

꾸지뽕나무 열매에서 추출한 4'-O-methylalpinumisoflavone의 항산화 및 미백 효과

류지효 · 노준용 · 김수라¹ · 이금산² · 이동호³ · 김관희⁴ · 김형우*

부산대학교 한의학전문대학원 약물의학부, 1: ㈜세원생명공학 바이오연구개발센터, 2: 원광대학교 한의과대학 본초학교실,
3: 고려대학교 생명과학대학 생명공학부, 4: 부산대학교 의과대학 약리학교실

Anti-oxidative and Whitening Effects of 4'-O-methylalpinumisoflavone Isolated from Fruit of *Maclura Tricuspidata* Carrière

Ji Hyo Lyu, Joon Yong Noh, Sura Kim¹, Guem San Lee², Dongho Lee³, Koanhoi Kim⁴, Hyungwoo Kim*

Division of Pharmacology, School of Korean Medicine, Pusan National University, 1: Bio R&D Center, Sewonbiotech,
2: Department of Herbology, College of Korean Medicine, Wonkwang University,
3: Department of Biosystems and Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University,
4: Department of Pharmacology, School of Medicine, Pusan National University,

The anti-inflammatory effects of 4'-O-methylalpinumisoflavone (OMAI) has been reported in recent years. To develop effective and safe skin whitening agents, we investigated the anti-oxidative and melanogenic effects of OMAI isolated from fruit of *Maclura tricuspidata* Carrière (*Cudrania tricuspidata*) in macrophage and melanoma cell lines. In our results, OMAI showed effective superoxide scavenging activity and suppressed production of lipopolysaccharide (LPS)-induced intracellular reactive oxygen species (ROS) in RAW264.7 cells. In addition, α -melanocyte stimulation hormone (MSH)-induced production of melanin was also reduced by OMAI in B16F10 cells. Finally, OMAI significantly inhibited tyrosinase activity in B16F10 cells. These results suggest that OMAI suppressed melanin production via scavenging reactive oxygen species and inhibition of tyrosinase activity.

keywords : *Maclura tricuspidata*, 4'-O-methylalpinumisoflavone, Anti-oxidant, Melanin, Tyrosinase

서 론

한의학에서는 뽕나무과(Moraceae)에 속한 꾸지뽕나무(柘木) *Maclura tricuspidata* Carrière [= *Cudrania tricuspidata* (Carrière) Bureau ex Lavallée]의 열매를 '柘樹果實'이라 하며 清熱涼血 舒筋活絡을 목적으로 응용하였다¹⁾. 최근 연구에 따르면 꾸지뽕나무 추출물은 항암^{2,3)}, 항염증⁴⁾, 항산화^{5,6)} 효과와 더불어 산화적 스트레스에 의한 신경병증을 감소⁷⁾시키는 등의 다양한 효능을 나타낸다. 또한 柘木의 잎, 뿌리, 줄기, 열매에서 추출한 prenylated xanthenes, phenolic acids, and flavonoids 등의 성분들은 항암⁸⁾, 항산화⁹⁻¹¹⁾, 항균¹²⁾, 신경세포·간세포·위장관 보호 효과¹³⁻¹⁵⁾와 더불어 제2형 당뇨, 암, HIV와 관련이 있는 α -glucosidase억제 효과¹⁶⁾가 있다고 보고되었다.

꾸지뽕나무의 열매에서 추출한 4'-O-methylalpinumisoflavone (OMAI)은 monoamine oxidase(MAO) 활성 억제 효과¹⁷⁾, microglial cells에서의 LPS로 유도된 NF- κ B 활성화 및 MAPK 인산화 억제

에 따른 항염증 효과¹⁸⁾가 보고된 바 있으며, OMAI이 Akt 인산화와 무관하게 NK- κ B 인산화를 억제함으로써 27-hydroxycholesterol로 유도된 monocytes/macrophages의 활성화를 억제한다¹⁹⁾는 사실이 최근에 보고되었다. 또한 *Lonchocarpus glabrescens*에서 추출한 methylalpinumisoflavone의 항암 효과도 보고되었다²⁰⁾. 꾸지뽕나무에서 추출된 다양한 성분들을 이용한 연구는 다양한 분야에서 활발히 이루어지고 있으나, 과실에서 추출된 OMAI를 이용한 연구는 항암, 항염증 효과에 관한 연구 외의 다른 연구는 찾아보기 힘들며, 피부 질환에 관한 연구는 거의 없는 상태이다.

인간의 신체를 덮고 있는 피부는 유해한 자외선 및 물리화학적 외부 독성물질로부터 개체를 보호하기 위해 피부 표피층에 있는 melanocyte의 melanosome에서 멜라닌을 생산한다. 이러한 과정은 정상 과정이라고 할 수 있으나, 과생성된 멜라닌이 축적되어 피부에 착색되면 피부 과다색소침착(hyperpigmentation)을 유발한다²¹⁾. 이러한 피부 과다색소침착 즉, 색소 이상 질환을 한의학에서는雀斑, 黧黑斑 등으로 기재하고 있다²²⁾.

