

A Study on the Cosmetic Materials of *Abies nephrolepis* MAX. Extracts with Whitening Activity

Min-Jeong Oh¹, Hyeon-Ji Yeom¹, Jung-Woo Chae² and Jin-Young Lee^{1*}

¹Division of Cosmetics and Biotechnology, Hoseo University, Chungnam 31499, Korea

²Gyeonggi-do Forest Environment Research Institute, Osan 12408, Korea

Received December 23, 2021 /Revised June 13, 2022 /Accepted June 14, 2022

We conducted a study on the whitening activity of *Abies nephrolepis* MAX. extracts. The electron-donating ability of 70% ethanol extracts from *A. nephrolepis* MAX. Stem (AN-S) and *A. nephrolepis* MAX. Leaf (AN-L) were found to be 89.4% and 90.9% at 1,000 µg/ml concentration, respectively. Their ABTS⁺ radical scavenging abilities were found to be 88.8% and 96% 500 µg/ml concentration, respectively. Their tyrosinase inhibitory effects were found to be 48.5% and 31.1% at 500 µg/ml concentration, respectively. Cell survival rates measured in B16F10 were examined with the AN-S and AN-L extracts. Results showed cell viabilities of 98.3% and 94.4% at 500 µg/ml concentration, respectively. The protein and mRNA expression inhibitory effects of AN-S and AN-L extracts were measured by Western blotting and RT-PCR, respectively, at 25, 50 and 100 µg/ml concentrations. The results of western blotting showed that the AN-S extract at 100 µg/ml concentration decreased the TRP-1 protein expression rate by 46%. The results of Western blotting also showed that the AN-L extract at 100 µg/ml concentration decreased the MITF protein expression rate was by 54.6%. Consequently, in the case of MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase, the amount of mRNA expressed decreased as the concentration of the extracts increased. Our results suggested that *A. nephrolepis* MAX. extracts can be used as a functional cosmetic material by confirming that they can be used as a whitening material.

Key words : *Abies nephrolepis* MAX., MITF, TRP-1, tyrosinase, whitening

서 론

멜라닌(melanin)은 피부의 표피 중 기저층에 있는 멜라닌 생성 세포(melanocyte)의 멜라노솜(melanosome)에서 생성되며, 멜라닌 외에도 카로틴(carotene), 헤모글로빈(hemoglobin) 등 피부에 존재하는 색소들은 많지만 멜라닌은 피부색을 결정하는데 가장 큰 영향을 준다고 보고되어 있다. 자연계에 흔히 발견되는 페놀류의 고분자 물질로 흑갈색과 검은색을 띠는 단백질의 복합체가 멜라닌이며 [5, 6, 12], 멜라닌 합성은 자외선에 피부가 노출되었을 때 폴리페놀 산화효소(polyphenol oxidase)의 한 종류인 tyrosinase가 아미노산의 종류 중 하나인 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2의 효소로 인해 하이드록시화(hydroxylation)하여 L-3,4-di-

hydroxy-L-phenylalanine (DOPA)를 생성한다. 그 후 산화된 DOPA는 DOPA quinone을 거쳐 산화되어 melanin을 합성하게 되며[16], microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 멜라닌 합성 조절 인자로서 멜라닌 합성 중 세포 증식 및 조절 기능의 역할을 한다[14]. 페오 멜라닌(pheo-melanin)과 유 멜라닌(eu-melanin)으로 나뉘는 것은 DOPA quinone으로 전환된 이후이며 페오 멜라닌은 DOPA quinone이 시스테인(cysteine)과 합성하여 생성되며, 유 멜라닌은 DOPA quinone이 DOPA chrome을 촉매, 산화되어 중합반응에 의해 고분자 합성으로 생성된다 [10]. 코직산(kojic acid), 알부틴(arbutin), 하이드로퀴논(hydroquinone), 글루타치온(glutathione) 등은 미백효과를 갖고 있는 tyrosinase 활성 억제제로 알려져 있어 색소침착이 유발되어 나타나는 기미, 주근깨 등의 피부질환에 사용되는 성분이지만 안정도가 떨어지고 독성, 피부 자극성으로 인해 알레르기, 피부 트러블 등이 발생하는 경우가 있어 천연물을 함유한 기능성 화장품의 개발이 이루어지고 있다[4].

