

# 三白草 에탄올추출물의 항산화능 및 피부 미백작용 연구

박대중<sup>#</sup>, 이장천<sup>\*</sup>

상지대학교 한의과대학 본초방제학교실

## A Study on the Antioxidative and Depigmentation Activities of the Ethanol Extract of Saururus Herba

Dae Jung Park<sup>#</sup>, Jang Cheon Lee<sup>\*</sup>

Department of Herbal Prescription, College of Oriental Medicine, Sangji University

### ABSTRACT

**Objectives :** The purpose of this study is to investigate the ethanol extract of Saururus Herba and their dermal bioactivity properties related to cosmeceuticals such as depigmentation and radical scavenging effect.

**Methods :** Using B16/F10 Melanin cells, we measured depigmentation effect of the ethanol extract of Saururus Herba. Antioxidant activities of the ethanol extract of Saururus Herba were determined by DPPH radical scavenging activity.

**Results :** The ethanol extract of Saururus Herba showed considerable radical scavenging activity(SC<sub>50</sub> : 25 µg/ml). Antioxidant activity is in a dose dependant manner. The ethanol extract of Saururus Herba down-regulated melanin synthesis effectively. B16 cells incubated with the ethanol extract of Saururus Herba showed reduces melanin formation and tyrosinase activity. The ethanol extract of Saururus Herba alone markedly suppressed melanin content and tyrosinase activity.

**Conclusions :** These results suggest that the ethanol extract of Saururus Herba is a potent depigmentation agent and it may be a candidate for antioxidant agent.

**Key words :** Saururus Herba, Antioxidative, Depigmentation

### 서 론

노화는 해부학적, 생화학적, 생리적, 행동적인 면을 포함한 모든 신체변화를 말하는 것으로 이러한 신체의 변화는 두뇌, 소화기계, 골격 등 모든 신체에서 일어나며<sup>1)</sup>, 특히 피부는 기능적, 구조적으로 변화

되어 노화를 시각적으로 나타내어 준다. 피부는 노화 과정에서 탄력 저하, 피지생성 감소, 수분 손실 증가, 각질세포 응집력 강화, 주름생성, 기미, 주근깨 등의 특징을 보인다<sup>2)</sup>. 피부는 항상 산소와 접촉하고 자외선에 노출되어 있어 활성산소종에 의한 피부의 광산화적 손상 위험이 항상 존재한다. 인간의 생체 내에

\* 교신저자 : 이장천, 강원도 원주시 우산동 660 상지대학교 한의과대학 본초방제학교실

· Tel : 011-9553-7878 · E-mail : jcl7788@sangji.ac.kr

# 제1저자 : 박대중, 강원도 원주시 우산동 660 상지대학교 한의과대학 본초방제학교실

· Tel : 011-9099-5124 · E-mail : inborn5124@hanmail.net

· 접수 : 2008년 5월 26일 · 수정 : 2008년 6월 13일 · 채택 : 2008년 6월 20일

서 필요한 에너지 공급을 위해 끊임없이 일어나는 생화학적 반응 과정에서 발생하는 활성산소는 자기 방어 기구인 생체 내 제거작용에 의해 대부분 소멸되지만, 이러한 활성산소가 정상적으로 소거되지 않았을 때, 유리기로 인한 산화적 스트레스가 생체 내에 가해지면 이들 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA, 효소 및 T세포와 같은 면역계통의 인자를 손상시켜 뇌졸중, 파킨슨씨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화 등과 같은 성인병과 암 등의 각종 질병을 일으키는 원인이 되고 있다<sup>3,4)</sup>. 성인병 질환의 원인이 활성산소에 기인된 것이라는 학설이 점차 인정되어짐에 따라 활성산소를 조절할 수 있는 물질인 항산화제의 개발 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>5)</sup>. 합성항산화제는 그 효과와 경제성, 안정성 때문에 많이 사용되고 있지만, 생체효소나 지방에 대한 변이원성 및 독성이 지적되면서 보다 안전하고 강한 효력을 가진 천연 항산화제의 개발이 절실히 요구되고 있으며<sup>6)</sup>, 솔잎과 녹차, 향신료 등의 추출물을 이용한 항균 및 항산화 효과가 보고되고 있다<sup>7)</sup>.

멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 멜라닌 세포의 멜라닌소체(melanosome)에서 합성되어 수상돌기를 통하여 표피의 각질화 세포로 이동되어 피부의 색을 나타내고, 자외선이나 외부자극 물질 등으로부터 피부를 보호하는 긍정적인 기능이 있는 반면, 과도한 색소 침착은 기미와 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하는 등 부정적인 기능을 나타내기도 한다<sup>8-10)</sup>. 멜라닌 생합성에 관여하는 인자로는 tyrosinase, dopachrome conversion factor, prostaglandin(PG), interferon(IFN), melanocyte stimulating hormone(MSH), Vit D3, histamine 등이 보고되어 있으며<sup>11)</sup>, 현재 tyrosinase 저해제로서 kojic acid와 albutin이 미백제로 많이 사용되나 세포독성, 돌연변이 유발 등의 부작용<sup>12)</sup> 등이 보고되고 있다. 따라서 피부에 안전하면서도 미백활성이 높은 새로운 물질의 개발이 요구되고 있다<sup>13)</sup>.

삼백초(*Saururus chinensis* Baill)는 삼백초과(Saururuaceae)에 속하는 다년생 초본으로 성질(性)은 차고(寒) 독성이 없으며(無毒) 맛(味)은 쓰고 맵다(苦辛). 귀경(歸經)은 폐(肺) 방광(膀胱)으로 가고, 효능은 청열이수(淸熱利水), 해독소종(解毒消腫)하며 거담(祛痰)한다<sup>14-16)</sup>. 삼백초의 약효로는 풍독(風毒), 이뇨(利尿), 수종(水腫), 임질(淋疾), 간염(肝炎), 황달(黃疸), 폐렴(肺炎), 변독(便毒), 고혈압(高血壓) 등의 치료효과가 있다<sup>17)</sup>.

