

선학초 추출물의 멜라닌합성 억제 및 항산화효과

김대성¹ · 김영목^{2,3} · 우원홍^{1,3} · 문연자^{4,*}

1: 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 2: 한의과대학 병리학교실, 3: 한국전통의학연구소, 4: 한의과대학 해부학교실

Study of Inhibitory Effect of Melanogenesis and Antioxidant Activity of *Agrimonia pilosa* Ledeb.

Dae Sung Kim¹, Yeong Mok Kim^{2,3}, Won Hong Woo^{1,3}, Yeun Ja Mun^{4,*}

1: Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine,

2: Department of Oriental Pathology, College of Oriental Medicine,

3: Research Center of Traditional Korean Medicine, 4: Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The purpose of this study was to investigate the mechanism of ethanol extract of *Agrimonia pilosa* Ledeb. (EAP)-reduced melanogenesis and diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity. *Agrimonia pilosa* Ledeb., a perennial herbaceous plant, has been used as an antihemorrhagic, anthelmintic, and antiinflammatory agents in Chinese herbal medicine. In the present study, we observed that melanin synthesis and tyrosinase activity of B16F10 cells were significantly decreased by EAP. However, EAP could not suppress tyrosinase activity in the cell-free system, whereas kojic acid directly inhibited tyrosinase activity. Furthermore, EAP decreased the protein expression of tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1), and tyrosinase-related protein 2 (TRP-2). EAP scavenged DPPH radical up to 41% with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration. These results suggest that the hypopigmentary effect of EPA was due to regulation of tyrosinase protein.

Key words : *Agrimonia pilosa* Ledeb., melanogenesis, DPPH, TRP-1, TRP-2

서 론

태양에 노출된 피부는 자외선으로 인해 활성산소 생성이 촉진되고 과도한 활성산소는 피부노화를 일으키는 원인이 되기도 한다. 또한 멜라닌세포에서 멜라닌의 합성이 증가되고 합성된 멜라닌은 자외선을 차단하여 피부를 보호하는 이로운 작용을 하기도 한다. 그러나 과도한 멜라닌 생성이나 분포의 이상으로 인해 기미, 주근깨 및 피부반점이 형성되고 피부노화 및 피부암 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁻³⁾.

Tyrosinase 효소는 멜라닌 합성의 속도조절단계인 tyrosine 기질을 DOPA로 전환 및 이후 DOPA quinone으로의 전환을 매개한다⁴⁾. 따라서 tyrosinase 활성 억제제를 찾는 연구가 미백제의 개발에 있어서 중요한 부분을 차지하고 있으며, 지금까지 알려진 tyrosinase 억제제로는 L-tyrosine과 경쟁적으로 작용하는 알부틴

⁵⁾, tyrosinase 활성 부위의 copper를 chelation하여 tyrosine에서 DOPA로 그리고 DOPA에서 DOPA quinone으로 진행되는 과정을 저해하는 kojic acid가 있다⁶⁾. 또한 fatty acid, glucosamine과 tunicamycin 같은 물질들은 tyrosinase의 glycosylation을 저해하여 tyrosinase의 성숙을 방해함으로써 멜라닌합성을 억제하고, 미성숙 tyrosinase는 ubiquitin-proteasome 경로를 통해 분해된다^{7,8)}. Sphingosylphosphorycholine은 ERK를 활성화시켜 microphthalmia-associated transcription factor(MITF)의 분해를 유도함으로써 멜라닌합성을 조절한다고 하였다⁹⁾.

선학초(仙鶴草, *Agrimonia pilosa* Ledeb.)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 짙신나물의 전초로서 용아초, 황아초, 지선초, 짙신나물 등으로 부르기도 한다. 선학초는 예로부터 폐암, 간암, 식도암, 토혈, 혈뇨, 자궁출혈 등에 이용되어 왔으며¹⁰⁾, 주요 성분으로는 전초에 agrimonin, agrimonolide, tormentic acid, ellagic acid 등이 있고, 잎과 줄기에는 luteolin-7-glucoside가 함유되어 있음이 알려져 있다¹¹⁾. 최근 연구에서는 항바이러스 효과¹²⁾, 당뇨치료 효과¹³⁾, 혈관이완 효과¹⁴⁾, 항균효과^{15,16)} 등이 보고되었고, 또한 선

