

오가피추출물의 멜라닌 생성 저해 효과

임 경 란 · 김 미 진 · 정 택 규 · 윤 경 섭[†]

(주)사임당화장품 기술연구소
(2008년 6월 4일 접수, 2008년 6월 12일 채택)

The Inhibitory Effects of *Acanthopanax sessiliflorum* Seeman on Melanogenesis

Kyung Ran Im, Mi Jin Kim, Taek Kyu Jung, and Kyung-Sup Yoon[†]

R&D Center, Saimdang Cosmetics Co., Ltd., 805-5, Gyesan-ri, Yeongdong-eup, Yeongdong-gun, Chungbuk
370-802, Korea

(Received June 4, 2008; Accepted June 12, 2008)

요약: 본 연구에서는 천연 미백소재 개발을 위하여 오가피에서 추출한 페놀산 분획의 멜라닌 생성에 연관된 생리활성을 분석하였다. 오가피에서 추출한 페놀산 분획은 free radical 소거활성(DPPH)에서 $IC_{50} = 3.43 \pm 0.35 \mu\text{g/mL}$, superoxide radicals 소거활성 $IC_{50} = 158.91 \pm 1.57 \mu\text{g/mL}$ 을 나타내었다. B16 melanoma 세포에서의 멜라닌 생합성 저해효과는 농도 의존적으로 저해하여 $100 \mu\text{g/mL}$ 에서 $27.2 \pm 2.65 \%$ 의 저해율을 보였다. 그리고 오가피에서 추출한 페놀산 분획은 $100 \mu\text{g/mL}$ 에서 세포 내 tyrosinase의 활성을 $53.67 \pm 8.55 \%$ 저해하였으며, Western blot을 이용하여 tyrosinase와 tyrosinase 관련 단백질(TRP-2)의 발현 감소를 확인하였다. 이러한 결과를 볼 때, 오가피에서 추출한 페놀산 분획은 tyrosinase의 활성 및 발현을 억제함으로써 멜라닌 생성을 감소시키는 것으로 사료된다. 그러므로 오가피에서 추출한 페놀산 분획추출물은 미백용도의 기능성 원료로써 큰 가능성을 가지고 있는 것으로 판단된다.

Abstract: To develop a new natural whitening agent for cosmetics, we investigated effects of *Acanthopanax sessiliflorum* Seeman on melanogenesis. We prepared phenolic acid-rich extract including two phenolic acids, chlorogenic acid and caffeic acid, as predominant constituents from *Acanthopanax sessiliflorum* Seeman. Phenolic acid-rich extract showed ROS scavenging activities in 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and xanthine/xanthine oxidase system with the IC_{50} values of $3.43 \pm 0.35 \mu\text{g/mL}$ and $158.91 \pm 1.57 \mu\text{g/mL}$, respectively. Phenolic acid-rich fraction reduced melanin contents of B16 melanoma cells dose-dependantly and the decrease was $27.27 \pm 2.66 \%$ at a concentration of $100 \mu\text{g/mL}$. And the phenolic acid-rich fraction reduced intracellular tyrosinase activity about $53.67 \pm 8.55 \%$ at a concentration of $100 \mu\text{g/mL}$. Phenolic acid-rich extract inhibited tyrosinase and TRP-2 expression at protein level. These results suggest that phenolic acid-rich fraction reduced melanin formation by the inhibitions of tyrosinase activity and expression in B16 melanoma cells. Therefore, we suggest that phenolic acid-rich extract could be used as a whitening ingredient in cosmetics.

Keywords: whitening, *Acanthopanax sessiliflorum* Seeman, melanogenesis, tyrosinase, TRP-2

[†] 주 저자 (e-mail: ksyoonjh@hanmail.net)

1. 서 론

인간의 피부색은 내적, 외적 요인에 의해 달라지는데 그 중 피부색을 결정하는 근본적인 내적인자는 천연 피부 색소인 멜라닌이다. 멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 멜라닌세포의 멜라노솜에서 합성되어 수상돌기를 통하여 표피의 각질세포로 이동되어 피부의 색깔을 나타내고, 자외선이나 외부자극 물질 등으로부터 피부를 보호하는 긍정적인 기능이 있는 반면, 과도한 색소침착은 기미와 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하는 등 미용적인 면에서 부정적인 기능을 나타내기도 한다[1].

관련 연구들을 살펴보면 tyrosine의 산화를 촉매하는 tyrosinase의 활성을 저해하는 물질에 대한 연구로 kojic acid, 알부틴, 감초추출물에 관한 연구가 있으며, 피부박리를 촉진하여 멜라닌색소 제거를 촉진시키는 소재에 관한 연구로는 retinoic acid 등에 대한 연구가 있다. 하지만 이들 대부분의 것은 효과가 불충분하거나 제형상 불완전한 면이 있고, 피부에 대한 안전성 측면에서 그 사용이 제한되고 있다[2,3].