근래 삼백초에 관한 연구로는 항산화 활성<sup>18)</sup>, 항균성<sup>17,19)</sup> 및 진통성분<sup>20)</sup> 등에 관한 연구가 있었고, 삼백

초의 피부의 미백작용에 대한 연구로는 이 등<sup>21)</sup>이 베타 타이로시네이즈 효소 활성을 억제한다고 보고하였다. 이에 본 저자는 피부의 생리활성을 위한 연구의 일환으로 삼백초의 에탄올추출물로 항산화능을 측정하고, B16흑색종세포를 DOPA염색을 통해 멜라닌과 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 관찰하여 피부 미백작용에 관한 검토를 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용된 삼백초는 신우약품사(서울)에서 구입한 국산 규격품을 정선하여 냉장실에 보관하면서 사용하였다.

#### 2) 시약

Dulbecco's Modified eagle medium(DMEM)은 Gibco사(New York, USA) 제품을, Fetal bovine serum(FBS)은 Hyclones사(Logan, UK) 제품을, Anti-Rabbit tyrosinase는 Santa Cruz사(California, USA) 제품을, Anti-Rabbit HRP antibody, Hybond-ECL Nitrocellulose membrane, Western Blotting detection reagent는 Amersham Biosciences사(London, UK) 제품을, Non-fat skim milk는 Becton사(New Jersey, USA) 제품을, Dimethylsulfoxide (DMSO),  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone( $\alpha$ -MSH), Bovine serum albumin (BSA), Phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF), Leupeptin, Aprotinin, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(TEMED), Catechol은 Sigma사(Missouri, USA) 제품을, protein assay 시약은 Bio-rad사(California, USA) 제품을 사용하였다.

#### 3) 사용기기

Centrifug HA-12, Clean Bench, CO2 incubator, Micro 17TR centrifuge는 한일기기사 제품을, ELISA reader는 Bio-TEK사(Vermont, USA) 제품을, Electrophoresis power supply는 Amersham Biosciences사(Buckinghamshire, UK) 제품을, ChemidocXRS image analysis는 Bio-rad사(California, USA) 제품을 사용하였다.

#### 4) 세포주 및 세포배양

한국세포주은행(서울대학교 의과대학)에서 분양받

은 B16/F10 멜라닌세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 10% 우태아혈청이 포함된 Dulbecco's modified eagle medium(Gibco BRL, Gaithersburg, MD; distributed by KDR biotech Co. Ltd., Seoul)으로 배양하였으며 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 삼백초 에탄올추출물을 처리한 후 생화학 및 분자생물학적 변화 실험을 수행하였다.

### 5) 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 여드름의 원인 균인 *Propionibacterium acnes* (KCCM41747)와 호기성 그람 양성 균주로 호흡기, 피부, 장관 등에 흔히 존재하는 상재균인 *Staphylococcus epidermidis*(KCTC1917)와 *Staphylococcus aureus* (KCTC1927)를 사용하였다.

### 6) 배지 및 배양 조건

*P. acnes*의 배양 배지는 GAM Broth(Nissui Seiyaku, Tokyo, Japan)를 사용하였으며 *P. acnes*는 4°C에서 보관하면서 실험 3일 전에 활성화 시켰다. 그리고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양 했다. 호기성 균주들은 nutrient broth(Difco, USA)를 사용하였으며, 균을 접종한 후 37°C에서 배양했다.

## 2. 방법

### 1) 시료의 추출물 제조

삼백초의 잎 200 g을 100% ethanol 2,500 ml에 넣고 상온에서 72시간 동안 추출하여 거즈로 여과한 후 그 추출액을 50°C에서 감압 농축하여 동결건조 하였다. 최종적으로 얻어진 추출물의 평균 회수율은 5.655% 정도였다. 얻어진 시료는 냉동보관 하였으며, 시료는 분주하여 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma Chemical Co., USA)에 녹여 사용하였다.

### 2) 세포 생존율 측정

세포생존율 측정은 세포 배양관(24-well)에 B16/F10 세포( $1 \times 10^4$  cells/well)를 1 ml씩 분주하여 24시간 이상 배양 후 삼백초 에탄올추출물을 다양한 농도로 처리한 다음, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 72시간 배양한 후, MTT 용액(5 mg/ml, PBS)을 배양액 최종부피의 1/10 되게 첨가하였다. 3시간 후 배양액을 제거하고, 형성된 formazan 침전물을 DMSO 1 ml로 녹여서 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) 세포의 형태학적 관찰

B16/F10 세포를 6 cm 배양용기에  $5 \times 10^4$  cells/ml씩 분주하여 세포를 부착시키고 삼백초 에탄올 추출물과  $\alpha$ -MSH(100 nM)을 각각 처리하여 배양한 후 B16/F10 세포의 수치상 돌기의 변화를 위상차도립현미경(inverted phase contrast microscope, Leica)를 이용하여 관찰하였다.

### 4) Tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Matinez-Esparza 등의 방법<sup>22)</sup>으로 측정하였다. 6-well 배양용기에 B16/F10 세포를  $8 \times 10^4$  cells/well 이 되도록 분주하여 24시간 동안 배양한 후, 삼백초 에탄올 추출물을 25, 50, 100  $\mu$ g/ml로 처리하고 60분 후에 100 nM  $\alpha$ -MSH를 처리했다. 이것을 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 5 mM EDTA가 포함된 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 1 ml에 1%(V/V) Trypton X-100과 0.1%(V/V) 0.1 M PMSF를 혼합한 lysis buffer를 200  $\mu$ l씩 분주한 후 세포를 수거하여 얼음에서 30분간 lysis 시켰다. 다음 4°C, 13,000 rpm에서 30분간 원심 분리 하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford 시약(Bio-Rad, USA)으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 동량의 단백질 양을 계산하였다. 계산된 단백질 양과 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8)의 총량이 150  $\mu$ l가 되도록 분주하고, 여기에 0.1% (W/V) L-DOPA (3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine)를 50  $\mu$ l씩 분주하였다. 37°C에서 1시간 동안 30분 간격으로 405 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

