

## 항산화와 미백효과를 증진시킨 새로운 Sulforaphane 함유 혼합 조성의 개발

이지혜\*·최강현\*·박영금\*·김응국·신은영<sup>†</sup>

충북대학교 의과대학 생화학교실

\*(주)그라젬

(2018년 10월 30일 접수, 2018년 12월 4일 수정, 2018년 12월 18일 채택)

### Development of Novel Sulforaphane Contained-composition to Increase Antioxidant and Whitening Effects

Ji Hye Lee\*, Kang Hyun Choi\*, Young Kum Park\*, Eung-Gook Kim, and Eun-Young Shin<sup>†</sup>

Department of Biochemistry, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

\*Gragem Co., Ltd., Incheon 21999, Korea

(Received October 15, 2018; Revised December 4, 2018; Accepted December 18, 2018)

**요약:** 본 연구는 새로운 항산화 및 미백 기능성 화장품 성분을 개발하기 위해 기존의 항산화와 미백 기능성 성분으로 알려진 두 가지 성분을 혼합한 새로운 조성을 개발하고, 이를 이용해 항산화 및 미백효과를 알아보고자 하였다. 두 가지 성분은 항산화와 멜라닌 생성억제 기능이 알려진 sulforaphane과 멜라닌 생성 억제 효과가 알려진 PF-3758309이다. 각 성분 및 혼합 조성에 대한 세포독성을 조사하여 세포독성이 나타나지 않는 농도를 결정하였다. 단독 처리 시 sulforaphane는 10  $\mu$ M까지, PF-3758309는 100 nM까지 세포독성이 없다는 것을 확인하였다. 두 화합물 10  $\mu$ M sulforaphane과 1 nM PF-3758309를 병합 처리 시 세포독성은 없었다. LPS 자극에 의해 생성된 일산화질소는 sulforaphane과 PF-3758309의 병합 처리시 현저히 감소되었다.  $\alpha$ -MSH에 의한 멜라닌 생성 역시 병합 처리에 의해 억제되었다. 화장품 소재로 사용 가능성을 확인하기 위해 혼합 조성 시료에 대한 인체적용시험을 실시하였다. 혼합조성 시료는 피부침포에 의한 안전성 평가는 무자극으로 판정되었고, 피부밝기 증가효과와 피부 멜라닌 침착을 억제함을 확인하였다. 이러한 결과들로 혼합 조성물이 항산화와 미백 기능이 있는 새로운 기능성 화장품 조성으로 개발될 가능성을 확인할 수 있었다.

**Abstract:** In this study, we analyzed two components, sulforaphane and PF-3758309 to prove that the mixed composition of them has more effective antioxidant and whitening functions compared to each component. We analyzed the cellular toxicity of each component and also the mixed composition to find the safe concentration level for cell viability. From the single component treatment, we discovered that sulforaphane was safe up to 10  $\mu$ M, and PF-3758309 up to 100 nM. Combination treatment of 10  $\mu$ M sulforaphane and 1 nM PF-3758309 did not affect the cell viability. The LPS-stimulated NO generation was significantly reduced by the mixed composition of sulforaphane and PF-3758309. Melanogenesis by  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) was also inhibited by the mixed composition. In order to confirm the possibility as the cosmetic material, we carried out clinical studies for the mixed composition samples. Skin safety evaluation using patch test was judged to be unstimulated, skin whitening effect was increased, and melanin deposition was suppressed by treatment of mixed composition samples. These results provide us with the opportunity for applying it into the development of new functional cosmetics.

**Keywords:** sulforaphane, functional cosmetics, antioxidant, whitening, skin

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: eyshin@chungbuk.ac.kr)  
call: 043)261-2865

## 1. 서 론

최근 들어, 인간의 수명이 증가함에 따라 아름답고 젊은 피부를 원하는 사람들의 요구에 맞춰 다양한 화장품들이 출시되고 있다. 화장품 과학의 발달은 기존의 화장품들보다 한층 업그레이드된 제품의 개발을 가능케 한다. 기능성 화장품의 개발에는 화장품 기업뿐 아니라 바이오, 제약, 의료기기 기업들도 적극적으로 참여하고 있는 추세이다. 피부 과학에 대한 연구가 활발해짐에 따라 기능성 천연 화장품이 개발 되었으며, 미백, 보습, 자외선 차단 및 흡수, 유해산소제거, 콜라겐 합성, 피부주름방지 등 다양한 효능을 가진 천연 소재에 대한 관심도 증가하고 있다.