오가피(*Acanthopanax sessiliflorum* Seeman)는 한반도와 시베리아 및 중국의 고지대에 자생하는 오가피속(*Acanthopanax*) 식물로 낙엽활엽 관목으로, 높이 1.5 ~ 2.0 cm, 줄기에는 드물게 큰 가시가 있고, 잎은 장상복엽으로 3 ~ 5엽이다[4].

일명 “시베리아 인삼”이라고 불리는 가시오가피는 강장제로서 기관지천식 치료, 육체적 증진, 근골격 증진, 항암, 항노화, 항피로, 그리고 인삼에 버금가는 신진대사 작용(adaptogenic activity)이 있다고 알려져 있으며, 우리나라를 비롯한 동양에서 고래로부터 주로 강장, 강정, 신경통, 중풍, 고혈압, 당뇨병 및 노인성 질환을 위한 귀중한 한약재의 하나로 사용되어 오고 있다[5-8].

현재까지 알려진 오가피속 식물의 성분은 eleutheroside A, B, C, D, E, I, K, L, M과 sesamin, chiisanoside, caffeic acid, chlorogenic acid, campesterol, 비타민, 미네랄 등으로 여러 측면을 연구한 결과 건강보조식품이나 식품이나 화장품 등의 첨가제로 사용되며, 오가피의 성분 분석과 효능에 관한 연구는 계속되고 있다[9-12].

본 연구에서는 오가피 성분들 중에 다양한 생리활성 작용을 하는 phenolic acids인 chlorogenic acid 및 caffeic acid를 유효성분으로 함유하는 정제된 오가피추출물을 제조함과 동시에 그들의 항산화 효과, B16 melanoma cell 내에서의 세포독성과 멜라닌 생성억제효과, tyrosinase 활성을 저해하는 효과를 기존의 잘 알려진 성분

들과의 비교로 효능을 평가하여 기능성화장품 원료로서의 사용 가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 기기

본 실험에 사용한 오가피는 충북 제천에서 채배하고 있는 오가피(*Acanthopanax sessiliflorum* S.)를 제천 시장에서 구입하여 사용하였다. 오가피의 추출과정 및 분획에 사용된 용매들은 시약급을 사용하였고, HPLC 분석용 용매로 사용한 CH₃CN와 H₂O는 HPLC grade로 Fisher사(USA) 제품을 사용하였다. Diaion HP20 (Mitsubishi Kasei Kogyo Co., Ltd. Japan)을 충전제로 사용하였으며, 오가피추출물에 포함된 생리활성 성분 중 지표성분인 chlorogenic acid (Sigma, USA), caffeic acid (Fluka, USA)는 초저온 냉장고 -40 °C에서 보관하여 사용하였다.

2.2. 시료의 제조 및 분석

2.2.1. 시료의 추출 및 정제

거피 및 절단된 오가피 약재 40 kg를 분쇄한 후, 75 % ethanol (EtOH) 수용액 400 L을 넣고 3일 동안 상온 교반 후 300 메시 여과포로 여과한 다음 추출여액을 회전식 증발 건조기로 40 °C에서 감압 농축하여 오가피 조추출물(*Acanthopanax sessiliflorum* extract, 5.32 kg)을 얻었다. 그 다음, 추출물 전량을 미리 10 % EtOH 수용액으로 평형화시켜 놓은 Diaion HP20으로 충전시킨 직경 40 cm, 길이 2 m의 column에 옮긴 후 순차적으로 10 %, 20 %, 40 %, 60 % EtOH 수용액을 사용하여 350 L씩 용출하여 4개의 분획으로 분리하였다. 20 % 및 40 % EtOH 분획물을 조합하여 회전식 증발 건조기로 40 °C에서 감압 농축하여 chlorogenic acid 및 caffeic acid를 함유하는 정제된 오가피추출물(phenolic acid-rich) 250 g를 얻었다.

2.2.2. HPLC를 이용한 분석

오가피추출물의 분석은 지표성분인 chlorogenic acid와 caffeic acid를 대상으로 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 분석하였다.

HPLC는 Agilent Technologies사 1200 series HPLC, 칼럼은 YMC-Pack Pro C18 (5 μm, 4.6 mm I.D. × 250 mm)을 사용하였고, 검출기의 자외부흡광도계 측정과

장은 330 nm로 하였다. 유속은 1.0 mL/min, 이동상은 용매 A (0.1 % CH₃COOH를 함유한 CH₃CN)와 용매 B (0.1 % CH₃COOH를 함유한 H₂O) 기울기용리로 하여 Table 1의 조건에 따라 분석을 실시하였다.

