 단백질 발현과 연관성이 있는지 보기 위해 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase 항체를 이용한 western blot으로 관련 단백질 발현양을 확인하였다(Figure 8). B16F10 mouse melanoma cell에 모링가 에탄올 추출물을 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도별로 처리한 후 control은 α -MSH를 처리하여 멜라닌을 과발현시키고, normal 부분에는 α -MSH를 처리하지 않는 구간으로 설정하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 β -actin을 사용하였다. MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase 단백질의 발현은 농도가 높아질수록 단백질 발현양이 억제되어 대조군과 유의한 결과를 나타내었고, 그중 MITF에서는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 80.7%의 단백질 발현 억제효과를 보여 58.7%의 단백질 발현 억제효과를 보인 대조군 kojic acid와 비교하였을 때 우수한 억제능을 확인할 수 있었다.

4. 결론

화장품 산업은 시대가 변화하면서 미백, 주름개선에서 한걸음 나아가 검증된 기능성 성분을 통해 피부 질환 치료를 돕는 제품을 요구하고 있으며, 식물유래의 천연 성분을 이용한 화장품 소재 개발의 중요성이 커지고 있다. 모링가(*M. oleifera*)는 모링가의 꽃, 뿌리, 씨, 잎, 열매에는 다른 식물들에 비해 비타민, 플라보노이드, 아미노산 등과 같은 phytochemical이 풍부한 것으로 알려져 있으며, 단백질과 비타민이 풍부해 영양가가 높고, 의학적으로 과혈당증과 항염증, 항암 등 다양한 약리작용을 가지고 있다[14,15]. 모링가의 다양한 부위들 중 잎은 β -카로틴, 단백질, 비타민 C, 칼슘 등이 풍부해 항산화제로 이용되며[16], 피부염증이나 피부 상처 치유에 효과[17] 등이 보고되면서 모링가 잎의 우수성이 밝혀진바 있다.

따라서 본 연구에서는 의학적으로도 많은 효능·효과를 가지고 있다고 알려진 모링가를 화장품 천연소재로서의 이용 가능성을 확인하였다. 모링가 에탄올 추출물의 미백 효과를 측정하기 위해 tyrosinase 저해 활성 측정 결과 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 47%의 효과를 나타내었으며 농도가 증가함에 따라 억제활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 elastase 저해활성 측정 결과

1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 39%의 효과를 나타내었다. 모링가 에탄올 추출물에 대한 collagenase 저해활성을 측정한 결과 농도의존적으로 저해 활성이 증가하였으며, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 에서 31%의 효과를 확인할 수 있었다. 세포 생존율을 MTT 분석법을 통해 확인한 결과 대식세포(RAW 264.7)와 멜라노마세포(B16F10)의 농도 구간이 100 $\mu\text{g/mL}$ 일 때 각각 94.2%, 94.8%의 생존율을 보였으며, 이에 따라 관련 실험을 세포생존율이 100%에 가까운 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 진행하였다. 활성산소 중 하나이며, 염증을 유발하는 것으로 알려져 있는 NO생성에 대해 모링가 에탄올 추출물의 효과를 측정한 결과 모링가 추출물을 처리한 군에서 NO발현을 억제시키는 것을 확인하였으며, 64.6%의 저해율을 나타내었다. RAW 264.7 세포에 모링가 에탄올 추출물을 처리하여 단백질 발현을 측정한 결과 iNOS 및 COX-2 인자에서 농도의존적으로 발현이 억제되었으며, 대조군으로 사용한 Vit.C와 비교하였을 때, iNOS 인자에서 우수한 단백질 발현억제를 확인할 수 있었다. B16F10 세포에 모링가 에탄올 추출물을 처리한 결과 TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 단백질 발현양이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 그중 MITF 발현양이 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 항산화 및 항염증 효과가 우수함을 확인하였고, 멜라닌 생합성에 관여하는 유전자발현의 억제를 확인하여 모링가 추출물의 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다. 본 연구의 결과로 모링가 추출물의 항산화, 항염증에 관한 우수한 효능을 확인하였고, 화장품 천연물 소재로서의 활용가능성을 확인할 수 있었다.

