

곰보배추 추출물이 항산화 및 피부미백효과에 미치는 영향

임하나* · 표영희 · 윤미연†

중앙대학교 의약식품대학원 · 오산대학교 뷰티디자인과 · 동남보건대학교 피부미용과
(2017년 11월 17일 접수: 2017년 11월 28일 수정: 2017년 12월 11일 채택)

Effects of *Salvia plebeia* Herb Extracts on Anti-oxidant Activity and Whitening action

Lim Ha Na · Pyo Young Hee · Yoon Mi Yun†

Dept. of Management for Cosmetic Industry, Chung-ang University · Dept. of Beautydesign, Osan University · Dept. of Cosmetology, Dongnam Health University†
(Received November 17, 2017; Revised November 28, 2017; Accepted December 11, 2017)

요약 : 본 논문은 재배가 용이하고 민간요법에서 다양하게 이용되고 있는 곰보배추의 에탄올 추출물이 화장품 소재로서 가능성이 있는지를 알아보기 위해 항산화, 미백효능에 대하여 관찰하였다. B16F10 세포에서 곰보배추 에탄올 추출물 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 독성이 나타나지 않았다. DPPH radical 소거능을 관찰한 결과 모든 농도에서 소거능을 보여주었고, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 65.2%, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 77.6%의 강한 항산화 효능을 나타냈다. Raw 264.7 세포 내에서 ROS 생성 저해능을 관찰한 결과 농도 의존적으로 유의하게 나타났고, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 39.1% 억제하는 것으로 나타났다. NO생성 억제를 관찰하기 위해 Raw 264.7 세포에 곰보배추 에탄올 추출물을 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 별로 첨가하여 관찰한 결과 농도 의존적으로 NO생성을 억제하였다. 시험관 내에서 L-DOPA와 L-tyrosine을 이용하여 곰보배추 에탄올 추출물이 tyrosinase activity를 농도 의존적으로 억제하는 것을 나타냈다. 세포 내에서 MSH를 가한 B16F10 세포에 곰보배추 에탄올 추출물을 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 melanin 함량을 관찰한 결과 농도 의존적으로 억제하는 것을 보여주며 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 30.7%로 억제하였다. 따라서 곰보배추 에탄올 추출물이 항산화 기능이 있는 미백 기능성 화장품의 소재로서 개발 가능성이 충분히 있는 것으로 사료된다.

주제어 : 곰보배추, 항산화, 항염증, 미백, 화장품

Abstract : Whitening and anti-oxidant effects were observed in order to investigate the biological activations of *Salvia plebeia* herb ethanol extracts.

No toxicity was found in both B16F10 melanoma cells and Raw 264.7 cells exposed to *Salvia plebeia* herb ethanol extracts for 48 hour. The extracts showed significant antioxidant activity in cell-free and cell-cultured system. In the DPPH radical assay, it removed dose-dependently DPPH

†Corresponding author
(E-mail: ymy@dongnam.ac.kr)

radicals and showed 77.6% at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In the cells, it also significantly removed silica-induced ROS generation and LPS-induced NO production in a dose dependent manner.

Using L-DOPA and L-tyrosine as a substrate, tyrosinase activity was inhibited using *Salvia plebeia* herb ethanol extracts in a dose-dependent manner. The suppression occurred to be in the B16F10 melanoma cells, where dose-dependently inhibited *Salvia plebeia* herb ethanol extracts of 1 μM α -melanocyte stimulated hormone-induced melanin production and the inhibitory effect was 30.7% at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

This suggests that the *Salvia plebeia* herb ethanol extracts are usable for cosmetic product developments for anti-oxidant and whitening effects.

Keywords : *Salvia plebeia* herb, anti-oxidant, anti-inflammatory, whitening, cosmetic

1. 서론

곰보배추(*Salvia plebeia* herb)는 본초강목(本草綱目)등에 기록되어 있으며, 눈 속에서도 볼 수 있다 하여 설견초(雪見草)라고도 한다.[1] 꿀풀과(Labiatae)의 배암차즈기속(*Salvia*)에 속하는 일년생 혹은 이년생 초본으로 서식한다. 축축한 땅에서 겨울을 이겨내는 식물이며, 뿌리에서 난 잎이 로제트 모양으로 땅바닥에 붙어나기 때문에 물이 고인 땅에서는 살 수 없다. 우리나라 전 지역에 분포하며 중국, 만주, 대만, 일본(혼슈이남), 우수리, 인도, 말레이시아, 호주 등의 냉온대 또는 난온대 지역에 분포한다.[2] 곰보배추의 전초에는 flavonoid 성분이 많이 함유된 것으로 알려져 있으며 hispidulin, hispidulin-7-O-glucoside, hispiduling-glucuronide, nepetin, nepetin-O-glucoside, caffeic acid, β -sitosterol luteolin, luteolin-o-glucoside, rosmarinic acid, coniferyl aldehyde, 6-methoxylnarigenin 등이 알려져 있다.[3]