분비나무(*Abies nephrolepis* MAX.)는 구상나무(*Abies koreana* E.H.Wilson)와 함께 우리나라 아고산 지대(subalpine zone)에서 자생하는 식물로서 아고산 지대는 고산대

*Corresponding author

Tel : +82-41-540-9552, Fax : +82-41-540-9538

E-mail : jylee@hoseo.edu

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(alpine zone)와 산지대(montane zone) 사이를 지칭하며, 기온이 낮고 강한 바람이 불며 불규칙한 적설량으로 인해 연교차가 크다. 최근 분비나무는 기후의 변화, 높은 산지의 기상 특성으로 인해 세계자연보전연맹(IUCN)에서 약관심종(Least Concern)으로 분류되어 분비나무를 보존하기 위해 침엽수종 증식, 복원 기술 개발을 위한 연구 활동을 추진 중이라고 보고된 바 있다[15].

본 논문에서는 우리나라 아고산 지대에서 자생하는 분비나무를 분비나무 줄기(*Abies nephrolepis* MAX. Stem)와 분비나무 잎(*Abies nephrolepis* MAX. Leaf) 두 가지 추출물로 나누어 생리활성 및 미백 활성을 검증하여 화장품 소재로서의 응용가능성을 연구하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료의 추출

본 연구에 사용된 분비나무는 경기도산림환경연구소에서 2020년 9월에 채취하여 70% 에탄올 추출을 하였다. 채취한 시료를 건조시킨 후 분쇄하여 70% 에탄올을 시료 무게의 10배로 가하여 실온에서 24시간 침지 후 상등액과 침전물을 분리시켜 추출하였다. 여과지(Whatman No.2)를 사용해 시료 추출물을 여과하였으며 EYELA evaporator로 감압농축, 용매 제거 후 동결건조한 파우더 상태의 시료를 -20°C 에서 보관하여 본 실험에 사용하였다.

시약 및 기기

전자공여능 측정 실험에는 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)과 ABTS⁺ radical 소거능 측정 실험에는 potassium persulfate 시약을 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입 후 사용하였고, 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 시약은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Japan)에서 구입 후 사용하였다. 미백 활성억제 측정 실험의 L-3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (L-DOPA), mushroom tyrosinase 시약 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 단백질 발현 효과 측정 실험에 사용된 1차 항체인 β -actin, MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase와 2차 항체인 anti-mouse는 Santacruz (CA, USA)에서 구입 후 사용하였다. RT-PCR에 사용된 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase와 GAPDH primer는 Bionics (Seoul, Korea)에서 제작하여 구입 후 사용하였다. ATCC (USA)사에서 멜라노마 세포인 B16F10을 구입 후 사용하였다. 세포 배양을 위해 Thermo Scientific Hyclone (USA)에서 penicillin/streptomycin, fetal bovine serum (FBS), trypsin, dulbecco's modified eagle medium (DMEM), phosphate buffered saline (PBS)을 구입 후 사용하였으며, 세포 독성 측정 실험에 사용된 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 BioShop (Canada)에서 구입 후 사용하였다. 3-[4,5-dimethylthiazol]-

2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입 후 사용하였다. 실험에 사용된 기기는 Davinch-ChemiTM Imager CAS-400 SM System (Davinch-K Co., Korea), pH meter (Mettler-Toledo AG, Switzerland), UV transilluminator (BioTop, Switzerland), CO₂ incubator (Vision Scientific, Korea), freeze drier (ILShin BioBase Co., Korea), microplate reader (Tecan, Austria), microscope (Olympus, Japan), digital shaker (Daihan Scientific, Korea), centrifuge (Hanil Science Industrial Co., Korea), Mini-PROTEAN[®] tetra cell (Bio-Rad, USA), micro centrifuge (Gyrozen, Korea), rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), Mini Trans-Blot[®] Cell (Bio-Rad, USA), autoclave (JS Research Inc., Korea), vortex (Scientific Industries, Inc., USA), PCR (ASTEC Co., Japan)을 사용하였다.

실험방법

전자공여능 측정

전자공여능(EDA: electron donating abilities) 측정을 위해 Blois의 방법[1]을 변형하여 실험을 진행하였다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 60 μl 와 추출물을 120 μl 씩 넣어 혼합 후 15분간 반응시켜 microplate reader를 이용해 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가구과 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

ABTS⁺ radical scavenging activity assay 측정

ABTS radical을 이용하여 ABTS⁺ decolorization assay 방법[17]에 의해 항산화력을 측정하였다. 2.45 mM potassium persulfate와 7 mM 2,2'-azino-bis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)를 혼합한 뒤 실온에서 24시간 동안 반응시켜 라디칼의 생성을 유도한 후 ABTS⁺를 형성시킨다. 이 후 에탄올에 희석한 후 ABTS⁺ 100 μl 에 시료를 100 μl 첨가하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{ABTS}^+ \text{ radical 소거능(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