2.3. 항산화효과 평가

2.3.1. 자유라디칼 소거효과 측정

자유라디칼 소거활성 시험은 안정한 자유라디칼 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH, Sigma, USA)을 사용하는 방법으로[13] 메탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 1 mL에 시료 각각의 농도를 메탄올에 녹여 2 mL로 하여 혼합하고, 실온에서 10 min 동안 반응시킨 후 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu, UV-1601, Japan)로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료액 대신 메탄올을 넣었으며, DPPH 용액 대신 메탄올을 넣어 보정값을 얻었다. 자유라디칼 소거율은 하기의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율 (\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.3.2. 활성산소 소거효과 측정

활성산소(superoxide anion) 소거활성 평가는 Noro 등의 방법을[14] 활용하여 xanthine/xanthine oxidase (Sigma, USA) 효소반응에 의한 활성산소 발생계를 이용하여 활성산소에 의한 nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma, USA)의 산화에 의한 흡광도 변화를 측정하였다. 0.05 M Na₂CO₃ (Sigma, USA), 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.15 % bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA) 0.75 mM NBT 및 시료를 넣고 잘 혼합하여 25 °C에서 10 min 동안 정치하였다. Xanthine oxidase를 넣고 25 °C에서 20 min 동안 반응시킨 후에 6 mM CuCl₂ (Sigma, USA)를 넣어 반응을 정지시키고 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 정제수를 넣었으며, xanthine oxidase 대신에 정제수를 넣어 색 보정값을 얻었다. 소거율은 DPPH radical 소거율에 사용된 식에 따라 계산하였다.

2.4. 미백효과 평가

2.4.1. 세포주 및 세포배양

세포주는 B16 melanoma cell을 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양받아 사용하였으며, 세포 배

Table 1. Gradient Elution Condition for HPLC Analysis

Time (min)	Solvent A ^{a)}	Solvent B ^{b)}
0	10	90
5	20	80
10	20	80
15	30	70
20	30	70
25	40	60
30	40	60

^{a)}Solvent A: 0.1 % CH₃COOH in CH₃CN,

^{b)}Solvent B: 0.1 % CH₃COOH in H₂O.

양에 사용된 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM)는 10 % fetal bovine serum (HyClone Lab., USA), 1 % antibiotic antimycotic (100 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin, Life Tech Inc., USA)을 혼합하여 사용하였고, 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다.

2.4.2. 세포 생존력 시험

본 실험에서 B16 melanoma cell에 대한 시료의 처리농도를 결정하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) assay를 Mosmann의 방법을[15] 변형하여 실시하였다. 이 분석법은 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 formazan으로 변환시키는 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용한 방법이다. 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다.

B16 melanoma cell을 1 × 10⁴ cells/well 농도로 96-well plate에 분주하여 4 h 동안 배양한 후, 각 well에 적당한 농도로 시료를 처리하여 CO₂ 배양기에서 72 h 더 배양하였다. MTT 용액(5 mg/mL) 10 µL을 첨가하고 4 h 후 상등액을 제거하고, 150 µL의 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, USA)를 첨가한 후 microplate reader (EL800, BIO-TEK Instruments, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조군은 시료를 처리하지 않은 배양액으로 설정한 후 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존능력은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포생존율 (\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.4.3. Melanin 생성량 측정

Melanin 함량 측정은 Meyskens의 방법을[16] 변형하여 사용하였다. B16 melanoma cell을 6-well plate에 5×10^4 cell/mL이 되게 준비한 후, 24 h 동안 37 °C, CO₂ 항온기에서 배양 후 시료를 농도별로 처리하여 2 ~ 3일 동안 배양하였다. 양성 대조군으로는 알부틴을 사용하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 3회 세척하고 PRO-PREP solution (iNtRON Biotechnology, Korea)으로 세포를 용해한 다음, 원심분리하여 상등액을 제거하고 건조시켰다. 10 % DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액으로 멜라닌을 용해시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 멜라닌 생성량은 총단백질로 보정하였다.

2.4.4. 세포 내 Tyrosinase 활성도 측정

세포 내의 tyrosinase 활성은 Pawelek 등의 방법[17] 변형하여 사용하였다. 시료첨가 후 72 h 동안 배양된 세포를 PBS로 3회 세척하고 PRO-PREP solution을 첨가한 다음 얼음상에서 30 min 동안 흔들면서 세포를 용해한 다음, 원심분리하고 얻어진 세포용액을 사용하여 tyrosinase 활성을 측정하였다. 세포 내 tyrosinase 활성 분석은 세포 내에 존재하는 tyrosinase의 작용결과 생성되는 DOPAquinone의 비색법에 의해 측정하였다. 동량의 단백질 각각에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8)와 10 mM L-DOPA를 혼합한 후, 37 °C 항온기에서 1 h 동안 반응시켰다. 반응액 중에 생성된 DOPAquinone을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase의 활성 저해율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.4.5. Western Blot 분석

B16 melanoma cell을 10 cm 배양용기에 2×10^5 개의 세포를 부착시키고 농도별로 시료를 처리한 후 72 h 동안 배양하였다. 배양된 세포를 모두 수거하여 세포침전물을 PRO-PREP solution에 용해시키고 원심분리하여 상등액을 취하였다.