그 외 곰보배추 종자에는 지방유, 락틱, 4-히드록시-페닐, 에시드, 프로트카테추익에시드가 함유된 것으로 알려졌으며, 정유, 사포닌, 강심 배당제, 불포화 스테롤, 폴리테르페니, 기타 페놀성 물질 등을 함유하고 있다.[4] 곰보배추의 효능으로는 정혈, 해독, 이뇨, 소염, 항균 및 소종, 편도선염, 자궁출혈, 자궁염, 치질, 위염 등의 치료와 항암 효과 및 면역세포 활성화에 긍정적인 영향을 주며, 무독성 식물로 알려져 있다.[4] 최근에는 민간약초에 대한 관심이 높아짐에 따라 식품은 물론 질병 예방과 치료에 활용하기 위해 민간에서 재배, 유통 판매되고 있는 실정이다.[5]

식물체에 존재하는 천연 flavonoid 성분은 세포 내에서 항산화 효과를 갖고 있는데, 항산화 효과란 활성산소의 산화활동을 억제하거나 제거하는 것을 뜻하며, 활성산소는 산소라디칼(oxygen free radical) 및 여기서 파생되는 산소화합물을 통칭하는 것으로 몸에서 과잉 생산된 여분의 산소로 전자쌍을 이루고 있지 않은 원자나 분자를 말한다.[6,7] 이는 생체막의 구성 성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질 과산화로 인해 막을 손상시켜 신체 기능의 저하나 노화 및 성인병을 유발하고 단백질의 내부 변형을 일으켜 면역기능을 손상시킨다.[8] 생체 내에는 활성산소를 방어하는 glutathione S-transferase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase 등의 항산화 효소를 자체적으로 가지고 있어 DNA 손상 등에 대한 방어 기능을 하고 있다. 하지만, 체내의 산화적 손상을 예방하기에는 충분하지 않아 외부로부터 항산화 물질들을 섭취를 해야 한다.[9]

현재까지 연구된 합성 항산화제로는 butylated hydroxy anisole(BHA), propylgallate(PG), butylated hydroxytoluene(BHT), Qt-butylhydroquinone(TBHQ) 등이 많이 사용되어 왔지만, 합성첨가물의 기피 현상과 더불어 과량섭취하였을 때 독성 등의 안전성 문제가 대두되고 있어 대체할 수 있는 안전한 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있다.[10] 식물체는 자외선에 의한 산화나 자동산화로부터 폴리페놀(polyphenol)류의 항산화 물질을 세포 내에 함유하고 있어 항산화성, 항알러지성, 항암성 등 다양한 생리활성 기능을 갖고 있다.[7] 본 연구를 통해 알아볼 곰보배추는 여지초의 in vitro에서의 항암 효과 및 면역

세포 활성화에 미치는 영향 등의 기존연구를 통해 항암이나 면역세포 활성화에 긍정적 영향을 끼치는 것으로 연구되었고, 특히 곰보배추 추출물은 활성산소 소거에 효과가 있는 것으로 보고되었다.[11] 본 연구의 목적은 지금까지 곰보배추 에탄올 추출물을 소재로 한 연구들이 약품, 식품 쪽으로 접근해 항산화, 항염 등의 연구가 진행되어 왔으나 화장품 소재와 관련된 기초 연구는 이루어지고 있지 않아 본 연구를 통해 항장학적 측면에서 화장품 소재로서의 활용 가능성을 기대할 수 있을지 미백효과에 대해 알아보려고 한다.

2. 실험

2.1. 시약

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), Mushroom Tyrosinase, L-DOPA, L-tyrosine은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo. USA)로부터 구입하였다. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)는 Molecular Probe Co.(Eugene, OR, USA) 에서 구입하였다. B16F10 melanin 세포, RAW 264.7 세포는 서울대학교 세포주 은행으로부터 구입하였다.