피부는 표피, 진피, 피하 조직으로 구성되어 있으며, 외부로부터 신체를 보호하는 기능 외에도 체온 및 면역 기능을 조절한다[1]. 자외선은 피부노화를 일으키는 대표적인 원인 중의 하나이다. 자외선에 의한 피부 손상, 즉 색소의 침착은 흑색 종, 주근깨 등을 생성시키는 것으로 잘 알려져 있다[2]. 자외선은 파장에 따라 UVA, UVB, UVC 세 군으로 나눌 수 있다. UVA는 파장이 긴 광선으로 피부의 진피까지 침투해 피부 노화의 원인으로 작용한다. UVB는 에너지가 가장 높은 광선으로 피부 진피, 표피까지 영향을 주기 때문에 노화, 홍반, 피부암 등을 유발하며 멜라닌 합성에도 직접적으로 관여한다. 또한, 피부 세포 내 활성 산소를 생성하여 직접 DNA의 손상을 일으켜 산화적 스트레스를 유발시킨다. UVC는 짧은 파장으로 오존층에서 대부분 흡수되어 지구상에는 거의 도달하지 않는다[3].

일상생활에서 흔히 접하는 식품인 십자화과 채소에 속하는 브로콜리는 항산화 성분인 sulforaphane (4-methylsulfinylbutyl isothiocyanate, SFN)을 많이 함유하고 있다[4]. Sulforaphane은 유기 황 화합물인 isothiocyanate (ITC) 그룹 내의 화합물로 채소를 통해 섭취했을 때 활성산소 생성을 억제하는 항산화 효과를 나타내 활성산소에 의해 손상을 억제하는 것으로 알려져 있어 건강보조 식품으로 많이 응용되고 있다[5]. Sulforaphane은 nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2 (Nrf2)의 유비퀴티네이션을 억제하여 Nrf2 단백질의 안정성을 증가시킨다. 이는 Nrf2의 핵으로 이동을 유도하여 antioxidant response element (ARE)-dependent genes의 발현을 증가시킨다[6]. 이때

발현이 증가되는 단백질은 glutathione (GSH) 및 thio-redoxin reductase같은 항산화 기능을 조절하는 단백질들이다. Sulforaphane은 이 기전을 통해 항산화 기능을 가지는 것으로 잘 알려져 있다. 또한, sulforaphane을 포함한 isothiocyanate계의 성분은 전립선 암 등에서 histone deacetylase (HDAC) 및 caspase-dependent apoptosis를 억제한다고 보고되어 있다[7]. 화장품 성분으로써 sulforaphane은 항산화 기능에 의한 항노화 효과를 기대할 수 있다. 사람 피부에는 산화적 스트레스 환경으로부터 피부를 보호하는 항산화 방어막이 존재하는데 산화적 스트레스가 과하게 생성되면 항산화 방어막은 파괴되어 피부 질환 및 노화를 야기시킬 수 있다[8]. 그러므로, sulforaphane은 피부 노화를 예방하고, 피부에 나쁜 영향을 주는 활성산소를 없애 피부를 더욱 건강하게 만드는 효과를 보여주고 있다[9]. 또한, sulforaphane은 mitogen activated kinase (MAPK)의 활성을 조절하여 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 알려졌다[10]. Sulforaphane은 extracellular signal-regulated kinase (ERK)의 활성을 증가시키고, p38-MAPK 활성은 억제하여 tyrosinase 발현을 억제한다. 이 기전을 통해 멜라닌 합성을 억제함으로써 미백기능을 나타내는 것으로 보고되어 있다[10]. 이러한 항산화 및 미백기능으로 인해 sulforaphane은 다양한 화장품 제품에 기능성 성분으로 첨가되어 사용되고 있다.

PF-3758309는 p21-activated kinase 4 (PAK4)의 저분자 저해제이며 세포의 증식, 분화, 발암 등을 억제하는 항암제 후보 물질로 개발되었다[11]. 또한, 본 연구자의 선행연구를 통해 PF-3758309는 PAK4 저해를 통해 멜라닌 생성을 억제한다는 기능을 규명한 바 있다[12]. 멜라닌 생성의 주요 기전은 아미노산 티로신(tyrosine)을 L-DOPA로 분해하는 tyrosinase 생성과 활성화에 의해 조절된다. 지금까지 알려진 미백 기능성 화장품의 성분 중에는 tyrosinase의 생성과 활성을 저해하는 물질들이 많이 있다. Tyrosinase의 생성은 전사인자 Microphthalmia-associated transcription factor (MITF)에 의해 조절되는데, MITF의 생성의 상위 조절자로 또 다른 전사인자 cAMP response element-binding protein (CREB)이 있고, PAK4는 바로 이 CREB의 양을 조절함으로써 MITF 발현을 억제하고, 결과적으로 tyrosinase의 발현을 억제한다. 이 과정을 거쳐 최종적으로 멜라닌 생성이 억제하는 것으로 알려졌다[13]. 그러나 PF-3758309에 의한

직접적인 항산화 조절 기능은 아직 알려진 바 없다. 본 연구는 sulforaphane과 PF-3758309의 혼합 조성이 각각에 대한 단일 화합물로 처리하였을 때보다 항산화와 미백기능이 증진되는가를 관찰하여, 두 물질의 혼합 조성이 항산화와 미백기능을 향상된 기능성 화장품 조성으로써 사용할 수 있는가에 대한 가능성을 검증하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시약

Lipopolysaccharides (LPS), arbutin, acetylsalicylic acid (ASA),  $\alpha$ -MSH, sulforaphane (SFN)은 Sigma (USA)로부터 구입하였다. PF-3758309은 Cayman Chemical (USA)로부터 구입하였다. B16F10 멜라노마 세포와 RAW 264.7 세포는 한국세포주 은행(Korea)에서 구입하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 및 cell proliferation assay kit는 Intron Biotechnology, Inc. (Korea)에서 구입하였다. Sulforaphane과 PF-3758309의 혼합 조성 성분에 대한 인체적용 시험은 (주)엘리드에서 시행하였다.

