

## Whitening Activity of *Sambucus Sieboldiana* Var. *Pendula* (Nakai) Extract

Dan-Hee Yoo, Jin-Tae Kim, Min-Jeong Oh, Hyeon-Ji Yeom and Jin-Young Lee\*

Department of Cosmetic and Biotechnology, Hoseo University, Chungnam 31499, Korea

Received October 23, 2018 / Revised December 13, 2018 / Accepted December 20, 2018

This study evaluated the anti-oxidant and whitening effects of a 70% ethanol extract of the *Sambucus sieboldiana* var. *pendula* (Nakai) (SS). At 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration, the electron donating ability of this SS extract was found to be 86.21% and the ABTS+ radical scavenging ability was 97.9%. In terms of whitening activity, the tyrosinase inhibitory effect of the extract was 37%, also at 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration. To explore the extract toxicity to B16F10 melanoma cells, a 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide assay was performed. Results showed 90% or more cells remained viable at 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration. A Western blot of the SS extract was used to measure microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2), and the tyrosinase protein expression inhibitory effect at 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentrations;  $\beta$ -actin was used as a positive control. Consequently, the MITF, TRP-1, TRP-2, and the tyrosinase protein expression inhibitory effect were seen to decrease by 34.5%, 45.6%, 58.4%, and 79.6%, respectively, at 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration. These were also then measured by reverse transcription-polymerase chain reaction at 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentrations with GAPDH as a positive control. As a result, the SS extract was seen to decrease MITF, TRP-1, TRP-2, and the tyrosinase protein expression inhibitory effect by 85.4%, 67.5%, 85.2%, 67.1%, respectively at the 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration. We therefore confirmed the possibility of *Sambucus sieboldiana* var. *pendula* (Nakai) extract as a whitening material.

**Key words** : MITF, *Sambucus sieboldiana* Var. *pendula* (Nakai), TRP-1, TRP-2, tyrosinase

### 서 론

현대에 있어서 깨끗하고 하얀 피부는 아름다움의 척도가 되었다. 특히 생활수준이 향상됨에 따라 사람의 평균 수명도 증가 되면서 사람들의 관심이 건강하게 오래 살며 아름답게 늙어가는 것으로 집중 되었고 피부트러블을 유발하는 각종 염증 등에 대한 예방 및 치료 와 기미(Melasma), 주근깨(freckle)와 같은 색소 침착형 피부질환에 대해 사회적 관심이 높아지고 있으며 또한 환경오염(오존층의 파괴 등)에 따른 피부의 자외선 노출 증가로 인한 피부 광노화 증가는 피부 미백에 대한 관심을 더욱 증가 시키고 있다[14, 18, 20].

미백은 현재 식품의약품안전처에서 허용하는 기능성화장품 중의 1가지로 피부미백에 대한 연구는 tyrosinase의 활성억제, 3,4-dihydroxyphenylamine (DOPA) 산화억제, 자외선 차단 등에 대해서 행해지고 있는데 Keratinocyte에 있는 멜라닌은 피부색을 결정하는 중요한 색소로서 자외선에 의한 손상을 막고 활성산소를 제거하여 피부를 보호하는 역할을 하지만

과도한 멜라닌 합성과 축적은 기미, 주근깨와 같은 시각적으로 좋지 않은 질병을 유발한다[8, 18, 20].

멜라닌은 피부가 자외선에 의해 노출되었을 때 melanocyte의 melanosome에서 tyrosine이 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2의 세 가지 효소에 의해 산화되어 생성되는데 멜라닌 생합성 기전의 출발물질인 tyrosine은 rate-limiting, enzyme인 tyrosinase에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)와 DOPA quinone으로 변형되고, DOPA chrom을 거쳐 중간체인 5,6-dihydroxyindol-2-carboxylic acid로 산화되어 eumelanin을 생성하게 된다. 이에 따라 피부 구성 물질을 증가 시키거나 멜라닌의 생합성을 억제하는 물질을 찾아내어 적용시킴에 따라 미백효과 등의 미백개선 효과를 볼 수 있는 것으로 알려져 있다[8, 20].

위와 같이 미백효과를 나타내는 미백제의 성분은 kojic acid, hydroquinone, Vitamin C, azelaic acid 등으로 대부분 안정성, 이취, 부작용, 세포독성 및 안전성 등의 이유로 제한적으로 사용되고 이러한 이유로 인해 최근에는 인체에 부작용이 적은 약용식물 및 천연물을 이용한 미백소재 개발에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 식품의약품안전처에서는 다나무추출물, 유용성 감초 추출물을 기능성 미백 원료로 고시 하고 있으며, 또한 삼백초, 당귀, 사삼, 울금, 인진쑥, 상백피 등이 미백효과, 피부노화 방지 등을 포함하는 복합적 기능평가가 연구가 증가 되고 있다[7].

말오줌나무는 서양에서 딱총나무속(*Sambucus*) 식물로 관

#### \*Corresponding author

Tel : +82-41-540-9552, Fax : +82-41-540-9538

E-mail : [jylee@hoseo.edu](mailto:jylee@hoseo.edu)

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.