* 교신저자 : 문연자, 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학

· E-mail : yjmun@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6942

· 접수 : 2010/02/18 · 수정 : 2010/03/11 · 채택 : 2010/04/07

학초의 isocoumarin은 간암 세포주의 생육을 억제하며, 간세포 독성에 대한 보호 작용이 있음이 밝혀졌다¹⁷⁾. 본 연구는 선향초 에탄올 추출물이 B16F10 세포에서 tyrosinase 활성과 멜라닌합성에 대한 조절 메커니즘과 DPPH 라디칼 소거 효능을 나타내는지 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시료 추출

실험에 사용된 선향초는 (주)유니허브에서 구입한 것으로 경북 영천에서 재배된 것을 사용하였다. 선향초 200 g에 100% 에탄올 2 L를 가하여 3일 동안 실온에서 추출하였고, 침전물을 여과한 후 감압 농축 하여 4.63 g(수율 2.32%)의 시료를 얻었다. 시료는 냉동실에 보관하였으며 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다.

2. 시약

Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS)은 Gibco(NY, USA)사 제품을, tyrosinase, TRP-1, TRP-2는 Santa Cruz(CA, USA)사 제품을, anti-Goat, anti-Rabbit anti-Mouse IgG HRP conjugate antibody는 ZYMED(CA, USA)사 제품을, hybond-ECL nitrocellulose membrane는 Amersham Biosciences(Buckinghamshire, England)사 제품을, western blotting detection reagent는 iNtRON(seongnam, korea)사 제품을, non-fat skim milk는 Becton(Le Pont de Claix, France)사 제품을, dimethylsulfoxide(DMSO), phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF), leupeptin, aprotinin, N,N,N',N' tetramethylethylenediamine (TEMED), thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT), L-3,4-dihydroxyphenyl alanine(L-DOPA)은 Sigma사 제품을, 단백질 정량 시약은 Bio-Rad(CA, USA)사 제품을 사용하였다.

3. 세포주 배양

B16F10 세포는 5% fetal bovine serum(FBS)과 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin B를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)을 사용하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

4. 세포 생존율 측정

세포생존율 측정은 Mosmann의 방법¹⁸⁾에 의하여 실시하였다. 24-well 배양 용기에 B16F10 세포를 7×10³ 개씩 분주하고 24시간 배양 후 선향초 에탄올추출물을 여러 농도로 처리한 다음 37°C, 5% CO₂ 하에서 1일간 배양하였다. 배양 후 최종 농도 0.5 mg/ml로 MTT 용액을 넣어 3시간 배양한 다음 상층액을 제거하고, 형성된 formazan을 DMSO(1 ml)로 녹여서 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 등의 방법¹⁹⁾으

로 측정하였다. 6-well 배양용기에 B16F10 세포를 각각의 well 당 8.5×10⁴ 개씩 분주하여 24시간 배양한 후, 선향초 에탄올추출물을 25, 50 µg/ml로 처리하고 3일간 배양한 후 PBS로 2회 세척하고, 5 mM EDTA가 포함된 0.1 M sodium phosphate buffer(SPB, pH 6.8) 1 ml에 1%(V/V) Triton X-100과 0.1%(V/V)의 0.1 M PMSF를 혼합한 lysis buffer를 200 µl씩 분주하고 세포를 수거하여 얼음에서 30분간 용해시킨 다음 4°C, 15,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford 시약으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 동량의 단백질 양을 계산하였으며, 계산된 단백질과 0.1 M SPB의 총량이 150 µl가 되도록 분주 하고 0.1%(W/V) L-DOPA를 50 µl씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시켰으며, 30분 간격으로 405 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

6. Cell-free tyrosinase 활성 측정

B16F10 세포를 10 cm 배양용기에 3×10⁵ 개씩 분주하여 4일간 배양하여 세포를 수거하고, 5 mM EDTA가 포함된 0.1 M sodium phosphate buffer(SPB, pH 6.8) 1 ml에 1%(V/V) Triton X-100과 0.1%(V/V)의 0.1 M PMSF를 혼합한 lysis buffer로 용해하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성 측정에 사용하였다. 이 상층액에 선향초 에탄올추출물을 농도별로 처리한 후 L-DOPA를 넣고 37°C에서 30분 간격으로 1시간동안 405 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

7. 멜라닌 합성양의 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등의 방법²⁰⁾을 변형하여 사용하였다. 직경 6 cm 배양용기에 1.5×10⁵ 개씩 분주하여 24시간 배양한 후, 선향초 에탄올추출물 25, 50 µg/ml씩 처리한 다음 3일간 배양하였으며, 각 군당 2×10⁶ 개씩 수거하여 lysis buffer(5 mM EDTA, 0.1 M SPB(pH 6.8), 1% Triton X-100)로 세포를 용해하였다. 원심분리 하여 얻은 세포 침전물은 알코올로 세척한 후 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액으로 90°C에서 1시간 용해하여 405 nm로 흡광도를 측정하였다.