2.2. 실험재료

본 연구의 실험재료로 사용한 곰보배추는 전라도 부안농장에서 구입하여 건조한 전초 200g 을 수세한 다음 시료에 95% ethanol 용액 4배량을 가한 후 실온에서 일주일 동안 침적시켜 얻어진 상층액을 3M filter paper를 이용하여 여과하고, 정제된 추출물을 Rotary evaporator로 농축한 후에 Heating block을 이용하여 남아있는 ethanol 을 모두 날리고 최종 추출물을 얻어 시료로 사용하였다.

2.3. 세포배양

B16F10 melanin 세포와 RAW 264.7 세포는 10% fetal bovine serum과 penicillin/streptomycin (100 IU/ 50 μ g/mL)을 함유한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 용액으로 37°C로 유지되는 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2.4. MTT를 이용한 세포독성 측정

곰보배추 에탄올 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 MTT법을 하였다. B16F10 melanin 세포를 사용하였으며, 96 well plate에 well당 1×10^4 의 세포수로 분주하고 시료를 농도별로 가한 후 48시간 동안 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하였다. 48시간 후 배양 용액을 버리고, Krebs 용액 (mM : NaCl 137, KCl 2.7, Na₂HPO₄ 0.4, MgCl₂ 0.5, HEPES [pH 7.4] 10, CaCl₂ 1.8, 포도당 5)에 녹인 MTT 용액 500 μ g/mL 을 각 well에 1 mL씩 가하고 어두운 곳에서 4시간 배양 후 상층액을 버리고, DMSO를 각 well에 200 μ L 를 가하여 MTT formazan을 용해시켰다. 실온에서 15분간 MTT formazan을 완전히 용해 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. DPPH radical 소거 정량

96 well plate에 에탄올에 녹인 0.1 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)용액 180 μ L와 각 농도별로 조제한 곰보배추 에탄올 추출물을 20 μ L씩 가하고 어두운 상태로 37°C에서 30분간 배양한 후 FL 600 spectrofluorometer (BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. 세포내 산화 스트레스 생성 측정

DCF-DA가 RAW 264.7 세포내로 들어가서 세포내에서 생성된 자유라디칼과 반응하여 형광 물질인 DCF로 산화되는 원리를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 15 mL의 Krebs buffer에 suspend시킨 후, 20 μ M DCF-DA를 가하고 1시간 어두운 곳에서 배양하였다. DCF-DA가 없는 Krebs buffer로 한번 세척한 후 원심분리 하여 세포를 추출하였다. 1×10^5 cells/mL로 소분하고 시료를 농도별로 전처리한 후 silica 1 mg/mL를 가하여 30분간 H₂O₂ 생성을 유도하였다. 원심분리 후 cell pellet을 200 μ L의 Krebs buffer에 재분산시켜 96 well plate에 옮긴 후 형광도(Ex 485 nm/ Em 535 nm)를 측정하였다.

2.7. 세포내 NO 생성 측정

RAW 264.7 세포를 24 well plate에 1×10^6 cells/mL로 각 well 당 1 mL씩 분주하였다. 96 well plate에 세포 배양 상등액 100 μ L와 Griess시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric

acid + 1% α -naphthylamide in H₂O) 150 μ L를 혼합한 후, 5분 동안 반응시켜 ELISA microplate reader(MQX200R, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선 작성을 위해 sodium nitrite(NaNO₂)를 표준품으로 사용하여 비교하였다.

2.8. 실험관 내에서 tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성 기질은 L-DOPA와 L-tyrosine을 사용하였다. L-DOPA는 2 mg/mL를 potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8)로 완전히 녹이고 tyrosinase는 20 units/mL 농도로 준비하였다. Tyrosinase 90 μ L에 농도별로 희석한 곰보배추 에탄올 추출물 시료 10 μ L를 eppendorf tube에 넣고 잘 섞어준 뒤 96 well plate에 40 μ L 씩 분주하고 L-DOPA (2 mg/mL)를 200 μ L를 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 475 nm 에서 흡광도를 측정하였다. L-tyrosine은 0.3 mg/mL를 potassium phosphate buffer(0.1 M, pH 6.8)로 완전히 녹이고 tyrosinase는 100 units/mL 농도로 준비하였다. Tyrosinase 90 μ L에 농도별로 희석한 곰보배추 에탄올 추출물 시료 10 μ L를 eppendorf tube에 넣고 잘 섞어준 뒤 96 well plate에 40 μ L 씩 분주하고 L-tyrosine (0.3 mg/mL)를 200 μ L를 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 475 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