Hyungwoo Kim, Department of Pharmacology, School of Medicine, Pusan National University, Yangsan, Gyeongnam 50612, Republic of Korea

E-mail : kronos7@pusan.ac.kr · Tel : +82-51-510-8458

Received : 2019/10/07 · Revised : 2019/11/05 · Accepted : 2019/12/17

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjpp.2019.12.33.6.349

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

최근 들어 피부 미용에 대한 수요가 증가함에 따라, 피부 과다 색소침착을 해결하기 위해 다양한 피부 미백 성분이 개발되고 있다. 연구자들은 미백 성분을 스크리닝하기 위하여 다양한 후보 물질들의 멜라닌 합성 억제 효과를 관찰한다. 멜라닌 합성은 tyrosinase, tyrosinase-related protein(TRP) 1, TRP2와 같은 enzymes에 의해 조절되는데, 특히 tyrosinase는 rate-limiting enzyme으로 알려져 있다. 대다수의 멜라닌 합성 억제제들은 tyrosinase 활성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 피부 미백 효과를 확인하는 방법으로 tyrosinase 활성 저해 정도를 많이 활용한다²³⁾.

기존의 피부 미백용 성분으로 사용되고 있는 ascorbic acid, kojic acid, arbutin, hydroquinone 등의 물질은 합성 항산화제로 tyrosinase 활성을 억제함으로써 효과적으로 멜라닌 합성을 억제한다고 알려져 있으나, kojic acid, hydroquinone, arbutin의 경우, 미백 효과는 뛰어나지만, 안전성은 낮다는 단점이 있다²⁴⁻²⁷⁾. 따라서 인체에 무해하면서도 피부 미백 효과가 탁월한 성분을 발굴하고자 육상 식물, 해양 자원, 한약재 등의 천연물에서 유래된 물질을 활용하는 연구가 다각도로 진행되고 있다²¹⁾. 따라서 본 연구에서는 꾸지뽕나무의 과실에서 추출된 OMAI의 활성산소 소거 활성 및 멜라닌 생성 저해 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

1. 시료 추출

본 연구에 사용한 OMAI는 고려대학교 생명과학대학 생명공학부에서 제공받았다. Lui Y. et al.²⁰⁾의 방법에 근거하여 꾸지뽕나무 열매로부터 OMAI를 분리하고, NMRspectra로 구조를 확인했다.

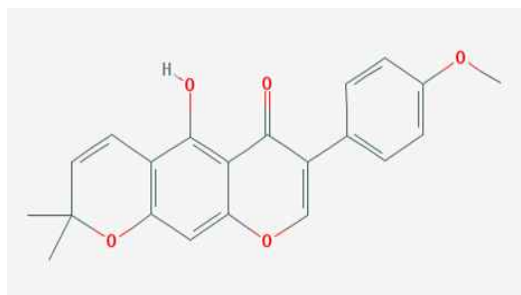


Fig. 1. Structure of 4'-O-methylalpinumisoflavone. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 4'-O-Methylalpinumisoflavone, CID=15596285, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4'-O-Methylalpinumisoflavone>.

2. 방법

1) 세포배양

본 실험에 사용한 HaCaT cells (human keratinocyte cell line)은 Cell lines Service (CLS, Eppelheim, Germany), RAW264.7 cells (murine macrophage cell line) 및 B16F10 cells (murine melanoma cell line)는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, US)에서 구매하였다. 각 세포는 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, MD, US), 1%

penicillin/streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone, Logan, UT, US)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다.

2) 세포 생존율 측정

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, Mo, US)를 이용하여 측정하였다. 측정과정을 요약하면, B16F10 cells 및 HaCaT cells를 각각 24 well plate에 1×10⁵ cells/well로 접종한 후 37°C에서 세포가 약 80% 이상 부착될 때까지 배양하였다. 하루간의 배양이 끝난 후, phenol red-free DMEM 배지로 교체하고 24시간 동안 OMAI 및 alpinumisoflavone (AI)를 각 농도별로 처리 하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 배지를 제거하고, MTT 용액 (500 µg/ml)을 첨가하여 30분 동안 37°C에서 다시 반응시켰다. 최종적으로 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 살아있는 세포가 생성한 formazan crystal을 용해한 다음, microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다²⁸⁾.

3) Superoxide radical 소거 효과 측정

Superoxide radical 소거 효과는 Furuno K, et al.²⁹⁾ 및 Sim GS, et al.³⁰⁾에 소개된 방법을 변형하여 측정하였다. 측정 원리는 Xanthine/xanthine oxidase 반응에서 생성된 superoxide radical을 nitroblue tetrazolium (NBT)으로 검출하는 것이며 개략적 방법은 다음과 같다. 500 mM Na₂CO₃ buffer (pH 10.2), 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT에 각 농도별로 OMAI를 첨가하고 37°C에서 5분간 반응한다. 반응 후 20 mU/ml xanthine oxidase를 첨가하여 37°C에서 25분간 추가로 반응한 후, microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 565nm에서 흡광도를 측정한다. 양성 대조군으로 arbutin 및 3-t-butyl-4-hydroxyanisole (BHA)을 사용하였다.