### 5) 멜라닌 합성 양의 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등의 방법<sup>23)</sup>을 변형하여 사용하였다. 직경 6 cm 배양용기에  $1.5 \times 10^5$  cells/dish 개씩 분주하여 24시간 배양한 후, 삼백초 에탄올추출물 25  $\mu$ g/ml를 처리하고 30분 후 100 nM,  $\alpha$ -MSH를 처리했다. 72시간 배양 후 세포를 수거하여 각 군당  $5 \times 10^3$ 개씩 취하였다. lysis buffer(5 mM EDTA, 0.1 M Sodium phosphate buffer(pH 6.8), 0.1% Triton X-100)로 세포를 용해하고 원심 분리하여 얻은 세포 침전물에 알코올을 가하여 세척한 후 건조시켰다. 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액으로 85°C에서 1시간 동안 멜라닌을 용해시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 6) DPPH 자유산소기 소거법에 의한 항산화 활성

항산화활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 을 이용하여 시료의 자유산소기 소거효과(radical scavenging effect)를 측정하는 Kweon 등의 방법<sup>24)</sup>을 활용하였다. 메탄올로 녹인 시료를 준비한 후, DPPH 약 2 mg을 methanol 15 ml에 녹여 0.3 mM의 DPPH용액을 제조하였다. 이 용액 12 ml에 DMSO 6.25 ml를 첨가한 후, 517 nm의 파장에서 대조군의 UV-Vis. 흡광도가 0.94-0.97이 되도록 methanol로 희석하여 10초간 진탕시켰다. 준비된 DPPH 450  $\mu$ l에 시료용액 50  $\mu$ l를 넣어 섞은 후 상온에서 10분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 7) Xanthine oxidase 저해활성 측정

50 mM phosphate buffer(pH 7.5) 2.9 ml에 삼백초 에탄올추출물 0.1 ml과 0.5 Unit/ml의 Xanthine oxidase를 0.2 ml를 넣어 상온에서 15분간 반응시킨 후, 0.15 mM의 Xanthine 2 ml를 넣어 상온에서 30분간 반응시킨 후, 1N HCl 1 ml을 넣어 반응을 종료시켰다. 이후 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 290 nm에서 측정하여 저해율을 구하였다.

## 8) 디스크 면역 확산법

삼백초 에탄올 추출물의 항균활성 평가는 디스크 면역 확산법을 이용하였다. *P. acnes* 균주를 GAM 액체배지에, *S. epidermidis*와 *S. aureus*는 Nutrient 액체배지에 각 균주의 single colony를 넣고 12시간 동안 배양 후 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. *P. acnes*는  $0.5(1 \times 10^9)$  cfu/ml로, *S. epidermidis*는  $0.3(2 \times 10^8)$  cfu/ml로, 그리고 *S. aureus*는  $0.3(8 \times 10^8)$  cfu/ml로 조절하여 평판배지에 균일하게 도말해 주었다. 삼백초 에탄올 추출물은 400 mg/ml 농도로 10% DMSO에 용해하여, 0.22  $\mu$ m filter로 여과하여 제공한 후 80% 에탄올로 희석하여 항균활성을 측정하였다. Paper disc( $\Phi$  8 mm, Adventec. USA)에 각각의 농도 별로 희석된 약제에서 40  $\mu$ l씩 분주하여 용매를 날린 후 균이 도말된 평판배지에 고착시켰다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 12~24시간 배양한 후 disc 주변의 clear zone 크기를 측정하여 항균활성으로 나타내었다. 대조군으로 80% 에탄올을 사용하였다.

## 9) 통계처리

실험 결과는 one way ANOVA test를 이용하여 p-value를 구하여 유의성을 검증하였다.

## 실험결과

### 1. 삼백초 에탄올추출물의 항산화 효과

#### 1) DPPH 라디칼 소거 활성 측정

삼백초의 에탄올추출물에 대해서 DPPH 라디칼 소거활성법을 이용하여 항산화 활성을 측정하여 보았다.

실험결과, 삼백초 에탄올추출물에서 처리농도에 따라 50  $\mu$ g/ml과 100  $\mu$ g/ml의 농도에서 각각  $59 \pm 1.0\%$ 와  $42 \pm 1.0\%$ 의 라디칼 소거활성(scavenging activity, SC)을 나타내 농도 의존적으로 DPPH의 자유산소기 소거 활성이 증가함을 보였다(Fig. 1).

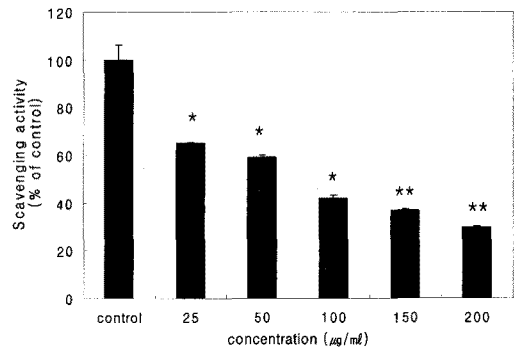


Fig. 1. DPPH radical scavenger activity with the ethanol extract of *Saururus Herba*

The values are expressed as percent(%) of control and each column represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments performed in triplicate (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

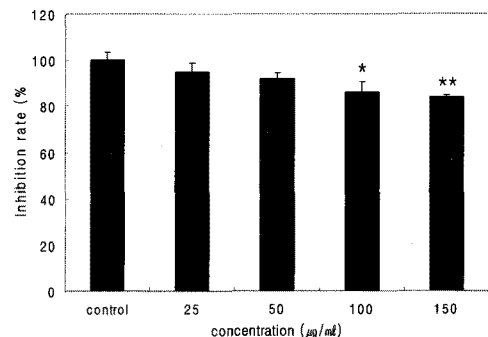


Fig. 2. Xanthine oxidase(XOD) inhibition activity of the ethanol extract of *Saururus Herba*.