Reference

1. D. O. Lim, J. S. Park, S. O. Hwang, K. M. Min, and Y. J. Chae, Cosmetics industry analysis report, **57**, Korea Health Industry Development Institute (2011).
2. J. M. Lee and J. S. An, The influence of purchasing behavior on brand attitude, shopping satisfaction, and recommendation of herbal cosmetics consumer, *J. Fashion Business*, **15**(1), 129 (2011).
3. Y. Heo and H. A. Kim, Correlation between skin prick test and enzyme-linked immunosorbent assay using serum for identification of subjects positive to

- major respiratory allergens, *Korea J. Environmental Health*, **34**(5), 369 (2008).
4. D. H. Jeong, K. B. W. R. Kim, B. K. Kang, S. A. Jung, H. J. Kim, H. Y. Jeong, S. W. Park, and D. H. Ahn, Anti-inflammatory activity of the *Undaria pinnatifida* water extract, *J. Appli. Biologi. Chemi.*, **55**(4), 221 (2012).
 5. J. K. Kundu and Y. J. Surh, Inflammation: gearing the journey to cancer, *Mutat. Res-Rev. Mutat.*, **659**(1), 15 (2008).
 6. M. Miyataka, K. A. Rich, M. Ingram, T. Yamamoto, and R. J. Bing, Nitric oxide, anti-inflammatory drugs on renal prostaglandins and cyclooxygenase-2, *Hypertension*, **39**(3), 785 (2002).
 7. D. J. Stuehr, H. J. Cho, N. S. Kwon, M. F. Weise, and C. F. Nathan, Purification and characteriazation of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD and FMN containing flavoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**(17), 7773 (1991).
 8. M. G. Ryo, KDA textbook editing board, *Dermatology*, **5**, 348, Seoul (2008).
 9. K. Maeda and M. Fukuda, *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes, *J. Soc. Cos. Chem.*, **42**, 361 (1991).
 10. N. Smit, J. Vicanova, and S. Pavel, The hunt for natural skin whitening agents, *Int. J. Mol. Sci.*, **10**(12), 5326 (2009).
 11. M. Seiji, K. Shimao, M. S. Birbeck, and T. B. Fitzpatrick, Subcellular localization of melanin biosynthesis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **100**(1), 497 (1963).
 12. T. Kushimoto, V. Basrur, J. Valencia, J. Matsunaga, W. D. Vieira, V. J. Ferrans, J. Muller, E. Appella, and V. J. Hearing, A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**(19), 10698 (2001).
 13. E. Y. Kwak, Effect of TPA on MIFT (microphthalmia-associated transcription factor) protein chip and melanogenesis in B16 melanoma cell, *Inha Univ.*, (2006).
 14. R. Paliwal, V. A. Sharma, and Pracheta, A review on horse radish tree (*Moringa oleifera*): a multipurpose tree with high economic and commercial importance, *J. Biotech.*, **3**(4), 317 (2011).
 15. F. Anwar, S. Latif, M. Ashraf, and A. H. Gilami, *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses, *Phyto. Res.*, **21**(1), 17 (2007).
 16. A. A. Hamza, Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam seed extract on liver fibrosis in rats, *Food Chem. Toxicol.*, **48**(1), 345 (2009).
 17. Y. J. Choi and K. I. Jung, Anti-diabetic, alcohol-metabolizing, and hepatoprotective activities of *Moringa (Moringa oleifera* Lam.) leaf extracts, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **45**(6), 819 (2016).
 18. H. H. Ki, K. H. Moon, J. H. Lee, J. H. Lee, D. G. Kim, K. O. Jeong, S. Y. Im, Y. M. Lee, and D. K. Kim, Synergistic inhibition of aronia melanocarpa and *Moringa oleifera* seed extract on experimental atopic dermatitis, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **46**(3), 298 (2017).
 19. H. J. Lee and Y. C. Chang, Suppression of TNF- α -induced inflammation by extract from different parts of *Moringa* in HaCaT cells, *J. Life Sci.*, **22**(9), 1254 (2012).
 20. A. Yagi, T. Kanbara, and N. Morinobu, Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract, *Planta Medica.*, **53**(6), 515 (1986).
 21. R. J. Cannell, S. J. Kellan, A. M. Owsiansk, and J. M. Walker, Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors, *Planta Medica.*, **54**(1), 10 (1988).
 22. E. Wünsch and H. G. Heindrich, Zur quantitativen bestimmung der kollagenase, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **333**(1), 149 (1963).
 23. J. Carmichael, W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Res.*, **47**(4), 936 (1987).
 24. L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum, Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids, *Analy. Bio.*, **126**(1), 131 (1982).