4) 세포 내 ROS 측정

RAW264.7 세포를 24 well plate에 1×10⁵ cells/well로 접종한 후 37°C에서 세포가 약 80% 이상 부착될 때까지 배양하였다. 세포가 충분히 부착되고 안정화 된 후, phenol red-free DMEM으로 배지에 OMAI를 각 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양하였고, lipopolysaccharide (LPS, Lonza) 100 ng/ml을 각 well에 첨가한 후 24시간 동안 추가로 배양하였다. 배양이 끝난 다음, carboxy-H2DCF-DA 100 µM/well 첨가하고 30분간 37°C에서 반응시킨 후 phosphate buffered saline (PBS)를 이용하여 2번 세척하였다. Fluorescence의 측정은 fluorescence plate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 수행되었으며 excitation과 emission wavelength는 각각 475nm와 530nm였다.

5) Melanin 함량 측정

OMAI의 미백 활성을 평가하기 위해 melanin 함량 정도를 식품의약품안전평가원의 기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인 I³¹⁾의 방법을 참고로 하여 측정하였다. 측정과정을 간략히 정리하면, B16F10 cells를 6 well plate에 3×10⁵ cells/well로 접종한 후 37°C에서 세포가 약 80% 이상 부착될 때까지 배양하였다. 이후, 배지를 제거하고 phenol red-free DMEM으로 교체한 다음, 각 농도별로 OMAI를 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간

후 α -MSH 200 nM을 각 well에 첨가하고, 48시간 동안 추가로 배양한 다음, 배지를 회수하고, microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 arbutin을 B16F10 cells에 처리하여 사용하였다.

6) 세포 내 tyrosinase 활성 측정

Tyrosine으로부터 melanin을 생산하는 데에 관여하는 효소인 tyrosinase의 활성을 측정하기 위하여 B16F10 cells를 6 well plate에 3×10^5 cells/well로 접종한 후 37°C에서 세포가 약 80% 이상 부착될 때까지 배양하였다. 이 후, 배지를 제거하고 phenol red-free DMEM으로 교체한 다음, 각 농도별로 OMAI를 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 α -MSH 200 nM을 각 well에 첨가하고, 48시간 동안 추가로 배양한 후, 세포를 PBS로 세척하고, 트립신으로 처리하여 세포를 회수하였다. 얻어진 세포는 Triton X-100이 1% 첨가된 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5)를 이용하여 용해되었으며, 13,000 rpm, 10분간 원심 분리하여 상층액을 모으고, BCA법으로 단백질을 정량하였다. 정량되어 동일한 농도로 맞춰진 상층액에 2 mg/ml L-DOPA를 첨가한 후, 37°C에서 30분 동안 반응시키고, microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 arbutin을 B16F10 cells에 처리하여 사용하였다.

3. 통계학적 분석

모든 통계학적 비교는 one way ANOVA test를 통하여 이루어졌고, 군간 비교에는 Dunnett test를 이용했으며, Prism 5 (Ver. 5.01, GraphPad Software Inc., CA, US)가 사용되었다. 연구의 결과는 평균±표준편차의 형태로 표기했으며, P값이 0.05 미만인 것을 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. OMAI가 세포 생존율에 미치는 영향

세포의 생존에 영향이 없는 OMAI의 농도를 확인하기 위하여 B16F10 cells에 OMAI를 각각 5, 10, 20 μ g/ml를 처리하고 24시간 후 MTT assay를 실시한 결과, 10 μ g/ml를 처리한 군에서는 약 3.1%의 세포 생존율 감소가 나타났고, 20 μ g/ml를 처리한 군에서는 약 9.06%의 세포 생존율 감소가 확인되었다. 이러한 결과가 OMAI의 구조적 특성 때문인지 확인하기 위해 꾸지뽕나무 열매에서 추출되었으며, OMAI와 구조적 유사성을 가진 AI를 이용하여 동일한 방법과 조건으로 MTT assay를 실시했다. 그 결과 alpinumisoflavone (AI)을 처리한 군에서는 OMAI를 처리한 군과 달리 현저하게 세포 생존이 저해되어 AI를 20 μ g/ml 처리한 군에서는 대조군에 비해 약 53.37%의 세포 생존이 감소되었다(Fig. 2A).

또한, mouse 유래 melanoma cell뿐만 아니라 human keratinocyte cell line인 HaCaT cell의 생존율에 OMAI가 미치는 영향을 확인하고자, MTT assay를 실시했다. 그 결과, B16F10 cells에서의 결과와 같이 5 μ g/ml 농도에서는 세포 생존율에 거의

영향이 없었으나, 10 μ g/ml를 처리한 군에서는 약 4.58%의 세포 생존율 감소가 나타났고, 20 μ g/ml를 처리한 군에서는 약 7.8%의 세포 생존율 감소가 확인되었다. 또한 AI를 20 μ g/ml 처리한 군에서는 대조군에 비해 약 89.4%의 세포 생존이 감소되었다(Fig. 2B).