목이면서 꽃이 많이 피고 열매가 아름다워 조경수로 개발되어 인기가 높으며 꽃과 열매는 다양한 용도로 활용 되고 있다. 이에 반해 우리나라에서는 딱총나무속 식물의 이용은 한방에서 딱총나무(*S. williamsii* var. *coreana*)가지를 접골목이라 하여 골절에 사용하거나 민간에서는 딱총나무나 말오줌나무(*S. sieboldiana* var. *pendula*)의 어린잎을 나물로 먹거나 열매를 술로 담가 먹는 등으로 이용되고 있다.

국내에 자생하는 딱총나무속 식물은 말오줌나무, 노랑말오줌나무(*S. sieboldiana* for. *xanthocarpa*), 덧나무(*S. sieboldiana*), 지렁쿠나무(*S. sieboldiana* var. *miquelii*), 딱총나무, 넓은잎 딱총나무(*S. latopinna*)가 있으며 이중에서 말오줌나무와 노랑말오줌나무는 울릉도에서만 자라는 특산식물이며 낙엽 관목이며 화서가 크고 열매가 작은 것이 특징이다. 하지만 말오줌나무의 약용효과에 대해서는 연구가 미비한 실정이다[12, 13].

본 논문에서는 아직까지 활발한 연구가 진행 되지 않은 말오줌나무를 새로운 식물자원으로 이용하기 위해 생리활성 및 미백 활성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 시료 추출

본 실험에 사용된 말오줌나무(*S. sieboldiana* var. *pendula* (Nakai))는 잎과 줄기를 사용하였으며, 울릉도에서 채취하였다. 채취한 시료는 분쇄한 시료에 시료 중량의 10배 양의 70% 에탄올을 가하여 실온에서 24시간 침지한 후 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각 시료 추출물은 (Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 EYELA evaporator로 감압 농축하여 용매를 제거 후 동결 건조하여 -20℃에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

### 세포주

세포 배양 및 세포 독성 측정에 사용된 멜라노마 세포인 B16F10은 ATCC (USA)에서 구입하였으며, 세포 배양을 위해 dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), penicillin/streptomycin, trypsin은 thermo scientific hyclone (USA) 및 Gibco BRL Co. (Grand Island, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 측정에 사용된 haemocytometer (Marienfeld, Germany), 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 BioShop (Canada)에서 구입하여 사용하였다.

### 시약 및 기기

ABTS radical 소거능 측정 실험에 사용한 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)는 Wako Pure Chemical

Industries. Ltd. (Japan)에서 구입하였다. 항산화능 측정 실험에 사용한 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)와 미백효과 측정 실험에 사용한 tyrosinase mushroom, L-3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (L-DOPA), dimethyl sulfoxide (DMSO) 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다. 세포 배양 및 세포 독성 측정에 사용된 멜라노마 세포인 B16F10은 ATCC (USA)에서 구입하였으며, 세포 배양을 위해 dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), penicillin/streptomycin, trypsin은 thermo scientific hyclone (USA) 및 Gibco BRL Co. (Grand Island, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 측정에 사용된 haemocytometer (Marienfeld, Germany), 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)는 BioShop (Canada)에서 구입하여 사용하였다. 단백질 발현 실험에 사용된  $\beta$ -actin, MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 primary antibody와 anti-mouse, anti-goat, anti-rabbit 등의 secondary antibody는 Santa Cruz (CA, USA)에서 구입하였다. mRNA 발현 실험에 사용된 cDNA polymerase kit, Go Script™ Reverse Transcription kits는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였으며, GAPDH, MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase는 Bionics (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용된 기기는 freeze drier (ILShin BioBase Co. Korea), centrifuge (Hanil Science Industrial Co. Korea), rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), microcentrifuge (gyrozen, Korea), microscope (Olympus, Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Vision Scientific, Korea), vortex (Scientific Industries, INC, USA), pH meter (Mettler-Toledo AG, Switzerland), autoclave (JS Research Inc, Korea), microplate reader (Tecan, Austria), PCR (ASTEC Co, Japan), Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM System (Davinch-K Co, Korea), Mini-PROTEAN® tetra cell (Bio-Rad, USA), Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad, USA), UV transilluminator (BioTop, Switzerland), digital shaker (Deihan Scientific, Korea)을 사용하였다.

### 전자공여능 측정

전자공여능(EDA: electron donating abilities)은 Blois의 방법[2]을 변형하여 측정하였다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 60  $\mu$ l와 농도별 추출물을 120  $\mu$ l씩 넣고 혼합한 후 15분간 방치한 다음 microplate reader를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

**ABTS<sup>+</sup> cation radical scavenging activity assay 측정**

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS<sup>+</sup> cation decolorization assay의 방법[6]에 의하여 측정하였다. 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 24시간 동안 보관하여 ABTS<sup>+</sup>를 형성시킨 후 에탄올로 희석시켜 사용하였으며, ABTS<sup>+</sup> 100  $\mu$ l에 시료 100  $\mu$ l를 1:1로 가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{ABTS 소거능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

**Tyrosinase 저해 활성 측정**

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법[19]에 따라 측정하였다. 반응구는 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 80  $\mu$ l에 10 mM L-DOPA (Sigma, USA)를 녹인 기질액 40  $\mu$ l 및 시료용액 40  $\mu$ l의 혼합액에 200 U/ml mushroom tyrosinase (Sigma, USA) 40  $\mu$ l을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 492 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