25. S. Im, O. Moro, F. Peng, E. E. Medrano, J. Cornelius, G. Babcock, J. J. Nordlund, and Z. A. Abdel-Malek, Activation of the cyclic AMP pathway by α -melanotropin mediates the rest of human melanocytes to ultraviolet B radiation, *Cancer Res.*, **58**(1), 47 (1998).
26. D. L. DeWitt, T. E. Rollins, J. S. Day, J. A. Gauger, and W. L. Smith, Orientation of the active site and antigenic determinants of prostaglandin endoperoxide synthase in the endoplasmic reticulum, *J. Bio. Chem.*, **256**(20), 10375 (1981).
27. M. E. Choi, B. K. Jeon, D. S. Kim, Y. J. Mun, and W. H. Woo, A study on application for beauty food of mixture of Korean red ginseng and *Fagopyrum esculentum*: anti-oxidative effect and collagenase inhibitory activity, *Herb. Formula Sci.*, **17**(1), 153 (2009).
28. S. P. Jeroma, L. Gabrielle, and F. Raul, Identification of collagen fibrils in scleroderma skin, *J. Investig. Dermatol.*, **90**(1), 48 (1998).
29. M. El-Domyati, S. Attia, F. Saleh, D. Brown, D. E. Birk, F. Gasparro, H. Ahmad, and J. Uitto, Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin, *Exp. Dermatol.*, **11**(5), 398 (2002).
30. P. U. Giacomoni and G. Rein, Factors of skin ageing share common mechanisms, *Biogerontology*, **2**(4), 219 (2001).
31. M. Wlaschek, I. Tancheva-Poor, L. Naderi, W. Ma, L. A. Schneider, Z. Razi-Wolf, J. Schuller, and K. Scharffetter-Kochanek, Solar UV irradiation and dermal photoaging, *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, **63**(1), 41 (2001).
32. H. Ukeda, S. Maeda, T. Ishii, and M. Sawamura, Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'--1--(phenylamino)-carbonyl--3, 4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase, *Anal. Biochem.*, **251**(2), 206 (1997).
33. B. G. Knowles and S. Moncada, Nitric oxide synthases in mammals, *Bio. J.*, **298**(2), 249 (1994).
34. C. Nathan, Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?, *J. Clinical investigation*, **100**(10), 2417 (1997).
35. R. M. Palmer, A. G. Ferrige, and S. Moncada, Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature*, **327**(6122), 524 (1987).
36. R. Korhonen, A. Lahti, H. Kankaanranta, and E. Moilanen, Nitric oxide production and signaling in inflammation, *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, **4**(4), 471 (2005).
37. J. Rodriguez-Vita and T. Lawrence, The resolution of inflammation and cancer, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **21**(1), 61 (2010).
38. D. O. Adams and T. A. Hamilton, The cell biology of macrophage activation, *Annu. Rev. Immunol.*, **2**, 283 (1984).
39. F. S. Laroux, Mechanisms of inflammation: the good, the bad and the ugly, *Front. Biosci.*, **9**, 3156 (2004).
40. M. E. Turini and R. N. DuBois, Cyclooxygenase-2: a therapeutic target, *Annu. Rev. Med.*, **53**, 35 (2002).
41. C. S. Williams, M. Mann, and R. N. DuBois, The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development, *Oncogene*, **18**(55), 7908 (1999).
42. G. E. Costin and V. J. Hearing, Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress, *FASEB J.*, **21**(4), 976 (2007).