

꿀풀과 식물 정유의 주성분인 Thymol의 미백활성에 관한 연구

최덕균^{1#}, 박찬익², 이선미², 백정인^{2*}

1: 경북대학교 생명과학부, 2: 대구한의대학교 힐링산업학부 향산업전공

Anti-Melanogenic Effect of Thymol, a Major Odorant in Essential Oils of Family Lamiaceae

Deok-Gyun Choi^{1#}, Chan Ik Park², Sun-Mi Lee², Jeong-In Baek^{2*}

1 : Department of Biology, Kyungpook National University, Republic of Korea

2 : Department of Aroma-Applied Industry, Daegu Haany University, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Thymol (2-isopropyl-5-methylphenol), a natural monoterpenoid phenol, is one of the major odorant constituents found in natural essential oils of various herbal plants, such as *Thymus quinquecostatus* and *Thymus vulgaris*. Multiple biological activities of thymol, including antioxidative, antimicrobial, and anti-inflammatory effects, have been reported in numerous *in vitro* studies, and recently it was suggested that thymol may could inhibit oxidization of L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) to dopaquinone required in melanogenesis pathway, as an antioxidant.

Methods : MTT assay was performed to test the cytotoxic effect of thymol in B16F10 cells. Inhibitory effect of thymol to tyrosinase activities were examined using both mushroom tyrosinase and intracellular tyrosinase. Expression level of tyrosinase in B16F10 cells were investigated by western blot analysis.

Results : The cell viability was decreased by thymol treatment in dose-dependant manner, leading significant cytotoxicity in 500 and 1000 μ M thymol-treated groups. In the alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-induced melanogenesis, administration of thymol significantly decreased extracellular (secreted) melanin content in dose-dependent manner. Cellular tyrosinase activity assay and western blot analysis of intracellular tyrosinase showed that thymol has a strong anti-melanogenic effect by inhibition of tyrosinase activity and by decreasing expression of tyrosinase that contribute to melanin synthesis in the B1610 cells.

Conclusions : As the first functional study that prove anti-melanogenic effect of thymol and its underlying mechanism in the living cells, our study suggests the applicability of fragrance as the functional materials of cosmetics or health supplement, not as just an additive.

Key words : Thymol, *Thymus quinquecostatus*, anti-melanogenesis, tyrosinase, skin

I. 서 론

피부는 표피, 진피, 피하지방의 다층구조를 가진 인체의 최외곽 기관으로, 외부의 물리적 화학적 자극에 대한 보호 작용을 통해 인체의 항상성을 유지할 뿐만 아니라, 외부 환경에 대한

일차적인 방어선으로서 선천성 면역을 담당하는 중요 기관이다¹⁾. 이러한 피부는 체 내 대사의 변화 및 정신적 스트레스 또는 체 외부로부터의 유해한 자극에 영향을 받아 그 기능이 저하될 수 있으며, 특히 자외선은 피부의 손상을 초래하는 가장 주된 요인 중 하나로 손꼽힌다. 멜라닌은 자외선에 의한 피부 세포의

*Corresponding author : Jeong-In Baek, Department of Aroma-Applied Industry, Daegu Haany University.

· Tel : +82-53-819-1465 · Fax : +82-53-819-1243 · E-mail : baek@dhu.ac.kr

#First author : Deok-Gyun Choi, Department of Biology, Kyungpook National University.

· Tel : +82-53-939-5387 · E-mail : equus0018@knu.ac.kr

· Received : 11 Jun 2019 · Revised : 12 Jul 2019 · Accepted : 25 Jul 2019

손상을 막기 위해 분비되는 색소 물질로서, 표피 기저층의 멜라닌형성세포에서 합성되어 멜라노솜 (melanosome)의 형태로 표피 전체의 각질형성세포로 수송되며, 세포 내에서 멜라닌 캡 (melanin caps)을 형성하여 자외선에 의한 DNA 손상을 차단함으로써 피부암과 같은 질병으로부터 피부를 보호한다²⁾. 이렇듯 멜라닌은 피부의 건강을 유지하는데 결정적인 기여를 하는 색소이지만, 불균일하고 과도한 멜라닌의 축적은 오히려 기미, 주근깨, 검버섯 등 과다색소침착 질환의 직접적인 원인이 되므로^{3, 4)}, 멜라닌 합성 및 분비를 억제하는 미백 성분의 발굴 및 그 기전에 대한 연구 역시 매우 활발하게 이루어지고 있다.