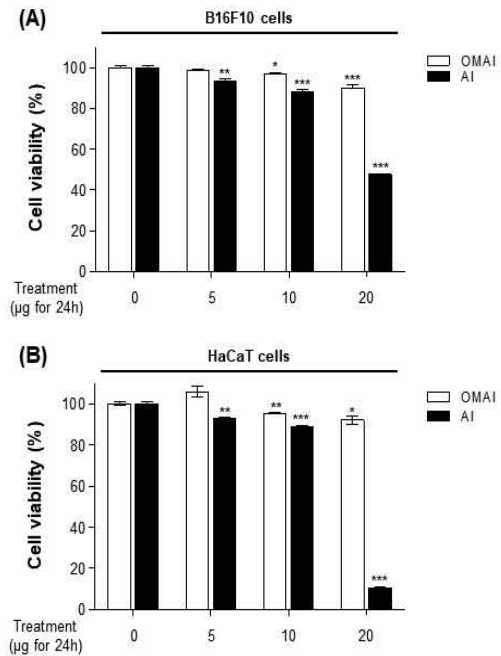


Fig. 2. The Effects of OMAI on Cell Viability. Cytotoxicity caused by OMAI was measured MTT assay. B16F10 cells (A) and HaCaT cells (B) were treated with indicated concentrations of OMAI for 24h prior to analyses. Data are expressed as percent (%) of vehicle treated group (naive) and were represented as mean±SD of triplicated experiments. *P < 0.05, **P < 0.001 and ***P < 0.0001 compared to vehicle treated group.

2. OMAI의 항산화 효과

OMAI의 항산화 효과를 확인하기 위하여, OMAI의 superoxide radical 소거 효과를 확인했다. 그 결과 OMAI 1, 5, 10 μ g/ml에서의 superoxide radical 소거 능력은 각각 $34.04 \pm 1.41\%$, $51.39 \pm 0.9394\%$, $57.19 \pm 0.7364\%$ 로 농도 의존적으로 증가하였다. 양성 대조군으로 사용한 arbutin과 BHA 10 μ g/ml(최대 처리 농도) 처리군에서는 각각 $24.68 \pm 2.128\%$, $35.15 \pm 0.5364\%$ 의 superoxide radical 소거 효과가 나타났다(Table 1). 또한, murine macrophage cell line인 RAW264.7 cells를 이용하여 세포 내 활성산소 생성에 OMAI가 어떤 영향을 미치는지 확인한 결과, superoxide radical 소거 실험과 동일하게 OMAI 농도 의존적으로 세포 내 활성산소 생성이 감소되었다(Fig. 3).

Table 1. Anti-oxidative Effects of OMAI Measured Using NBT Assay.

treatments concentration	Superoxide scavenging activity (%)*		
	OMAI	Arbutin	BHA
1 μ g/ml	34.04 ± 1.41	23.58 ± 0.9447	20.84 ± 1.237
5 μ g/ml	51.39 ± 0.9394	21.99 ± 1.488	29.65 ± 1.083
10 μ g/ml	57.19 ± 0.7364	24.68 ± 2.128	35.15 ± 0.536

* Data are expressed as percentage (%) of vehicle treated control and the mean±SD of triplicated experiments. BHA means 3-t-butyl-4-hydroxyanisole.

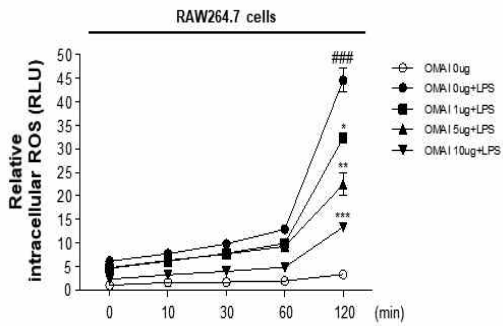


Fig. 3. Inhibitory Effects of OMAI on Production of Intracellular ROS. RAW 264.7 cells were treated with indicated concentrations of OMAI for 24h and subsequently with 100 ng/ml of LPS, an inducer of ROS, for 24h. Data are expressed as relative light unit (RLU) of vehicle treated controls and each plots were represent as the mean±SD of triplicated experiments. ###P < 0.001 vs. vehicle treated group (naive) and *P < 0.05, **P < 0.001 and ***P < 0.0001 compared to LPS treated only group.

3. OMAI의 멜라닌 생성 저해 효과

꾸지뽕나무 열매에서 추출한 OMAI가 피부 미백 성분으로서의 효용성이 있는지 확인하고자, B16F10 cells를 이용하여 멜라닌 생성 정도에 OMAI가 미치는 영향을 확인하였다. 멜라닌 생성량을 측정된 결과, OMAI는 농도 의존적으로 멜라닌 생성량을 감소시키는 경향이 관찰되었다. 아무런 처리도 하지 않은 음성 대조군의 멜라닌 합성 정도를 100%로 했을 때, α-MSH만 처리한 군에서 167.28%, OMAI 1 µg/ml와 α-MSH를 처리한 군에서 131.64%, OMAI 5 µg/ml와 α-MSH를 처리한 군에서 72.23%가 측정되었으며, 양성 대조군으로 사용한 arbutin 5 µg/ml와 α-MSH를 처리한 군에서는 104.12%의 멜라닌 합성 정도가 확인되었다(Fig. 4).