**세포 배양**

B16F10 세포 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

**MTT assay에 의한 세포 생존율 측정**

세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법[3]에 따라 측정하였다. B16F10 세포를 96 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 180  $\mu$ l 분주하였고, 시료를 농도별로 조제하여 20  $\mu$ l 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 여기에 2.5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 40  $\mu$ l를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 100  $\mu$ l를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가구와 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

**Western blot을 통한 단백질 발현 측정**

MITE, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 미백관련 인자들의 활성을 알아보기 위하여 cell line B16F10을 100 mm tissue culture dish에 1×10<sup>6</sup> cells/well로 분주한 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화시켰다. 배지를 제거한 후  $\alpha$ -MSH (100 nM)를

2시간 처리 한 후 추출물을 농도 별로 처리한 배지로 24시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 1×PBS로 2번 세척해주었다. Complete mini 1tab을 가한 100  $\mu$ l로 RIPA buffer 10 ml에 용해하여 4°C, 13,200 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 BCA protein assay kit로 정량하였으며, 20  $\mu$ l의 단백질을 10% acryl amide gel에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer 기기를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 동안 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 배양시켰다. 1차 항체를 희석하여 4°C에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3회 세척하였다. 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였으며, TBST로 3회 세척한 후 Davinch-Chemi<sup>TM</sup> Imager CAS-400SM System를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

**Total RNA 분리 및 cDNA 합성**

B16F10을 100 mm culture dish에 1×10<sup>6</sup> cells/well로 cell seeding하여 24시간 동안 배양한 후  $\alpha$ -MSH (100 nM)를 2시간 처리해준 뒤 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 trizol lysis buffer를 well에 1,000  $\mu$ l씩 분주하여 세포를 lysis한 후 chloroform 200  $\mu$ l를 분주하여 20 초간 반응 시켰다. 그 후, 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500  $\mu$ l가 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 13,200 rpm에서 20분간 원심분리하였고, 그 상층액을 제거한 후 75% EtOH-diethylpyrocarbonate (DEPC) water를 각 튜브에 1,000  $\mu$ l씩 분주하여 13,200 rpm에서 2분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조하였다. DEPC를 처리한 증류수를 50  $\mu$ l씩 분주하여 녹인 후 96 well plate에 RNA 5  $\mu$ l와 멸균수 195  $\mu$ l를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측정하였다. Oligo (dT) 15 primer (500  $\mu$ g/ml) 1  $\mu$ l, 추출한 RNA (2  $\mu$ g)와 nuclease free water로 10  $\mu$ l를 맞추고 75°C에서 5분간 반응시킨 후 5X reaction buffer, MgCl<sub>2</sub>, PCR nucleotide mix, rnasin inhibitor, reverse transcriptase, nuclease free water를 첨가하여 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

**Reverse transcription-PCR**

MITE, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 5X green Go Taq flexi buffer, MgCl<sub>2</sub>, PCR nucleotide mix (10 mM), primer, Go Taq DNA polymerase, nuclease free water, 합성한 cDNA를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR을 실행하였다. GAPDH는 96°C에서 2분, 96°C에서 10초, 64°C에서 30초, 72°C에서 1분, 72°C에서 10분(35 cycles), tyrosinase는 94°C에

Table 1. Sequence of the primers used for RT-PCR

Gene	Primer	Sequence (5' →3')
GAPDH	sense	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC
	anti-sense	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC
MITF	Forward	AGC GTG TAT TTT CCC CAC AG
	Reverse	TAG CTC CTT AAT GCG GTC GT
TRP-1	Forward	ACT TCA CTC AAG CCA ACT GC
	Reverse	AGC TTC CCA TCA GAT GTC GT
TRP-2	Forward	GCT CCA AGT GGC TGT AGA CC
	Reverse	AAT GCA GTG GCT TGG AAA TC
Tyrosinase	Forward	GAC GGT CAC TGC ACA CTT TG
	Reverse	GCC ATG ACC AGG ATG AC

서 30초, 60℃에서 45초, 72℃ 45초(40 cycles), TRP-1, TRP-2, MITF는 94℃에서 30초, 58℃에서 45초, 72℃에서 45초(40 cycles)을 실행하였다. PCR로 합성시킨 후 0.002% ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel을 100 V에서 40분 동안 전기영동한 후 UV transilluminator를 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

**결과 및 고찰**

**전자공여능 측정 결과**

활성산소는 인체 내에서 노화를 일으키기 쉬운 물질로서, 활성산소를 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강한 폐놀성 화합물이 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다. DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 함황아미노산과 BHA 등에 의해 환원되어 탈색되어 다양한 천연소재로부터 항산화능을 검색하는데 많이 이용되고 있다[9, 21].

말오줌나무 추출물의 전자공여능을 측정한 결과 Fig. 1와 같이 나타내었다. 말오줌나무 추출물의 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 증가되는 것을 나타내었고, 1,000 µg/ml에서 86.21%의 활성을 나타내었다. Cha 등[4]의 두릅 순 추출물의 전자공여능을 측정한 결과 1,000 µg/ml 농도에서 28.69%의 활성을 나타내는 결과와 비교하였을 때 말오줌나무 추출물의 전자공여능이 우수한 활성을 나타내었음을 확인할 수 있었다.

**ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity assay 측정 결과**

ABTS radical을 이용한 항산화능 측정은 potassium salt의 반응에 의해 생성된 ABTS free radical이 추출물에 있는 항산화 물질에 의해 제거되면서 특유의 색인 청록색에서 연한 청록색으로 탈색되는 것을 이용한 방법이다[10].

말오줌나무 추출물의 ABTS 소거능을 측정한 결과 Fig. 2과 같이 나타내었다. 말오줌나무 추출물은 1,000 µg/ml 농도에서 97.9%의 소거능을 보였으며, 대조군인 Vit. C와 비교하였을 때 유의한 결과를 나타내었다. 이는 Oh 등[16]의 울금과 강황 추출물이 1,000 µg/ml 농도에서 86.4%, 90.73%의 효능을 나타

낸 결과를 비교하였을 때 말오줌나무 추출물의 효능이 우수하다는 것을 나타냈다.

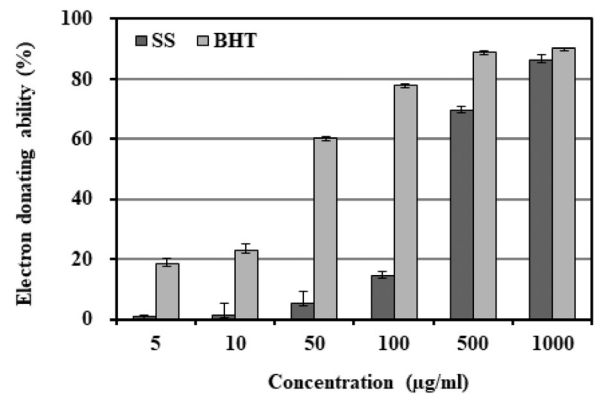


Fig. 1. Electron donating ability of extract from *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai). ■ SS: *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai) extracted with 70% ethanol, □ BHT: dibutyl hydroxy toluene. Result are means ± SD. of triplicate data.

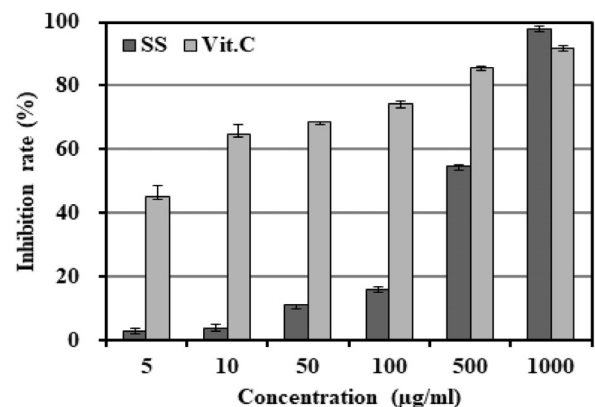


Fig. 2. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity of *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai) extracts. ■ SS: *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai) extracted with 70% ethanol. Vit. C: L-ascorbic acid. Result are means ± SD. of triplicate data.

**Tyrosinase 저해활성 측정 결과**

Tyrosinase는 tyrosine의 산화를 촉진하여 피부 표피층의 melanocyte의 melanosome에서 melanin을 생합성 하기 위한 주 효소로 알려져 있다. 이 tyrosine이 산화 중합반응을 하면, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) 또는 DOPA quinone이 되고, melanin이 합성되는 과정이다. Tyrosinase 저해제는 미백 기능성과 관련이 깊으며, 식품과 화장품 산업에서 많은 주목을 받고 있다[5].

말오줌나무 추출물의 tyrosinase의 활성을 측정한 결과 Fig. 3과 같이 나타내었다. 말오줌나무 추출물의 tyrosinase 저해활성은 1,000 µg/ml에서 37%의 저해활성을 나타내었다. 이는 Choi 등[6]의 갈근, 지실 및 향부자 추출물의 1,000 µg/ml 농도에서 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과 25%, 15%, 11%의 효과를 나타낸 결과와 비교하였을 때 말오줌나무 추출물의 tyrosinase 저해활성이 우수한 결과는 나타냄을 확인할 수 있었다.

**MTT assay에 의한 세포 생존율 측정 결과**

MTT assay는 대사 과정에서 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 MTT tetrazolium인 노란색 수용성 물질을 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키며, 그 환원된 formazan의 흡광도는 550 nm 근처 파장에서 최대가 되며, formazan을 생성하는 생 세포의 농도를 반영하여 측정하는 검사법이다[17].