Thymol (2-isopropyl-5-methylphenol)은 페놀 모노테르펜에 속하는 천연 휘발성 유기화합물로, 다양한 허브 식물의 에센셜 오일에서 발견되는 주요 향기 물질이다. 특히 꿀풀과 다년생 목본식물인 백리향 (百里香, *Thymus quinquecostatus* Celakov.) 정유에서 thymol의 함량이 매우 높은 것으로 알려져 있으며, 국내 울릉도에서 자생하는 천연기념물 제 52호 섬백리향 (*Thymus magnus* Nakai)의 정유에서는 thymol의 함량이 54.7%에 달하는 것으로 보고된 바 있다⁵⁾. 섬백리향은 전통적으로 구풍, 발한에 효능이 있다고 알려져 왔으며, 유럽에서는 타임 (Thyme, *Thymus vulgaris*)의 정유가 호흡기 (천식, 기관지염), 소화기 (구풍, 위장장애), 심혈관 (고혈압), 신경계 (흥분성 질환) 등 여러 기관에서 발생하는 질환을 치료하기 위해 사용되어 왔다⁶⁾. 뿐만 아니라 현재에도 유럽에서는 Thyme이 기침과 기관지염 등의 호흡기 질환에 대한 정식 약물로 사용되고 있다⁷⁾. 이러한 기록들을 바탕으로 백리향의 효능 및 기전 연구는 주로 항균작용에 초점을 맞추어 수행되어 온 바, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* 등에 대한 섬백리향의 항진균작용⁸⁾ 및 항균작용⁹⁾에 대한 연구가 국내에서 보고되었으며, *Thymus vulgaris* 정유 역시 항균작용 및 항진균작용을 가지는 것으로 확인되었다¹⁰⁻¹¹⁾. 그 외에도 2007년에는 마우스 모델을 사용하여 섬백리향 정유의 진통, 항염증 작용을 규명한 연구가 보고된 바 있다¹²⁾. 이와 유사한 효능은 백리향 정유의 주성분인 thymol에서도 지속적으로 연구되어, 특히 thymol이 마우스 유선상피세포에서 tumor necrosis factor α (TNF- α)와 interleukin (IL)-6의 생산을 억제하고¹³⁾, 목막증피세포에서 TNF- α , IL-6, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)과 α -smooth muscle actin (α -SMA)의 활성을 줄이며¹⁴⁾, 대식세포에서 Jun N-terminal kinase (JNK)와 signal transducer and activator of transcription (STAT-3)의 발현량을 조절하여¹⁵⁾, lipopolysaccharide (LPS) 유도성 염증에 대한 항염효과를 가지는 것이 다수의 논문에서 발표되고 있다. 또한 급성호흡증후군 마우스 동물 모델에서 MDA, MPO와 SOD의 현저한 감소를 통해 항염증 효능을 보인다고 보고된 바 있다¹⁶⁾. 이는 *Thymus* 속의 약용식물이 가지는 항균 및 항염 효능이 그들의 주성분인 thymol에서 비롯하였을 것이라는 추론을 가능케 한다.

이와 같이 thymol이 발휘하는 다양한 생리학적 효능이 활발히 연구되어 왔으나, 피부에서 기대할 수 있는 thymol의 효능, 특히 멜라닌 색소의 합성에 미치는 영향에 대해서는 배양세포 및 피부조직을 대상으로 한 연구가 매우 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 마우스 유래의 melanoma 세포인 B16F10 세포에서 백리향과 타임 등 *Thymus* 속 식물 정유의

공통적 주성분인 thymol이 멜라닌의 합성에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 나아가 thymol의 미백기능이 멜라닌 합성 효소인 tyrosinase의 활성 저해와 어떠한 관련이 있는지 조사함으로써 미백 기능성 화장품의 소재 및 색소침착 완화제로서의 thymol의 활용 가치에 대해 탐구하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

본 실험에서 사용된 thymol (T0501) 및 alpha melanocyte stimulating hormone (α -MSH, M4135), dimethyl sulfoxide (DMSO), arbutin (A4256), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), mushroom tyrosinase (T3824), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, 333736), L-tyrosine (T3754) 은 sigma (St.Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 는 hyclone (Logan, UT, USA) 제품을 사용하였고, tyrosinase 항체는 abcam (Cambridge, MA, UK)에서, 2차 항체인 Goat anti-rabbit IgG HRP conjugate antibody 는 cell signaling (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

2. 세포 배양

마우스 흑색종 (mouse melanoma, B16F10) 세포는 경북대학교 강남주 교수님 연구실로부터 분양 받아 사용하였으며, 10% fetal bovin serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건 하에 incubator에서 배양하였다.

3. 세포 독성 평가

B16F10 세포를 96 well plate에 5X10³ cells/well이 되도록 분주하여 24시간 동안 배양한 후 DMSO에 농도별로 희석한 thymol을 배지 부피의 0.1% 되도록 처리하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 세포 생존을 확인을 위해 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액을 각 well당 10 μ l씩 첨가하여 빛을 차단한 상태로 2시간 동안 배양한 후, 배양액을 제거 하고 각 well당 DMSO를 100 μ l씩 넣어 formazan crystal 생성물을 용해시켰다. 결정을 완전히 녹인 후 EPOCH microplate reader (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT USA)로 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4. 멜라닌 함량 측정

B16F10 세포를 6well plate에 4X10⁵ cells/well이 되도록 분주하여 24시간 동안 배양한 후 phenol red free DMEM으로 배지를 교체하여 thymol을 농도별로 처리 하였다. 1시간 뒤에 α -MSH를 200 nM로 첨가하고 48시간 동안 배양하여 멜라닌 합성을 유도한 후, 배지를 걷어 96well plate에 100 μ l씩 분주하여 EPOCH microplate reader로 475nm 파장에서 멜라

닌에 대한 흡광도를 측정하였다. 미백 활성에 대한 positive control 물질로는 arbutin을 사용하였다.

