

포도송이가지 추출물의 항염증 및 미백효능에 대한 연구

최안나^{1#}, 이현서^{1#}, 김장호¹, 조병옥^{1,2}, 신재영¹, 정승일³, 장선일^{1,2*}

1 : 전주대학교 의과학대학, 2 : (주)아토큐엔에이, 3 : (재)전주농생명소재연구원

Studies on Anti-Inflammatory and Anti-Melanogenic Effect of Grape Fruit Stem Extract

Anna Choi^{1#}, Hyun-Seo Lee^{1#}, Jang Ho Kim¹, Byoung Ok Cho^{1,2}, Jae Young Shin¹
Seung-Il Jeong³, Seon Il Jang^{1,2*}

1 : Ato Q&A Corporation, 2 : College of Medical Sciences, Jeonju University
3 : Jeonju AgroBio-Materials Institute

ABSTRACT

Objectives : The various grape extracts derived from grape pulp, seed and skin, containing various types of polyphenols and flavonoids, have been known to have anti-inflammatory, antioxidant and improve cardiovascular condition as well as sun's damaging effects. However, there have been rare reports of various beneficial effects of grape fruit stem extract (GFSE), one of the waste products of grapes. We investigated anti-inflammatory and melanogenesis inhibitory effects of GFSE.

Methods : One-hundred gram of grape fruit stem was extracted with 80% ethanol at room temperature for 3 days. After filtration, the ethanol was removed using vacuum evaporator, then lyophilized to obtain the dry extract which was stored at -20°C until used. NO levels were measured by using Greiss reagent. Prostaglandin E₂ (PGE₂) production was measured by ELISA assay. The expression levels of iNOS, COX-2, TRP-1 and TRP-2 were evaluated by western blot analysis.

Results : GFSE reduced the level of nitric oxide and prostaglandin E₂ (PGE₂) production in a dose-dependent manner, compared to control. Expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein were also effectively inhibited by the GFSE. In a tyrosinase inhibitory activity, GFSE significantly reduced the tyrosinase activity and melanin content in a dose dependent manner, compared to control. GFSE also decreased the expression of tyrosinase related protein-1 (TRP-1) and tyrosinase related protein-2 (TRP-2), known as a melanocyte-specific gene product involved in melanin synthesis.

Conclusions : Therefore, these results indicated that GFSE had powerful anti-inflammatory and anti-melanogenic effects.

Key words : grape fruit stem, antioxidant, anti-inflammation, melanogenesis inhibition.

*Corresponding author : Seon Il Jang, Department of Health Care & Science, College of Medical Sciences, Jeonju University, Jeonju, Jeonbuk 55069, Korea,

· Tel : +82-63-220-3124 · Fax : +82-63-220-2054 · E-mail : sonjjang@jj.ac.kr

#First author : Anna Choi, College of Medical Sciences, Jeonju University, 303 Cheonjam-ro, Wansan-gu, Jeonju 55069, Korea,

· Tel : +82-63-220-3124 · Fax : +82-63-220-2054 · E-mail : mm1550@naver.com

Hyun-Seo Lee, College of Medical Sciences, Jeonju University, 303 Cheonjam-ro, Wansan-gu, Jeonju 55069, Korea,

· Tel : +82-63-220-3124 · Fax : +82-63-220-2054 · E-mail : jkl14903@hanmail.net

- These two authors equally contributed in this work.