Tyrosinase 저해활성 측정

미백 활성을 확인하기 위해 tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법[18]에 따라 실험을 진행하였다. pH 6.8인 67 mM sodium phosphate buffer 80 μl 를 이용해 10 mM L-DOPA (Sigma, USA)를 용해한 기질 액 40 μl 와 시료용액 40 μl 의 혼합 용액에 200 U/ml mushroom tyrosinase (Sigma, USA) 40 μl 를 첨가시켜 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 반응시킨다. 그 후 생성된 DOPA chrome을 흡광도 492 nm에서 측정하였으며, tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구과 무첨가

구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

세포주 및 세포 배양

본 실험에 사용된 멜라노마 세포인 B16F10의 배양은 1%의 penicillin/streptomycin (100 U/ml)와 10%의 FBS를 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C의 5% CO₂ incubator에 적응시키며 계대 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

MTT assay에 의한 세포 독성 측정은 Carmichael의 방법 [2]에 따라 실험을 진행하였다. 멜라노마 세포(B16F10)를 96-well plate에 1×10⁵ cells/well로 180 µl씩 분주하였고, 시료를 농도구간 별로 조제하여 20 µl를 첨가한 후 37°C의 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 여기에 MTT 용액을 2.5 mg/ml 농도로 제조 후 40 µl 첨가, 3시간 배양 후 배양액을 제거하고 DMSO 100 µl를 각 well당 가하여 실온에서 10분간 반응시켜 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도 측정을 실시하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가구과 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

Western blot을 통한 단백질 발현 측정

미백인자인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 인자들의 단백질 발현 활성을 알아보기 위해 cell line B16F10을 각각 100 mm tissue culture dish에 1×10⁶ cells/dish로 seeding한 후 24시간 동안 배양하여 안정화시켰다. Cell line B16F10에 추출물을 농도 구간별 처리한 배지로 24시간 배양한 후 PBS로 2회 washing하였다. Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 ml에 complete mini 1 tab을 가한 80 µl로 용해하여 4°C, 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 분리된 상층액은 BCA protein assay kit를 이용하여 정량 후 20 µl의 단백질을 질량의 차이를 이용한 10%의 SDS-PAGE상에서 전기영동 하여 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer 기기를 사용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮기고 skim milk와 TBST를 혼합하여 제조한 5% blocking buffer를 사용해 실온에서 1시간 blocking을 진행하였다. 1차 항체를 희석하여 4°C에서 overnight 한 후, tris-buffered saline and tween 20 (TBST)를 이용해 10분 간격으로 3회 washing한다. 2차 항체를 1:500로 희석하여 실온에서 1시간 30분 반응시킨 후 3회 washing하여 Davinch-ChemiTM Imager CAS-400SM 기기를 이용해 밴드를 확인하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

실험에 사용된 cell line B16F10을 100 mm culture dish에 1×10⁶ cells/dish로 cell을 seeding한 후 24시간 동안 배양하여 추출물을 농도별로 처리 후 24시간 동안 배양하여 안정화시켰다. 배지의 상층액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 dish에 1 ml 씩 분주하여 세포를 lysis 하였고 chloroform을 200 µl 씩 분주하여 20초 동안 위아래로 흔들어 반응시켜주었다. 그 후 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 µl와 1:1로 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 이전과 동일한 조건으로 원심분리 하였고, 상층액 제거 후 75% EtOH-diethylpyrocarbonate (DEPC) water를 각 e-tube에 1 ml씩 분주한 뒤 13,200 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 실온에서 건조시켰다. DEPC water를 50 µl씩 분주하여 녹인 뒤 96-well plate에 멸균수 195 µl와 RNA 5 µl를 총 양이 200 µl가 되도록 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 total RNA양을 측정하였다. Oligo (dT) 15 primer (500 µg/ml) 1 µl, 추출한 RNA 2 µl와 nuclease free water로 10 µl를 맞추고 75°C에서 5분간 반응시킨 뒤 5X reaction buffer, RNasin inhibitor, MgCl₂, PCR nucleotide mix, nuclease free water, reverse transcriptase를 첨가 후 25°C 5분, 42°C 60분, 70°C에서 15분간 반응을 시켜 cDNA를 합성하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

본 실험에 사용된 인자인 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 mRNA 발현 억제율을 알아보기 위하여 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 진행하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 5X green GoTaq flexi buffer, PCR nucleotide mix (10 mM), MgCl₂, primer, nuclease free water, GoTaq DNA polymerase, 합성한 cDNA를 첨가하여 잘 섞어준 후 PCR을 실행하였다. GAPDH는 96°C 2분, 96°C 10초, 64°C 30초, 72°C 1분(40 cycles), TRP-1, TRP-2, MITF는 94°C 30초, 58°C 45초, 72°C 1분(40 cycles), tyrosinase는 94°C 30초, 60°C 45초, 72°C 45초(40 cycles)을 하였다. 그 후 PCR로 합성시켜 10 mg/ml solution의 ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 100 V에서 35분간 전기영동하여 UV transilluminator를 사용하여 밴드를 확인, 분석 정량하였다.