2.9. B16F10 melanin 세포에서 melanin 생성 억제 측정

B16F10 melanin 세포를 6 well plate에 3 mL로 분주한 후 10% FBS이 함유된 phenol red-free DMEM 용액에서 12시간 동안 배양하였다. 그리고 시료를 각각의 농도로 처치하고 37°C에서 10분간 배양한 후, 1 μ M의 melanocyte stimulating hormone (α -MSH)를 처치하여 37°C에서 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나고 난 후 1% (w/v) Triton X-100을 함유한 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 100 μ L를 가하고 5분간 shaking한 후 시험관으로 옮기고 이를 10,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 얻은 cell pellet에 1 N NaOH 100 μ L와 증류수 200 μ L를 가하고 60°C에서 1시간 배양하여 멜라닌을 완전히 녹인 후 96 well plate에 200 μ L를 옮기고 405 nm에

서 흡광도를 측정하였다. 동일한 조건으로 4회 반복적으로 실험하여 평균값을 얻어 멜라닌 표준품으로 얻은 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 멜라닌 양을 산출하였다.

2.10. 자료분석 및 통계적 검정

실험 결과는 평균 \pm 표준편차로 표기 하였으며, 실험 성적은 non-paired student's t- test로 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포독성 측정

곰보배추 에탄올 추출물의 세포 독성을 알아보기 위하여 B16F10 melanin 세포를 이용하여 MTT를 통해 관찰하였다. 곰보배추 에탄올 추출물의 농도는 25, 50, 100 μ g/mL의 범위를 사용하여 48시간 동안 실험한 모든 농도에서 독성이 나타나지 않았다. 따라서 곰보배추 에탄올 추출물의 세포 독성에 대한 안전성을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 선행연구인 여지초 추출물의 항산화 및 항염 활성 효과에서[4] 세포 생존율 측정 결과를 뒷받침하는 것으로 곰보배추 에탄올 추출물을 화장품 첨가 성분으로 사용하여도 안전할 것으로 사료된다.

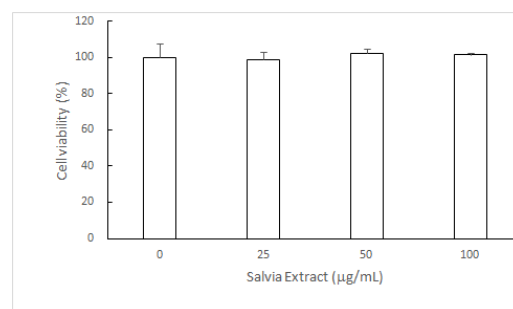


Fig. 1. Cytotoxicity of *Salvia plebeia* herb ethanol extracts in B16F10 cells. Results are means \pm SD from 4 separate experiments.

3.2. 시험관내에서의 항산화 작용

곰보배추의 전초에는 항산화 효능이 있다고 알려진 luteolin, caffeic acid 등의 성분을 포함하고

있으며[5] 곰보배추 에탄올 추출물의 자체적인 항산화 효능을 규명하기 위하여 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다.

곰보배추 에탄올 추출물 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 DPPH radical 소거능을 관찰한 결과 농도 의존적으로 유의하게 증가하였고, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 65.2%, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 77.6%의 항산화 효능을 나타내었다. 또 대조군인 L-ascorbic acid의 100 μM (17.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 농도와 비교하였을 때는 곰보배추 에탄올 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 대조군과 유사한 DPPH radical 소거능을 보였다.[Fig. 4] 이러한 결과는 최봉겸 등이 연구한 배암차즈기 에탄올 추출물의 항산화 및 항알레르기 효과를 관찰한 연구논문에서 농도 의존적으로 DPPH radical 소거능을 나타낸 결과와 유사하며,[12] 곰보배추 구성성분 중 특히 phenylpropanoid 계열의 caffeic acid가 SOD(superoxidase dismutase) 활성을 유의하게 증가시키는 것으로 밝혀진 연구 결과에 따라[13] 곰보배추 에탄올 추출물의 항산화 효능에 caffeic acid가 영향을 미친것으로 사료된다.