Data are means  $\pm$  S.D. of three experiments performed in triplicate (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

#### 2) Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해는 통풍억제 및 자유산소기의 생성억제를 통해 생물학적으로 중요한 의미를 갖

는다. 삼백초 에탄올추출물의 xanthine oxidase 저해 활성을 검토해 본 결과, 저농도에서는 농도 의존적으로 약간의 활성을 나타냈지만, 뚜렷한 차이를 나타내지는 않았으나, 100  $\mu\text{g/ml}$ 과 150  $\mu\text{g/ml}$ 의 처리 농도에서 각각  $86\pm 4.7\%$ 와  $84\pm 0.1\%$ 의 xanthine oxidase 저해활성을 나타내었다(Fig. 2).

### 2. 삼백초 에탄올추출의 항균 효과

삼백초 에탄올추출물을 각 시험균주를 대상으로 미리 제조한 항균시험용 고체배지에 일정량 점적한 후에 항균활성을 조사하였다.

삼백초 에탄올추출물로 항균력을 측정한 결과 *Staphylococcus epidermidis*에서는 1 mg, 5 mg, 10 mg에서 각각 9 mm, 12 mm, 18 mm의 투명대를 형성하였고, *Staphylococcus aureus*에서는 5 mg과 10 mg에서 각각 16 mm와 20 mm의 투명대를 형성하였다. 그러나 여드름의 주된 원인균인 *Propionibacterium acnes* 균주에 대해서는 어떠한 농도에서도 투명대를 형성하지 않았다(Table 1).

Table 1. Antimicrobial Activities of the Ethanol Extract of *Saururus Herba* on the Pathogenic Bacteria

Bacteria \ Extract conc.(mg/disk)	Inhibition zone(mm)		
	1	5	10
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9	12	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	16	20
<i>Propionibacterium acnes</i>	-	-	-

### 3. 삼백초 에탄올추출물의 미백효과

#### 1) 세포 생존율(cell viability)에 미치는 영향

삼백초 에탄올추출물의 멜라닌세포인 B16 흑색종세포주의 생존율에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 삼백초 에탄올추출물을 B16세포( $1\times 10^4$  cells/well)에 12.5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 24시간 배양하여 MTT assay 방법으로 생존율을 측정하였다. 실험 결과 세포 생존율은 농도 의존적으로 지속적인 감소를 보였으며, 25  $\mu\text{g/ml}$ 과 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각  $67\pm 6.9\%$ 와  $37\pm 3.4\%$ 로 현저한 감소를 나타냈다(Fig. 3).

#### 2) 멜라닌세포의 형태학적 관찰

멜라닌세포는 수지상의 가지돌기를 통하여 인접한 각질형성세포와 연결하여 표피-멜라닌 단위(epidermal melanin unit)를 형성하는데, 이는 멜라노솜의 수송에

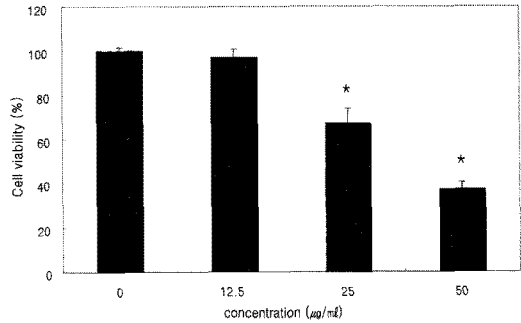


Fig. 3. Cell viability measured by MTT assay

Cell viability of B16 cells after treatment with ethanol extract of *Saururus Herba*, compared with control cells. The values are expressed as percent(%) of control and each column represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments performed in triplicate(\*  $p<0.05$ ).

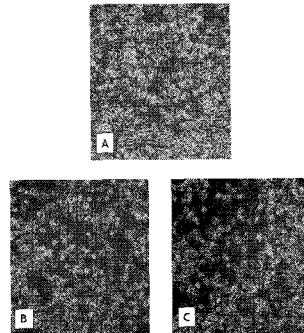


Fig. 4. Light micrographical observation of B16/F10 cells after treatment of the ethanol extract of *Saururus Herba*

Cells were incubated of the ethanol extract of *Saururus Herba*. After 48 hrs, cells were photographed with phase contrast inverted microscope. (A) Control, (B) Ethanol extract of *Saururus Herba* 12.5  $\mu\text{g/ml}$ , (C) Ethanol extract of *Saururus Herba* 25  $\mu\text{g/ml}$  ( $\times 200$ ).

중요한 역할을 하고 있다. 본 실험에서 삼백초 에탄올추출물이 수지상 가지돌기의 변화와 세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위하여  $5\times 10^4$  cells/ml의 B16 멜라닌 흑색종세포에 12.5  $\mu\text{g/ml}$ 와 25  $\mu\text{g/ml}$ 의 시료를 처리하여 48시간 배양하고 광학현미경으로 세포의 형태학적변화를 관찰하였다. 그 결과, 현미경적인 소견은 대조군에 비하여 세포증식은 감소되었으나, 피사나 세포손상 등의 독성을 나타내는 소견은 관찰되지 않았으며, 수지상 가지돌기를 감소시켰으며, 세포의 형태가 두꺼워졌다(Fig. 4).

#### 3) 멜라닌색소 정량

멜라닌은 멜라닌 세포의 세포소기관인 멜라닌소체(melanosome)에서 일련의 효소 반응에 의해 생성되

므로, 삼백초 에탄올추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 멜라닌세포주인 B16 세포에 삼백초 에탄올추출물 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 B16세포에 처리하여 72시간 동안 배양하고, 각 군당  $1 \times 10^6$  cells를 수집하여 멜라닌 양을 측정하였다.

실험결과 삼백초 에탄올추출물 처리군은 대조군의  $76 \pm 5.9\%$ 로 B16 흑색종세포에서 최종적인 산물인 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 5).