말오줌나무 추출물의 멜라노마(B16F10) 세포에서의 세포 생존율을 MTT assay에 의해 확인한 결과 Fig. 4과 같이 나타내었다. 말오줌나무 추출물은 100 µg/ml 농도에서 94.7%의 세포 생존율을 나타내었으며, 본 실험에서는 90% 이상의 생존율을 보이는 100 µg/ml 농도 이하에서 실험을 진행하였다. Kwon 등[11]의 백강잠 추출물은 500 µg/ml에서 16.7%의 생존율을 나타낸 결과와 비교하였을 때 말오줌나무 추출물은 63.3%의

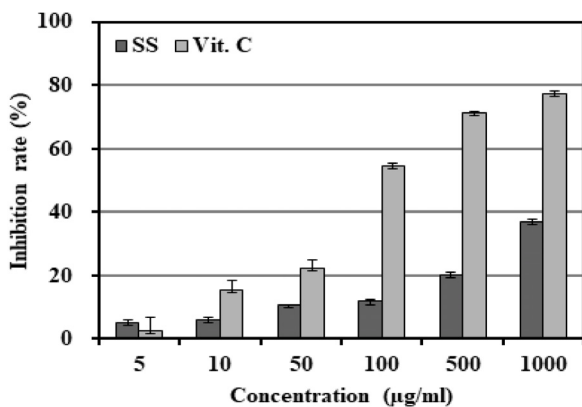


Fig. 3. Inhibition rate of *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai) extracts on tyrosinase. ■ SS: *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai) extracted with 70% ethanol. Vit. C: L-ascorbic acid. Result are means ± SD. of triplicate data.

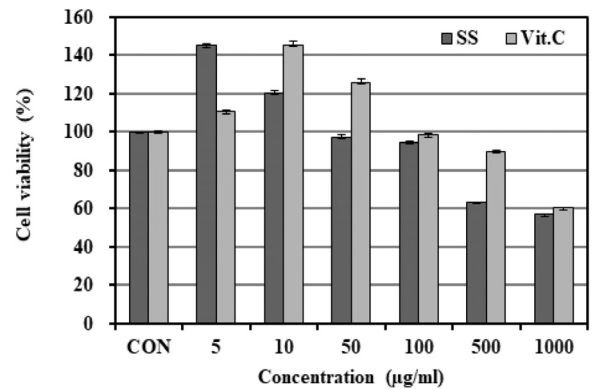


Fig. 4. Cell viability of extracts from *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai) on melanoma cell (B16F10). After B16 F10 cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were started in medium for 24 hr the cells were treated with 5, 10, 50, 100, 500 and 1,000 µg/ml of extracted SS for 24 hr. ■ SS: 70% (v/v) ethanol extract of *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai). Vit. C: L-ascorbic acid. Result are means ± SD. of triplicate data.

생존율을 나타내 세포 생존율이 상당히 높았음을 확인할 수 있었다.

**B16F10 세포에서 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase 단백질 발현에 미치는 영향**

B16F10 멜라노마 세포는 melanocyte의 세포막에 존재하는 melanocortin 1 receptor (Mc1R)을 통해 멜라닌 합성의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다. 이 과정에서 MITF는 핵으로 이동하여 DNA의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 promotor에 결합하여 각 유전자 발현을 증가시켜 melanogenesis를 유도하며, 즉, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 발현억제를 통하여 MITF의 억제와 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다[1, 15].

미백 인자인 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 단백질 발현 억제 효과를 측정하기 위해 western blot을 진행하였다. 그 결과 Fig. 5 ~ Fig. 8에 나타내었다. B16F10 세포에 말오줌나무 추출물을 25, 50, 100 µg/ml로 농도별로 처리한 후 control은 α-MSH를 처리하여 멜라닌을 과발현한 구간으로 설정하였고, normal은 α-MSH를 처리하지 않은 구간으로 설정하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 β-actin을 positive control로 사용하였다. α-MSH에 의해 증가된 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 단백질 발현양이 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 대조군인 kojic acid와 비교하였을 때 MITF와 TRP-1의 단백질 발현양에서 특히 유의한 결과를 확인할 수 있었다.

**B16F10 세포에서 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase mRNA 발현에 미치는 영향**

말오줌나무 추출물이 멜라닌 합성에 관련된 인자인 MITF,

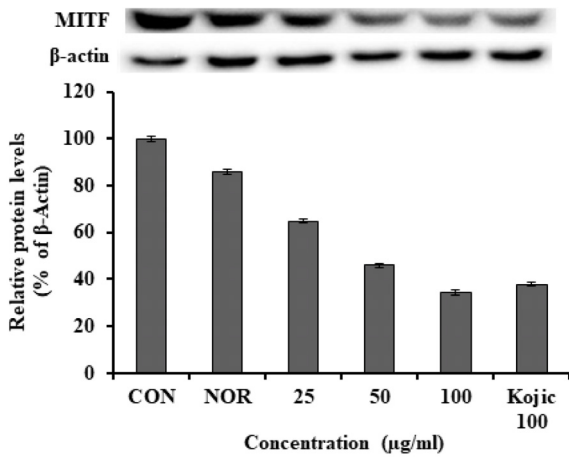


Fig. 5. MITF protein expression rate of *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai) extracts on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were started in medium for 24 hr the cells were treated 25, 50 and 100  $\mu$ g/ml of extracts from SS for 24 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with  $\alpha$ -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with  $\alpha$ -MSH. Results are means  $\pm$  S.D. of triplicate data.