### 2.2. 세포배양

B16F10 멜라노마 세포는 5% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다[14]. RAW 264.7 세포는 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin을 함유한 DMEM 배지에서 배양하였다[15]. 두 세포는 37 °C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 배양하였다.

### 2.3. 세포독성 측정

Sulforaphane, PF-3758309 및 sulforaphane+PF-3758309의 세포독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 사용하였다. 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포는 96-well plate에 well당  $1 \times 10^4$ 의 세포수로 분주하고 시료를 농도 별로 가한 후 24 h 동안 37 °C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 24 h 후 배양용액에 MTT solution을 10  $\mu$ L를 넣고 4 h 배양하였다. 그 후 상층액을 버리고, 용출용액(10% triton-x in acidic isopropanol)을 well당 100  $\mu$ L씩 넣고 microplate reader (Bio-Rad, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다[15]. 동일한 조건으로 3회 반

복적으로 실험하여 평균값을 측정하였다.

### 2.4. 활성산소 생성 저해 측정

RAW 264.7 세포는 24-well plate에  $1 \times 10^4$ cells/mL로 각 well당 1 mL씩 분주하였다. 18 h 후 96-well plate에 세포 배양 상등액 100  $\mu$ L와 Griess 시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid +1%  $\alpha$ -naphthylamide in H<sub>2</sub>O) 100  $\mu$ L를 혼합한 후, 10 min 동안 반응시켜 microplate reader (Bio-Rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다[16]. Sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)를 standard로 사용하여 비교하였다. 동일한 조건으로 3회 반복적으로 실험하여 평균값을 측정하였다.

### 2.5. 멜라닌 생성 저해 측정

B16F10 멜라노마 세포를 6-well plate에 2 mL로 분주한 후 5% FBS가 함유된 DMEM 용액에서 48 h 동안 배양하였다. 그리고 시료를 각각의 농도로 37 °C에서 30 min 배양하여 전 처리한 후, 50 nM의  $\alpha$ -MSH를 처리하여 37 °C에서 72 h 동안 배양하였다. 배양이 끝나고 난 후 이를 13000 rpm에서 5 min 원심분리 하여 얻은 cell pellet에 1 N NaOH와 10% DMSO를 가하고 95 °C에서 20 min 끓인 후 멜라닌을 완전히 녹여 96-well plate에 150  $\mu$ L를 옮기고 microplate reader (Bio-Rad, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다[10]. 동일한 조건으로 3회 반복적으로 실험하여 평균값을 얻어 각 well에서 생성된 멜라닌 양을 산출하였다.

### 2.6. 피부척포에 의한 안전성 평가 인체적용 시험

화장품 재료로 사용하기 위한 피부척포에 의한 안전성 평가와 피부뻣기 및 피부멜라닌 개선효과는 (주)엘리드에 의뢰하여 시행하였다. 피부척포에 의한 안전성 평가를 위해 20-55세의 성인 남녀 33명을 선정하였다. 연구 대상자의 Van der Bend chamber (van der Bend, Brielle, the Netherlands)를 이용하여 등 부위에 sulforaphane (1 mg/kg)과 PF-3758309 (0.1 mg/kg) 혼합시료 35  $\mu$ L씩 적하시킨 후 시험부위에 얹어 고정하였다. 24 h 동안 피부에 척포 후 제거하였다. 제거한 후 30 min, 24 h 및 48 h 후에 5 point scale을 기준으로 피부 반응을 관찰하였다. 피부반응은 draize dermal irritation scoring system의 평가기준에 따라 자극 정도를 평가하였다. 평균피부자극도 계산 공식에 따라 mean irritation

**Table 1.** EPA Dermal Classification System

Grade	MII
Negligible	$0.00 \leq \text{MII} < 0.50$
Slight	$0.50 \leq \text{MII} < 2.00$
Moderate	$2.00 \leq \text{MII} < 5.00$
Strong	$5.00 \leq \text{MII} \leq 8.00$

index (MII)를 산정한 후 environmental protection agency standard evaluation procedure dermal classification system의 자극 분류법(Table 1) 기준으로 피부자극실험 결과를 판정하였다.