8. Western blot 분석

B16F10 세포를 10 cm 배양용기에 3×10⁵ 개씩 세포를 부착시키고 25, 50 µg/ml씩 선향초 에탄올추출물을 처리하고 3일 동안 배양하였다. 배양된 세포를 모두 수거하여 lysis buffer(1× RIPA buffer 1 ml, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM DTT)로 30분간 용해시킨 후, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 단백질은 Bradford 시약을 이용하여 정량하였고, 계산된 단백질과 2× sample buffer(1 ml glycerol, 0.5 ml β-mercaptoethanol, 3 ml 10% SDS, 1.25 ml 1 M Tris-HCl, 2 µg bromophenol blue)를 동량으로 혼합한 후 총 단백질 40 µg을 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. Nitrocellulose membrane로 전이시키고 5% non-fat skim milk로 blocking 시킨 후, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 antibody를 1:1000으로 희석하여 각각 실온에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. TBST

로 3회 세척한 후, 2차 antibody를 1:3000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. TBST로 세척한 후 ECL 용액으로 발색 후 ChemiDoc을 이용하여 band의 사진을 촬영하였다.

9. DPPH 라디칼 소거능

활성산소 소거능은 Blois 방법²¹⁾에 의한 DPPH 라디칼 소거 방법으로 측정하였다. 즉, 선학초 에탄올추출물을 메탄올에 녹여 준비하고, 메탄올에 녹인 0.3 mM DPPH 용액을 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10. 통계처리

실험 결과는 student's t-test를 이용하여 p-value를 구하였으며, p<0.05인 경우 *, p<0.01인 경우 **로 유의성이 있다고 표시하였다.

결 과

1. 세포독성 검사

선학초 에탄올추출물이 B16F10 세포에 미치는 생존율을 조사하기 위하여 12.5, 25, 50 µg/ml로 처리하여 세포 생존율을 측정하였다. 실험 결과 대조군 100%에 비해 선학초 에탄올추출물 처리군은 98%, 94.6%, 93.5%의 생존율을 보였다(Fig. 1).

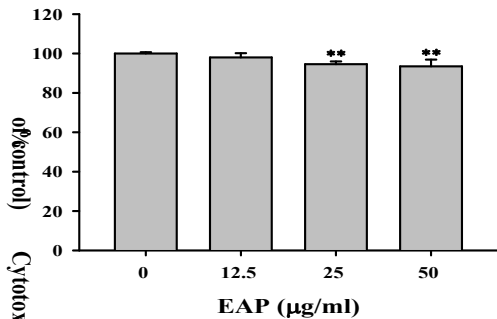


Fig. 1. Effect of ethanol extract of *Agrimonia pilosa* Ledeb. (EAP) on the cytotoxicity. Cells treated with EAP at different concentrations for 1 day was assayed using MTT. Data are mean ± S.D. of triplicate experiments. ± SD. **p<0.01 compared to the untreated control.

2. 멜라닌 합성 억제 효과

세포내의 멜라닌 합성량의 변화를 측정하기 위하여 선학초 에탄올추출물을 25 µg/ml, 50 µg/ml로 처리하고 3일간 배양하고 2×10⁶개의 세포를 수집한 다음 세포를 용해하여 멜라닌 합성량의 변화를 측정한 결과 Fig. 3B와 같았다. 선학초 에탄올추출물 25 µg/ml는 79%, 50 µg/ml는 57%로 멜라닌 합성 양을 현저하게 감소시켰으며(Fig. 2B), 멜라닌색소 침착을 육안으로 관찰한 결과 또한 확실한 색의 변화를 보였다(Fig. 2A).