· Received : 22 March 2017 · Revised : 9 May 2017 · Accepted : 20 May 2017

I. 서론

포도(*Vitis vinifera* L.)는 갈매나무목(Rhamnales) 포도과(Vitaceae)에 속하는 낙엽성 덩굴식물로 8000년 전부터 인간이 재배한 오래된 과일이며, 전 세계적으로 소비가 매우 많은 과일 중에 하나이다. 국내 포도는 남미나 유럽의 포도 소비 형태와는 다르게 총 생산량의 3.3%만 가공에 이용되고 있고 나머지는 생식용으로 소비되고 있다^{1,2)}. 포도는 향긋한 향과 함께 당, 유기산, 미네랄, 탄닌 등을 함유하고 있다. 또한 항산화성 폴리페놀 성분인 플라보노이드, 레스베라트롤 폴리페놀 에시드 등이 풍부하게 함유되어 있어 항염, 피부노화억제, 항산화, 피부미용 및 항암 효과가 있다고 밝혀지면서 천연 염료, 화장품 및 의약품등의 기능성 소재로서 개발에 큰 관심을 받고 있다³⁻⁷⁾. 현대사회에서 아름다움의 기준은 깨끗한 피부가 되고 있으며, 생활수준이 높아짐에 따라 피부미용에도 소비와 관심이 높아지고 있다. 대기오염과 기후변화로 인한 과도한 자외선 노출 등으로 인하여 기미나 주근깨와 같은 피부질환과 성인 여드름과 같은 각종 피부 트러블로부터 피부보호와 미백 등 건강한 피부에 관심은 더욱 증가하고 있는 추세이다⁸⁻¹⁰⁾. 폴리페놀물질은 2개 이상의 폴리페놀릭 수산기를 가지고 있어 단백질 및 거대 분자들과 쉽게 결합하여 항염증과 항산화 등의 다양한 생리활성 기능을 가진다고 알려져 있다. 페놀성 화합물은 유리기를 환원시키는 능력이 강하고 인체 내에서 천연 항산화제와 노화를 억제하는 척도로도 이용할 수 있다. 폴리페놀의 이러한 생물학적 특성으로 많은 의약품과 화장품 제품들은 폴리페놀 성분이 풍부한 식물성 소재를 기본 베이스로 첨가하고 있다¹¹⁾. 피부 손상에 있어서 자외선은 홍반과 같은 염증을 일으키고 멜라닌을 증가시켜 색소 침착을 유발한다. 많은 양의 자외선이 장시간 노출될 경우 심각한 피부질환으로 이어져 피부세포 사멸, 종양이 발견되기도 한다^{12,13)}. 멜라닌은 피부의 멜라닌소체에서 만들어지고 피부 손상으로부터 피부를 보호하는데 있어 중요한 역할을 한다. 하지만 과도한 자외선에 노출 되거나, 환경오염을 포함한 외부 자극요인과 호르몬, 염증 유발인자 등의 내부 자극요인이 동시에 작용하는 경우, 멜라닌은 과잉으로 생성 및 축적되어 기미, 주근깨, 검버섯, 과다 색소침착증후군과 같은 피부장애를 일으키며, 피부노화를 촉진하고 피부암을 유발하게 된다^{14,15)}. 지금까지 알려져 있는 미백제는 멜라닌 합성에 중요한 효소인 티로시나아제 저해 활성에 집중하여 개발되었다. 대표적인 미백제로는 알부틴과 히드로퀴논, 코직산 등이 잘 알려져 있다. 하지만 히드로퀴논과 코직산은 피부자극 등과 같은 부작용이 있으며 미백효과가 약한 것으로 알려져 있다¹⁶⁻¹⁸⁾. 그러므로 더욱 안전하고 피부에 효과를 높일 수 있는 새로운 미백효능이 있는 물질을 찾기 위해 다양한 연구가 진행되어 왔으며, 그 중에서도 천연소재에 대한 관심이 높아지고 있다. 현재까지 티로시나아제 활성을 억제하는 천연소재로는 상백피, 녹차, 오미자, 울무, 감초, 등이 있으며 이외 다양한 천연소재를 이용한 미백활성 연구가 보고 되고 있다¹⁹⁻²¹⁾. 또한 염증은 병원균의 침입과 조직손상 뿐 만 아니라 외부의 물리적, 화학적인 자극에 의해 일어나는 생체조직 면역반응중 하나이며, 손상된 조직을 재생하려는 현상과 다양한 면역 세포에 의해 진행되는 복합적인 과정이다²²⁻²⁴⁾. 이 과정에는 신체 내 대식세포가 다양한 항상성 유지에 관여하며 병

원균 침입에 반응하여 여러 사이토카인과 같은 염증성 인자들을 유도하여 병원균을 제거한다²⁵⁾. 이러한 반응이 조절 되지 못하여 과도한 염증반응이 나타날 때 iNOS에 의해 생성되는 nitric oxide (NO)와 COX-2에 의해서 과량 만들어지는 PGE₂ 등과 같은 염증 촉진 인자들이 만들어지며, 이들 염증성 인자들로 인해 다양한 아토피 등과 같은 질병이 걸릴 수도 있고 사망에 이를 수 있다. 그러므로 염증인자들의 활성을 억제하는 천연유래 소재의 항염증 효능에 관한 연구가 꾸준히 진행되고 있다²⁶⁻²⁸⁾. 위에서 언급 한 바와 같이 우리나라 포도 소비의 대부분이 생식 형태로 소비되고 일부 가공 산업에 쓰여 지는 주된 원료도 포도의 과육이나 과즙이 대부분이다. 생식과 포도 가공 도중 발생하는 포도껍질이나 포도송이가지는 비료나 사료용으로 소량 사용되거나 거의 대부분 음식물 쓰레기로 폐기되고 있어 처리비용을 고려할 때 경제적 손실이 큰 편이다²⁸⁾. 따라서 본 연구에서는 포도 소비 과정에서 버려지는 부산물 중 하나인 포도송이가지 추출물(GFSE : grape fruit stem)을 이용하여 항산화 및 항염 효과를 다양한 방법으로 탐색하고, 티로시나아제 저해 활성과 멜라닌 저해효과 등을 통하여 현대 산업 분야에서 큰 관심을 받고 있는 항염, 미백효능을 조사함으로써 천연유래 기능성 원료의 바이오 소재로서의 가능성을 확인하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS)는 Invitrogen사 (Carlsbad, CA, USA)에서 구입 하였다. potassium persulfate, sodium bicarbonate, Ascorbic acid, 2-mercaptoethanol, lipopolysaccharide (LPS), prostaglandin E₂ (PGE₂)는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. Penicillin-streptomycin, cyclooxygenase-2 (COX-2)와 inducible nitric oxide synthase (i-NOS)항체는 Cayman chemical사 (Ann Arbor, MI, USA), Cell Signaling (Danvers, MA, USA), tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2) 항체는 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 이차 항체와 β -actin은 Santa Cruz Biotechnology사 (Santa Cruz, CA, USA), 기타 시약은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

2. 포도송이가지 재료

실험에 사용한 포도송이가지(Muscat Bailey A grape fruit stem) 부위 소재는 전라북도 정읍시 신태인읍 농업회사법인 주식회사 한스올가닉에서 구입한 후 우석대학교 한의과대학 본초방제학교실 김홍준 교수에게 동정하여 확인하였고, 그 표본(#GF2016-06-14)은 전주대학교 보건관리학과 연구실에 보관 하였다. 건조된 포도송이가지는 분쇄하여 100g으로 정량하여 80% EtOH 2000mL를 용매로 실온에서 72시간 방치 후 얻어진 추출물을 ADVANTEC 5A(Tokyo, Japan) 필터로 1회,