단백질은 Bradford 시약(BIO-RAD)을 이용하여 정량하였고, 단백질과 sample buffer (glycerol 1 mL, β -mercaptoethanol 0.5 mL, 10 % SDS 3 mL, 1 M Tris-HCl 1.25 mL, 1 ~ 2 μ g of bromophenol blue)를 동

량으로 혼합한 후 10 % SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. Nitrocellulose membrane에 전이시키고 5 % skim milk powder로 blocking시킨 후, tyrosinase, TRP-1, 2, 그리고 actin antibody와 각각 반응시킨 후 alkaline phosphatase-conjugated antibody와 반응시켰다. TBS-T (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.05% Tween 20)로 세척 후 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) 용액으로 발색 후 단백질 band를 분석하였다.

2.5. 피부안전성 시험

오가피에서 추출한 페놀산 분획에 대한 피부안전성, 즉 피부반응의 관찰을 통해서 자극 혹은 알레르기성 반응의 발생 여부를 알아보기 위하여 인체접촉시험을 실시하였다.

임상시험 시험기준에 부합하고 제외기준에 해당되지 않는 18세 이상의 여성 30명을 피험자로 선정하였다. 우선, 첩보부위인 등을 70 % EtOH로 세척한 후, 준비된 시험물질을 IQ Ultra™ chamber 내에 20 μ L을 적하시켰다. 첩보는 48 h 동안 도포하며, 첩보를 제거한 후에는 skin marker로 시험부위를 표시하고 30 min, 24 h 후에 자극 발생 유무를 평가하였다. 평가기준은 Forsch & Kligman[18]과 The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association (CTFA) guideline[19]을 반영한 판정기준에 따랐으며, 피부반응도의 평가는 다음 계산식으로부터 계산된 평균값으로 하였다.

$$\text{피부반응도 (\%)} = \sum \frac{\text{가중치} \times \text{반응인원수}}{4(\text{최대가중치}) \times n(\text{전체인원수})} \times 100 \times 0.5$$

3. 결과 및 고찰

3.1. 지표성분의 함량 분석

오가피의 조추출물과 오가피에서 추출한 페놀산 분획을 분석한 결과, chlorogenic acid는 2.52 ± 0.01 %에서 20.52 ± 0.92 %로 caffeic acid는 0.36 ± 0.00 %에서 4.66 ± 0.22 %로 함량이 각각 약 7배, 12배 증가함을 알 수 있었다. 오가피의 조추출물 및 오가피에서 추출한 페놀산 분획의 HPLC 크로마토그램을 Figure 1에 나타내었다.

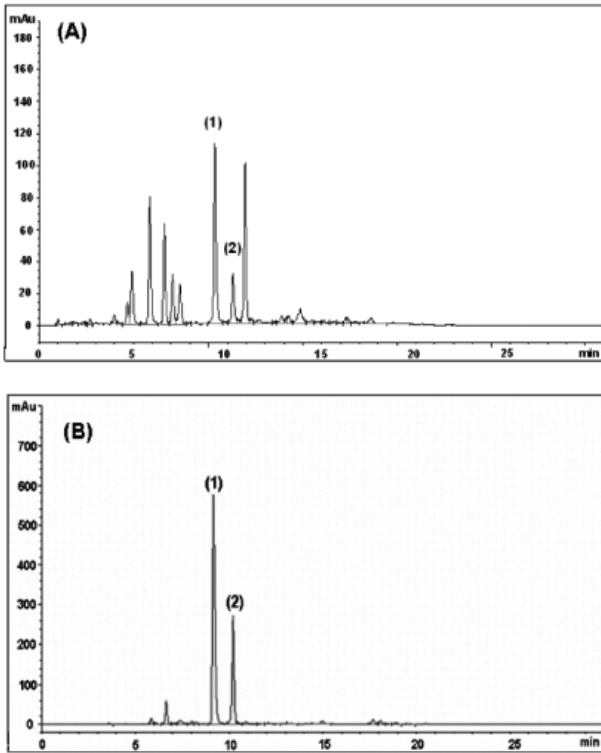


Figure 1. HPLC chromatogram of *Acanthopanax sessiliflorum* extract (A) and phenolic acid-rich (B). The peaks were identified as: chlorogenic acid (1), caffeic acid (2).

3.2. 항산화효과

3.2.1. 자유라디칼 소거효과

DPPH는 화합물 내 질소 중심의 radical로 free radical의 안정된 모델이다. 따라서 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제정도를 예측할 수 있다.