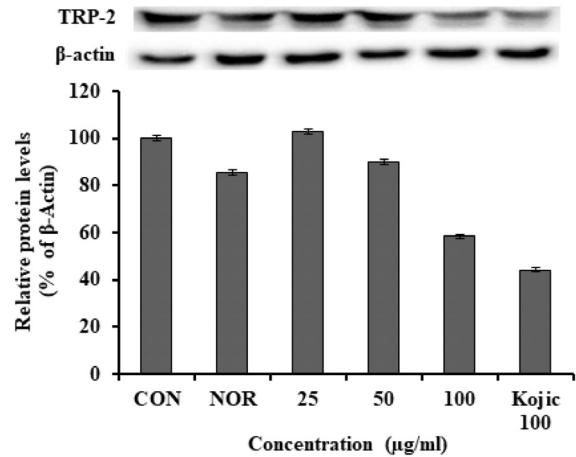


Fig. 7. TRP-2 protein expression rate of *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai) extracts on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were started in medium for 24 hr the cells were treated 25, 50 and 100  $\mu$ g/ml of extracts from SS for 24 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with  $\alpha$ -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with  $\alpha$ -MSH. Results are means  $\pm$  S.D. of triplicate data.

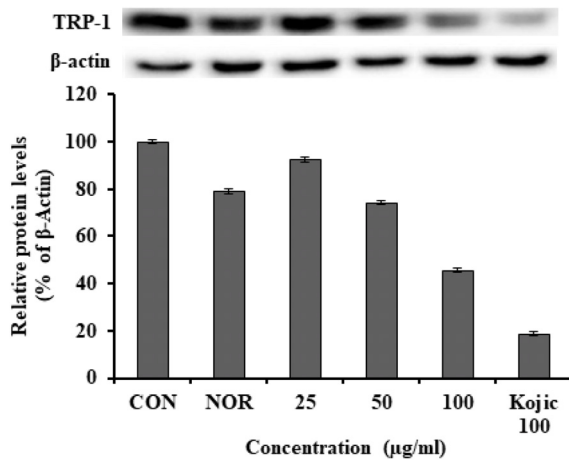


Fig. 6. TRP-1 protein expression rate of *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai) extracts on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were started in medium for 24 hr the cells were treated 25, 50 and 100  $\mu$ g/ml of extracts from SS for 24 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with  $\alpha$ -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with  $\alpha$ -MSH. Results are means  $\pm$  S.D. of triplicate data.

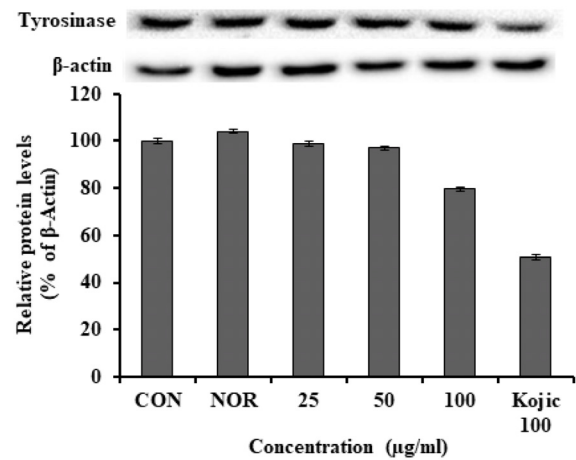


Fig. 8. Tyrosinase protein expression rate of *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai) extracts on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were started in medium for 24 hr the cells were treated 25, 50 and 100  $\mu$ g/ml of extracts from SS for 24 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with  $\alpha$ -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with  $\alpha$ -MSH. Results are means  $\pm$  S.D. of triplicate data.

TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase에 미치는 mRNA 발현의 영향을 알아보기 위하여 RT-PCR을 측정하였다. B16F10 세포에 말오줌나무 추출물을 25, 50, 100  $\mu$ g/ml의 농도별로 처리한 후 control은  $\alpha$ -MSH를 처리하여 멜라닌을 과발현을 시키고, normal 구간에는  $\alpha$ -MSH를 처리하지 않은 구간으로 설정하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의

없는 house keeping gene인 GAPDH을 positive control로 사용하였다. 그 결과 Fig. 9 ~ Fig. 12와 같이 나타내었다. MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 mRNA 발현을 측정한 결과 농도가 증가함에 따라 mRNA 발현을 억제하였고, 대조군인 kojic acid와 비교하였을 때 말오줌나무 추출물에서 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 mRNA 발현이 유사하거나 억제되었음

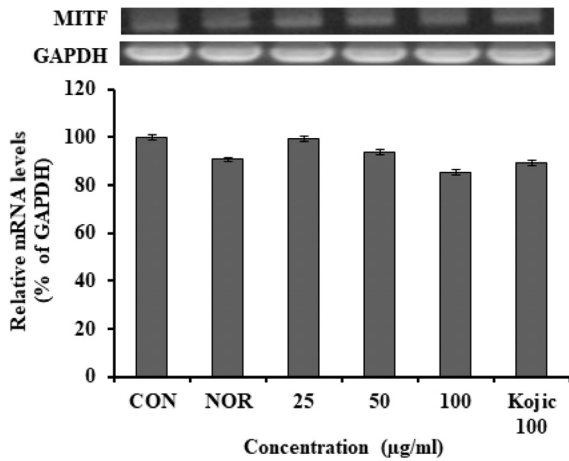


Fig. 9. MITF mRNA expression rate of *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai) extracts on melanoma cells (B16F10). After B16F10 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were started in medium for 24 hr the cells were treated 25, 50 and 100 µg/ml of extracts from SS for 24 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with α-MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α-MSH. Results are means ± S.D. of triplicate data.