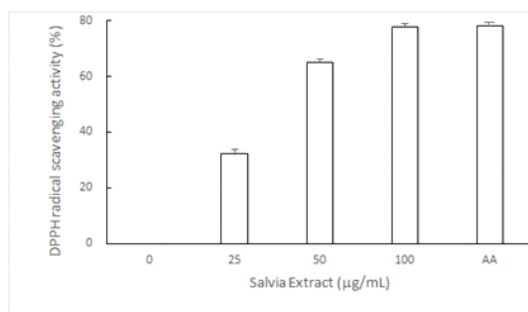


Fig. 2. Antioxidant activity of *Salvia plebeia* herb ethanol extracts in DPPH Assay. Results are means \pm SD from 4 separate experiments. AA : ascorbic acid (100 μM)

3.3. RAW 264.7 세포에서 reactive oxygen species (ROS) 소거 활성

활성산소는 호기성 생물체 체내에서 끊임없이 생성되며, 지질 과산화에 의한 세포막의 손상과 단백질의 구조적인 변형을 가져와 인체에 유해한 영향을 미친다.[9]

식물에서 나타난 항산화 작용은 H_2O_2 를 통하여 산화적 스트레스를 주었을 때 세포의 손상을

농도 의존적으로 억제하는 것으로 보고되어 있다.[14] 따라서 시험관 내에서 DPPH free radical 소거 활성을 확인하였다면 세포내에서의 항산화능을 확인하기 위해 DCF-DA를 이용한 ROS(reactive oxygen species) 생성 저해능을 관찰하였다. 곰보배추 에탄올 추출물 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 stimulant로 사용한 silica 1 mg/mL를 처치한 후 ROS 생성 저해능을 관찰한 결과 silica는 ROS 생성을 41.2% 증가시켰으며 곰보배추 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 ROS scavenging 활성을 나타내었고, 특히 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 39.1% 억제하였다.[Fig. 5] 이러한 결과는 DPPH radical 소거능 결과와 일치한다.

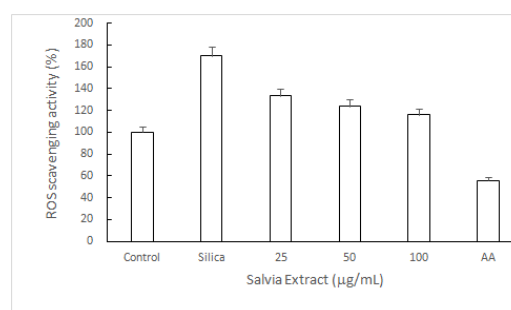


Fig. 3. Antioxidant activity of *Salvia plebeia* herb ethanol extracts 1 mg/mL silica-induced ROS production in Raw 264.7 cells. Results are means \pm SD from 4 separate experiments. * $p < 0.05$: Significantly different from silica. AA : ascorbic acid (100 μM)

3.4. RAW 264.7 세포에서 Nitric Oxide (NO) 생성 억제활성

산화과정에서 나타나는 염증반응은 생체 내에서 물리적 작용, 세균 감염, 화학적 물질 등의 기질적 변화를 가져오는 인체에 발생하는 흔한 현상으로 감염으로부터 몸을 보호해주는 역할을 한다. 그러나 과도한 염증반응은 피부 노화 및 주름에 직접적인 영향을 주게 되며, 반응의 매개체로는 산화질소, 활성산소, prostaglandin(PG)과 사이토카인으로 알려져 있다. 산화 과정에서 나타나는 염증반응이 일어나면 nitric oxide(NO), prostaglandin E_2 (PGE₂), interleukin(IL)-6, tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin(IL)-1 등이 분비되는데 이 중 nitric oxide(NO)는 조직과 세포에서 L-arginine에서 nitric oxide synthase

(NOS)에 의해 합성되며 면역기능 조절, 혈관확장, 신경전달, 혈액응고 등의 기능을 하는 것으로 알려져 있다.[15]

NOS는 cNOS와 iNOS로 나눌 수 있는데 cNOS는 Ca^{2+} -calmodulin 의존성으로 지속적으로 NO를 분비해 항상성을 유지하고, iNOS는 lipopolysaccharide(LPS)나 사이토카인 등의 자극으로 인해 장시간 대량의 NO를 생성한다.[16]

생체 내의 과도한 NO생성은 노화를 가속화시키고 각종 질병을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 세포벽을 쉽게 통과할 수 있는 특징을 가지고 있다. 따라서 NO가 생체 내에서 superoxide anion radical과 반응하여 peroxynitrite radical을 생성하고 이러한 과정은 인체 노화에 직접적인 영향을 미친다.[17]

LPS로 자극받은 Raw 264.7 세포에 곰보배추 에탄올 추출물을 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도별로 첨가하여 NO생성 억제를 관찰한 결과 농도 의존적으로 NO생성을 억제하였다.[Fig. 6]

이러한 결과는 활성산소에 의한 피부 노화 과정을 최대한 지연시켜 항노화에 효능이 있는 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성을 시사한다.