5. Mushroom tyrosinase 저해 활성 측정

Mushroom tyrosinase 활성 측정을 위해 tyrosinase의 기질인 L-tyrosine을 0.1M potassium phosphate buffer (pH 6.8)에 1mM 농도로 완전히 녹이고, mushroom tyrosinase는 1000 U/ml로 준비하였다. 0.1M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 550 μ l에 mushroom tyrosinase 50 μ l를 첨가한 후 최종농도가 각 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M이 되도록 농도별로 thymol 50 μ l를 첨가한 후, 23 $^{\circ}$ C 에서 10 분간 반응시켰다. 이 후에 1 mM L-tyrosine 100 μ l를 추가 하고 23 $^{\circ}$ C 에서 3분간 반응시킨 뒤 96well plate에 100 μ l씩 분주하여 EPOCH microplate reader로 475 nm 파장에서 dopachrome에 대한 흡광도를 측정하였다.

6. 세포 내 tyrosinase 저해 활성 측정

B16F10 세포를 6well plate에 4×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 24시간 동안 배양한 후 phenol red free 배지로 교체하여 thymol을 농도별로 처리 하였다. 처리 후 1시간 뒤에 α -MSH를 200 nM로 첨가하고 48시간 동안 배양한 다음, 배양액을 제거 하고 1X PBS로 2번 세척하였다. 그리고 cell lysis buffer (2,5mM sodium pyrophosphate, 1% triton, 1mM EGTA)를 well당 100 μ l 처리 한 후 scraper를 이용하여 세포를 모아 13,000 rpm으로 25분간 원심분리한 후, 상층액 80 μ l에 10 mM L-DOPA를 20 μ l 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하였다. dopachrome에 대한 흡광도는 475 nm 파장에서 측정하였다.

7. Western blot을 이용한 tyrosinase발현 측정

Thymol 및 α -MSH를 처리한 후 48시간 배양한 B16F10 세포를 차가운 1X PBS로 2번 세척하였다. Cell lysis buffer를 이용하여 세포를 용해시키고, 4 $^{\circ}$ C 13,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 얻은 후, BCA assay로 총 단백질을 정량하였다. 시료 당 20 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE gel 에서 전기영동 하여 분리한 후, 이를 nitrocellulose membrane에 옮긴 다음 상온에서 1시간 동안 blocking buffer (5% skim milk in TBS-T)에서 incubation 시켰다. Tyrosinase에 대한 1차 항체를 blocking buffer에 1:1000 으로 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 약 12시간 반응시킨 다음, TBS-T를 이용하여 5분간 3회 세척 후 anti-rabbit IgG HRP conjugate 2차 항체를 1:1000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 약 3회 세척 후 enhanced chemiluminescent (ECL) detection 방법으로 목적 단백질의 발현을 확인하였으며, 이미지 촬영은 invitrogen사 iBrightCL1000 으로 수행 하였다.

8. 통계분석

본 연구의 각 실험들은 triplicate로 세 번 이상 수행하였으며, 그래프는 각 실험 반복횟수에 대한 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 각 그룹간의 차이에 대한 통계적 유의성에 대한 검증은 student t-test(양측검정)를 사용하여 수행했으며, p-value가 0.05 이하인 값에 대해 유의한 것으로 판단하였다.

III. 결 과

1. Thymol의 세포독성

Thymol이 멜라닌의 형성 및 분비에 미치는 영향을 조사하기 위해 앞서, 심각한 세포독성을 나타내지 않는 선에서의 최적 thymol 처리 농도를 결정하기 위하여 세포 생존율 측정 실험을 수행하였다. B16F10 세포에 각각 1, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 μ M의 thymol을 48시간 처리한 후, 생성되는 formazan crystal의 양을 흡광도로 측정하여 그룹 간 측정값을 상대적인 세포 생존율로 환산 비교하였다. Thymol을 처리하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 고정 하였을 때, 1 μ M 처리군 부터 각각 98.52%, 94.15%, 94.52%, 86.13%, 82.74%, 76.36%을 나타내었으며, 특히 최고농도 1000 μ M 처리군에서는 22.96%의 낮아진 세포 생존율을 보였다(Fig. 1).

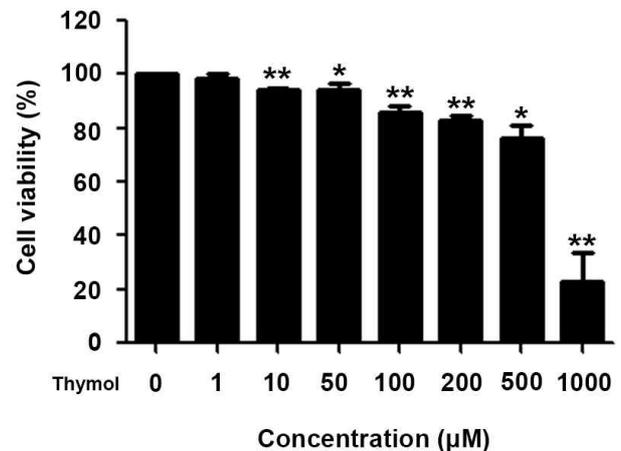


Fig 1. Effects of thymol on cell viability in B16F10 cells. Cell viability was measured by the MTT assay. Cells were incubated with 1, 10, 50, 100, 200, 500 and 1000 μ M of thymol, respectively. The results expressed as the relative percentage of the control (untreated with thymol) group. * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001