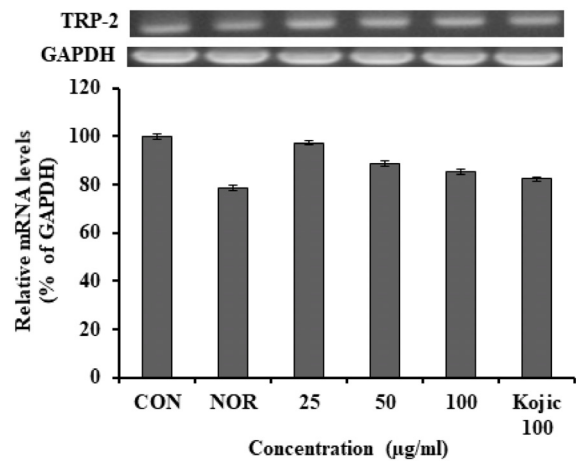


Fig. 11. TRP-2 mRNA expression rate of *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai) extracts on melanoma cells (B16F10). After B16F10 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were started in medium for 24 hr the cells were treated 25, 50 and 100 µg/ml of extracts from SS for 24 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with α-MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α-MSH. Results are means ± S.D. of triplicate data.

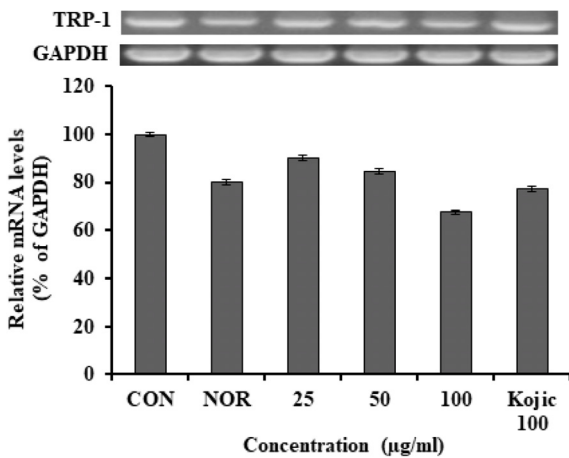


Fig. 10. TRP-1 mRNA expression rate of *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai) extracts on melanoma cells (B16F10). After B16F10 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were started in medium for 24 hr the cells were treated 25, 50 and 100 µg/ml of extracts from SS for 24 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with α-MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α-MSH. Results are means ± S.D. of triplicate data.

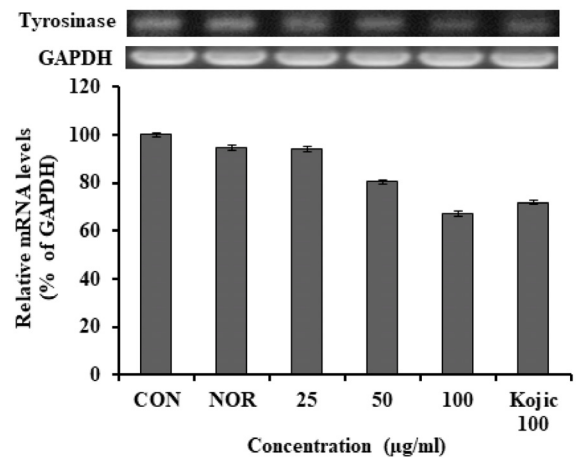


Fig. 12. Tyrosinase mRNA expression rate of *Sambucus sieboldiana var. pendula* (Nakai) extracts on melanoma cells (B16F10). After B16F10 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were started in medium for 24 hr the cells were treated 25, 50 and 100 µg/ml of extracts from SS for 24 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with α-MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α-MSH. Results are means ± S.D. of triplicate data.

을 확인할 수 있었다.

References

1. Abdel-Malek, Z. A., Swope, V. B., Suzuki, I., Harriger, D., Boyce, S. T., Urabe, K. and Hearing, V. J. 1995. Mitogenic

and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 1789-1793.  
 2. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nat. Kor. J. Oriental Physiol. Pathol.* **26**, 1199-1120.  
 3. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D.