ADVANTEC 2 필터로 2회 여과 한 후 회전진공농축기(Eyela A-1000S, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 감압농축하여 에탄올을 제거하고 동결건조기(EYELA FDU-2100, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)에서 건조하여 분말형태로 23g을 회수하였다. 회수한 추출물은 -20°C 에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

3. 세포배양

마우스 배아에서 유래한 RAW264.7 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 설치류 유래 B16/F10 melanoma 세포주는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)로부터 분양받았다. B16/F10 세포와 RAW264.7 세포는 10% FBS와 1% antibiotics (penicillin & streptomycin)가 함유된 DMEM배지를 사용하여 습도가 충분하고 37°C 가 유지되는 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

4. 총 폴리페놀 함량 측정

농축 및 동결건조 된 포도송이가지 EtOH 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis reagent에¹⁷⁾ 준하여 측정하였다. 각각의 추출물과 표준 물질인 gallic acid (reference)를 0 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석하여 100 μl 를 갈색 에펜도르프 튜브에 주입하고 Folin & Ciocalteu's phenol을 100 μl 넣어 5분 동안 실온에서 반응시키고 sodium carbonate (NaCO_3)를 1 ml씩 주입시켜 다시 30분간 실온에서 반응시킨 후 분광광도계 (ELISA reader) 750 nm에서 흡광도 측정을 하였다.

5. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정은 Moreno등의²⁹⁾ 방법에 따라 포도송이가지 추출물과 Quercetin을 각 농도별로 준비한 후 10% aluminum nitrate 0.1 ml, 1 M potassium acetate 0.1 ml 및 EtOH 4.3 ml을 차례로 혼합하여 실온에서 40분 동안 방치시켜 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. DPPH 라디칼 소거 활성 측정

DPPH 라디칼 소거 활성은 Blois의³⁰⁾ 방법으로 측정하였다. 시료를 EtOH로 녹여 최종 농도가 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 정량하여 96 well plate에 각 시료를 100 μl 을 주입하고, 동시에 0.3 mM DPPH 100 μl 를 넣어 총량이 200 μl 가 되도록 하였다. 실온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland)로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거 활성(%)

$$= \{1 - (\text{시료 첨가군 흡광도} / \text{시료 무첨가군 흡광도})\} \times 100$$

7. ABTS 라디칼 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거능은 Dudonne등의³¹⁾ 방법에 의하여 측정하였다. ABTS 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6 mM을 혼합한 다음 실온, 암소에서 24시간 동안 방치하여 라디칼을 형성한 다음 ABTS 용액을 실험직전에 732 nm에서 흡광도가 ± 0.04 (\pm 표준오차)이 되도록 EtOH로 희석하여 사용하였다. 추출물의 최종 농도가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되도록 정량하여 50 μl 에 준비된 ABTS 용액 950 μl 를 첨가하여 암소에서 30분간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS의 소거활성은 시료 용액의 첨가군과 무첨가군 사이의 흡광도의 차이를 백분율로 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거 활성 (%)

$$= \{1 - (\text{첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도})\} \times 100$$

8. 환원력 측정

환원력은 Oyaizu의¹⁹⁾ 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 포도송이가지 부위별 추출물을 25 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 정량하여 증류수에 녹인 후 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 500 μl 를 각각 혼합하여 50°C 에서 반응시킨 후 실온에서 냉각하고 10% trichloroacetic acid 2.5 ml을 가하였다. 위 반응액을 1900 rpm 에서 10분간 원심 분리하여 상층액과 증류수, 1% ferric chloride를 가하여 혼합한 반응액의 흡광도 값을 700 nm에서 측정하였다.

9. NO assay

세포배양액 내의 NO는 NO의 분해산물인 nitrite (NO_2^-)를 측정함으로써 NO의 양을 간접적으로 측정하는 Griess reagent 방법³²⁾으로 측정하였다. Raw 264.7세포에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 시료를 처리하고 16시간 동안 배양하였다. 배양 상층액과 같은 양의 griess reagent를 섞어 실온 암소에서 10분 동안 방치 후 분광광도계(ELISA reader)를 활용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10. PGE₂ assay

PGE₂의 측정은 R&D systems사가 제공하는 방법에 따라 실험하였다. 실험방법은 RAW 264.7 세포에 포도송이가지 추출물을 1시간 전처리하고 LPS (lipopolysaccharide)를 처리하여 16시간 배양 후 상층액을 PGE₂ 측정에 사용하였다. goat anti-mouse로 코팅된 96 well plate에 각각의 배양액을 100 μg 씩 주입하였고, primary antibody solution 50 μg 과 PGE₂ conjugate 50 μg 씩 첨가하여 실온에서 반응시킨다. 반응 후, 기질 용액을 200 μg 처리하여 반응시킨 후, 50 μg 의 stop solution을 처리하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

11. B16/F10 멜라닌세포의 Tyrosinase 활성 측정

B16/F10세포의 tyrosinase 활성은 Yagi등의³³⁾ 방법을 용

용하여 측정하였다. B16세포는 well 당 4×10^4 cell/ml로 계수하여 6 well plate에 접종하였다. 접종 후 α -MSH (1 μ M)로 자극하여 16시간 배양하고 포도송이가지 추출물을 농도별 (25, 50, 75, 100 μ g/ml)로 처리하여 48시간 배양하였다. 배양된 세포는 PBS용액으로 2회 세척 후 0.2% trypsin을 처리하여 수거하였다. 세척된 세포는 PBS용액을 사용하여 1,500 rpm으로 2회 원심세척하고 NP-40 lysis buffer (St. Louis, MO, USA) 를 100 μ l 주입하고 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치한 후 12,000 rpm으로 20분 동안 원심 분리하여 상층액을 얻었다. Bradford method로 단백질 정량하였고, 각각의 세포용해액은 well 당 100 μ l씩 96 well plate에 주입한 후 여기에 인산완충액(pH 6.8)에 0.1% L-dihydroxy phenylalanine (L-DOPA) 용액을 100 μ l을 다시 주입하여 혼합하고 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 방치한 후 405 nm ELISA reader를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