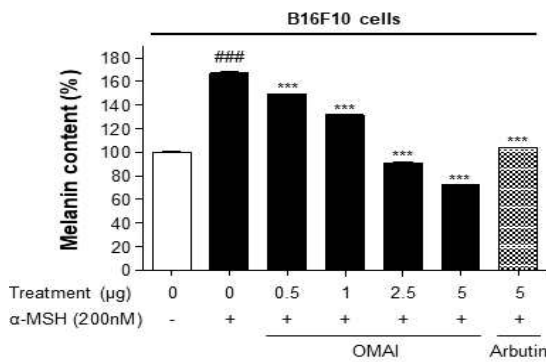


Fig. 4. Inhibitory Effects of OMAI on Melanin Production. B16F10 cells were treated with indicated concentrations of OMAI, along with arbutin (5 µg/ml) for 24h and subsequently with 200 nM of α-MSH for 48h. Data are expressed as percent (%) of vehicle treated group (naive) and data were represented as the mean±SD of triplicated experiments. ###P < 0.001 vs. vehicle treated group (naive) and ***P < 0.0001 compared to α-MSH treated only group.

4. OMAI의 세포 내 tyrosinase 활성 저해 효과

멜라닌 생성을 억제하는 효능을 가진 OMAI가 tyrosinase 활성에는 어떤 영향을 미치는지 확인하고자 B16F10 cell 내에서 tyrosinase 활성 저해 효과를 확인하였다. 그 결과, 아무런 처리도 하지 않은 음성 대조군의 tyrosinase 활성을 100%로 했을 때, α-

-MSH만 처리한 군에서는 124.58%로 증가하였고, OMAI 1 µg/ml와 α-MSH를 처리한 군에서는 127.62%로 약간 증가했다가, OMAI 5 µg/ml와 α-MSH를 처리한 군에서는 96.07%로 현저하게 tyrosinase 활성이 감소되었다. 양성 대조군으로 사용한 arbutin 5 µg/ml와 α-MSH를 처리한 군에서는 120.05%로 측정되었다 (Fig. 5).

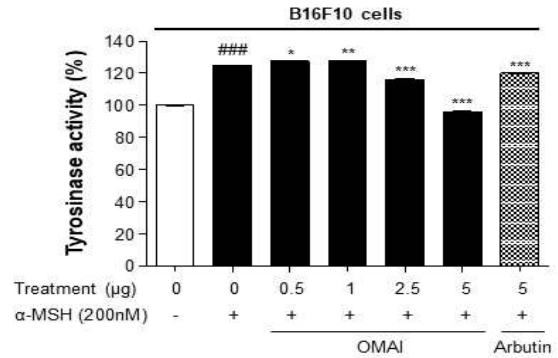


Fig. 5. Inhibitory Effects of OMAI on Tyrosinase Activity. B16F10 cells were treated with indicated concentrations of OMAI, along with arbutin (5 µg/ml) for 24h and subsequently with 200 nM of α-MSH for 48h. Data are expressed as percent (%) of vehicle treated group and data were represented as the mean±SD of triplicated experiments. ###P < 0.001 vs. vehicle treated group (naive) and *P < 0.05, **P < 0.001 and ***P < 0.0001 compared to α-MSH treated only group.

고찰

한의학에서는 피부염 증상을 피부의 風熱 질환으로 인식하는 경향이 있다. 또한, 피부염의 주요 증상인 가려움, 발적, 발진, 부스럼, 물집, 딱지 등은 한의학의 搔痒, 斑疹, 腫과 瘡 등에 해당한다. 이러한 피부의 질환들은 血分の 熱에 의해 나타날 수 있으며, 清熱涼血의 방법으로 치료한다³²⁾. 이러한 의미에서 清熱涼血, 舒筋活絡 효과를 가지고 있는 꾸지뽕나무 열매의 피부과적 용도를 과학적으로 고찰해볼 필요가 있다.

꾸지뽕나무 추출물은 항암^{2,3)}, 항염증⁴⁾, 항산화^{5,6)} 효과와 신경병증을 감소⁷⁾시키는 등의 다양한 효능을 나타낸다고 보고되었으며, 꾸지뽕나무의 잎, 뿌리, 줄기, 열매에서 추출된 prenylated xanthenes, phenolic acids, and flavonoids 등의 성분들은 항암⁸⁾, 항산화⁹⁻¹¹⁾, 항균¹²⁾, 신경세포·간세포·위장관 보호 효과¹³⁻¹⁵⁾와 α-glucosidase억제 효과¹⁶⁾가 있다고 보고된 바 있다.

꾸지뽕나무의 열매에서 추출한 성분인 OMAI은 MAO 활성 억제 효과¹⁷⁾와 더불어 항염증 효과¹⁸⁾가 보고된 바 있고, 최근에는 27-hydroxycholesterol로 유도된 monocytes/ macrophages의 활성화를 억제한다¹⁹⁾는 사실이 보고된 바 있다. 이렇듯 꾸지뽕나무에서 추출한 다양한 성분들을 이용한 연구는 다각도로 이루어지고 있으나, 꾸지뽕나무 열매에서 추출한 OMAI를 이용한 연구는 실험동물의 뇌에서의 MAO억제 및 항염증 효과에 관한 연구 외의 다른 연구는 찾아보기 힘들며, 피부 질환에 관한 연구는 거의 없는 상태이다.

기존의 피부 미백 성분보다 안전한 성분을 찾고자 다양한 천연

자원을 활용하는 연구가 활발하게 이루어지고 있다²¹⁾. 따라서 본 연구에서는 꾸지뽕나무 열매로부터 추출한 OMAI의 피부 미백 성분으로서의 유용성을 확인하고자 하였다.