### 2.7. 피부밝기 및 피부멜라닌 개선효과 인체적용 시험

피부밝기 및 피부멜라닌 개선효과를 측정하기 인체 적용 시험을 평균 연령  $47.62 \pm 4.17$ 세 남성 21명을 대상으로 시행하였다. 적용 방법은 sulforaphane (1 mg/kg) 과 PF-3758309 (0.1 mg/kg) 혼합시료를 1일 2회(아침, 저녁) 세안 후 크림 단계에서 지름 2 cm 정도의 양을 눈가 부위를 제외하고 얼굴에 펴 바른 후 가볍게 두드려 흡수시켰다. 피부밝기는 시료 적용 전(baseline), 적용 2주 후, 적용 4주 후 3단계로 구분하여 측정하였다. 평가는 VISIA-CR (Canfield Imaging System, USA)을 이용한 안면부 사진 촬영 및 이미지 분석 프로그램을 이용해 피부 밝기를 측정과 mexameter MX18 (Courage and Khazaka, Germany)를 이용한 색소침착 부위의 피부멜라닌을 측정하였다. 통계분석 결과는 정규성 검정 결과에 따라 95% 신뢰구간에서 시료 적용 전/후 간의 유의성 여부를 ANOVA 분석을 통해 확인하였다.

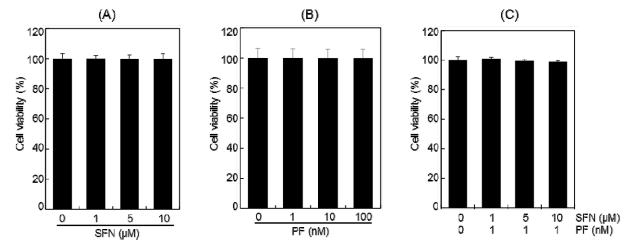
### 2.8. 통계 처리

본 연구의 실험은 3회 이상 반복하여 평균값으로 결정하였고 대조군과 실험군 사이의 통계적 유의성 검증은 Students' *t*-test를 사용하였으며  $p < 0.05$  이하인 경우 유의하다고 판정되었다. 인체적용 시험에 대한 통계 분석은 (주)엘리드에서 IBM SPSS Statistics 21.0 (SPSS, USA)를 이용하여 ANOVA 분석을 실시하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 세포 생존율

RAW 264.7 세포에서 sulforaphane, PF-3758309 및



**Figure 1.** Effect of sulforaphane, PF-3758309 or sulforaphane+PF-3758309 on cell viability in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells ( $1 \times 10^4$ ) were seeded into 96-well plates and cultured for 24 h. Cells were then treated with increasing concentrations of sulforaphane (SFN) (A), PF -3758309 (PF) (B) or the indicated concentrations of sulforaphane+PF-3758309 (C) for 24 h. Cell viability was measured by the MTT assay.

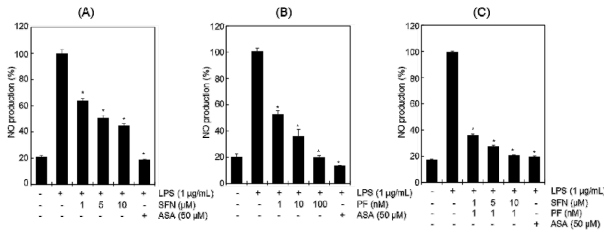
sulforaphane+PF-3758309 조성의 세포독성을 확인하기 위해서 각각의 농도로 처리하고 24 h 후 세포 생존율을 측정하였다(Figure 1). 그 결과 sulforaphane 처리한 농도 1, 5, 10  $\mu\text{M}$ 에서 각각 100, 100, 99%의 세포 생존율을 나타내었다. PF-3758309 농도 1, 10, 100 nM에서는 각각 100, 99, 99%의 세포 생존율을 나타내었다. 마지막으로 혼합한 조건인 PF-3758309 1 nM에 sulforaphane을 각각 1, 5, 10  $\mu\text{M}$  첨가한 조건에서의 세포 생존율은 99, 100, 99%로 나타났다. 결론적으로 모든 조건에서 대조군과 실험군 사이에서 유의한 세포 생존율의 차이는 나타나지 않았다. 따라서 실험에 사용한 조건이 세포 독성에 안정된 조건임을 확인할 수 있었다.

### 3.2. 활성산소 생성 저해

활성산소 생성 저해 효과를 조사하기 위해 L-arginine 으로부터 NOS에 의해 생성되는 NO의 양을 관찰하고자 하였다. RAW 264.7 cell에 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS를 처리한 후 sulforaphane, PF-3758309 및 sulforaphane+PF-3758309 조성을 각 농도별로 처리한 후 NO 생성을 관찰하였다(Figure 2). 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군과 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 억제시키는 물질인 ASA를 처리한 군을 억제효과에 대한 양성 대조군으로 사용하였다 [17]. Sulforaphane, PF-3758309, sulforaphane+PF-3758309는 세포 생존율 측정 결과에 따라 세포에 영향을 미치지 않는 농도에 처리하였다. LPS를 처리한 군을 100% 기준으로 봤을 때 음성 대조군과 ASA 처리군은 둘 다 5배 정도 감소하였고, sulforaphane과 PF-3758309는 처