12. 멜라닌양 측정

B16/F10 멜라닌 세포를 6 well plates에 4×10^4 cells/ml개로 분주하여 배양한다. 배양된 세포는 α -MSH (1 μ M)로 자극하여 방치 후 포도송이가지 추출물을 처리하여 48시간 배양한다. 배양 후 배지를 제거하고 1 N NaOH를 500 μ l 주입하고 24시간 세포를 녹인 다음 100 $^{\circ}$ C에서 20분간 가열하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

13. Western bolt analysis

B16/F10 세포를 6 well plates에 4×10^4 cells/ml개로 분주하여 24시간 배양하고 α -MSH (1 μ M)로 자극하여 방치 후 포도송이가지 추출물을 처리하여 48시간 배양한 B16/F10 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하고, NP-40 lysis buffer를 혼합하여 얼음위에서 반응시킨 후 12000 rpm에서 5분 원심 분리하여 상층액을 회수하였다. 단백질 농도는 Bradford protein assay reagent를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 정량 후의 동일한 단백질 양의 각 시료를 SDS-polyacrylamide gel (7.5 ~ 12%)을 사용하여 변성 분리하고 100V로 2시간동안 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Bio-Rad)에 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk가 함유된 Tris buffered saline에 실온에서 blocking하였으며, primary antibody로 anti - COX-2 polyclonal antibody와 anti - iNOS polyclonal antibody 그리고 anti - TRP-1 polyclonal antibody, anti - TRP-2 polyclonal antibody를 각각 1 : 200 으로 희석하여 처리한 후 4 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 반응된 TBS-T(Tris-buffered saline and 0.1% tween 20)로 10분씩 3회 washing하고, secondary antibody (goat anti-rabbit IgG HRP)를 5% skim milk에 각각 1 : 5000으로 희석하여 실온에서 1시간동안 반응시킨 뒤 다시 10분씩 3회 washing하였다. 크기별로 분류된 단백질은 발광할 수 있는 물질과 반응시켜 확인하였다. Band density는 ImageJ gel analysis software (National Institutes of Health, Maryland, USA) 프로그램을 사용하여 분석하였다.

14. 통계처리

모든 실험값은 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 표시하였고, 통계학적 비교분석은 IBM SPSS statistics 22 (IBM, New York, NY, USA)를 이용하였고 각 실험군간의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)로 처리하였으며, 실험군들과의 유의차를 알아보기 위한 다중비교방법으로 Duncan's multiple range test 검정을 실시하였다. 검정 유의도는 P 값이 <0.05 수준일 때를 기준으로 하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 포도송이가지 추출물의 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량 및 항산화 평가

포도송이가지 추출물의 항산화 성분을 측정하기 위해 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 분석 한 결과 각각 약 7990 \pm 32mg/100g과 9110 \pm 11mg/100g 의 함량을 나타냈다(Table. 1). Makris등의 연구 결과에서 포도 부산물 중의 하나인 포도껍질의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 3625 \pm 290mg/100g과 3587 \pm 323mg/100g으로 보고된 결과와 비교 했을 때³⁴⁾ 포도송이가지 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함유량이 유의하게 높은 것으로 나타났다. 또한 DPPH와 ABTS free radical 소거 활성이 좋은 것으로 알려진 합성 항산화제는 세포의 대사 및 미토콘드리아 전자전달계의 작용을 방해하며 발암성 및 독성이 강하다는 문제점이 보고되고 있다³²⁾. 따라서 본 연구에서 DPPH와 ABTS를 이용하여 포도송이가지 추출물의 항산화 활성을 평가한 결과, DPPH와 ABTS free radical 소거능은 포도송이가지 추출물이 농도(25, 50, 75, 100 μ g/ml) 의존적으로 현저하게 증가하였다. 환원력은 Ascorbic acid와 비교하여 연구하였다. 결과는 Table 4와 같이 25 μ g/ml농도에서 0.13 \pm 0.01%로 낮은 활성이 보였지만 100 μ g/ml농도에서 0.29 \pm 0.01%로 적지만 활성이 증가한 것으로 봤을 때 농도가 증가할수록 활성이 증가되는 것을 알 수 있다. 이전 연구 결과에 의하면 포도송이가지 추출물에 항산화 효능이 우수한 레스베라트롤이 다량 함유되어 있고, 총 폴리페놀이 1 g 당 약 8 mg이 있는 것으로 보고하였지만³³⁾, 본 연구에서는 1 g 당 약 79.9 mg으로 약 10배 정도 높은 것으로 나타났다. 또한 Jeong 등³⁴⁾은 Muscat Bailey A (MBA) 포도송이줄기를 첨가하여 제조한 포도주에 레스베라트롤 함량이 높을 뿐만 아니라, 항산화 효능 또한 우수한 것으로 나타났다. 따라서 본 연구결과에서 나타난 효능은 높은 폴리페놀 및 플라보노이드 성분에 의한 것으로 사료되며, 본 연구실에서 추가 연구를 통한 성분 분석을 진행 중에 있다.