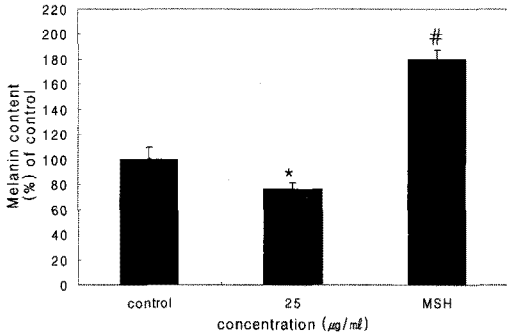


Fig. 5. Effect of the ethanol extract of *Saururus Herba* on melanin contents

Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/dish. After 24 hrs, cells were treated with 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of the ethanol extract of *Saururus Herba*. The values are expressed as percent(%) of control and each column represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments performed in triplicate. (#  $p < 0.01$  : compared with control, \*  $p < 0.01$  : compared with MSH)

4) 세포내 tyrosinase 활성 억제효과

멜라닌세포에서 멜라닌을 합성하는 주요기전은 tyrosinase가 tyrosine을 기질로 하여 DOPA를 DOPA quinone으로 전환시키는 DOPA oxidase로서 멜라닌 합성의 처음 두 단계 반응을 촉매하면서 시작된다.

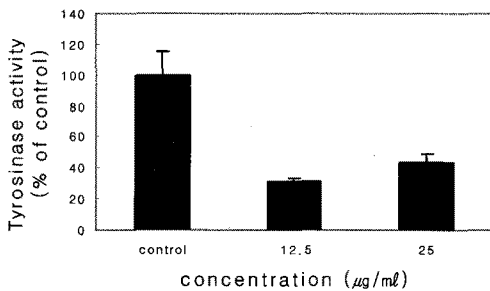


Fig. 6. Effect of the ethanol extract of *Saururus Herba* on tyrosinase activity in B16 melanoma cells

Cell were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/well. After 24 hrs, cells were treated of ethanol extract of *Saururus Herba* for 72 hrs. Data are expressed as percent(%) of control and each column represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments performed in triplicate.(\*  $p < 0.01$  : compared with control)

삼백초 에탄올추출물은 B16 흑색종세포에서 최종적인 산물인 멜라닌 생성이 억제된 것으로 나타나 멜라닌 합성에 관여하는 효소들의 활성과 관련성을 알아보기 위하여, 삼백초 에탄올추출물 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 B16세포에 처리하여 72시간 배양한 후 세포내 tyrosinase 효소 활성을 조사하였다. 실험 결과 삼백초 에탄올추출물의 tyrosinase 활성은 대조군에 비교하여 각각  $31 \pm 2.8\%$ ,  $43 \pm 5.4\%$ 로 tyrosinase 활성을 억제시키는 것으로 나타났다(Fig. 6).

5) DOPA 염색을 통한 형태학적 관찰

멜라닌세포는 일반적인 염색방법으로 염색되지 않으나 DOPA를 처리하면 멜라닌세포의 tyrosinase 효소에 의하여 산화되어 암갈색 침전물을 형성하므로써 DOPA염색을 통하여 관찰할 수 있다. 따라서 DOPA 염색을 이용하여 멜라닌세포내에 생성된 멜라닌 양을 형태학적으로 관찰하였다.

B16 흑색종세포는 DOPA 염색 시 양성 소견을 보였고, 삼백초 에탄올추출물 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 전처리한 군에서는 대조군에 비해 DOPA 염색의 강도가 현저히 약하게 나타났다(Fig. 7).

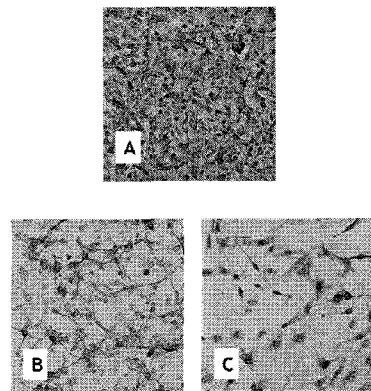


Fig. 7. Morphological findings of B16 cells of the ethanol extract of *Saururus Herba* by DOPA staining

All cells showed DOPA-positive ( $\times 200$ ). Cells were seeded at  $5 \times 10^4$  cells/well. (A) Control, (B) Ethanol extract of *Saururus Herba* 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (C) Ethanol extract of *Saururus Herba* 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 72 hrs.

고찰

피부는 표피, 진피 피하지방층으로 구성되어 있으며 표피는 각질층, 과립층, 유극층, 기저층으로 나누어져 있다. 기저층에는 melanocyte와 keratinocyte가 존재한다<sup>8)</sup>. 멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 멜라닌

세포의 멜라닌 소체(melanosome)에서 합성되어 수송 돌기를 통하여 표피의 각질화세포로 이동되어 피부의 색을 나타내고, 자외선이나 외부자극 물질 등으로부터 피부를 보호하는 긍정적인 기능이 있는 반면, 과도한 색소 침착은 기미와 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하며 피부암을 유발, 세포사멸 촉진 등 부정적인 기능을 나타내기도 한다<sup>3)</sup>.

최근에는 대기오염으로 인한 오존층의 파괴와 이에 따른 자외선의 유해성에 대한 관심이 증가하면서, 이로 인한 피부노화에 따른 피부색의 변화, 침착이 심해지고 있으며, 또한 미용적인 이유에서 피부 착색에 대한 관심이 고조되고 있다<sup>10)</sup>.

멜라닌 생합성에 관여하는 인자로는 tyrosinase, dopachrome conversion factor, prostaglandin(PG), interferon(IFN), melanocyte stimulating hormone (MSH), Vit D3, histamine 등이 보고되어 있다<sup>11)</sup>. 현재 tyrosinase 저해제로는 Hydroquinone, resorcinol 등의 phenol 유도체, L-ascorbic acid와 그 유도체 및 kojic acid, arbutin 등이 사용되고 있다<sup>25)</sup>. 이 중 kojic acid와 albutin은 미백제로 많이 사용되나 세포독성, 돌연변이 유발 등의 부작용<sup>12)</sup>이 최근 보고되고 있다. 따라서 피부에 안전하면서도 미백활성이 높은 새로운 물질의 개발이 요구되고 있으며, 때문에 최근 항산화작용을 가진 각종 천연물 및 화학물질을 건강식품 또는 의약품으로 개발하려는 노력이 증대되고 있다<sup>13)</sup>.