본 연구의 결과에서 OMAI는 10 µg/ml 이상에서 유의한 수준의 세포 독성을 나타냈고, OMAI와 유사한 구조를 가진 AI는 5 µg/ml 처리 군에서도 유의한 수준의 세포 독성을 나타냈으며, 모든 처리 농도에서 OMAI보다 높은 세포 독성을 보였다(Fig. 2). 이러한 연구 결과로부터 OMAI의 세포 독성은 구조적 특성에 기인한 것으로 판단되며 세포 내 연구를 위한 OMAI의 적정 농도는 10 µg/ml 미만임을 알 수 있다.

피부 표피층에 존재하는 melanocyte는 표피를 구성하는 다양한 세포와 상호작용을 하고 있다. 특히, melanocyte와 keratinocyte의 crosstalk으로 melanocyte에서 생성된 멜라닌은 keratinocyte로 전이된다고 잘 알려져 있다³³⁾. 또한, B16F10 cell은 mouse 유래의 melanoma 세포로 실험적으로 사용하기 위해 변형이 가해진 상태이기 때문에 인간 유래의 정상 세포군에 대한 세포 독성을 확인하여 참고할 필요가 있다. 이러한 이유로, 본 연구에서 HaCaT cells의 생존율에 OMAI가 미치는 영향을 확인한 결과, B16F10 cell에서와 유사한 수준의 세포 독성이 관찰되었다. 이러한 결과로부터 OMAI가 B16F10 cell과 같은 생쥐 유래 종양세포와 인간 유래 정상에서 유사한 수준의 세포 독성을 나타낸 다른 것을 알 수 있다. 이와는 다르게 AI의 경우 전반적으로 세포 독성이 강하기도 하지만, 인간 유래 피부각질화 세포의 최고농도 투여 (20 µg/ml)에서 현저한 세포 생존율 감소를 나타냈다.

피부 과다색소침착을 유발하는 원인 중 가장 잘 알려진 것은 유해 자외선이다. 자외선에 의해 피부 세포 내에서는 활성산소를 생성되고, 생성된 활성산소에 의해 DNA가 손상되어 산화적 스트레스가 유발된다. 또한 활성산소는 tyrosinase와 같이 tyrosine의 산화 과정에 작용하여 멜라닌 생성을 증가시킨다. 따라서 멜라닌 생성을 억제하는 것뿐만 아니라 세포 내 활성산소를 제거하는 것 또는 활성산소 생성을 억제하는 것은 피부 미백 성분의 중요한 기능으로 볼 수 있다³⁴⁻³⁸⁾. 이러한 이유로 항산화 물질은 일련의 산화 과정을 억제함으로써 멜라닌의 생성을 억제하고, 생성된 활성산소를 제거함으로써 멜라닌 생성을 억제할 수 있는 피부 미백 물질로 인식되고 있다³⁹⁾. 본 연구의 결과를 살펴보면, OMAI의 superoxide radical 소거 능력은 농도 의존적으로 증가하였고 동일 농도에서 arbutin과 BHA보다 소거 능력이 우수하였다(Fig. 3). 이러한 결과에서 OMAI는 arbutin과 BHA보다 높은 superoxide radical 소거 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

또한, OMAI가 세포 내 활성산소 생성에 미치는 영향을 확인한 결과, superoxide radical 소거 실험과 동일하게 농도 의존적으로 세포 내 활성산소 생성이 감소되었다(Fig. 4). 따라서 꾸지뽕나무 열매에서 추출한 OMAI는 기존의 피부 미백제 성분인 arbutin과 BHA보다 비교적 우수한 항산화 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

우수한 항산화 효과를 가지는 시료는 기능성 화장품 시장에서 피부 진정, 항염증, 미백 기능성 후보 물질로서 각광을 받는다. 이러한 추세를 반영하여 꾸지뽕나무 열매에서 추출한 OMAI의 피부

미백 효과를 좀 더 구체적이고 직접적으로 확인하고자, B16F10 cells를 이용하여 멜라닌 생성 정도에 OMAI가 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, 최저 투여 농도인 0.5 µg/ml를 사용한 군에서도 멜라닌 생성 저해 효과가 관찰되었으며, 이러한 저해 효과는 농도 의존적으로 증가되었다. 또한, 최고 농도인 5 µg/ml에서의 저해 효과가 양성 대조군으로 사용된 arbutin보다 높았다. 이러한 결과는 OMAI가 기존의 피부 미백 성분인 arbutin보다 더 우수한 멜라닌 생성 저해 효과를 가졌음을 시사한다.

멜라닌 생성은 melanosome의 구조단백질, 멜라닌 합성반응에 관여하는 효소, 멜라닌 수송과 분배에 작용하는 단백질에 의해 조절된다고 알려져 있다^{22,39)}. Tyrosinase는 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)으로 전환하는 반응과, DOPA를 DOPA-quinone으로 산화시키는데 관여한다. 즉 tyrosinase는 멜라닌 합성반응에 관여하는 효소로 멜라닌 합성반응의 속도결정단계인 초기 반응에 작용한다고 할 수 있다⁴⁰⁾. Tyrosinase 활성 억제 정도를 확인하는 것은 필수적인 피부 미백 성분의 효능 검증 방법이다²³⁾. 본 연구의 결과를 살펴보면, OMAI는 유의한 수준으로 tyrosinase 활성을 억제시켰으며 최고 농도인 5 µg/ml에서는 α-MSH를 처리하지 않은 대조군 수준의 tyrosinase 활성을 나타냄으로써 양성 대조군인 arbutin보다 우수한 tyrosinase 활성 저해 효과를 나타냈다. 이러한 결과는 OMAI가 피부 미백 기능성 원료로서의 가능성이 있음을 의미하며 OMAI는 tyrosinase 활성 억제를 통하여 멜라닌 생성을 억제할 수 있음을 의미한다.