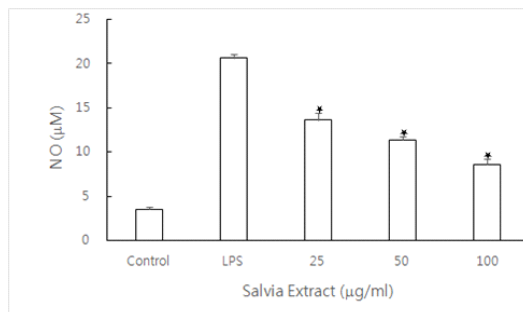


Fig. 4. Effects of *Salvia plebeia* herb ethanol extracts on NO production by 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lipopolysaccharide (LPS) in Raw 264.7 cells. Results are means \pm SD from 4 separate experiments. * $p < 0.05$: Significantly different from LPS.

3.5. 곰보배추 추출물의 미백효능 평가

멜라닌은 대부분의 생명체에 존재하는 색소분자로 아미노산 티로신의 유도체이다. 갈색 또는 검은 색소로 이루어진 단백질의 복합체는 인체에서 독성 물질을 제거하여 세포를 보호하며, 자외

선에 대한 방어 기능을 한다. 하지만, 멜라닌의 과잉생산은 기미나 주근깨를 형성하고 피부 노화를 촉진하며 부족하게 되면 저색소 침착증이나, 탈색소 등의 질환을 야기한다.[18]

멜라닌 합성에 중요한 역할을 미치는 요인은 선천적 요인 외에 자외선과 호르몬 작용이 있는데, 이 중에서도 자외선 A, B가 중요하다. 자외선은 피부에 침투되어 비타민 D를 합성해 칼슘의 흡수를 돕고 뼈의 발육을 촉진, 살균, 소독 등의 중요한 역할을 하지만 홍반, 색소침착, 피부노화, 피부암 유발 등의 유해한 반응을 보인다.[19] 멜라닌 생합성 경로는 피부 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌 세포에서 tyrosine이 tyrosinase에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환되고 다시 DOPA-quinone으로 전환되어, DOPA-quinone에서 DOPA-chrome을 생성, DOPA-chrome에서 5,6-dihydroxyindole (DHI)로 전환되어 최종적으로 멜라닌이 된다.[19] 이와 같은 과정을 통해 생성된 멜라닌은 인지질이나 단백질 등과 결합하여 멜라닌 과립을 형성하고, 각질 형성 세포(keratinocyte)에 들어가 각화과정을 통해 각질층의 탈락을 통해 피부 밖으로 배출된다. 이러한 작용을 통해서 멜라닌은 피부를 자외선으로부터 보호하는 역할을 한다.[20]

멜라닌 생성 매커니즘은 비교적 명확히 밝혀졌고, 생성 과정 중 tyrosinase라는 효소가 티로신(tyrosine)으로부터 도파퀴논(DOPA-quinone)으로 전환에 관여하고 있기 때문에 우리가 현재 사용하는 미백 원료의 대부분은 tyrosinase 활성을 직·간접적으로 조절해 멜라닌 색소의 생합성을 방해하는 작용을 하며 대부분의 미백 연구에서 tyrosinase 활성을 저해하는 연구를 하고 있다.[19,20]

시험관내에서 L-DOPA를 활성기질로 하여 tyrosinase 활성 저해능을 관찰한 결과 농도 의존적으로 활성을 억제하였으며 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 20.4% 억제하였다.[Fig. 8] 또한 L-tyrosine을 활성기질로 하여 tyrosinase 활성 저해능을 관찰한 결과 역시 농도 의존적으로 활성을 억제하였으며, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 16.9% 억제하였다.[Fig. 9]

세포수준에서 곰보배추 에탄올 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위해 B16F10 세포에 MSH를 가하여 melanin 생성을 관찰하였다. 곰보배추 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 은 MSH에 의한 melanin 생성을 30.7%로 유의하게 억제하였다.