이에 본 연구에서는 삼백초를 이용하여 항산화 효과와 항균효과, 멜라닌 형성에 어떠한 영향을 미치는지 검토하였다.

삼백초(*Saururus chinensis* Baill)는 삼백초과(Saururuaceae)에 속하는 다년생 초본으로 잎과, 꽃 및 뿌리가 백색을 띠므로 삼백초(三白草)라고 하며, 천성초(天性草)라 불리기도 한다. 삼백초는 우리나라, 중국 및 일본 등지에 분포하며, 우리나라에서는 제주도 및 남부지방에서 자생 및 재배되고 있으며<sup>26)</sup>, 성질(性)은 차고(寒) 독성이 없으며(無毒) 맛(味)은 쓰고 맵다(苦辛). 귀경(歸經)은 폐(肺) 방광(膀胱)으로 가고, 효능은 청열이수(淸熱利水), 해독소종(解毒消腫)하며 거담(祛痰)한다<sup>14-16)</sup>. 삼백초의 약리작용으로는 풍독(風毒), 이뇨(利尿), 수종(水腫), 임질(淋疾), 간염(肝炎), 황달(黃疸), 폐렴(肺炎), 변독(便毒), 고혈압(高血壓) 등의 치료효과가 있다. 삼백초 전초에는 정유가 함유되어 있고, 주성분은 quercetin, quercetrin, isoquercitrin, rutin 및 수용성 tannin 등으로 이에 대해 비교적 상세히 보고되어있다<sup>17-30)</sup>.

최근 산화적 스트레스에 기인한 많은 종류의 질병

이 발생되고 있으며<sup>27)</sup>, 이와 관련하여 우수한 항산화 활성을 갖는 물질에 대한 탐색연구가 활발히 진행되고 있다. 현재 널리 사용되고 있는 BHA(butylated hydroxy hydroxy anisole)와 TBHQ(2-tert-butyl hydroquinone)는 폐놀계 합성 항산화제로, 그 효과와 경제성 때문에 많이 사용되어왔지만 이들은 50 mg/kg/day 이상의 고 용량으로 장시간 복용 시 지질대사의 불균형과 암을 유발시킬 수 있기 때문에 이들의 사용을 제한하고 있는 실정이다<sup>28)</sup>. 그러므로 이러한 합성산화제를 대체시킬 수 있는 안전하고 우수한 천연항산화제의 개발이 시급하게 요구되고 있으며, 그에 따른 연구가 활발히 이루어지고 있다<sup>17,28)</sup>.

DPPH는 radical을 갖는 물질 중에서 비교적 안정한 화합물로 EtOH에서 보라색으로 발색된다. 그러나 항산화 활성을 갖는 물질을 만나면 항산화 활성물질이 DPPH의 radical을 소거시켜 보라색을 잃어 탈색되며 UV측정 시 그 수치도 낮아진다<sup>9)</sup>. 또한 실제 항산화 활성과도 연관성이 매우 높은 장점이 있는 방법이며 전자공여 작용은 활성 라디칼에 전자를 공여하여 지방질 산화를 억제시키는 척도로 사용되고 있고, 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 작용의 척도로도 이용되고 있다<sup>29)</sup>.

Xanthine oxidase는 모든 purine의 terminal oxidation에서 rate-limiting enzyme으로 작용하며 superoxide radical이나 hydrogenperoxide와 같은 산화제의 source로서 작용하는 효소이다<sup>30,31)</sup>. Xanthine oxidase 분자는 네 개의 redox-active site를 포함하고 있으며, 여기에는 molybdenum, flavin adenosine dinucleotide (FAD), 한 쌍의 ferridoxin type의 iron-sulfur center가 있다. NADH를 제외한 purine은 xanthine oxidase의 molybdenum site에서 작용하고, 반면에 oxygen은 flavin site에 작용 한다<sup>10,11)</sup>. 분자상의 산소를 수소수용체로 이용하여 xanthine을 uric acid형으로 산화하는 반응을 촉매하며, uric acid는 통풍의 원인이 되기도 한다<sup>32)</sup>. Xanthine oxidase 저해는 통풍억제 및 자유산소기의 생성억제를 통해 생물학적으로 중요한 의미를 갖는다.

이에 본 연구에서 DPPH 라디칼 소거 활성법을 이용하여 삼백초 에탄올추출물의 항산화 활성을 측정 한 결과, 농도 의존적으로 항산화효과를 나타내었다. Xanthine oxidase 저해활성 또한 농도 의존적으로 활성을 나타냈다. 이는 삼백초 에탄올추출물은 항산화능을 갖고 있으며, 천연항산화제로 활용할 수 있는 의미가 있다고 할 수 있다.