오가피에서 추출한 페놀산 분획의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 양성 대조군으로는 항산화 효과가 알려진 ascorbic acid와 DL- α -tocopherol (1000 IU/g, Sigma)을 이용하여 오가피에서 추출한 페놀산 분획의 항산화 효과를 비교하였다. 그 결과 free radical을 50 % 소거할 수 있는 농도 (IC₅₀)가 오가피에서 추출한 페놀산 분획은 3.43 ± 0.35 μ g/mL, ascorbic acid는 3.01 ± 0.16 μ g/mL, 그리고 DL- α -tocopherol은 18.31 ± 0.03 μ g/mL로 오가피에서 추출한 페놀산 분획은 ascorbic acid와는 유사한 정도의 효과를 보였으며, DL- α -tocopherol보다 약 2배의 소거효과를 나타내었다(Table 2).

Table 2. Antioxidative Effect of *Acanthopanax sessiliflorum* Stem Extract

Material	IC ₅₀ ^{a)} (μ g/mL)	
	DPPH assay	SOD-like assay
Phenolic acid rich	3.43 ± 0.35	158.91 ± 1.57
Ascorbic acid	3.01 ± 0.16	-
DL- α -tocopherol	18.31 ± 0.03	225.32 ± 4.27

^{a)}IC₅₀: Concentration of the sample required for 50 % the free radical or the reactive oxygen to be scavenged.

3.2.2. 활성산소 소거효과

Superoxide anion radical 소거활성 평가는 xanthine/xanthine oxidase 효소반응에 의한 활성산소 발생계를 이용하여 활성산소에 의한 NBT의 산화에 의한 흡광도 변화를 측정하였다. 양성 대조군으로 ascorbic acid와 DL- α -tocopherol을 이용하였다. 그 결과 superoxide radical을 50 % 소거할 수 있는 농도(IC₅₀)로 오가피에서 추출한 페놀산 분획은 158.91 ± 1.57 μ g/mL, DL- α -tocopherol은 225.32 ± 4.27 μ g/mL로 측정되었다(Table 2). 오가피에서 추출한 페놀산 분획은 DL- α -tocopherol보다 약 2배 정도의 reactive oxygen 소거효과를 나타내었다. DPPH radical 소거활성 등을 종합해 볼 때, 오가피에서 추출한 페놀산 분획은 지질 radical과 반응하는 primary 항산화제로서 매우 효과적임을 알 수 있었다.

3.3. 미백효과

3.3.1. Melanoma Cell의 생존율

오가피추출물의 B16 melanoma cell에서 세포독성측정과 더불어 실험농도를 결정하기 위하여 시료를 농도별로 처리하고, 72 h 후에 MTT 방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다. Figure 2에서 보는 바와 같이 오가피 조추출물, 오가피에서 추출한 페놀산 분획 그리고 chlorogenic acid에 의한 세포의 생존율은 200 μ g/mL에서도 75 % 이상의 생존력을 보였다. 따라서 200 μ g/mL 이하의 농도 범위에서 시료의 B16 melanoma cell에 대한 독성이 미미한 것으로 판단하고 이후 실험에서는 200 μ g/mL 이하의 농도에서 실험을 실시하였다.

3.3.2. Melanin 생성억제 효과

B16 melanoma cell은 마우스 유래의 멜라닌이라는 흑

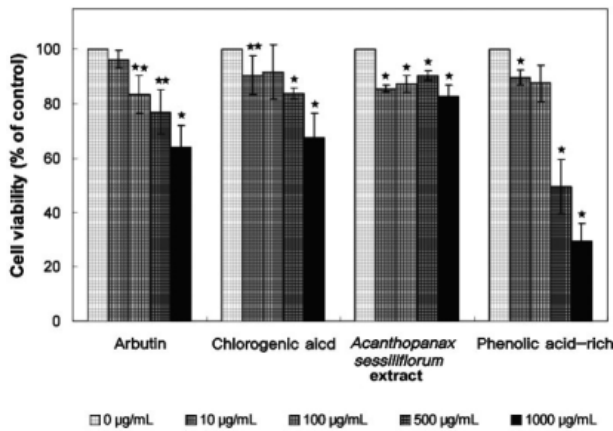


Figure 2. Effect of samples (*Acanthopanax sessiliflorum* extract, phenolic acid-rich, chlorogenic acid) on the viability of B16 melanoma cells. The cells were treated with various concentration of samples for 72 h. The results were expressed as the average of triplicate samples. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.1$ compared with control.