결과적으로 thymol의 처리 농도가 증가함에 따라 세포독성이 지속적으로 소폭 증가하였으며, 이는 과량의 thymol이 세포의 성장 및 유지에 악영향을 미친다는 것을 의미한다. 따라서 이 후의 모든 실험은 세포 생존율이 80% 이상 보장되는 범위 내에서 50, 100, 200 μ M을 사용하여 수행되었다.

2. Thymol의 멜라닌 합성 억제 효과

일차적으로 thymol이 멜라닌형성세포에서 멜라닌 합성 반응의 활성화를 억제할 수 있는지 확인하기 위하여, 멜라닌 합성경로 촉진 하에서 thymol의 처리에 따른 멜라닌 합성량을 측정 및 비교 하였다. B16F10 세포에 농도별 arbutin과

thymol을 처리하고 200 nM의 α -MSH로 멜라닌 합성을 유도한 후, 각 그룹별로 배지로 분비된 멜라닌의 양을 비교하였다.

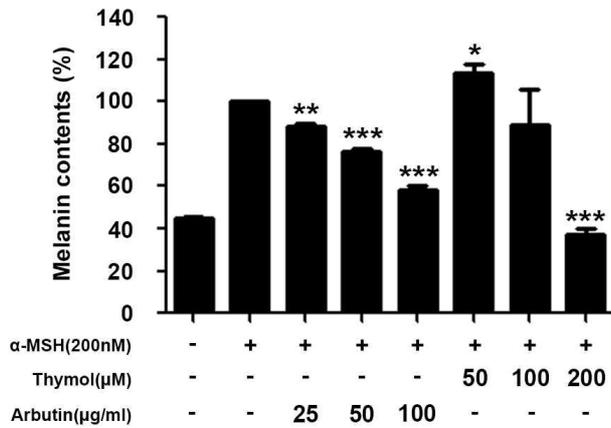


Fig 2. Anti-melanogenic effects of Thymol in B16F10 cells. Extracellular melanin levels between thymol-treated and non-treated cells. The result shows that thymol significantly inhibited α -MSH-induced melanin production in B16F10 cells. The values represent mean \pm SD. * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001.

그 결과, α -MSH의 자극은 멜라닌의 분비량을 대조군에 비해 약 2.23배 증가시켰으며, 이를 100%로 환산하였을 때 기존의 보고된 미백 활성 물질인 arbutin은 25, 50, 100 μ g/ml의 농도에서 각각 88.02%, 76.26%, 58.53%의 멜라닌 분비량을 보였다(Fig. 2). 이와 비교하였을 때, thymol은 50 μ M에서 113.42%로 분비된 멜라닌의 양이 소폭 증가한 것으로 보였지만, 100 μ M 농도에서 89.18%, 그리고 200 μ M에서는 37.19%로 멜라닌 분비량이 50% 이상 감소하였고, 이는 P -value 0.001 이하로 매우 유의성이 큰 결과였다. 따라서, 이는 thymol이 α -MSH 자극에 의한 멜라닌합성을 효과적으로 억제하였음을 의미한다.

3. Thymol의 tyrosinase 효소 저해 활성

Thymol의 멜라닌 분비 억제 효과가 멜라닌합성효소인 tyrosinase의 활성과 관련이 있는지 확인하기 위하여, 2가지의 실험을 통해 thymol의 tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 먼저 L-tyrosine을 기질로 하여 mushroom tyrosinase에 의한 dopachrome의 생성량을 흡광도를 통해 측정함으로써, 이 과정에서 thymol의 처리 유무에 따른 dopachrome의 생성량 차이를 비교하였다. 기질 (L-tyrosine)과 효소 (mushroom tyrosinase)를 전혀 사용하지 않은 음성대조군에서의 흡광도를 100%로 하였을 때, 양성대조군에서 기질과 효소의 반응에 의한 dopachrome의 생성량은 314.83%였다. 여기에 미백물질인 arbutin을 50, 100 μ g/ml로 처리하였을 때에는 dopachrome 생성량이 각각 222.33%, 190.01%로 감소하였으며, 50, 100, 200 μ M의 thymol을 처리했을 때에는 285.72%, 269.47%, 258.79%로 농도가 증가함에 따라 dopachrome의 생성량이 함께 감소하는 결과를 나타내었다(Fig. 3). 이러한 차이는 100, 200 μ M 농도에서 통계적으로 유의하였으며, 본 실험의 mushroom tyrosinase 활성에 대해서는 기존의 arbutin 보다

다소 효소 저해 활성이 낮은 것으로 판단되었다.