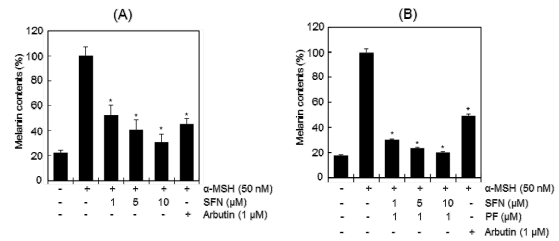
**Table 2.** Skin Safety Evaluation Using Patch Test

Number of respondents	Degree of skin irritation												MII	
	After 30 min				After 24 h				After 48 h					
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
Erythema	12	5	2	1	-	6	3	-	-	4	3	-	-	0.47
Edema	5	3	1	-	-	3	-	-	-	3	1	-	-	



**Figure 2.** Effect of sulforaphane, PF-3758309 or sulforaphane+PF-3758309 on NO production. RAW 264.7 cells ( $1 \times 10^4$ ) were seeded into 24-well plates and pre-treated with SFN, PF, SFN+PF, ASA for 30 min and stimulated with or without LPS ( $1\mu\text{g/ml}$ ) for 18 h. Cells were then treated with SFN (A), PF (B) or SFN+PF (C). The culture media was collected and subjected to Griess assay for measurement of NO generated. The results were expressed as the mean  $\pm$  SD from the three independent experiments ( $*p < 0.05$ ).

리한 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 생성되는 NO의 양이 감소하는 것을 관찰하였다. Sulforaphane은 1, 5, 10  $\mu\text{M}$  농도로 처리하였을 때 음성대조군 대비 64%, 51%, 45%로 감소하였고, PF-3758309는 1, 10, 100 nM로 처리하였을 때 53%, 36%, 20%로 감소하였다. 혼합 조성인 sulforaphane (1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) + PF-3758309는 증가된 농도에 sulforaphane에 1 nM의 PF-3758309를 추가적으로 처리하였을 때 36%, 28%, 21%로 감소하였고, 이는 같은 농도의 sulforaphane만을 처리하였을 때 보다 NO 생성의 억제효과가 증가함을 관찰할 수 있었다. 본 연구결과는 sulforaphane이나 PF-3758309를 단독으로 처리했을 때보다는 혼합해서 사용하였을 때보다 효과적으로 NO 생성 저해효과가 증가하므로 항산화제를 통한 항노화 기능성 화장품의 원료 성분으로 두 혼합물이 매우 효율적으로 사용 가능할 수 있다는 것을 제시하고 있다.



**Figure 3.** Effect of sulforaphane, PF-3758309 or sulforaphane+PF-3758309 on melanin synthesis in B16F10 cells. B16F10 melanoma cells were seeded at  $1 \times 10^4$  cells/well and cultured for 48 h. Cells were treated with SFN (A) or SFN+ PF (B) in the absence or presence of  $\alpha$ -MSH for 24 h. Melanin contents were measured at 490 nm. Arbutin was used as a melanogenesis control. The results were expressed as the mean  $\pm$  SD from the three independent experiments ( $*p < 0.05$ ).

3.3. 멜라닌 생성 저해

Sulforaphane과 sulforaphane+PF-3758309의 멜라닌 생성 저해 효과를 측정하기 위하여 B16F10 멜라노마 세포에서 50 nM  $\alpha$ -MSH를 처리한 후 유도된 멜라닌 생성량을 측정하였다(Figure 3).  $\alpha$ -MSH의 처리에 의해 생성된 멜라닌의 함량을 100% 기준으로 하고, 각 화합물을 처리한 조건에서의 멜라닌 생성 정도를 비교하였다. 또한, 멜라닌 생성 억제제로 알려진 arbutin 처리군을 멜라닌 생성 억제효과에 대한 기준으로 비교하였다. Sulforaphane의 농도가 1, 5, 10  $\mu\text{M}$ 로 높아질수록 멜라닌 생성이 57%, 44%, 36%로 점차 감소하였다. 1  $\mu\text{M}$ 의 arbutin 처리군은  $\alpha$ -MSH만 처리한 군에 비해 멜라닌 생성이 50% 감소함을 확인하였다. 또한, sulforaphane의 농도 1, 5, 10  $\mu\text{M}$ 에 각각 1 nM PF-3758309를 추가로 첨가한 혼합 조성을 처리하였을 때 멜라닌 생성은 30%, 23%, 20%로 감소되었다. 본 연구결과로부터 두 화합물의 혼합이 피부 색소인 멜라닌 생성을 단독으로 처리하였을 때 보다 효과적으로 억제함을 알

**Table 3.** Statistical Results of Skin Brightness (V)

Statistical value		Samples	Value
V	Mean ± SD	Baseline	170.559 ± 8.735
		2 weeks	171.687 ± 8.650
		4 weeks	171.353 ± 8.402
p-value	Baseline - 2 weeks		0.002**
	Baseline - 4 weeks		0.015*
Average increasing rate	2 weeks		0.668%
	4 weeks		0.479%

The results were expressed as the mean ± SD from the three independent experiments (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

수 있었고, 이는 혼합 성분이 보다 효과적인 화장품 성분으로 사용될 수 있을 가능성을 제시한 것이다.