결 론

본 연구에서는 꾸지뽕나무 열매에서 추출한 OMAI을 이용하여 murine melanoma cell line인 B16F10 cells에서 α-MSH로 유도된 멜라닌 생성에 대한 억제 효과 및 항산화 효과를 검토하여 기존의 피부 미백 성분보다 안전하고 효과적인 미백 효능을 가지는 미백제로의 유용성을 검토하고자 하였고 다음과 같은 결론을 도출했다.

본 연구의 결과에서 꾸지뽕나무 열매에서 추출한 OMAI는 효과적으로 superoxide를 소거하며, RAW264.7 cell에서 LPS에 의해 유도된 세포 내 활성산소 생성을 현저하게 억제했다. 또한, B16F10 cell에서 α-MSH로 유도된 멜라닌 생성을 억제했고, 멜라닌 합성 반응에 관여하는 tyrosinase 활성을 억제했다.

이상의 결과로 꾸지뽕나무 열매에서 추출한 OMAI는 활성산소를 제거함으로써 α-MSH에 의해 유발되는 tyrosinase의 활성을 억제하고, 그 결과 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 보인다. OMAI는 기존의 항산화 효능이 있는 tyrosinase 억제제보다 높은 항산화 효능 및 멜라닌 생성 억제 효과를 나타내는 것으로 보아 피부 미백 성분으로 활용도는 높을 것이라 사료된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업 (2년)에 의하여 연구되었음.

References

- Guo jia zhong yi yao guan li ju "Zhonghua ben cao" bian wei hui. Zhong hua ben cao, v2. Shanghai : Shanghai Scientific & Technical Publishers. 1998:520.
- Seo WG, Pae HO, Oh GS; Chai. KY, Yun. YG, Chung. HT, Jang. KK, Kwon TO. Ethyl acetate extract of the stem bark of *Cudrania tricuspidata* induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells. *Am. J. Chin. Med.* 2001;29:313-20.
- Kwon SB, Kim MJ, Yang JM, Lee HP, Hong JT, Jeong HS, Kim ES, Yoon DY. *Cudrania tricuspidata* stem extract induces apoptosis via the extrinsic pathway in SiHa cervical cancer cells. *PLOS ONE.* 2016;11:e0150235.
- Chang SH, Jung EJ, Lim DG Oyungerel B, Lim KI, Her E, Choi WS, Jun MH, Choi KD, Han DJ, Kim SC. Anti-inflammatory action of *Cudrania tricuspidata* on spleen cell and T lymphocyte proliferation. *J. Pharm. Pharmacol.* 2008;60:1221-6.
- Cha JY, Kim HJ, Chung CH, Cho YS. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of *Cudrania tricuspidata*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 1999;28:1310-5.
- Kang DH, Kim JW, Youn KS. Antioxidant activities of extracts from fermented mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit, and inhibitory actions on elastase and tyrosinase. *Korean J. Food Preserv.* 2011;18:236-43.
- Jeong CH, Choi GN, Kim JH, Kwak JH, Jeong HR, Kim DO, Heo JH. Protective effects of aqueous extract from *Cudrania tricuspidata* on oxidative stress-induced neurotoxicity. *Food Sci. Biotechnol.* 2010;19:1113-7.
- Xin LT, Yue SJ, Fan YC, Wu JS, Yan D, Guan HS, Wang CY. *Cudrania tricuspidata*: an updated review on ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology. *RSC Adv.* 2017;7:31807-32.
- Lee BW, Lee JH, Lee ST, Lee. HS, Lee WS, Jeong TS, Park KH. Antioxidant and cytotoxic activities of xanthones from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005;5:5548-52.
- Lee YJ, Kim S, Lee SJ, Ham I, Whang WK. Antioxidant activities of new flavonoids from *Cudrania tricuspidata* root bark. *Arch. Pharm. Res.* 2009;32:195-200.
- Kim DW, Lee WJ, Asmelash Gebru Y, Choi HS, Yeo SH, Jeong YJ, Kim S, Kim YH, Kim MK. Comparison of Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of *Maclura tricuspidata* Fruit Extracts at Different Maturity Stages. *Molecules.* 2019;24:pii:E567.
- Chen X, Mukwaya E, Wong MS, Zhang YA. systematic review on biological activities of prenylated flavonoids. *Pharm. Biol.* 2014;52:655-60.
- Hiep NT, Kwon J, Kim DW, Hong S, Guo Y, Hwang BY, Kim N, Mar W, Lee D. Neuroprotective constituents from the fruits of *Maclura tricuspidata*. *Tetrahedron.* 2017;73:2747-59.
- Tian YH, Kim HC, Cui JM, Kim YC. Hepatoprotective constituents of *Cudrania tricuspidata*. *Arch. Pharm. Res.* 2005;28:44-8.
- Kim OK, Nam DE, Jun W, Lee J. Anti-inflammatory and gastroprotective activities of *Cudrania tricuspidata* leaf extract against acute HCl/ethanol-induced gastric mucosal injury in Sprague-Dawley rats. *J. Food Biochem.* 2015;39:508-16.
- Seo EJ, Curtis-Long MJ, Lee BW, Kim HY, Ryu YB, Jeong TS, Lee WS, Park KH. Xanthones from *Cudrania tricuspidata* displaying potent α -glucosidase inhibition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007;17:6421-4.
- Han XH, Hong SS, Hwang JS, Jeong SH, Hwang JH, Lee MH, Lee MK, Lee D, Ro JS, Hwang BY. Monoamine oxidase inhibitory constituents from the fruits of *Cudrania tricuspidata*. *Arch Pharm Res.* 2005;28:1324-7.
- Lim JY, Hwang BY, Hwang KW, Park SY. Methylalpinumisoflavone inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in microglial cells by the NF- κ B and MAPK signaling pathway. *Phytother Res.* 2012;26:1948-56.
- Lee J, Kim BY, Son Y, Giang DH, Lee D, Eo SK, Kim K. 4'-O-Methylalpinumisoflavone inhibits the activation of monocytes/macrophages to an immunostimulatory phenotype induced by 27-hydroxycholesterol. *Int J Mol Med.* 2019;43:2177-86.
- Liu Y, Veena CK, Morgan JB, Mohammed KA, Jakobson MB, Nagle DG, Zhou YD. Methylalpinumisoflavone inhibits hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) activation by simultaneously targeting multiple pathways. *J Biol Chem.* 2009;284(9):5859-8.
- Sapkota K, Park SE, Kim JE, Kim S, Choi HS, Chun HS, Kim SJ. Antioxidant and Antimelanogenic Properties of Chestnut Flower Extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 2010;74:1527-33.
- Jung YJ, Ko WS, Yoon HJ. A study on correlation of melanin & pigmentation disorder and viscera and bowels. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 2016;29:27-41.
- Aoki Y, Tanigawa T, Abe H, Fujiwara Y. Melanogenesis inhibition by an oolong tea extract in b16 mouse melanoma cells and UV-induced skin pigmentation in brownish guinea pigs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*