여드름은 다양한 피부병변을 나타내는 모낭 피지선의

염증성 질환으로 사춘기와 젊은 연령층에 흔히 발생한다<sup>33)</sup>. 여드름의 원인으로는 피지의 과다분비, 비정상적인 모낭각화, 및 그로 인한 모공폐쇄, *Propionibacterium acnes*의 증식 등이 있다<sup>34)</sup>. 염증성 여드름의 치료에 주로 사용되는 항생제는 tetracycline, clindamycin, erythromycin 등이며 장기간 항생제를 사용할 경우 내성이 생겨 치료 효과가 떨어질 수 있다<sup>35)</sup>. 최근 천연 항균 물질에 대한 관심이 증가하면서 이에 대한 연구가 다양하게 수행되고 있고, 차나무 기름<sup>36)</sup>, 삼백피, 오미자 등의 *Propionibacterium acnes*에 대한 항균활성이 보고되어 있다. 삼백초 에탄올추출물의 항균활성으로는 이 등이 삼백초 에탄올 추출물 1 mg/disc에서 *Staphylococcus aureus*에 대하여 항균력을 나타냈다고 보고하였다<sup>21)</sup>. 이에 본 연구에서는 여드름의 원인균인 *Propionibacterium acnes*와 호기성 그람 양성 균주인 *Staphylococcus epidermidis*와 *Staphylococcus aureus*의 세 가지 균주에 대한 삼백초 에탄올추출물의 항균활성을 살펴보았다. 삼백초 에탄올추출물은 *Propionibacterium acnes* 균주에 대해서는 항균성을 나타내지 않았고, *Staphylococcus epidermidis* 균주는 5mg/disc에서 그리고 *Staphylococcus aureus* 균주는 1mg/disc에서 항균성을 나타냈다.

멜라닌은 인체 내에서 표피 이외에 진피 점막상피, 모낭 망막, 포도막, 연수막, 내이 및 기타 조직에서도 관찰되며, 멜라닌 세포 주변의 섬유아세포, 각질형성 세포, 내피세포 등에서 분비되는 많은 내적 환경 요소의 작용에 의해 멜라닌 세포의 기능에 변화를 주어 생성된다. 특히 각질형성세포에서 분비된 여러 인자가 멜라닌 세포의 성장과 형태 및 분화에 영향을 미치며 궁극적으로 피부의 색소 침착에 영향을 미친다<sup>38)</sup>. 멜라닌은 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase 효소에 의하여 DOPA, DOPAquinone으로 전환되고 이는 다시 DOPochrome, DHI나 DHICA를 형성하고 최종적으로 중합반응에 의하여 멜라닌 polymer를 형성하는 것으로 알려져 있다. 이 과정 중 초기 두 단계의 반응이 tyrosinase의 촉매작용을 통하여 일어나며, 일단 반응이 개시되면 매우 빠르게 진행된다. 따라서 멜라닌세포에서의 tyrosinase활성은 피부 멜라닌 생성에 결정적으로 영향을 미치게 되고, 피부 멜라닌 생성 억제제 개발에 있어서 tyrosinase 활성 억제제는 매우 큰 의미를 갖게 된다<sup>37,38)</sup>.

피부색소질환과 멜라닌 합성은 밀접한 관계가 있으며, tyrosinase는 직접적으로 멜라닌 합성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 삼백초가 피부의 멜라닌 합

성과정에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 B16 흑색종세포를 이용하여 다양한 실험을 시행한 결과, 삼백초 에탄올추출물은 멜라닌 형성에 중요하게 작용하는 tyrosinase의 활성과 최종적으로 생성되는 멜라닌 양을 억제하였으며, 또한 세포에 대한 독성효과가 있는지 관찰한 결과 B16 흑색종세포의 증식이 약간 감소되었다.

아울러 삼백초 에탄올추출물의 효과를 세포의 형태학적인 관찰을 통하여 확인하기 위하여 DOPA 염색을 시행한 결과, 삼백초 에탄올추출물 처리군은 대조군에 비해 DOPA 염색 양성의 강도가 감소되었다. 이는 삼백초 에탄올추출물이 tyrosinase 활성을 억제함으로써 멜라닌 형성을 억제시키는 것으로 추정된다.

이상의 결과를 종합하면 삼백초 에탄올추출물은 항산화 효능이 있으며, B16 흑색종세포의 tyrosinase 활성과 수지상 가지돌기의 형성 억제를 통하여 멜라닌의 생성을 감소시켜 효과적인 미백효능을 나타냈다. 따라서 삼백초 에탄올추출물은 미백기능성 피부 생리활성 효능 소재로서 앞으로도 멜라닌 합성 억제 효과에 대한 더욱 정확한 작용기전과 응용방법의 개발 등 더욱 체계적이고 심도 있는 연구가 필요하리라 사료된다.

## 결론

피부의 생리활성 물질 탐색을 위한 연구의 일환으로 삼백초 에탄올추출물로 항산화능을 측정하고, 멜라닌 합성 조절 기전에 미치는 영향을 조사하고자 B16/F10 세포를 이용하여 멜라닌과 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 삼백초 에탄올추출물은 농도 의존적으로 DPPH의 자유산소기 소거 활성이 증가하였다.
2. 삼백초 에탄올추출물의 xanthine oxidase 저해 활성은 농도 의존적이었지만, 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다.
3. 삼백초 에탄올추출물은 *Staphylococcus epidermidis*와 *Staphylococcus aureus*에서 항균력을 나타내었으나 *Propionibacterium acnes* 균주에 대해서는 항균력을 나타내지 않았다.
4. 삼백초 에탄올추출물의 세포 생존율은 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 67±6.9%와 37±3.4%로 현저한 감소를 나타냈다.



5. 삼백초 에탄올추출물은 세포내 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 나타났다.

이상의 결과 삼백초 에탄올추출물은 항산화 효능과 tyrosinase 활성과 수지상 가지돌기의 형성 억제를 통하여 멜라닌 생성을 감소시키는 미백효능을 보였으나, 삼백초 에탄올추출물이 미백기능성 피부생리 활성 효능 소재로서 개발되기에는 멜라닌 합성 억제 효과에 대한 작용기전과 응용방법 등의 연구가 필요하리라 사료된다.