3. 세포내 tyrosinase 활성도 측정

멜라닌 합성은 tyrosine을 DOPA로 전환 시키는 tyrosine hydroxylase와 DOPA를 DOPAquinone으로 전환시키는 DOPA

oxidase로서 처음 두 단계의 반응을 촉매 하는 tyrosinase의 작용에 의해 시작된다. B16F10 세포에 선학초 에탄올추출물을 25, 50 µg/ml로 처리하여 3일간 배양 후 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정된 결과 25 µg/ml에서 74.8%, 50 µg/ml에서 48.3%로 억제시킴을 알 수 있었다(Fig. 3A). 선학초 에탄올추출물이 tyrosinase의 효소활성을 억제시키는 것 인지 알아보기 위하여 배양된 B16F10 세포를 용해하여 tyrosinase 활성도 측정에 사용될 효소를 얻었다. 세포 용해액에 선학초 에탄올추출물을 농도별로 처리하고 L-DOPA oxidation 활성을 측정된 결과 선학초 에탄올추출물은 50 µg/ml에서 10%, 100, 200 µg/ml에서 14%로 tyrosinase 활성도를 약간 감소시켰다. 반면 양성대조군으로 사용된 kojic acid는 cell-free tyrosinase 활성도 측정에서 농도 의존적으로 현저한 tyrosinase 활성 억제 효과를 보였다(Fig. 3B). 이러한 결과는 선학초 에탄올추출물이 tyrosinase에 직접적으로 작용하기 보다는 세포의 대사과정에 영향을 주어 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성을 억제한 것으로 생각된다.

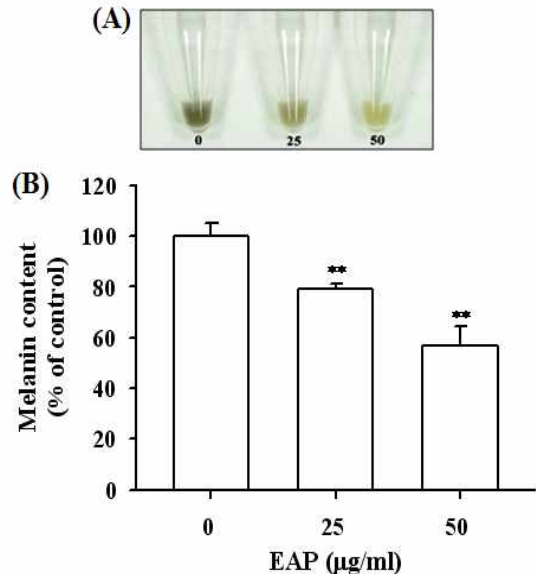


Fig. 2. EAP decreased the melanin synthesis in B16F10 cells. The cells were cultured with 25 and 50 µg/ml EAP for 3 days. (A) Dose-dependent fading of color was observed in B16F10 cell pellets. (B) The melanin contents were measured in B16F10 cells. The results are averages of triplicate experiments, and the data are expressed as means ± SD. **p<0.01 compared to the untreated control.

4. 멜라닌 합성관련 단백질의 발현

선학초 에탄올추출물을 배양액 중에 첨가하였을 경우 tyrosinase 활성이 감소하였으나, 세포 용해 후 용해액에 첨가한 경우 tyrosinase 활성에는 변화가 거의 없었으므로 선학초 에탄올추출물은 tyrosinase 활성에 직접 작용한 것이 아니라고 판단되어 tyrosinase 활성 감소가 단백질 발현량의 변화에 의한 것인지 확인하기 위하여 Western blot을 시행하였다. 선학초 에탄올추출물 25, 50 µg/ml로 처리하고 3일간 배양 하여 단백질 발현량의 변화를 조사한 결과 tyrosinase는 대조군에 비하여 발현량이 현저하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, tyrosinase-related

protein 1(TRP-1)과 tyrosinase-related protein 2(TRP-2) 모두 단백질 발현양이 감소하였다(Fig. 4).

0.09(28%), $0.192 \pm 0.03(18\%)$ 로 측정되었다(Fig. 5).