Table 1. Total polyphenol and Total flavonoid contents of GFSE

Extract	Total polyphenol ¹⁾	Total flavonoid ²⁾
GFSE	7990 \pm 32 ³⁾	9110 \pm 11 ³⁾

¹⁾ GAE : mg gallic acid equivalent/100g dried grape fruit stem extract (GFSE)

²⁾ QE : mg quercetin/100g dried grape fruit stem extract(GFSE)

³⁾ Mean values \pm SD of determinations were made in triplicate experiments.

Table 2. DPPH Radical scavenging activity of GFSE

GFSE or compound ¹⁾ ($\mu\text{g/ml}$)	DPPH Radical scavenging activity (%)
25	24.6 \pm 0.1 ^{2),a)}
50	57.6 \pm 0.5 ^{2),b)}
75	69.9 \pm 0.6 ^{2),c)}
100	86.3 \pm 0.1 ^{2),d)}
IC50 ³⁾	44.4 \pm 0.2
BHT (100 $\mu\text{g/ml}$)	53.1 \pm 0.1 ^{2),b,e)}

¹⁾ Reference compound : BHT (butylated hydroxyanisole).
²⁾ Each value is the result of mean \pm SD of three independent experiments.
³⁾ IC50 : Sample concentration ($\mu\text{g/ml}$) was 50% activity loss.
^{a-e)} Means in the same row not sharing common superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

Table 3. ABTS Radical scavenging activity of GFSE

GFSE or compound ¹⁾ ($\mu\text{g/ml}$)	ABTS Radical scavenging activity (%)
25	15.2 \pm 0.1 ^{2),a)}
50	25 \pm 0.1 ^{2),b)}
75	34.1 \pm 0.1 ^{2),c)}
100	50.8 \pm 0.3 ^{2),d)}
IC50 ³⁾	108.9 \pm 0.8
Trolox (100 $\mu\text{g/ml}$)	75.9 \pm 0.5 ^{e)}

¹⁾ Reference compound : Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid).
²⁾ Each value is the result of mean \pm S. D of three independent experiments.
³⁾ IC50 : Sample concentration ($\mu\text{g/ml}$) was 50% activity loss.
^{a-e)} Means in the same row not sharing common superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

Table 4. Reducing power of GFSE

GFSE or compound ¹⁾ ($\mu\text{g/ml}$)	Reducing power (O.D.)
25	0.13 \pm 0.01 ^{2),a)}
50	0.15 \pm 0.01 ^{2),a)}
75	0.21 \pm 0.01 ^{2),b)}
100	0.29 \pm 0.01 ^{2),c)}
Ascorbic acid (100 $\mu\text{g/ml}$)	1.07 \pm 0.01 ^{2),d)}

¹⁾ Reference compound: Ascorbic acid.
²⁾ Each value is the result of mean \pm S. D of three independent experiments.
^{a-e)} Means in the same row not sharing common superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

2. 포도송이가지 추출물이 NO와 PGE₂ 생성에 미치는 영향

염증 반응은 대식세포의 활성화로 인해 염증인자가 증가하여 나타나며 과도한 염증반응은 정상조직을 손상시키고 암이나 대사성 질환 등의 주요 원인으로 작용 한다고 알려져 있다. 염증을 매개하는 물질로 NO, 프로스타글란딘, 히스타민 등이 알려져 있는데 이들 중 프로스타글란딘은 염증이나, 신경 전달 물질 분비 등과 같은 생리적 변화에 관여한다. 프로스타글란딘 계통의 신호분자로서 발열 및 동통 등을 유발하는 염증반응에 중요하게 작용하는 프로스타글란딘 PGE₂는 혈관 확장, 부종, 발열, 동통 등을 매개한다³⁵⁾. 따라서 본 연구에서는 포도송이가지 추출물이 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 1). 그 결과 포도송이가지 추출물의 농도가 증가 할수록 염증매개 인자인 PGE₂ 생성은 유의적으로 감소되었다.

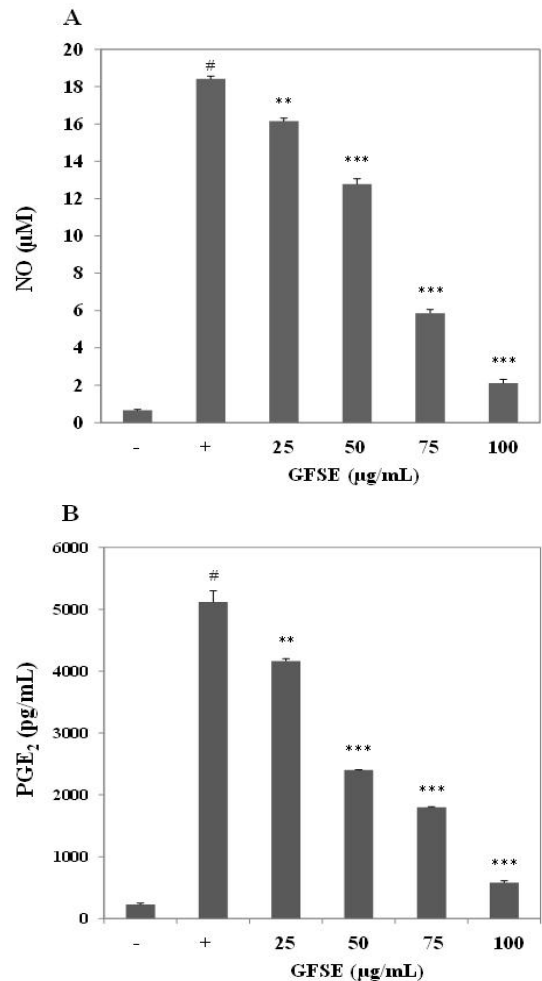


Figure 1. Inhibitory effects of GFSE on NO and PGE₂ production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.