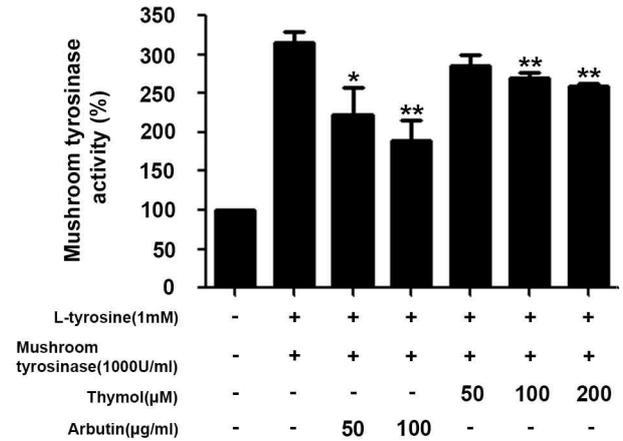


Fig 3. Inhibitory effects of thymol on mushroom tyrosinase activity. Mushroom tyrosinase activity was determined by measuring formation of dopachrome. The results shows that thymol inhibited tyrosinase oxidative activity in 200 μ M, suggesting that the anti-melanogenic effect of thymol was mediated by direct inhibition of tyrosinase activity. The values represent mean \pm SD. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

다음으로는 실제 B16F10 세포 내에서 발현하는 intracellular tyrosinase에 대한 thymol의 효소 저해활성을 측정하였다. Arbutin과 thymol을 각각 농도별로 전처리하고 α -MSH로 멜라닌 합성을 유도한 후 세포 내 tyrosinase를 포함한 총단백질을 추출하여 기질인 L-DOPA와 반응시킴으로써 thymol 농도에 따른 dopachrome의 생성량을 확인하였다. 그 결과, arbutin 처리군에서는 100 μ g/ml 처리군에서도 91.59%로 유효한 tyrosinase 저해 활성이 나타나지 않았다. 반면 thymol을 처리한 경우, 200 μ M에서 75.58%로 tyrosinase 활성이 크게 감소했음이 확인되었으며, 이는 통계적으로 유의하였다(Fig. 4). 앞선 mushroom tyrosinase 활성측정의 결과와는 다르게 실제 B16F10 세포 내 tyrosinase에 대해서는 thymol이 arbutin 보다 월등한 효소저해 활성을 가지는 것으로 나타났다.

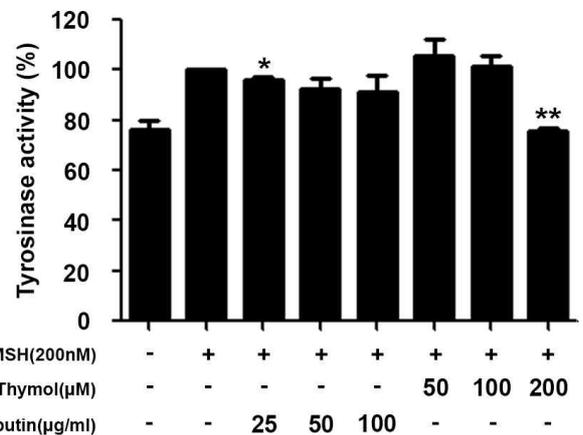


Fig 4. Inhibitory effects of thymol on cellular tyrosinase activity. Thymol inhibited cellular tyrosinase activity in 200 μ M. This result suggests that thymol inhibited melanogenesis by interrupting cellular tyrosinase activity. The values represent mean \pm SD. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

4. Thymol의 tyrosinase 발현 억제 기능

앞서 확인된 thymol의 세포 내 tyrosinase 저해 활성을 바탕으로, thymol이 tyrosinase의 활성 뿐만 아니라 α -MSH 자극에 의한 tyrosinase의 발현 촉진에 대한 억제 기능도 가지는지 확인하기 위하여 western blot을 수행하였다. 멜라닌 합성 경로에서 가장 중심적인 역할을 하는 tyrosinase는 α -MSH의 신호에 의해 그 발현이 촉진되므로, thymol의 처리에 따른 tyrosinase의 발현량을 비교함으로써 thymol이 α -MSH에 의해 활성화되는 신호경로를 억제하는 기능을 가지는지 확인하고자 하였다. 기존에 알려진 바와 같이, 본 실험의 결과 α -MSH의 자극은 대조군에 비해 tyrosinase의 발현을 단백질 수준에서 약 240% 증가시켰으며, 100 μ g/ml의 arbutin 처리군에서는 tyrosinase 발현이 약 162%로 대조군보다는 높지만 α -MSH 처리군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 5). 특히 thymol을 처리하였을 때, 50 μ M에서 200%, 100 μ M에서 187%, 200 μ M에서 97%로 tyrosinase의 발현이 지속적으로 감소한다는 것을 확인할 수 있었고, 200 μ M에서는 통계적으로도 유의한 발현 억제 효과가 나타났다. 따라서, thymol이 α -MSH 자극에 의한 tyrosinase의 발현 촉진을 억제함으로써 멜라닌 합성을 막는다고 판단된다.