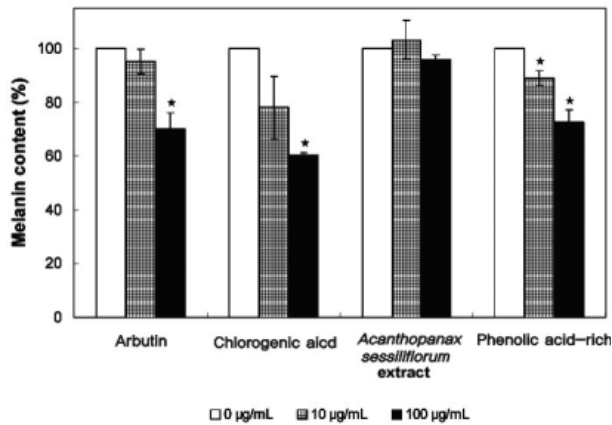


Figure 3. Inhibitory effect of samples (*Acanthopanax sessiliflorum* extract, phenolic acid-rich, chlorogenic acid) concentration on melanin content of B16 melanoma cells. After the treatment of samples for 72 h, melanin contents were measured at 405 nm. The results were expressed as the average of triplicate samples. * $p < 0.05$ compared with control.

색색소를 분비하는 세포로서 멜라닌을 생합성한다. 오가피 조추출물, 오가피에서 추출한 페놀산 분획, 그리고 chlorogenic acid가 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 B16 melanoma cell을 이용하여 멜라닌 함량을 측정된 결과를 Figure 3에 나타내었다. 오가피 조추출물은 멜라닌 생성 억제를 거의 하지 않았으며, chlorogenic acid 및 오가피에서 추출한 페놀산 분획은 농도의존적으

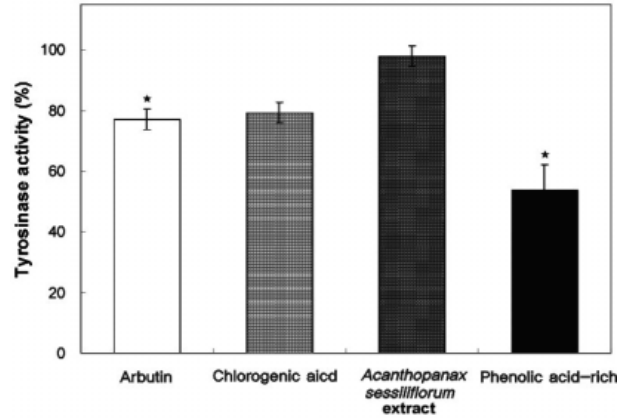


Figure 4. Inhibitory effect of samples (*Acanthopanax sessiliflorum* extract, phenolic acid-rich, chlorogenic acid, 100 µg/mL) on melanin content of B16 melanoma cells. After the treatment of samples (100 µg/mL) for 72 h, melanin contents were measured at 405 nm. The results were expressed as the average of duplicate samples. * $p < 0.1$ compared with control.

로 멜라닌 생성을 억제하여, 100 µg/mL에서 각각 $39.64 \pm 0.46 \%$, $27.26 \pm 2.65 \%$ 의 멜라닌 생성을 억제하였다. 즉, 양성대조군인 알부틴(100 µg/mL, $29.90 \pm 2.629 \%$) 보다 높은 멜라닌 억제효과를 갖는 페놀산을 주성분으로 하는 페놀산분획을 제조함으로써, 알부틴과 유사한 멜라닌 생성억제 효과를 보였다. 이 결과는 오가피에서 추출한 페놀산 분획은 멜라닌 생성을 줄이면서 세포독성이 낮아야 하는 미백제로서의 기준에 부합되는 것으로 판단되어진다.

3.3.3. 세포 내 Tyrosinase 활성 저해 효과

오가피 조추출물, 오가피에서 추출한 페놀산 분획 그리고 chlorogenic acid의 melanoma 세포에서의 tyrosinase 활성 저해 효과를 측정하여 Figure 4에 나타내었다. Tyrosinase는 Cu^{2+} 와 결합한 효소로 동식물, 미생물 및 사람 등에 널리 분포되어 있는 polyphenol oxidase로 멜라닌 합성과정에서 속도를 제한하는 등 멜라닌 합성의 주요한 조절적 단계를 나타내는 효소이다[20]. 이러한 멜라닌 합성에 관여하는 주요 효소인 tyrosinase에 대한 영향을 측정된 결과, 100 µg/mL에서 $97.86 \pm 3.46 \%$ (조추출물), $53.67 \pm 8.55 \%$ (페놀산 분획), $79.32 \pm 3.50 \%$ (chlorogenic acid)의 활성 저해율을 나타내었다. 오가피를 정제함으로써 얻은 페놀산 분획은 조추출물에 비하여 약 2배정도 활성 저해를 보여, 대조물질인 알부틴($77.02 \pm 3.42 \%$)보다 높은 저해율을 나타냄을 알 수 있었다.