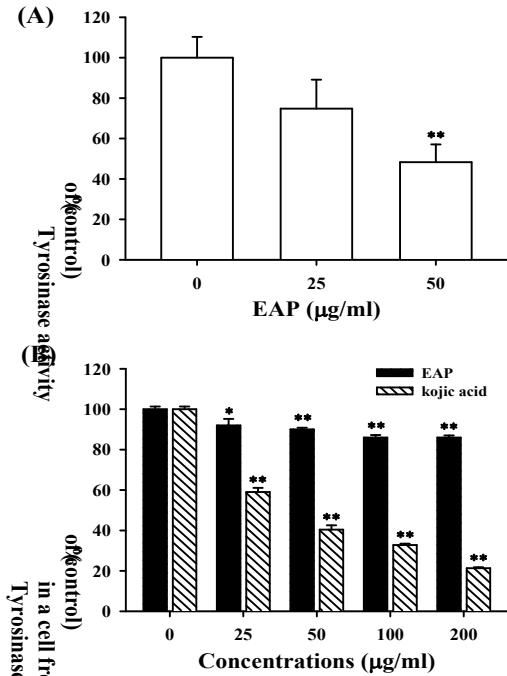


Fig. 3. Effect of EAP on tyrosinase activity and a cell-free system. (A) The cells were cultured with 25–50 µg/ml EAP for 3 days. Tyrosinase activity was measured in B16F10 cells. (B) To test their direct effects on tyrosinase, B16F10 tyrosinase activity was measured in a cell-free system, as described in Materials and Methods. 25–200 µg/ml of EAP was added to each well. The results are averages of triplicate experiments, and the data are expressed as means ± S.D. *p<0.05, **p<0.01 compared to the untreated control.

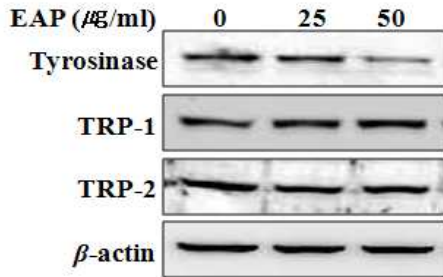


Fig. 4. Effect of EAP on the tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 protein expressions in B16F10 cells. B16F10 cells were incubated with EAP. After 3 days, cells were analysed using Western blotting as described in Materials and Methods.

5. DPPH 라디칼 소거능

활성산소 소거능은 라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 능력, 즉 DPPH 라디칼 소거능 측정법을 이용하여 선학초 에탄올추출물의 항산화력을 측정하였다. 0.3 mM DPPH 용액에 선학초 에탄올추출물을 넣고 실온에서 30분간 반응시킨 후, ELSA reader로 517 nm에서 흡광도를 측정한 결과 대조군은 $1.063 \pm 0.06(100\%)$ 이었으며, 선학초 에탄올추출물 25, 50, 100, 150, 200 µg/ml로 처리한 구간의 흡광도는 각각 $0.78 \pm 0.04(73\%)$, $0.669 \pm 0.08(63\%)$, $0.437 \pm 0.06(41\%)$, $0.298 \pm$

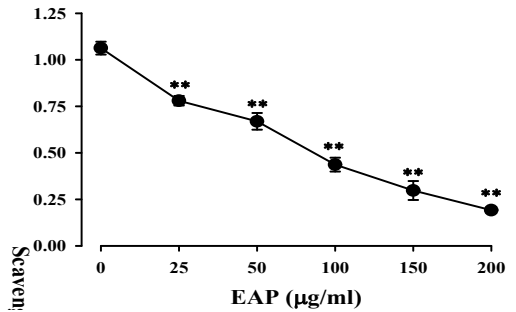


Fig. 5. DPPH radical scavenging activity of EAP. The values are expressed as optical density and each column represents the mean ± S.D. of at least three experiments performed in triplicate. **P<0.01 compared with control of EAP.

고찰

선학초는 장미과에 속하는 짙신나물의 전초를 이르는 것이며 예로부터 설사약, 지혈제로 응용되어 왔다. 최근 연구에 따르면 선학초 부탄올추출물이 NO/cGMP 계를 경유하여 혈관 이완 효과를 나타내었으며, 물추출물은 간 손상이 유도된 동물 모델에서 대표적인 간 손상 지표인 AST, ALT 수치를 회복시켰다¹⁴⁾. 또한 선학초 메탄올추출물은 여드름의 원인균인 Propionibacterium acnes에 대한 항균효과가 있음이 보고되었다²²⁾. 그러나 멜라닌 합성 조절에 관한 것은 아직 밝혀지지 않았다.