결과 및 고찰

전자공여능 측정 결과

산화능 억제하는 목적으로 사용되는 전자공여능은 인체 내에서 노화 억제 작용으로 이용되어지고 있다[11]. 이에 따라 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)을 사용하여 전자공여능을 측정하였으며, DPPH는 환원되지 않은 상

Table 1. Sequence of the primers used for RT-PCR

Gene	Primer	Sequence (5' → 3')
GAPDH	Sense	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC
	Anti-sense	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC
MITF	Forward	AGC GTG TAT TTT CCC CAC AG
	Reverse	TAG CTC CTT AAT GCG GTC GT
TRP-1	Forward	ACT TCA CTC AAG CCA ACT GC
	Reverse	AGC TTC CCA TCA GAT GTC GT
TRP-2	Forward	GCT CCA AGT GGC TGT AGA CC
	Reverse	AAT GCA GTG GCT TGG AAA TC
Tyrosinase	Forward	GAC GGT CAC TGC ACA CTT TG
	Reverse	GCC ATG ACC AGG ATG AC

태에서는 자줏빛을 띠고 flavonoid 화합물, peptide에 의해 환원되어 자색이 탈색된 후 발색 정도에 따라 효과를 측정하는 원리를 갖고 있으며 환원된 후에는 노란색을 띤다 [1, 3].

이러한 방법으로 분비나무 추출물의 전자공여능을 측정한 결과, Fig. 1과 같이 분비나무 줄기와 잎 추출물 모두 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 증가하였고, 각각 1,000 µg/ml 농도에서 89.4%, 90.9%의 효과를 나타내었다.

ABTS⁺ radical scavenging activity assay 측정 결과

ABTS⁺ radical 소거능은 ABTS diammonium salt와 potassium persulfate의 반응으로 생성되는 양이온인 ABTS free radical (ABTS⁺)이 추출물 내 항산화 물질에 의해 파괴되어 radical의 색이 청록색에서 연한 녹색으로 탈색되는 원리를 갖는 방법이다[13].

분비나무 추출물의 ABTS⁺ radical scavenging activity assay를 측정한 결과, Fig. 2와 같이 나타내었다. 분비나무

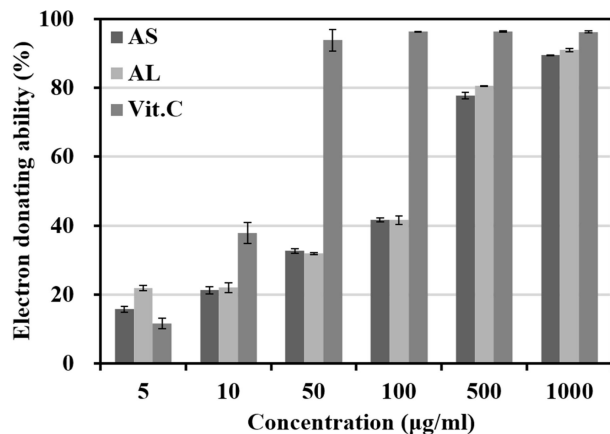


Fig. 1. Electron donating ability of *Abies nephrolepis* MAX. extract. The results were expressed as the average of triplicate samples. ■ AS : *Abies nephrolepis* MAX. Stem, □ AL : *Abies nephrolepis* MAX. Leaf, ■ Vit.C : L-ascorbic acid.

줄기와 잎 추출물은 농도가 증가함에 따라 각각 500 µg/ml에서 88.8%, 96%의 우수한 소거능을 나타내었다.