#### 3.4. 피부접촉에 의한 안전성 평가 인체적용 시험

Sulforaphane (1 mg/kg)과 PF-3758309 (0.1 mg/kg) 혼합조성이 포함된 시료를 (주)엘리드에서 피부접촉에 의한 안전성 평가 실험을 하였다(Table 2). 성인 남녀 33명을 대상으로 시료 35  $\mu$ L씩을 Van der Bend chamber를 이용하여 등 부위에 적하시킨 후 시험부위에 얹어 24 h 동안 피부에 접촉하였다. 접촉 후 30 min, 24 h, 48 h 후에 시험부위를 관찰한 평균적인 피부자극도는 0.47로 무자극성으로 판정되었다(Table 1). 본 시험을 통해 혼합 조성 시료가 피부 자극에 이상 반응이 없어서 믿고 사용할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 또한, 패치 테스트에서 예상 또는 수반될 수 있는 피부 반응 이외의 특별한 피부 이상 반응을 나타내지 않았다.

#### 3.5. 피부 밝기 및 피부멜라닌 개선효과 인체 적용 시험

Sulforaphane (1 mg/kg)과 PF-3758309 (0.1 mg/kg) 혼합 조성 시료에 대한 피부밝기 및 피부멜라닌 개선효과에 대한 인체적용 시험은 성인 남성 21명을 대상으로 시행하였다(Table 3). 대상자는 1일 2회, 4주간 시료를 도포하고, 시료 적용 전(baseline), 2주 후, 4주 후 피부의 밝기와 피부멜라닌을 측정하였다. 피부밝기를 나타내는 V값은 Table 2에 서술된 것과 같이 각 단계별로 170.559 ± 8.735 (baseline), 171.687 ± 8.650 (2주 후), 171.353 ± 8.402 (4주 후)로 증가하였고 통계적으로 유의하였다. 연구 대상자 각 개인별 평균적인 V 값 증가율은 적용 2주 후는 0.668%, 적용 4주 후는 0.479%가 증가하였다. 또한, mexameter를 이용해 색소침착 부위에 대한

피부 멜라닌 인덱스 (melanin index, MI) 측정값을 시료 적용 전(baseline), 적용 2주 후, 적용 4주 후 분석하였다(Table 4). 각 단계별 측정 결과는 220.048 ± 43.215 (baseline), 219.921 ± 42.626 (2주 후), 218.206 ± 42.715 (4주 후)로 감소하였고, 그 결과는 통계적으로 유의하였다. 연구 대상자 각 개인별 평균적인 멜라닌 인덱스 값에 따른 감소율은 적용 2주 후는 0.942%, 적용 4주 후는 1.747%로 통계적으로 유의한 감소결과를 나타냈다. 이러한 결과를 통해 sulforaphane과 PF-3758309 혼합 조성 시료가 피부 밝기를 증가시키고, 피부멜라닌 침착 효과를 감소 시킨다는 것을 증명하였다.

## 4. 결 론

본 연구는 sulforaphane과 PF-3758309의 혼합 조성이 항산화 및 미백 기능성의 화장품 원료로 사용할 수 있는가를 알아보려고 하였다. Sulforaphane은 이미 항산화 기능과 멜라닌 생성 억제 기능이 알려져 있는 물질이고, PF-3758309는 피부 멜라닌 생성 억제제로 작용할 수 있다는 것이 최근에 알려진 물질이다[12]. 이 두 화합물을 조합하여 항노화 및 미백 기능이 향상된 새로운 기능성 화장품 소재로서 개발 가능성을 증명하였다. 이를 위해 본 연구는 RAW264.7 세포에서 두 화합물을 각각 처리하였을 때뿐만 아니라 혼합하여 처리하였을 때도 세포독성이 나타나지 않는 농도를 결정하였다(Figure 1). Sulforaphane의 단독 처리 농도는 1, 5, 10  $\mu$ M, PF-3758309 단독 처리 농도는 1, 10, 100 nM, 혼합 조성은 sulforaphane의 농도가 1, 5, 10  $\mu$ M에 1 nM의 PF-3758309를 추가하는 조건으로 처리하였다. 이 조건에서 NO 생성 저해 효과를 측정함으로써 항산화 기능

**Table 4.** The MI of Skin Pigmentation

Statistical value		Samples	Value
Mean ± SD		Baseline	220.048 ± 43.215
		2 weeks	219.921 ± 42.626
		4 weeks	218.206 ± 42.715
MI	<i>p</i> -value	Baseline - 2 weeks	0.004**
		Baseline - 4 weeks	< 0.001***
Average decreasing rate		2 weeks	0.942%
		4 weeks	1.747%

The results were expressed as the mean ± SD from the three independent experiments (\*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001).