(A) : NO production, (B) : PGE₂ production. RAW264.7 Cells (2×10^5 cell/ml) were pretreated with or without extract at indicated concentrations for 2 hour, and then incubated with or without 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS for 16 hours. NO released by cells was measured by the method of Griess. Data were means \pm SD of three independent experiments. # p<0.001 : compared to control group. * p<0.05 and **p<0.01 and ***p<0.001 : compared to the LPS treated group.

3. 포도송이가지 추출물이 COX-2, iNOS 발현에 미치는 영향

본 연구에서는 포도송이가지 추출물의 iNOs, COX-2 유전자 발현 억제 효과를 알아보고자 western blot을 수행하였다. 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포주에 LPS를 처리하여 염증을 유도 한 후 포도송이가지 추출물을 처리 한 결과, iNOs와 COX-2 유전자 발현은 농도 의존적으로 유의하게 감소되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 NO 생성 저해와 유사한 경향을 보였다. NO생성 효소인 iNOS 와 PGE₂의 생성에 관여하는 효소인 COX-2의 발현을 억제하는 것은 염증반응을 조절하는데 매우 중요한 요소이며 iNOS는 세포내에 존재하지 않으나 자극에 의해 유도가 되면 NO를 생성하며 생성된 NO는 혈관확장, 세포독성, 조직손상과 같은 작용을 하며 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다. NO생성 억제는 iNOS 단백질 발현 저하 기전을 경유한 것으로 사료된다.

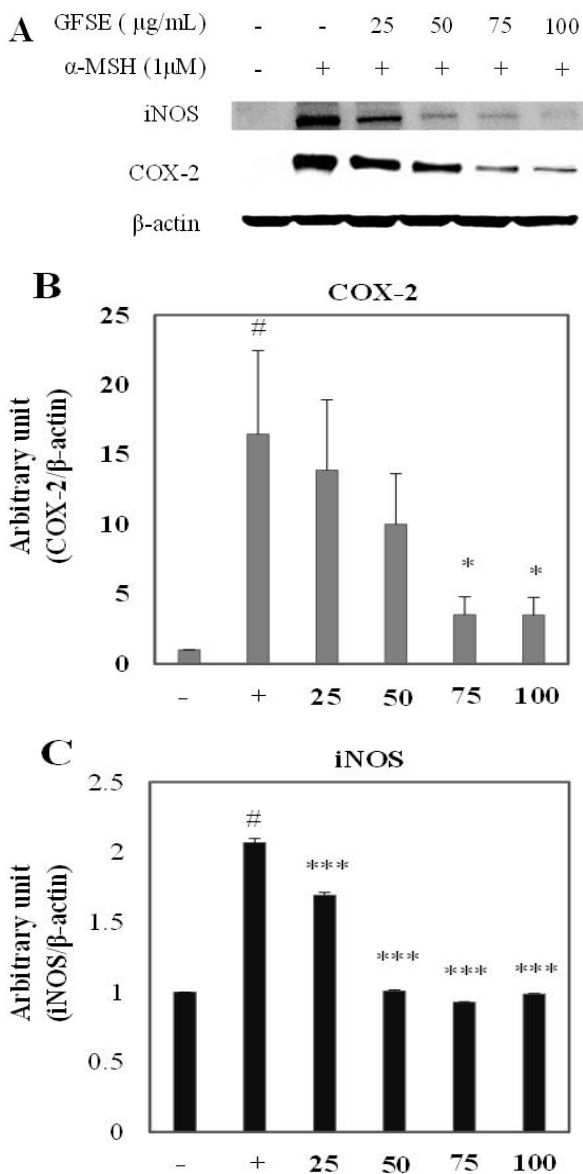


Figure 2. Inhibitory effects of LPS-induced iNOS and COX-2 protein expression on GFSE in RAW264.7 cells. (A) iNOS and COX-2 protein expression. The expression levels of COX-2 were determined by western blotting as described in Materials and Methods. (B and C) The density of each band in an immunoblot was analyzed using the ImageJ gel analysis software.

4. 포도송이가지 추출물의 Tyrosinase 저해 효과

포도송이가지 추출물이 멜라닌 합성에 관계된 효소인 tyrosinase에 미치는 영향을 알아보기 위하여 α-MSH로 자극한 B16/F10 멜라닌세포에 포도송이가지 추출물을 처리하여 tyrosinase의 효소 저해 효과와 멜라닌 생성 억제 효과를 측정하였다. 미백 효과를 나타내는 물질은 tyrosinase의 효소 활성 혹은 eumelanin 합성에 관여하는 단백질 발현 억제 기전을 통해 멜라닌 생성을 억제한다. 멜라닌은 노란색과 빨간색을 나타내는 pheomelanin과 갈색과 검은색을 나타내는 eumelanin의 두 가지 종류로 체내에서 합성되는데, 이러한 과정에서 여러 효소들이 관여한다. Tyrosinase는 L-tyrosine을 L-DOPA로, L-DOPA를 DOPAquinone으로 변화시키는데 작용하는 멜라닌

생성 key enzyme이다. DOPAchrome에서 여러 단계를 거치면서 최종적으로 black과 brown색소인 eumelanin이 생성되는데 이 과정에 관여하는 효소가 TRP-1과 TRP-2이다^{36,37}. 본 실험 결과 B16/F10 멜라닌세포에 멜라닌 합성 호르몬인 α-MSH을 처리한 후 포도송이가지 추출물을 처리한 군은 α-MSH 단독 처리 군에 비해서 농도 의존적으로 멜라닌 합성 양이 감소되었으며, tyrosinase 활성 측정 결과 역시 포도송이가지 추출물을 처리한 군은 α-MSH 단독 처리 군에 비해서 티로시나아제 활성을 유의하게 억제하였다(Fig. 3).