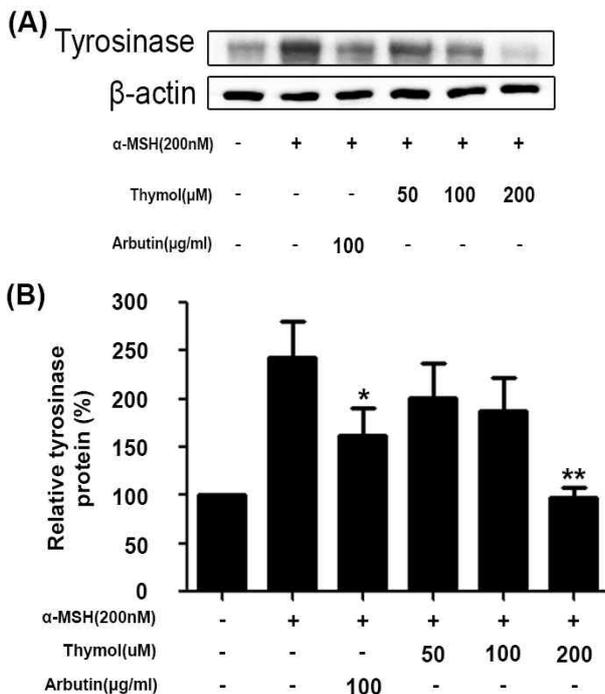


Fig 5. Effects of thymol on α -MSH-induced tyrosinase expression in B16F10 cells. (A) Expression levels of tyrosinase were analyzed by western blot. (B) Relative ratio of tyrosinase expression. The expression levels of tyrosinase in each group were normalized to β -actin. Tyrosinase expression was significantly reduced in the 200 μ M thymol-treated group. * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001.

IV. 고 찰

멜라닌형성세포에서의 멜라닌 합성은 자외선으로부터 피부를

보호하는 매우 중요한 기작이며, 다양한 인자들이 관여하는 복잡한 과정을 통해 이루어진다¹⁷. UV와 같은 외부 자극은 각질형성세포로 하여금 멜라닌형성세포 자극 호르몬인 α -MSH를 분비하게 하고, 그것은 멜라닌형성세포 표면의 수용체인 melanocortin 1 receptor (MC1R)와 결합한다. 이 결합 신호는 adenylyl cyclase의 활성화를 통해 세포 내 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)를 증가시키고¹⁸⁻¹⁹, 연쇄적인 효소 활성화를 통해 전사인자인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현을 촉진한다. 최종적으로 활성화된 MITF는 멜라닌 합성에 중심 역할을 하는 tyrosinase와 tyrosinase-related protein 1, 2 (TRP1, TRP2) 유전자 및 그 단백질의 발현을 증가시킴으로써 멜라닌의 합성을 더욱 촉진하게 된다^{18,20}. 특히 tyrosinase는 멜라닌 합성에 필수적으로 요구되는 효소로, tyrosinase에 의해 기질인 tyrosine이 수산화 및 산화되어 중간 생성물인 dopaquinone을 만들어냄으로써 멜라닌 합성을 촉발한다²¹.

본 연구의 결과, thymol은 비세포성 실험에서 mushroom tyrosinase의 효소 활성을 직접적으로 차단했을 뿐만 아니라, B16F10 세포 내에서 발현하는 tyrosinase의 활성을 더욱 크게 억제한다는 것이 확인되었다. 본 intracellular tyrosinase 저해 활성 결과를 통해 얻을 수 있는 가능성은 두 가지가 있다. 첫 번째는 intracellular tyrosinase가 기질을 산화하는 것을 thymol이 직접적으로 차단할 가능성이며, 두 번째는 cell lysate에 존재하는 tyrosinase의 양이 처음부터 적었기 때문에 기질 산화 효율이 감소하였을 가능성이 있다. 실제 1999년 발표된 한 연구에서는 thymol이 식물성 오일에서 정제한 triacylglycerols의 산화를 효과적으로 방지하는 항산화 활성이 있다고 보고하였으며²², 또 다른 연구에서는 thymol이 특정 효소의 활성과는 독립적으로 L-DOPA가 dopaquinone으로 산화되는 것을 억제하는 항산화활성을 가진다고 발표하였다²³. 이는 thymol이 tyrosinase에 특이적인 상호작용을 통해 효소 활성을 차단하기 보다는, 다양한 효소의 산화작용에 대해 기질과 경쟁적으로 작용함으로써 일종의 항산화물질의 역할을 할 수 있음을 의미한다.