이는 오가피에서 추출한 페놀산 분획이 세포 내 tyrosinase 활성을 저해함으로써 결과적으로 생성되는 멜라닌이 줄어들고 있다는 것을 알 수 있었다.

3.3.4. 멜라닌 합성 관련 단백질 발현에 미치는 영향

멜라닌 합성은 tyrosinase 효소뿐만 아니라 DOPAquinone을 dihydroxyindole carboxylic acid (DHICA)로 전환시키는 TRP-2와 DHICA를 indol-5,6-carboxylic acid로 전환시키는 TRP-1의 일련의 효소반응에 의하여 일어난다 [21]. 본 연구에서는 Western blot을 이용하여 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 오가피에서 추출한 페놀산 분획은 tyrosinase 발현을 현저히 저해하였으며, TRP-2의 발현도 약간 저해하는 것으로 나타났다(Figure 5). 그러나 페놀산 분획은 TRP-1의 발현량에는 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. 따라서 오가피에서 추출한 페놀산 분획은 멜라닌 생합성 경로에서 초기에 관여하는 tyrosinase의 활성을 직접적으로 억제할 뿐만 아니라 세포 내 tyrosinase 발현량을 감소시킴으로써 멜라닌 생성량을 감소시키는 것으로 판단된다. 또한, TRP-2도 어느 정도 저해된 것으로 보아 멜라닌 형성세포의 멜라닌 생성에 관여하는 세포 신호 전달이나 유전자 수준에서도 조절되는 것을 의미하며 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

3.4. 피부자극 평가

피험자 30명에 대하여 실시한 인체접촉시험의 검사 결과에 근거하여 48 h 및 72 h의 평균 반응도를 비교하였으며, 이를 기준으로 하여 그 결과를 판정한 결과, 오가피에서 추출한 페놀산 분획 1 %에 대한 피부반응도 (Means)는 0으로 대조군과 마찬가지로 무자극으로 판정되었다. 이는 세포독성과 같이 종합해 볼 때, 독성이 거의 존재하지 않는 안전한 소재임을 알 수 있었다. 향후 오가피에서 추출한 페놀산 분획물에 대한 인체시험을 진행함으로써 피부에서의 안전성을 검증할 예정이며, 안전성 외에 오가피에서 추출한 페놀산 분획물 함유 제품에 대한 피부 미백효능도 진행될 예정이다.

4. 결 론

오가피는 건강보조식품이나 화장품 등의 첨가제로 좋은 약재로 평가되고 있다. 본 연구에서는 오가피 조추출물을 Diaion HP20 column 분획을 이용하여 오가피 페놀

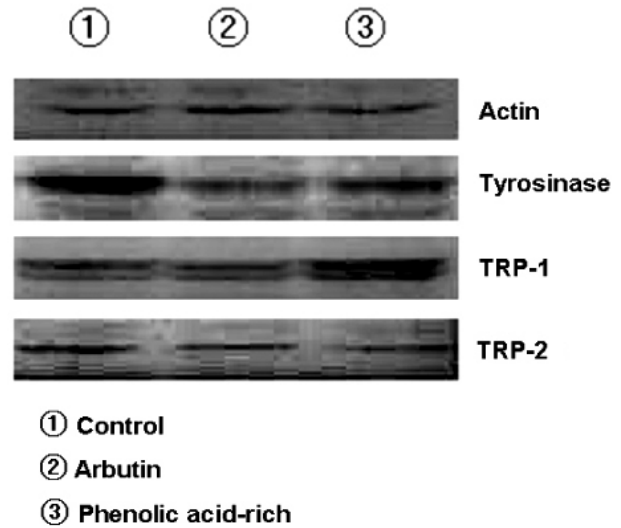


Figure 5. The effect of phenolic acid-rich on tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 protein expression in murine B16 melanoma cells. The cells were treated with phenolic acid-rich solution at 100 µg/mL for 72 h.

산 분획을 제조하여 항산화효과, 미백효과에 대한 평가를 통하여 향상된 화장품 원료로서의 가능성을 알아보았다.