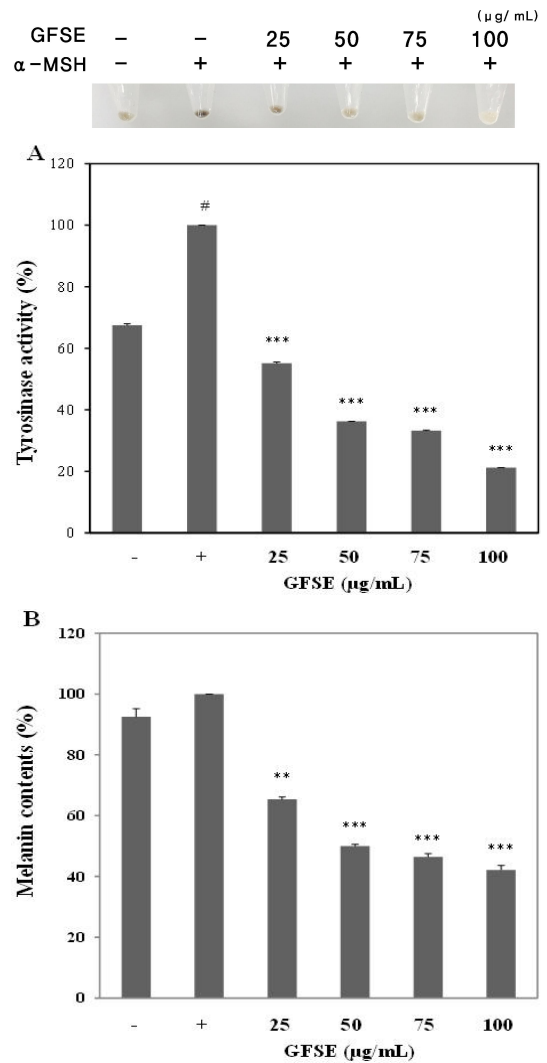


Figure 3. Inhibitory effects of GFSE on tyrosinase activity and melanin contents in B16/F10 cells. (A) tyrosinase activity. (B) melanin contents. Cells were seeded at 4×10^5 cell/ml. After 16 hours, α-MSH was treated and followed by treating with several concentrations of GFSE for 48 hours. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Means ± SD of determinations were made in triplicate experiments. # p<0.01; compared to control group. * p<0.05 and **p<0.01 and ***p<0.001 : compared to the α-MSH treated group.

5. 포도송이가지 추출물이 TRP-1, TRP-2 발현에 미치는 영향

위에서 언급한 바와 같이 tyrosinase와 마찬가지로 TRP-1과

TRP-2는 멜라닌 합성에 중요한 역할을 하는 효소이다. 본 연구에서는 Western blot 분석을 통해 TRP-1과 TRP-2 단백질 발현 변화를 조사하였다(Fig. 4). 그 결과 포도송이가지 추출물은 α -MSH에 의해 증가된 TRP-1과 TRP-2 단백질 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다. 결과적으로 포도송이가지 추출물은 tyrosinase 활성을 억제하고 TRP-1과 TRP-2 발현을 감소시킴으로서 멜라닌 합성을 억제하였음을 알 수 있다.

IV. 결 론

본 연구에서 포도송이가지 추출물을 대상으로 항산화 효과와 미백효과를 검증한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드함량, DPPH, ABTS 라디칼 소거 활성 및 환원력이 우수하였다.
2. 포도송이가지 추출물이 염증과 관련된 COX-2, iNOS 단백질 발현에 미치는 영향을 조사한 결과 COX-2와 iNOS 단백질 발현이 농도 의존적으로 줄어들었고, NO와 PGE₂ 생성 억제 여부를 관찰한 결과 포도송이가지 추출물 농도 의존적으로 현저히 감소하였다.
3. 또한 B16/F10 세포에서 포도송이가지 추출물이 tyrosinase 활성을 억제하고 TRP-1, TRP-2 발현을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

이러한 결과를 바탕으로 포도송이가지 추출물의 우수한 항염 효과와 노화 방지에 중요한 역할을 하는 탁월한 항산화 활성 뿐 만 아니라 피부미용 분야에 주된 관심사인 미백효능을 통해 안전성을 확보하고 고부가가치를 창출할 수 있는 천연 유래소재 기능성 화장품이나 식품 등의 첨가물로서의 사용 가능성을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청의 기술혁신개발사업[S2385924, 고음나무와 울금 유래 바이오 활성물질을 활용한 코스메슈티컬 제품 개발]과 2016년 풀뿌리기업육성[R0005297, 닥나무 소재의 생리활성 물질을 활용한 코스메슈티컬 시트(부직포), 액상소재 및 제품개발, 공간조성] 사업의 일환으로 수행하였음