을 확인하였고, 두 화합물의 혼합 조성물은 각각 단독으로 처리하였을 때보다 강력한 항산화 효과를 나타낸다는 것을 증명할 수 있었다(Figure 2). 이는 항산화 기능 조절에 관여하는 두 물질의 신호전달 경로가 다르다는 것을 시사한다. Sulforaphane은 Nrf2의 유비퀴티네이션을 억제함으로써 Nrf2 단백질의 안정성을 증진시켜 핵에서 ARE-dependent genes의 발현을 촉진한다. 이는 항산화 조절 단백질인 glutathione 및 thioredoxin reductase 등의 발현을 증가시키고, 결과적으로 항산화 기능을 증진시킨다. PF-3758309에 의한 직접적인 항산화 조절기전은 아직까지 보고된 바 없다. 따라서 PAK4에 의해 유도되는 활성산소 생성 기전을 살펴봄으로써 예측할 수 있다. Kesnakurti 등은 최근 PAK4-PPAR  $\gamma$ -NOX1 신호전달 경로를 통해 활성산소 생성이 유도된다는 것을 보고하였다[18]. 이 결과는 glioblastoma (교모세포종)의 epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) 과정에서 일어나는 활성산소 증가를 관찰한 것으로 정상세포에서는 아직 보고가 없다. 그러므로 PF-3758309에 의해 억제되는 항산화를 조절하는 기전을 검증하기 위해서는 보다 심도 있는 연구가 필요할 것이다. 또한, 미백기능 조절을 관찰하기 위해 B16F10 멜라노마 세포에서 멜라닌 생성억제 효과를 관찰하였다. Sulforaphane 단독 처리시 1, 5, 10  $\mu$ M 농도를 사용하였고, 혼합 조성은 sulforaphane 1, 5, 10  $\mu$ M에 1 nM PF-3758309를 추가하는 조건에서 실험하였다(Figure 3). PF-3758309가 추가됨에 따라 sulforaphane 단독으로 처리한 같은 조건 보다 멜라닌 생성이 억제됨을 관찰할 수 있었다. 이는 두 물질이 기존에 보고된 바와 같이 각기 다른 신호전달 경로를 통해 멜라닌 합성을 조절하고 있음을 의미한다. 즉, sulforaphane은 MAPK 경

로를 통해서 멜라닌 생성을 억제하고, PF-3758309는 PAK4-CREB-MITF 경로를 통해 멜라닌 생성을 억제하기 때문에 두 물질에 대한 혼합 조성은 보다 강력한 미백기능을 나타내게 된다. 그러므로 두 물질을 혼합하여 사용하는 혼합 조성물이 보다 강력한 미백기능을 가진 화장품 조성으로 사용될 수 있을 가능성을 증명하였다.

화장품 재료로 적용 가능성을 확인하기 위한 sulforaphane과 PF-3758309 혼합조성 시료의 피부세포에 의한 안전성 평가와 피부발기 및 피부멜라닌 개선효과에 대한 인체적용 시험은 (주)엘리드에 의뢰하여 시행하였다. 혼합조성 시료는 피부세포 안정성 평가에서 피부 자극도 0.47로 무자극성으로 판정되었다(Table 2). 또한 혼합조성 시료는 피부발기를 나타내는 V 값이 적용 전 170.559 ± 8.735인 것에 비해, 적용 2주 후, 4주 후에 각각 171.687 ± 8.650과 171.353 ± 8.402로 증가하였고, 이는 피부발기를 개선효과가 있음을 의미하는 것이다(Table 3). 뿐만 아니라 피부멜라닌 침착을 관찰하였을 때 시료 적용 전에는 220.048 ± 43.215이였으나, 시료 적용 2주, 또는 4주 후에는 각각 219.921 ± 42.626과 218.206 ± 42.715으로 뚜렷하게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(Table 4). 따라서, 본 연구는 sulforaphane와 PF-3758309의 혼합 성분이 세포 내의 활성산소 저해에 의한 항산화 및 미백기능에 보다 효과적으로 작용함을 관찰하였으므로 피부에 사용할 수 있는 향상된 새로운 화장품 성분 물질이 될 가능성을 제시하였다.

### Acknowledgement

본 연구는 중소기업벤처부 창업성장기술개발사업

(No. S2536221) 연구비 지원에 의해 수행되었음.