두 번째 가능성은, western blot을 통해 tyrosinase의 발현 변화를 비교 분석함으로써 확인되었다. α -MSH에 의해 멜라닌 합성이 유도되었을 때 tyrosinase의 발현이 단백질 수준에서 크게 증가한 것과는 대조적으로, thymol을 처리한 세포에서는 α -MSH의 자극에도 불구하고 tyrosinase의 발현이 음성대조군과 동등한 정도로 감소하였다. 이는 intracellular tyrosinase 활성 측정을 위해 세포 내 총단백질을 동량 추출하였다고 하더라도, 그 속의 tyrosinase의 함량이 α -MSH 처리군에 비해 낮았을 것임을 의미한다. 따라서 thymol이 α -MSH에 의해 활성화되는 tyrosinase의 발현 촉진 경로를 차단하였고, 그것이 결과적으로 낮은 효소 활성으로 나타난 것이라 볼 수 있다. 직접적인 항산화활성의 측정 등을 통한 추가검증이 필요할 수도 있겠으나, 본 연구의 실험 결과 및 선행 연구를 바탕으로 한 합리적 추론에 따라서, thymol의 항산화 활성과 tyrosinase 발현 억제 기능이 복합적으로 세포에 작용하여 미백 효능을 나타내었을 것이라 판단된다. 나아가 세포 내 cAMP level 측정 및 CREB (cAMP response element-binding protein), MITF 등 tyrosinase의 발현을 촉진하는 상위 조절

인자의 활성화 분석 등 추가적인 실험이 수행된다면 thymol의 작용기전을 더욱 명확히 규명할 수 있을 것으로 기대된다.

피부 미용의 측면 뿐 아니라 의학적인 측면에서도 멜라닌 형성 경로 연구 및 미백 기능성 소재의 발굴은 매우 광범위하게 이루어져왔다. 특히 Arbutin 또는 kojic acid와 같은 기존의 여러 미백 기능성 물질들이 실제 화장품 및 의약품에 널리 사용되어 왔으나, 최근 고농도에서 알려지 반응 및 백반증 등의 부작용이 보고됨에 따라 안정성에 대한 지속적 논란이 있고, 현재는 그 사용이 제한적이다²⁴⁻²⁵. 그 후 안전성이 높은 천연 유래의 물질을 대상으로 단백질, 당, 펩타이드, 핵산, 비타민 유도체 등의 수 많은 미백 기능성 소재가 발굴되어 왔으나, 이들 역시 결국 피부 장벽에 대한 침투력의 한계로 실질적인 효능에 대한 근거가 여전히 부족한 실정이다²⁶. 반면 천연 에센셜 오일 또는 식물 정유로 대표되는 향기 물질은 고대 이집트시대부터 인류 역사 3000년 이상 미용 및 치료의 목적으로 널리 사용되어 왔다. 향기 물질은 화학적으로 분자 내 탄소 수 16개 이하, 분자량 300 g/mol 이하의 비극성 저분자 물질로 정의되며, 높은 휘발성을 가지기에 공기의 흡입을 통해 후각으로 인지될 수 있다. 이러한 비극성 향기 물질은 피부에 적용시 강력한 피부 장벽인 표피의 세포간지질로 쉽게 확산될 수 있고, 따라서 진피층까지 충분히 도달할 수 있는 것으로 알려져 있다²⁷. 이러한 장점으로 인해 실제 많은 연구에서 약물의 경피 흡수 촉진제로서의 에센셜 오일 효능을 검증한 바 있다²⁸. Thymol 역시 이러한 향기물질의 특성을 그대로 가지고 있으며, 세포실험을 통해 검증된 미백 활성 뿐 아니라 실제 피부 적용시 표피 기저층의 멜라닌형성세포에 도달할 수 있는 가능성 역시 높다는 장점을 가지고 있다. 더욱이 후각을 통해 감성적인 측면을 자극할 수도 있기에 기능과 감성을 모두 충족시키는 새로운 기능성 화장품의 소재로 그 활용 가치가 높게 평가될 수 있을 것이라 기대한다.

V. 결 론

백리향과 타임 등 *Thymus* 속 식물 정유의 가장 주요한 성분인 thymol이 멜라닌 합성 경로에 미치는 영향을 분석하여 미백 활성을 조사한 결과, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. B16F10 세포에 thymol을 처리하여 세포 독성을 확인한 결과, 200 μ M 농도까지는 80% 이상의 세포 생존율을 유지하였으며, α -MSH 자극 하에 해당 농도에서 48 시간 동안 세포를 배양하였을 때 대조군과 비교하여 멜라닌 분비량이 37.19%로 크게 감소하였다.
2. Mushroom tyrosinase를 사용한 비세포성 효소 저해 활성 실험과 B16F10 세포의 intracellular tyrosinase를 사용한 세포성 효소 저해활성 실험에서 모두 thymol이 농도에 비례하여 tyrosinase의 활성을 억제하는 것으로 확인되었으며, 그 저해 활성은 intracellular tyrosinase에 대하여 더 강하게 나타났다.
3. Western blot을 통하여 분석한 결과, thymol은

tyrosinase의 활성을 억제하는 것 뿐만 아니라, α -MSH 자극에 의한 tyrosinase의 발현 촉진도 유의하게 저해한다는 것이 단백질 수준에서 확인되었다.

본 연구는 *Thymus* 속 식물 정유의 주요 단일 성분인 thymol을 대상으로, 멜라닌형성세포에서의 미백 활성을 검증하였다. 천연에 다량 존재하는 성분인 동시에 효율적인 피부 침투력을 기대할 수 있는 비극성 저분자 물질로서, 본 세포 실험에서 검증된 thymol의 미백활성이 실제 화장품 및 의약품 보조제에서 미백 기능성 소재로 유용하게 활용될 수 있을 것이라 생각된다.