- 2007;71:1879-85.
24. Chakraborty AK, Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 1998;11:206-12.
 25. Halder RM, Richards GM. Topical agents used in the management of hyperpigmentation. *Skin Therapy Lett.* 2004;9:1-3.
 26. Maeda K, Fukada M. In vivo effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem.* 1991;42:361-8.
 27. Lee C, Jang JH, Ahn EM, Park CI. Inhibitory Effects of Marine Natural Products on Melanogenesis in B16 Melanoma Cells. *Kor. J. Herbology.* 2012;27:73-80.
 28. Skehan P. Assays of cell growth and cytotoxicity. In Studzinski, G.P. (Ed.), *Cell Growth and Apoptosis.* New York: 1998. Oxford University press 180.
 29. Furuno K, Akasako T, Sugihara N. The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* 2002;25:19-23.
 30. Sim GS, Kim JH, Lee BC, Lee DH, Lee GS, Pyo HB. Inhibitory effects on melanin production in B16 Melanoma Cells of *Sedum sarmentosum*. *Yakhak Hoeji* 2008;52:165-71.
 31. Guidelines for the Validation of Functional Cosmetics I -Data demonstrating the effectiveness or function of the product to help skin whitening. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation. 2015.
 32. Ji Kim, GM J. East-West Medical Review of Atopic Dermatitis. *J. ped. Kor. Med.* 1994;8(1):75-80.
 33. Quevedo WC, Jr. Epidermal melanin units: melanocyte-keratinocyte interactions. *AM. Zoologist.* 1972;12:35-41.
 34. Smit NP, van Nieuwpoort FA, Marrot L, Out C, Poorthuis B, van Pelt H, Meunier JR, Pavel S. Increased melanogenesis is a risk factor for oxidative DNA damage-study on cultured melanocytes and atypical nevus cells. *Photochem Photobiol.* 2008;84:550-5.
 35. Napolitano A, Panzella L, Monfrecola G, d'Ischia M. Pheomelanin induced oxidative stress: Bright and dark chemistry bridging red hair phenotype and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27:721-33.
 36. Hagiwara K, Okura M, Sumikawa Y, Hida T, Kuno A, Horio Y, Yamashita T. Biochemical effects of the flavanol-rich lychee fruit extract on the melanin biosynthesis and reactive oxygen species. *Journal of Dermatology.* 2016;43:1174-83.
 37. Han YS, Jung ES. A study of correlation between antioxidant activity and whitening. *Asian J Beauty Cosmetol.* 2003;1:11-22.
 38. Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors.* 2009;35:193-9.
 39. Hearing VJ, Tsukamoto K. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 1999;4:24-8.
 40. Oh WK, Kim KB, Lim JY, Lee SK, Kwon YD, Yeom SR, Song YS. Effects of Dokhwalkisaeng-tang on melanin synthesis inhibition and gene expression in B16F10 melanoma cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 2009;23:63-75.