멜라닌 합성은 합성 과정 초기에 작용하는 tyrosinase에 의해 시작되기 때문에 tyrosinase 활성 억제제를 주 표적으로 하는 멜라닌 합성 억제제를 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있고, 그 중에서도 환경 친화적이고 피부 안정성이 우수한 한방화장품의 개발에 대한 관심이 높아지고 있다. 현재까지 tyrosinase 억제제로 알려진 물질로는 4-hydroxy-anisole, 5-hydroxyindole 및 hydroquinone와 kojic acid, arbutin, oxyresveratrol 등이 있으며, 그 외에도 stilbene계 화합물인 α-viniferin, isoflavonoid 류인 ferulic acid가 알려져 있다²³⁾. 최근 보고되어지고 있는 천연물들은 녹나무, 싸리꽃, 교맥, 어성초 등이 보고되어 있다²⁴⁻²⁷⁾.

본 연구에서는 선학초 에탄올추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16F10 세포를 사용하여 tyrosinase 활성을 측정하였다. 기본 배지만 사용한 것을 대조군으로 하고, 선학초 에탄올추출물을 농도별로 처리하였을 때 세포내 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성 양을 측정할 결과 세포내 tyrosinase 활성은 효과적으로 억제되었으며 멜라닌 합성 양의 현저한 감소를 나타냈다. Kojic acid는 tyrosinase 활성 부위의 구리를 chelation하여 tyrosine에서 DOPA로 그리고 DOPA에서 DOPA quinone으로 진행되는 과정을 조절한다⁶⁾. 본 실험에서 선학초 에탄올추출물에 의한 멜라닌 합성 억제가 tyrosinase 활성에 대한 직접적인 억제효과로 인한 것인지 알아보기 위해 기본 배지만 배양한 B16F10 세포를 용해하여 얻은 효소액에 선학초 에탄올추출물을 직접 처리하여 tyrosinase 활성을 측정하였

다. 그 결과 tyrosinase 활성이 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 14%로 일부 억제 를 보인 반면, 양성대조군으로 사용한 kojic acid는 농도 의존적으로 tyrosinase 활성을 현저하게 억제시켰다. 선향초 에탄올추출 물이 tyrosinase 활성에 대한 직접적인 억제효과가 일부 나타나 기는 했지만, 세포내 멜라닌 합성의 현저한 억제 효과를 설명하 기에는 부족한 것으로 사료된다. 따라서 선향초 에탄올추출물은 tyrosinase에 직접 작용하여 효소활성을 억제하는 kojic acid와 달리 세포내 대사과정에 영향을 미쳐 tyrosinase 활성을 억제하 는 것으로 사료된다.

멜라닌 합성 중 가장 중요하다고 할 수 있는 tyrosinase 단백 질의 발현 조절 기전은 크게 전사 이전과 이후로 구분할 수 있 다. 전사 이전 단계 중 하나인 cAMP 경로는 피부 색소 침착을 조절하는 중요한 기전임은 잘 알려진 사실이다. 피부가 UV에 노출되었을 때 멜라닌세포는 세포내 cAMP가 증가되고 이것의 하 류 신호전달 물질인 PKA가 활성화 된다. PKA는 전사조절 인자 로 알려진 CREB을 인산화 시킬 수 있고, 인산화된 CREB은 멜라 닌 생성 주 효소의 전사를 증가시키는 tyrosinase 프로모터 영역 에 결합하는 MITF의 발현을 증가시킨다. 멜라닌 생성의 증가를 유도하는 MITF는 ERK 경로를 통해 발현이 조절될 수 있다²⁸⁻³⁰. 최근 C2-ceramide가 사람 멜라닌 세포에서 ERK 활성을 연장시 켜 멜라닌 생성을 조절한다고 보고하였다. C2-ceramide는 ERK 의존적으로 MITF의 Ser-73을 인산화 함으로서 proteasome을 경 유한 MITF 분해를 유도하고 전사 수준에서 tyrosinase 발현을 억 제시킨다³¹. 전사 이후 과정에는 tyrosinase 활성을 직접적으로 억제함으로써 멜라닌 생성을 감소시키거나, tyrosinase의 glycosylation을 저해하여 tyrosinase의 성숙을 방해하고 완전히 성숙되지 못한 tyrosinase는 ubiquitin-proteasome 경로를 통해 분해되는 경로 등이 있다. 본 실험에서 선향초 에탄올추출물은 tyrosinase 단백질 발현을 효과적으로 억제시켰다. 이러한 결과 가 전사 수준이나 단백질 합성 또는 성숙과정 중에 일어났을 가 능성이 있지만 선향초 에탄올추출물의 멜라닌 합성 억제효과는 tyrosinase 단백질 발현의 감소로 인한 것임을 확인 하였다. 현재 선향초 에탄올추출물의 미백효과를 나타내는 기전을 밝히기 위 해 실험 중에 있다.