이는 대조군인 arbutin 100 μ M (27.2 μ g/mL)에서 41.8%로 억제하는 결과를 볼 때 곰보배추 에탄올 추출물이 멜라닌 생성억제에 우수한 효능이 있는 것을 알 수 있다. 또한 곰보배추의 주요 성분 중 luteolin이 tyrosinase 활성에는 직접적인 억제 작용을 보이지 않았으나 B16F10 세포에서는 melanin 생성을 억제한 결과를 밝힌 연구와 매우 유사한 결과를 나타내었으며,[21] 따라서 곰보배추 에탄올 추출물에 포함되어 있는 luteolin의 작용으로 멜라닌 생성이 억제된 것으로 볼 수 있어 미백관련 기능성 화장품 소재로서의 활용 가능성이 매우 높을 것으로 사료된다.

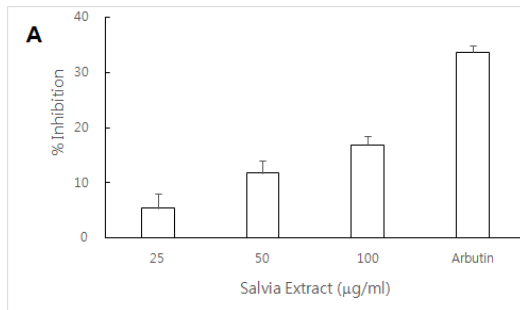


Fig. 5. Effect of Peanut Spouts extract on L-dopa induced tyrosinase activity in Mushroom tyrosinase. Results are means \pm SD from 4 separate experiments.

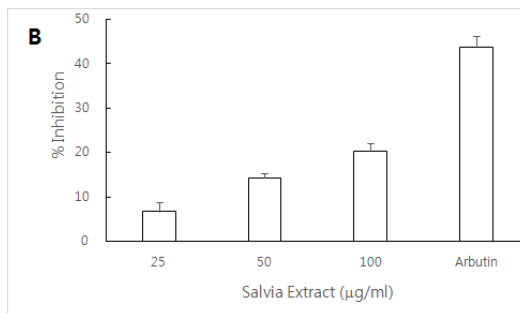


Fig. 6. Effects of Salvia plebeia herb ethanol extracts on tyrosinase activity using substrate as L-tyrosine(A) and L-DOPA(B). Results are means \pm SD from 4 separate experiments.

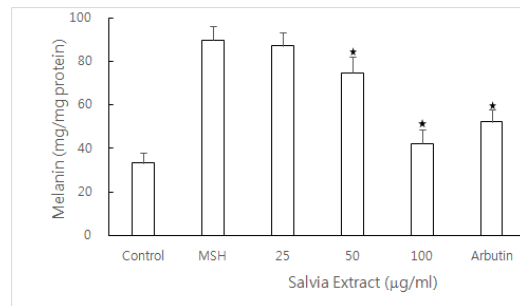


Fig. 7. Effects of Salvia plebeia herb extracts on melanin production by 1 μ M MSH in B16F10 cells. Results are means \pm SD from 4 separate experiments. * $p < 0.05$: Significantly different from MSH.

4. 결론

채배가 용이하고 민간요법에서 다양하게 이용되고 있는 곰보배추의 에탄올 추출물이 화장품 소재로서 가능성과 활용도가 있는지를 알아보기 위해 항산화, 미백효능에 대하여 관찰하였다.

B16F10 세포에서 곰보배추 에탄올 추출물 25, 50, 100 μ g/mL 농도에서 독성이 나타나지 않았다.

DPPH radical 소거능을 관찰한 결과 모든 농도에서 소거능을 보여주었고, 50 μ g/mL의 농도에서 65.2%, 100 μ g/mL에서 77.6%의 강한 항산화 효능을 나타냈다. Raw 264.7 세포 내에서 ROS 생성 저해능을 관찰한 결과 농도 의존적으로 유의하게 나타났고, 100 μ g/mL 농도에서는 39.1% 억제하는 것을 나타냈다.

NO생성 억제를 관찰하기 위해 Raw 264.7 세포에 곰보배추 에탄올 추출물을 25, 50, 100 μ g/mL 농도별로 첨가하여 관찰한 결과 농도 의존적으로 NO생성을 억제하였다.

시험관 내에서 L-DOPA와 L-tyrosine을 이용하여 곰보배추 에탄올 추출물이 tyrosinase activity를 농도 의존적으로 억제하는 것을 나타냈다. 세포 내에서 MSH를 가한 B16F10 세포에 곰보배추 에탄올 추출물을 25, 50, 100 μ g/mL의 melanin 함량을 관찰한 결과 농도 의존적으로 억제하는 것을 보여주며 100 μ g/mL에서 30.7%로 억제하였다.