오가피에서 추출한 페놀산 분획의 DPPH와 superoxide anion radical 소거효과는 처리농도가 증가함에 따라 농도의존적으로 소거효과를 나타내었으며, 각각 IC₅₀ 값이 3.43 ± 0.35 µg/mL, 158.91 ± 1.57 µg/mL로 우수한 항산화효과를 나타내었다. B16 melanoma cell에서는 농도의존적으로 멜라닌 생합성이 감소하였으며, 세포 내에 존재하는 tyrosinase의 활성은 100 µg/mL에서 53.67 ± 8.55 %로 대조물질인 알부틴(77.02 ± 3.42 %)보다 높은 저해율을 나타냄을 알 수 있었다. 또한 오가피에서 추출한 페놀산 분획의 멜라닌 생합성 저해 기전을 검정하기 위하여 melanoma cell에서의 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 발현량을 Western blot하여 측정한 결과 TRP-1의 발현량에는 영향을 미치지 않으나 tyrosinase 및 TRP-2의 발현량을 감소시킴을 확인할 수 있었다. 따라서 오가피에서 추출한 페놀산 분획은 멜라닌 생합성의 초기에 주요한 역할을 하는 tyrosinase의 활성 및 발현을 억제함으로써 멜라닌 생성을 감소시키는 것으로 사료된다. 또한 멜라닌 생성에 관련된 세포신호전달 경로를 저해함으로써 tyrosinase 및 TRP-2 등의 멜라닌 생성에 필요한 효소경로를 저해하는 것으로 보이므로, 향후 오가피에서 추출한 페놀산 분획은 피부자극 없이 미백효능의 기능성

원료로써 큰 가능성을 가지고 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2007년 지식경제부 지역연구진흥사업의 연구비 일부에 의하여 이루어진 것으로 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. K. Maeda and M. Fukuda, *In vivo* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**, 361 (1991).
2. E. V. Curto, C. Kwong, H. Hermersdorfer, H. Glatt, C. Santis, V. Virador, V. J. Hearing, and P. Dooley, Inhibitors of mammalian melanocytes tyrosinase: *In vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors, *Biochemical Pharmacology*, **57**, 663 (1999).
3. S. O. Ando, Y. S. Ando, and Y. Mishima, Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor, *J. Invest. Dermatol.*, **100**, 150 (1993).
4. 전국한의과대학 본초학교수, *본초학*, 283, 도서출판, Seoul (1994).
5. C. C. Zhou, Anti-inflammatory action of ethanol extracts from *Acanthopanax sessiliflorus*, *Zhong Yao Tong Bao*, **10**(10), 37 (1985).
6. L. K. Rabin and Y. Henkin, Age-related changes in the visual perception of phonologically significant contrasts, *Br. J. Audiol.*, **34**(6), 363 (2000).
7. Y. M. Wang, C. X. Chen, M. Ji, and K. H. Lin, A study of pharmacological actions of flos *Acanthopanax senticosi*, *J. Tradit. Chin. Med.*, **6**(4), 297 (1986).
8. B. E. Shan, K. Zeki, T. Sugiura, Y. Yoshida, and U. Yamashita, Chinese medicinal herb, *Acanthopanax gracilistylus*, extract induces cell cycle arrest of human tumor cells *in vitro*, *Jpn. J. Cancer Res.*, **91**(4), 383 (2000).
9. S. Lee, B. K. Kim, S. H. Cho, and K. H. Shin, Phytochemical constituents from the fruits of *Acanthopanax sessiliflorus*, *Arch. Planta Med.*, **25**(3), 280 (2002).
10. C. S. Yook, X. Q. Liu, S. Y. Chang, S. Y. Park, and T. Nohara, Lupane-triterpene glycosides from the leaves of *Acanthopanax gracilistylus*, *Chem. Pharm. Bull.*, **50**(10), 1383 (2002).
11. J. S. Kang, P. T. Linh, X. F. Cai, H. S. Kim, J. J. Lee, and Y. H. Kim, Quantitative determination of eletheroside B and E from *Acanthopanax* species by high performance liquid chromatography, *Arch. Pharm. Res.*, **24**(5), 407 (2001).
12. H. S. Kang, H. K. Song, J. J. Lee, K. H. Pyun, and I. Choi, Effects of acanthoic acid on TNF-alpha gene expression and haptoglobin synthesis, *Mediators Inflamm.*, **7**(4), 257 (1998).
13. M. S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958).
14. T. Noro, O. Yasushi, M. Toshio, U. Akira, and S. Fukushima, Inhibition of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3984 (1983).
15. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods*, **65**, 55 (1983).
16. P. R. Gordon, C. P. Mansur, and B. A. Gilchrest, Regulation of human melanocyte growth, dendricity and melanization by keratinocyte derived factors, *J. Invest. Dermatol.*, **92**(4), 565 (1989).
17. J. Pawelek, Melanoma cells in culture, *Methods Enzymol.*, **58**, 564 (1978).
18. P. J. Frosch and A. M. Kligman, The soap chamber test. A new method for assessing the irritancy of soaps, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **1**(1), 35 (1979).
19. CTFA Safety Testing Guideline: The Cosmetic, 20036, Toiletry and Fragrance Association, Inc., Washington, D. C. (1991).
20. T. N. Lopez, J. Tudela, R. Varon, and F. G. Canovas, Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway, *J. Biol. Chem.*, **267**, 3901 (1992).
21. V. J. Hearing and M. Jimenez, Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *Int. J. Biochem.*, **19**(12), 1141 (1987).