## Reference

1. C. Hwa, E. A. Bauer, and D. E. Cohen, Skin biology, *Dermatol. ther.*, **24**(5), 464 (2011).
2. A. A. Ortiz, B. Yan, and J. A. D. Orazio, Ultraviolet radiation aging and the skin: prevention of damage by topical cAMP manipulation, *Molecules*, **19**(5), 6202 (2014).
3. H. G. Lee, Y. S. Won, E. B. L. Koh, Y. A. Kim, J. E. Kim, Y. J. Kim, C. W. Han, M. W. Choi, J. I. Kim, and Y. J. Jeon, Protective effects of ecklonia cava film on UV B-induced photodamages, *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.*, **50**(6), 714 (2017).
4. H. D. Je, The inhibitory effect of broccoli in cruciferous vegetables derived-sulforaphane on vascular tension, *Yakha. Hoeji.*, **58**(4), 223 (2014).
5. J. W. Fahey and P. Talalay, Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of phase II detoxication enzymes, *Food. Chem. Toxicol.*, **37**(9), 973 (1999).
6. S. Boddupalli, J. R. Mein, S. Lakkanna, and D. R. James, Induction of phase2 antioxidant enzymes by broccoli sulforaphane :perspectives in maintaining the antioxidant activity of vitamins A, C, and E, *Front. Genet.*, **3**(7), 1 (2012).
7. A. Wiczak, D. Hofman, G. Konopa, and A. H. Antosiewicz, Sulforaphane, a cruciferous vegetable-derived isothiocyanate, inhibits protein synthesis in human prostate cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1823**(8), 1295 (2012).
8. A. Qazi, J. Pal, M. Maitah, M. Fulciniti, D. Pelluru, P. Nanjappa, S. Lee, R. B. Batchu, M. Prasad, C. S. Bryant, S. Rajput, S. Gryaznov, D. G. Beer, D. W. Weaver, N. C. Munshi, R. K. Goyal, and M. A. Shammas, Anticancer activity of a broccoli derivative, sulforaphane, in barrett adenocarcinoma: potential use in chemoprevention and as adjuvant in chemotherapy, *Transl. Oncol.*, **3**(6), 389 (2010).
9. S. M. Figueiredo, N. S. Binda, J. A. Nogueira-Machado, S. A. Vieira-Filho, and R. B. Caligiorme, The antioxidant properties of organosulfur compounds (sulforaphane), *Recent. Pat. Endocr. Metab. Immune. Drug. Discov.*, **9**(1), 24 (2015).
10. I. Shirasugi, M. Kamada, T. Matsui, Y. Sakakibara, M. C. Liu, and M. Suiko, Sulforaphane inhibited melanin synthesis by regulating tyrosinase gene expression in B16 mouse melanoma cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**(3), 579 (2010).
11. B. W. Murray, C. Guo, J. Piraino, J. K. Westwick, C. Zhang, J. Lamerdin, E. Dagostino, D. Knighton, C. M. Loi, M. Zager, E. Kraynov, I. Popoff, J. G. Christensen, R. Martinez, S. E. Kephart, J. Marakovits, S. Karlicek, S. Bergqvist, and T. Smeal, Small-molecule p21-activated kinase inhibitor PF-3758309 is a potent inhibitor of oncogenic signaling and tumor growth, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**(20), 9446 (2010).
12. C. Y. Yun, S. T. You, J. H. Kim, J. H. Chung, S. B. Han, E. Y. Shin, and E. G. Kim, p21 activated kinase 4 critically regulates melanogenesis via activation of the CREB/MITF, and b-Catenin/MITF pathways, *J. Invest. Dermatol.*, **135**(5), 1385 (2015).
13. M. H. Park, H. S. Lee, C. S. Lee, S. T. You, D. J. Kim, B. H. Park, M. J. Kang, W. D. Heo, E. Y. Shin, M. A. Schwartz, and E. G. Kim, p21-activated kinase 4 promotes prostate cancer progression through CREB, *Oncogene.*, **32**(19), 2475 (2013).
14. I. S. An, J. H. Kim, H. S. Yoo, R. Zhang, S. M. Kang, T. B. Choe, T. J. Kwon, S. K. An, and G. Y. Kim, The Inhibition effect of L-cysteine on melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **5**(2), 239 (2007).
15. M. J. Kim, N. Y. Bae, K. B. W. R. Kim, J. H. Park, S. H. Park, Y. J. Cho, and D. H. Ahn, Anti-inflammatory effect of zosteria marina ethanoic extract on LPS induced RAW 264.7 cells and mouse model, *Kor. Soci. Biotechnol. Bioengin.*, **30**(4), 182 (2015).
16. Y. J. Kang, A. R. Han, H. Y. Min, J. Y. Hong, E. K. Seo, and S. K. Lee, Inhibitory effects of morachalcone A on lipopolysaccharide- induced nitric ox-



- ide production in RAW 264.7 cells, *Cancer. Pre. Res.*, **14**(2), 118 (2009).
17. Y. Liu, S. Fang, X. Li, J. Feng, J. Du, L. Guo, Y. Su, J. Zhou, G. Ding, Y. Bai, S. Wang, H. Wang, and Y. Liu, Aspirin inhibits LPS-induced macrophage activation via the NF- $\kappa$ B pathway, *Sci. Rep.*, **7**(1), 1 (2017).
18. D. Kesanakurti, D. Maddirela, Y. K. Banasavadi-Siddegowda, T. H. Lai, Z. Qamri, N. K. Jacob, D. Sampath, S. Mohanam, B. Kaur, and V. K. Puduvalli. A novel interaction of PAK4 with PPAR $\gamma$  to regulate Nox1 and radiation-induced epithelial-to-mesenchymal transition in glioma, *Oncogene*, **14**(36), 5309 (2017).