### 참고문헌

1. 김숙희, 김화영, 노화, 민음사, 1997.
2. 김기연, 고해정, 김광욱, 김연주, 장문정, 피부관리학, 수문사, 1997.
3. Park YJ, Kim HJ, Heo BG. Anti-microbial, Anti-oxidant and Anti-inflammation Effects with of the Flower and the Young Seaf Extracts in Oriental Cherry Plants. 한국식물 · 인간 · 환경학회지. 2007 ; 10(1) : 43-9.
4. Halliwell B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? Drugs. 1991 ; 42(4) : 569-605.
5. Rehman Z, Habbib F, Shah WH. Utilization of potatopeels extract as a natural anti-oxidant in bean oil. Food Chemistry. 2004 ; 85 : 215-20.
6. Branen AL. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. J Am Oil Chem Soc. 1975 ; 52(2) : 59-63.
7. Jeong GT, See KM, Park DH. Study of Antimicrobial and Antioxidant Activities of Rumex crispus Extract. Korean Chem Eng Res. 2006 ; 44(1) : 81-6.
8. Chenm JS, Wei C, Marshall MR. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. J Agric Food. 1991 ; 39 : 1887-1901.
9. Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishiyama S. Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1(TRP 1) dopachrome tautomerase(TRP 2) and a melanogenic inhibitor. J Invest Dermatol. 1993 ; 100 : 126.
10. Maeda K and Fukuda M. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in

human melanocytes. J Soc Cosmet Chem. 1991 ; 42 : 361-8.

11. Imokawa G, Mishima Y. Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glucosylation inhibitors within malignant melanoma cells. Cancer Res. 1982 ; 42(5) : 1994-2002.

12. Duncan CL, Foster EM. Effect of sodium nitrite, sodium chloride, and sodium nitrate on germination and outgrowth of anaerobic spores. Appl Microbiol. 1968 ; 16(2) : 406-11.

13. Ryu CK and Hwang MK. Immune Supression and Stimulation of Antioxidants 2- Effect of Propyl gallate on Murine Cell Mediated Immune Functions. Kor J Food Hygiene. 1990 ; 5(2) : 41-8.

14. 전국한외과대학 본초학교수, 본초학. 서울 : 영림사. 2004 : 371-2.

15. 국가중의약관리국 중화본초편찬위원회. 중화본초. 상해 : 상해과학기술출판사. 1999 ; 3권. 419-20.

16. 정보섭 외 1인. 향약대사전. 서울 : 영림사. 1990 : 812-4.

17. Koh MS. Antimicrobial Activity of Saururus chinensis Baill Extract. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2004 ; 33(7) : 1098-105.

18. Cho HY, Cho CW, Song YS. Antioxidative and Anti-Inflammatory Effects of Saururus chinensis Methanol Extract in RAW 264.7 Macrophages. J Med Food. 2005 ; 8(2) : 190-7.

19. Kwak JW, Kwon CH. Pharmacological Studies on Saururus Chinensis Baill. Bull KH Pharma Sci. 1988 ; (16) : 137-54.

20. 박시경 외. 삼백초의 진통성분. 약학회지. 1998 ; 42(3) : 238-42.

21. 이진태, 정수현, 조우아, 강보연, 최은영, 정연숙, 손애량. 백출과 삼백초를 이용한 기능성 한방화장품 소재에 관한 연구. 한약응용학회지. 2005 ; 5(1) : 7-14.

22. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, Garcia-Borron JC. Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. Eur J Biochem. 1998 ; 255 : 139-46.

23. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1a, 25-dehydroxyvitamin D3

- and retinoic acid. *Cancer Res.* 1985 ; 45(4) : 1474-8.
24. Kweon MH. Hwang HJ. Sung HC. Identification activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo(*Phyllostachys edulis*). *J Agric Food Chem.* 2001 ; 49(10) : 4646-55.
25. Fox JB Jr. Thomsom JS. The Formation of green Heme pigments from metmyoglobin and methemoglobin by the action of nitrite. *Biochemistry.* 1964 ; 3 : 1323-8.
26. 이영노. 한국식물도감. 향문사. 1997 : 252.
27. Yagi K. Lipid peroxides and human disease. *Chem Phy Lipids.* 1987 ; 45 : 337-47.
28. Branen AL. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. 1975 ; 52(2) : 59-63.
29. Aber W. Anderson KE. White IR. Should patch testing be restricted to dermatologists only. *Contact Dermatitis.* 1993 ; 28 : 1.
30. Kennedy TP. Rao NV. Hopkins C. Pennington L. Tolley E. Hoidal JR. Role of Reactive oxygen species in Reperfusion injury of the rabbit lung. *J Clin Invest.* 1989 ; 83 : 1326-35.
31. Nelson CA. Philip H. Preparation of bovine xanthine oxidase and the subunit structures of some iron flavoproteins. *J Biol Chem.* 1968 ; 243 : 5368-73.
32. Hatano T. Tasuhara T. Rukuda T. Noro T. Okuda T. Phenolic constituents of licorice. II. Structures of licopyranocoumarin, licoaryl coumarin and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase. 1989 ; 37(11) : 3005-9.
33. Winston MH. Shalita AR. Acne vulgaris, ptogenesis and treatment. *Pediatric clinics of North America.* 1991 ; 38 : 889-903.
34. Kearney JK. Hamby D. Gowland G. The follicular distribution and abundance of resident bacteria on human skin. *J Gen Microbiol.* 1984 ; 130 : 797-801.
35. Bassett IB. Pannowitz DL. Barnetson RS. A comparative study of tea tree oil versus benzoyl peroxide in the treatment of acne. *Med J.* 1990 ; 153 : 455-8.
36. Yoo JY. Park SG. Hwang IA. Joe SJ. Huh CH. Youn SW. Park KC. A Clinical study on the effect of a containing *Ranulus Mori* extract and Tea tree oil on acne vulgaris and aerobic skin flora. *Kor J Dermatol.* 2003 ; 41(9) : 1136-41.
37. Kuzumaki T. Matsuda A. Wakamatsu K. Ito S. Ishikawa K. Eumelanin biosynthesis is regulated by coordinate expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 genes. *Exp Cell Res.* 1993 ; 207(1) : 33-40.
38. Jimbow K. Gomez PF. Toyofuku K. Chang D. Miura S. Tsujiya H. Park JS. Biological role of tyrosinase related protein and its biosynthesis and transport from TGN to stage I melanosome. late endosome, through gene transfection study. *Pigment Cell Res.* 1997 ; 10(4) : 206-13.