최근 들어 인간의 수명이 증가함에 따라 노화 및 각종 퇴행 성 질환과 심혈관계 질환 등의 질병에 관심이 커지고 있으며, 그 원인이 활성산소에 기인된 것이라는 보고가 있다³². 생체 내에서 에너지 생산을 위한 대사 과정 중 발생하는 활성산소는 불안정 하고 반응성이 매우 강하여 세포의 구성 성분인 지질, 단백질, 당 및 DNA 등을 손상시킨다. 특히 피부는 자외선에 의한 광학적 반응을 통해 활성산소를 생성하는데, 이러한 활성산소는 피부의 항산화 방어체계의 균형을 붕괴시켜 피부 세포 및 조직의 손상, 피부 탄력 감소와 주름살 및 기미 주근깨 등의 피부 노화, 세포 사멸 등을 초래한다. 본 실험에서 선향초 에탄올추출물의 항산화 효능을 알아보기 위하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정할 결과 우 수한 DPPH 라디칼 소거 효능이 있음을 나타내었다. 따라서 선향초 에탄올추출물은 미백효과 뿐만 아니라 활성산소에 대한 방 어체계를 향상시켜 노화를 지연시키고 각종 질병을 예방하기 위

한 후보 물질로서 가능성이 있다고 사료된다.

결 론

B16F10 세포에서 선향초 에탄올추출물의 미백효과를 알아 보기 위하여 다양한 농도로 처리한 후 세포독성, tyrosinase 활성 억제, 멜라닌 양의 변화 및 멜라닌합성 관련 단백질의 발현 양을 측정하였다. 또한 DPPH 라디칼 소거법을 이용하여 활성산소 소 거능을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 선향초 에탄올추출 물 처리 시 세포내 tyrosinase 활성도와 멜라닌 합성이 현저하게 감소하였으며, Western blot 결과 tyrosinase 단백질 발현이 현저 하게 감소하였다. 또한 우수한 DPPH 라디칼 소거 효능을 갖고 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2009학년도 원광대학교 교비지원에 의하여 수행 되었음.

참고문헌

- Bell, A.A., Weeler, M.H. Biosynthesis and function of fungal melanin, *Ann Rev Phthopathol* 24: 411-451, 1986.
- Chen, J.S., Wei, C., Marshall, M.R. Inhibition mechanism of Kojic acid on polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 39: 1897-1901, 1991.
- Urabe, K., Aroca, P., Tsukamoto, K., Mascagna, D., Paulumbo, A., Prota, G., Hearing, V.J. The inherent cytotoxicity of melanin precursors. *Biochim Biophys Acta* 1221: 272-278, 1994.
- Alaluf, S., Heath, A., Carter, N., Atkins, D., Mahalingam, H., Barrett, K., Kolb, R., Smit, N. Variation in melanin content and composition in type V and VI photoexposed and photoprotected human skin: the dominant role of DHI. *Pigment Cell Res* 14: 337-347, 2001.
- Maeda, K., Fukuda, M. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 765-769, 1996.
- Battaini, G., Monzani, E., Casella, L., Santagostini, L., Pagliarini, R. Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. *J Biol Inorg Chem* 5: 262-268, 2000.
- Ando, H., Funasaka, Y., Oka, M., Ohashi, A., Furumura, M., Matsunaga, J., Matsunaga, N., Hearing, V.J., Ichihashi, M. Possible involvement of proteolytic degradation of tyrosinase in the regulatory effect of fatty acids on melanogenesis. *J Lipid Res* 40: 1312-1316, 1999.
- Ando, H., Wen, Z.M., Kim, H.Y., Valencia, J.C., Costin,