따라서 곰보배추 에탄올 추출물이 항산화 기능이 있는 미백 기능성 화장품의 소재로서 개발 가능성이 충분히 있는 것으로 사료된다.

References

1. C. M. Kim, Natural product chemistry. Younglim Publishers,(2003)
2. J. G. Kim, Illustrated natural drugs encyclopedia. Namsandang Publishers, (2005)
3. X. F. Jin, Y.H. Lu, D.Z. Wei, Z.T. Wang, "Chemical fingerprint and quantitative analysis of Salvia plebeia R. Br. by high-performance liquid chromatography", Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis, 48:100~104,(2008)
4. S. K. Bae, "The Antioxidant and Antimicrobial Effects of Plebeiae Herba (Salvia plebeia R. Br.)-Extract", Chonnam National University,(2011)
5. K. Y. Lee, "Antioxidative activity and content of the phenolic compounds from Salvia plebeia R. Br.", Chonbuk National University,(2011)
6. I. S. Kwak, "Comparison of Different Assays for Evaluating Antioxidant Activity of Polyphenols and Tea Extracts", Chonbuk National University,(2007).
7. B. G. Chol, S. Y. Jung, G. S. Park, J. H. Jo, Reactive oxygen substances and diseases, Shinilbooks,(2004)
8. S. M. Lee, "Study on the consumers' recognition of antioxidant health functional foods", chung-ang University,(2008)
9. S. R. Kang, M. O. Shin, S. K. Kim, S. H. Lee, M. H. Kim, "Antioxidative Activity of Pine (Pinus densiflora) Needle Extracts in Rats Fed High-Cholesterol Diet", Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, Vol.38, No.4. pp.423-429, (2009)
10. I. H. Baek,(2012). "Antioxidant activity and skin improvement effects of Smilacis glabrae Rhizoma extracts", Seokyoung University,(2012)
11. M. J. Bae, E. J. Ye, S. J. Kim, J. M. Kim, S. T. Lee, E. M. Park, "The Effects of Plebeiae Herba (Salvia plebeia R. Br.) on the Anticancer (in vitro) and Activation of Immune Cells", Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, Vol.36, No.4, pp.377-382(2007)
12. B. K. Choi, S. H. Lee, N. S. Kim, S. Y. Cho, H. H. Jang, J. B. Kim, Y. M. Lee, S. K. Yoon, S. H. Lee, "Anti-oxidative and Anti-allergic Effects of Salvia plebeia R. Ethanol Extracts", Kor. J. Pharmacogn. Vol.45, No.4. pp.332-337,(2014)
13. Ozyurt H, Ozyurt B, Koca K and Ozcocmen S., "Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress", Vascular Pharmacology, 47, pp.108-112,(2007)
14. S. H. Seo, M. O. Choi, "Protective effects of Lonicerae Japonicae Flos against hydrogen peroxidase-induced oxidative stress on Human keratinocyte, HaCaT cells", The Korea Journal of Herbology, Vol.28, No.4. pp.57-62,(2013)
15. M. J. Wu, L. Wang, H.Y. Ding, C. Y. Weng, J.H. Tyen, "Glossogyne tenuifolia acts to inhibit inflammatory mediator production in a macrophage cell line by downregulating LPS-induced NF- κ B", J. Biomed Sci, 11, 186-99(2004).
16. Aberhard, E., Henderson, S.A., Arabolos, N.S., Griscavage, J.M., Castro, F. E., Barrett, C. T., Ignarro, L. J.(1995). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit expression of the inducible nitric oxide synthase gene. Biochem. Biophys. Res. Commun., 208, 1053-1059.
17. Hyun, M.K and J.C, Jeong.(2005). Effects of Ichungwhan on the Aging Process. Korean J. Orient. Int., Med. 26, 379-389.
18. Y. H. Lee, "Chemical Stability and Whitening Activity of Mixture of Arbutin,

- Oil-soluble Licorice Extract and Vitamin C Analogues", Chung-Ang University, (2005)
19. M. H. Choi, "The antioxidant activity and whitening effect of the ethanolextract of *Ribesfasciculatum var. chinens*" Daegu Haany University,(2013)
 20. M. Y. Yoon, "Anti-oxidant and whitening activity of acteoside", Chung-Ang University,(2004)
 21. H. S. Heo, "Anti-oxidant activity and whitening activity of luteolin", Chung-Ang University,(2007)