- and Mitchell, H. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
4. Cha, J. Y., Ahn, H. Y., Eom, K. E., Park, B. K., Jun, B. S. and Cho, Y. S. 2009. Antioxidative Activity of *Aralia elata* Shoot and Leaf Extracts. *J. Life Sci.* **19**, 652-658.
  5. Cha, J. Y., Yang, H. J., Jeong, J. J., Seo, W. S., Park, J. S., Ok, M. and Cho, Y. S. 2010. Tyrosinase inhibition activity and antioxidant capacity by fermented products of some medicinal plants. *J. Life Sci.* **20**, 940-947.
  6. Choi, B. W., Lee, B. H., Kang, K. J., Lee, E. S. and Lee, N. H. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**, 237-242.
  7. Kim, D. E., Yeon, S. H., Chang, B. Y., Han, J. H., Kim, D. S., Kim, H. S., Cho, H. K. and Kim, S. Y. 2006. Whitening effect and mechanism of aerial part of *Pueraria lobata*. *Kor. J. Pharmacogn.* **47**, 343-351.
  8. Kim, D. H., An, B. J. and Lee, J. Y. 2011. Whitening activities of the *Agrimonia pilosa* L. extracts. *J. Appl. Biol. Chem.* **54**, 284-289.
  9. Kim, H. K., Kim, Y. E., Do, J. R., Lee, Y. C. and Lee, B. Y. 1995. Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *J. Food Sci. Technol.* **27**, 80-86.
  10. Kim, Y. E., Yang, J. W., Lee, C. H. and Kwon, E. K. 2009. ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of *Tricholoma matsutake* Sing. (Pine Mushroom). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 555-560.
  11. Kwon, I. H., Du, I. S., Park, M. C., Hwang, C. Y. and Kim, N. K. 2005. Effect of *Batryticus bombycis* extract on apoptosis in B16F10 cells. *Kor. J. Oriental Physiol. Pathol.* **19**, 765-771.
  12. Lee, J. Y., Yoo, D. H. and Chae, J. W. 2017. Inhibitory Effect of *Sambucus sieboldiana* var. *pendula* (Nakai) extract on the mRNA and protein expression of iNOS and COX-2 in Raw 264.7 cells. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **45**, 178-183.
  13. Lee, S. G., Lee, D. J., Kim, H. Y. and Ku, J. J. 2014. Characteristics of seed germination and potted seedlings growth of endemic species, *Sambucus sieboldiana* var. *pendula* and *Sambucus sieboldiana* for. *xanthocarpa*. *J. Kor. Forest Society* **103**, 359-367.
  14. Lee, T. H. 2003. Depigmentation activity of barley, unpolished rice, Job's-tear. *Kyung Hee Uni. Korea* **16**, 126.
  15. Lin, J. W., Chiang, H. M., Lin, Y. C. and Wen, K. C. 2008. Natural products with skin-whitening effects. *J. Food Drug Analysis* **16**, 1-10.
  16. Oh, H. I., Park, H. B., Ju, M. S., Jung, S. Y. and Oh, M. S. 2010. Comparative study of anti-oxidant and anti-inflammatory activities between *Curcuma longae* radix and *Curcuma longae* rhizoma. *Kor. J. Herbol.* **25**, 83-91.
  17. Park, J. G., Karmar, B. S., Steinberg, S. M., Carmichael, J., Collins, J. M., Minna, J. D. and Gazdar, A. F. 1987. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res.* **47**, 5875-5879.
  18. Park, T. S., Kim, D. H. and Son, J. H. 2015. Whitening Effect of *Salvia miltorrhiza* Bunge Water Extract in Human Epidermal Melanocyte. *J. Appl. Biol. Chem.* **58**, 333-338.
  19. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. 1987. Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. *Planta Med.* **53**, 515-517.
  20. Yu, J. M., Son, J. H. and Kim, D. H. 2015. Whitening effects of solvent fractions isolated from *Vitex rotundifolia*. *J. Appl. Biol. Chem.* **58**, 266-271.
  21. Yu, M. H., Im, H. G., Lee, H. J., Ji, Y. J. and Lee, I. S. 2006. Components and their antioxidative activities of methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* Rehder. *Kor. J. Food Sci. Tech.* **38**, 128-134.

## 초록 : 말오줌나무 추출물의 미백활성 검증

유단희 · 김진태 · 오민정 · 염현지 · 이진영\*

(호서대학교 화장품생명공학부)

본 연구는 말오줌나무 70% 에탄올 추출물의 항산화 효과와 미백 효과를 검증하였다. 말오줌나무 추출물의 전자공여능 측정실험은 1,000 µg/ml에서 86.21%의 효과를 나타내었고, ABTS 소거능을 측정된 결과 1,000 µg/ml 농도에서 97.9%의 소거능을 보였다. Tyrosinase 저해활성 측정은 1,000 µg/ml 농도에서 37%의 효과를 보였다. 말오줌나무 추출물의 세포 생존율을 melanoma cell (B16F10)에서 확인하기 위해 MTT assay를 진행하였는데 세포 생존율을 측정된 결과, 100 µg/ml 농도에서 90% 이상의 생존율을 보였다. 말오줌나무 추출물의 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 단백질 발현 효과를 25, 50, 100 µg/ml 농도에서 측정하였으며 양성 대조군으로 β-actin을 사용하였다. 그 결과, MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 각각 100 µg/ml 농도에서 34.5%, 45.6%, 58.4%, 79.6%의 단백질 발현 억제 효과를 보였다. MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 mRNA 발현을 RT-PCR로 25, 50, 100 µg/ml 농도에서 측정하였고, 양성 대조군으로 GAPDH를 사용하였다. 그 결과, 말오줌나무 추출물의 100 µg/ml 농도에서 각각 85.4%, 67.5%, 85.2%, 67.1%의 mRNA 발현이 감소함을 확인 할 수 있었다. 따라서, 말오줌나무 추출물이 미백 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.