References

1. Shin HJ, Kang BS, Ahn JB, Kim BH. Isolation and purification of resveratrol from a grape twig. *Korean J Biotechnol Bioeng.* 2011 ; 22 : 351-5.
2. Jang JK, Han JY. The antioxidant ability of grape seed extracts. *Korean J Food Sci Technol.* 2002 ; 34 : 121-4.
3. Renauds S, Loregeril M. Wine, alcohol, platelets, and the french paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992 ; 339 : 1523-6.
4. Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanner J. Possible mechanisma for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol.* 1993 ; 4 : 85-9.
5. Kanner J, Frankel E, Granit R, German B, Kinsella JE. Natural antioxidants in grapes and wines. *J Agric Food Chem.* 1994 ; 42 : 64-9.
6. Tanahashi H, Suwa Y, Toyoda Y, Itakura H. Clinical and component studies on antioxidant ability of red wine. *Am J Enol Vitic.* 1995 ; 46 : 405-9.
7. Clare MH. Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. *Food Technol.* 1998 ; 52 : 63-70.
8. Chen JS, Wei C, and Marshall MR. Inhibitionmechanism of Kojic acid on polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem.* 1991 ; 39 : 1897-901.
9. Urabe K, Aroca P, Tsukamoto K, Mascagna D, Paulumbo A, Prota G et al. The inherent cytotoxicity of melanin precursors. *Biochim Biophys Acta.* 1994 ; 1221 : 272-8.
10. Jin KS, Oh YN, Park JA, Lee JY, Jin SJ, Hyun SK et al. Anti-Oxidant, Anti-Melanogenic, and Anti-Inflammatory Activities of Zanthoxylum schinifolium Extract and its Solvent Fractions. *Korean J Microbiol Biotechnol.* 2012 ; 40 : 371-9.
11. Kim JS, Kim KL. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effects of Artemisiae Capillaris Extract. *Kor J Aesthet Cosmetol.* 2015 ; 13 : 805-12.
12. Shimoda N, Mutou Y, Shimura N, Tsukimoto M, Awaya A, Kojima S. Effect of heterocyclic pyrimidine compounds on UVB-induced cell damage in human keratinocytes and on melanogenesis in mouse B16 cells. *Biol Pharm Bull.* 2010 ; 33 : 862-8.
13. Svobodova A, Walterova D, Vostalova J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006 ; 150 : 25-38.
14. Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 2007 ; 21 : 976-94.
15. Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Oetting WS, Ortonne JP. *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology.* 2nd Edition, Wiley-Blackwell, 2007.
16. Chakraborty AK, Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 1998 ; 11 : 206-12.
17. Halder RM, Richards GM. Topical agents used in the management of hyperpigmentation. *Skin Therapy*

- Lett. 2004 ; 9 : 1-3.
18. Maeda K, Fukada M, *In vivo* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem*, 1991 ; 42 : 361-8.
 19. Lee JS, Kim JA, Cho SH, Son AR, Jang TS, So MS, Chung SR, Lee SH. Tyrosinase inhibitors isolated from the roots of glycyrrhiza glabra L. *Kor J Pharmacogn*, 2003 ; 34 : 33-9.
 20. You MJ. Inhibitory Effect of Morus alba Extracts on Tyrosinase Activity and Melanogenesis in SK-MEL-2 cells. *Kor J Aesthet Cosmetol*, 2011 ; 9 : 19-30.
 21. No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, Chung HY. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci*, 1999 ; 65 : PL241-6.
 22. Maines MD. The oxygenase system: a regular of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997 ; 37 : 517-54.
 23. Zedler S, Faist E. The impact of endogenous triggers on trauma associated inflammation. *Curr Opin Crit Care*, 2006 ; 12 : 595-601.
 24. Zamora R, Vodovtz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med*, 2000 ; 6 : 347-73.
 25. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994 ; 91 : 2046-50.
 26. Higuchi M, Higashi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol*, 1990 ; 144 : 1425-31.
 27. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol*, 2007 ; 147 : 227-35.
 28. Shin HJ, Kang BS, Ahn JB, Kim BH. Isolation and purification of resveratrol from a Grape Twig. *Korean J Biotechnol Bioeng*, 2007 ; 22 : 351-5.
 29. Moreno DA, Carvajal M, López-Berenguer C, García-Viguera C. Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *J Pharm Biomed Anal*, 2006 ; 41 : 1508-22.
 30. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958 ; 181 : 1199-1200.
 31. Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Merillon JM. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agr Food Chem*, 2009 ; 57 : 1768-74.
 32. Lee HJ, Oh TH, Yoon WJ, Kang GJ, Yang EJ, Park SS, Lee NH, Kang HK, Yoo ES. Eutigoside C inhibits the production of inflammatory mediators(NO, PGE₂, IL-6) by down-regulating NF- κ B and MAP kinase activity in LPS-stimulated RAW264,7 cells. *J Pharm Pharmacol*, 2008 ; 60 : 917-24.
 33. Cho CH, Kim SY, Yoo GJ, Son MH, Park KH, Lim BL, Kim DC, Chae HJ. Resveratrol extraction from grape fruit stem and its antioxidant activity. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2008 ; 51 : 11-16.
 34. Jeong SH, Chang EH, Hur YY, Jeong SM, Nam JC, Koh SW, Choi IM. Phenolic compounds of must and wine supplemented with Muscat Bailey A grape fruit stem. *Korean J Food Preserv*, 2015 ; 22 : 91-99.
 35. Oh HI, Park HB, Ju MS, Jung SY, Oh MS. Comparative Study of Anti-oxidant and Anti-inflammatory Activities between Curcuma longae Radix and Curcuma longae Rhizoma. *Kor J Herbology*, 2010 ; 25 : 83-91.
 36. Kim SS, Kim MJ, Choi YH, Kim BK, Kim KS, Park KJ, Park SM, Lee NH, Hyun CG. Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16 F10 melanoma. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2013 ; 3 : 617-22.
 37. Oh SM, Mun YJ, Woo WH. Effects of Rubus coreanus Miquel on the Expressions of Tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in B16 Melanoma Cells. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*, 2007 ; 21 : 1456-61.