- G.E., Watabe, H., Yasumoto, K., Niki, Y., Kondoh, H., Ichihashi, M., Hearing, V.J. Intracellular composition of fatty acid affects the processing and function of tyrosinase through the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem J* 394: 43-50, 2006.
9. Kim, D.S., Park, S.H., Kwon, S.B., Park, E.S., Huh, C.H., Youn, S.W., Park, K.C. Sphingosylphosphorylcholine-induced ERK activation inhibits melanin synthesis in human melanocytes. *Pigment Cell Res* 29: 147-153, 2006.
 10. Kang, B.S. Medical herbs. Young-Rym-Sa, seoul pp 384-386, 1992.
 11. Pei, Y.H., Li, X., Zhu, T.R. Studies on the structure of a new ellagic acid glycoside from the root sprouts of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Yao Xue Xue Bao* 25: 798-800, 1990.
 12. Min, B.S., Kim, Y.H., Tomiyama, M., Nakamura, N., Miyashiro, H., Otake, T., Hattori, M. Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activities. *Phytother Res* 15: 481-486, 2001.
 13. Swanston-Flatt, S.K., Day, C., Bailey, C.J., Flatt, P.R. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia* 33: 462-464, 1990.
 14. Cao, L.H., Lee, J.K., Cho, K.H., Kang, D.G., Kwon, T.O., Kwon, J.W., Kim, J.S., Sohn, E.J., Lee, H.S. Mechanism for the Vascular Relaxation Induced by Butanol Extract of *Agrimonia pilosa*. *Kor J Pharmacogn* 37: 67-73, 2006.
 15. Lee, E.S., Seo, B.I. Growth inhibition of *Escherichia coli* KCTC 2441 by *Agrimonia pilosa* Ledeb. extract. *Kor J Herbology* 18: 15-20, 2003.
 16. Bae, J.H., Sohn, M.A. Effect of *Agrimonia Pilosa* Ledeb. Extract on the Growth of Food-Borne Pathogens. *Korean J Nutr* 38: 112-116, 2005.
 17. Park, E.J., Oh, H., Kang, T.H., Sohn, D.H., Kim, Y.C. An isocoumarin with hepatoprotective activity in Hep G2 and primary hepatocytes from *Agrimonia pilosa*. *Arch Pharm Res* 27: 944-946, 2004.
 18. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983.
 19. Martínez-Esparza, M., Jiménez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J.A., García-Borrón, J.C. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem* 255: 139-146, 1998.
 20. Hosoi, J., Abe, E., Suda, T., Kuroki, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid.. *Cancer Res* 45: 1474-1478, 1985.
 21. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200, 1958.
 22. Kim, H.J., Lim, H.W., Kim, B.H., Kim, H.S., Choi, S.W., Yoon, C.S. Studies on the anti-acne effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *J. Soc. Cosmet* 32: 53-58, 2006.
 23. Maeda, K., Fukuda, M. In vivo effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem* 42: 361-368, 1991.
 24. Ha, S.K., Moon, E.J., Lee, M.J., Park, H.M., Yoo, E.S., Oh, M.S., Kim, S.Y. Effect of the BuOH Soluble Fraction of *Cinnamomum camphora* on Melanin Biosynthesis. *Korean J Medicinal Crop Sci* 17: 293-300, 2009.
 25. 유인식, 박시준, 문연자, 고준석, 신기돈, 이장천, 우원홍, 임규상. 싸리꽃 추출물의 tyrosinase 활성 및 멜라닌합성 억제 효과. *동의생리병리학회지* 21: 1142-1147, 2007.
 26. 노성택, 김대성, 이성진, 박대중, 이장천, 임규상, 우원홍, 문연자. 교맥 에탄올 추출물의 피부 미백기전 연구. *동의생리병리학회지* 21: 1243-1249, 2007.
 27. Chin, J.E., Cho, N.C. Effect of *Houttuynia cordata* extracts on tyrosinase gene expression. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1284-1288, 2005.
 28. Buscà, R., Ballotti, R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* 13: 60-69, 2000.
 29. Sassone-Corsi, P. Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 27-38, 1998.
 30. Bertolotto, C., Buscà, R., Abbe, P., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J.P., Ballotti, R. Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol Cell Biol* 18: 694-702, 1998.
 31. Kim, D.S., Kim, S.Y., Chung, J.H., Kim, K.H., Eun, H.C., Park, K.C. Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cell Signal* 14: 779-785, 2002.
 32. Chi, H.Y., Kim, K.H., Kong, W.S., Kim, S.L., Kim, J.A., Chung, I.M. and Kim, J.T. Antioxidant activity and total phenolic compound of *P. eryngii* spp. extracts. *Kor J Crop Sci* 50: 216-219, 2005.