감사의 글

이 연구의 결과물은 한국연구재단 신진연구지원사업(2017R1C1B2009705)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 진심으로 감사드립니다.

References

1. Heath WR, Carbone FR. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat Immunol*. 2013 ; 14 : 978-85.
2. Kobayashi N, Nakagawa A, Muramatsu T, Yamashina Y, Shirai T, Hashimoto MW, Ishigaki Y, Ohnishi T, Mori T. Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *J. Invest Dermatol*. 1998 ; 110 : 806-10.
3. Hearing VJ, Tsukamoto K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J*. 1991 ; 5 : 2902-09.
4. Briganti S, Camera E, Picardo M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res*. 2003 ; 16 : 101-10.
5. Kim YH, Lee JC, Choi YH. Essential oils of *Thymus quinquecostatus* Celakov. and *Thymus magnus* Nakai. *Korean J. Medicinal Crop Sci*. 1994 ; 2 : 234-40.
6. Chevallier A. *Herbal Remedies*. London : Dorling Kindersley. 2007 : 87-89.
7. Salehi B, Mishra AP, Shukla I, Sharifi-Rad M, Contreras MDM, Segura-Carretero A, Fathi H, Nasrabadi NN, Kobarfard F, Sharifi-Rad J. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytother Res*. 2018 ; 32 : 1688-706.
8. Shin SW, Kim JH. Antifungal activities of essential oils from *Thymus quinquecostatus* and *T. magnus*. *Planta Med*. 2004 ; 70 : 1090-2.

9. Shin SW, Kim JH. In vitro inhibitory activities of essential oils from two Korean Thymus species against antibiotic-resistant pathogens. Arch. Pharm. Res. 2005 ; 28 : 897-907.
10. Marino M. Antimicrobial activity of the essential oils of Thymus vulgaris L. measured using a bioimpedometric method. Food Prot. 1999 ; 62 : 1017-23.
11. Soliman K. M. : Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food Chem. Toxicol. 2002 ; 40 : 1669-75.
12. Kim SM, Suk KD. Anti-nociceptive, anti-inflammatory, mental effects of essential oil from Thymus magnus. 2007 ; 51 : 508-16.
13. Liang D, Li F, Fu Y, Cao Y, Song X, Wang T, Wang W, Guo M, Zhou E, Li D, Yang Z, Zhang N. Thymol inhibits LPS-stimulated inflammatory response via down-regulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in mouse mammary epithelial cells. Inflammation. 2014 ; 37 : 214-22.
14. Wang Q, Cheng F, Xu Y, Zhang J, Qi J, Liu X, Wang R. Thymol alleviates lipopolysaccharide-stimulated inflammatory response via downregulation of RhoA-mediated NF- κ B signalling pathway in human peritoneal mesothelial cells. Eur J Pharmacol. 2018 ; 15 : 210-220.
15. Gholijani N, Gharagozloo M, Farjadian S, Amirghofran Z. Modulatory effects of thymol and carvacrol on inflammatory transcription factors in lipopolysaccharide-treated macrophages. J Immunotoxicol. 2016 ; 13 : 157-64.
16. Wan L, Meng D, Wang H, Wan S, Jiang S, Huang S, Wei L, Yu P. Preventive and Therapeutic Effects of Thymol in a Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury Mice Model. Inflammation. 2018 ; 41 : 183-92.
17. Videira IFS, Moura DFL, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. An Bras Dermatol. 2013 ; 88 : 76-83.
18. Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. Pigment cell Res. 2000 ; 13 : 60-9.
19. Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrist BA. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. Cell Mol Life Sci. 2009 ; 66 : 1493-506.
20. Gillbro JM, Olsson MJ. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents-existing and new approaches. Int J Cosmet Sci. 2011 ; 33 : 210-21.
21. Kitajima N, Moro-oka Y. Dalton perspectives. μ - η 2: η 2-peroxide in biological systems. J Chem Soc Dalton. 1993 ; 18 : 2665-71.
22. Yanishlieva NV, Marinova EM, Gordon MH, Raneva VG. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. Food Chem. 1999 ; 64 : 59-66.
23. Satooka H, Kubo I. Effects of thymol on mushroom tyrosinase-catalyzed melanin formation. J Agric Food Chem. 2011 ; 59 : 8908-14.
24. Kwon OJ. Effect of Mori Folium extract on the melanogenesis and skin fibril matrix. Kor J Herbol. 2016 ; 31 : 41-6.
25. Nakagawa M, Kawai KE, Kawai KY. Contact allergy to kojic acid in skin care products. Contact Dermatitis. 1995 ; 32 : 9-13.
26. Lavin J, Momin SB. How much do we really know about our favorite cosmeceutical ingredients? J Clin Aesthet Dermatol. 2010 ; 3 : 22-41.
27. Cal K, Janicki S, Sznitowska M. In vitro studies on penetration of terpenes from matrix-type transdermal systems through human skin. Int J Pharm. 2001 ; 224 : 81-8.
28. Herman A, Herman AP. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. J Pharm Pharmacol. 2015 ; 67 : 473-85.