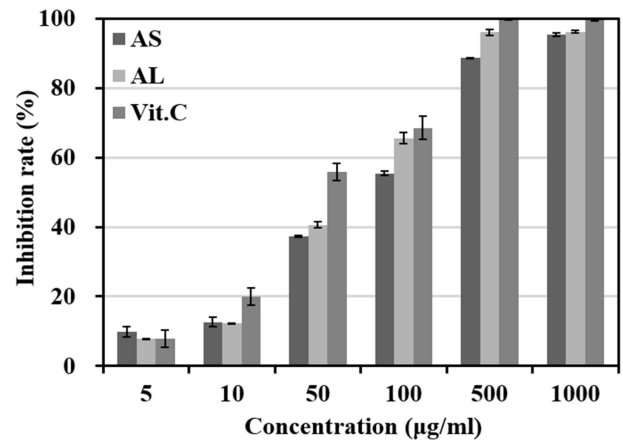


Fig. 2. ABTS⁺ radical scavenging ability of *Abies nephrolepis* MAX. extract. The results were expressed as the average of triplicate samples. ■ AS : *Abies nephrolepis* MAX. Stem, □ AL : *Abies nephrolepis* MAX. Leaf, ■ Vit.C : L-ascorbic acid.

Tyrosinase 저해활성 측정 결과

Tyrosin을 기질로 하여 DOPA와 DOPA quinone을 거쳐 tyrosinase는 melanocyte의 유사분열이 일어나 활성화된다. 그 후 tyrosinase 합성이 촉진되고 melanin이 과생성 되어 피부의 표피 밖으로 배출되면 기미, 주근깨와 같은 색소 침착이 생기게 된다. 이를 방지하기 위하여 피부 미백에 관한 연구가 활발해지고 있으며, 그 중 tyrosinase 저해활성 측정법은 유용한 평가법으로 인정받고 있다[7-9].

분비나무 추출물의 tyrosinase 저해활성 측정 결과, Fig. 3과 같이 나타내었다. 분비나무 줄기와 잎 추출물 모두 농도가 증가함에 따라 억제활성이 증가됨을 확인할 수 있었고, 각각 1,000 µg/ml의 농도에서 48.5%, 31.1%의 저해활성을 나타내었다.

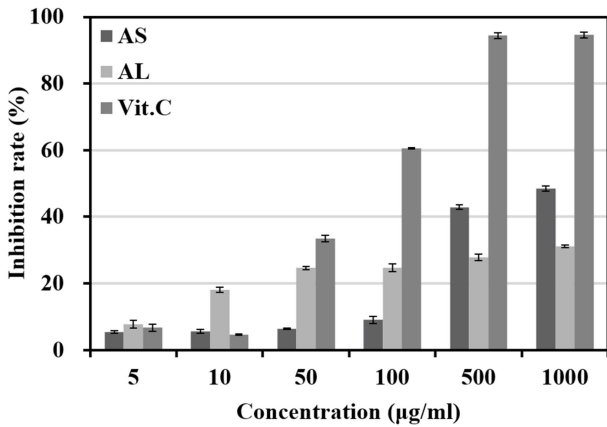


Fig. 3. Inhibition rate of extract from *Abies nephrolepis* MAX. on tyrosinase. The results were expressed as the average of triplicate samples. ■ AS : *Abies nephrolepis* MAX. Stem, □ AL : *Abies nephrolepis* MAX. Leaf, ■ Vit.C : L-ascorbic acid.

MTT assay에 의한 세포독성 측정 결과

분비나무 추출물에 대한 멜라노마 세포인 B16F10에서의 세포 생존율을 MTT assay에 의해 확인한 결과, Fig. 4와 같이 나타내었다. 500 µg/ml의 농도에서 각각 98.3%, 94.4

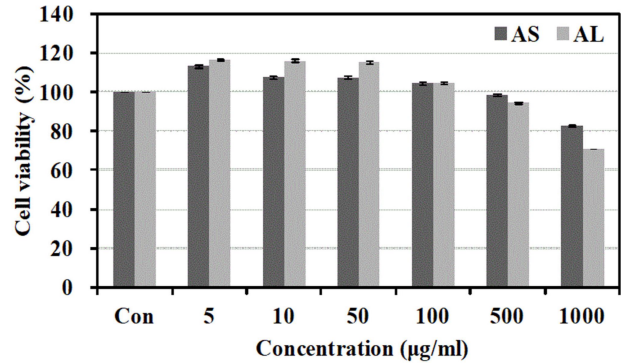


Fig. 4. Cell viability of extract from *Abies nephrolepis* MAX. on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells were incubated for 24 hr in DMEM, the cells were treated with various concentrations of *Abies nephrolepis* MAX. for 24 hr. Result are means ± SD of triplicate data. ■ AS : *Abies nephrolepis* MAX. Stem, □ AL : *Abies nephrolepis* MAX. Leaf.

%의 세포 생존율을 나타내었으며 이에 본 실험에서는 시료용액을 100%에 가까운 세포 생존율이 확인된 25, 50, 100 µg/ml의 농도구간으로 설정하여 실험을 진행하였다.

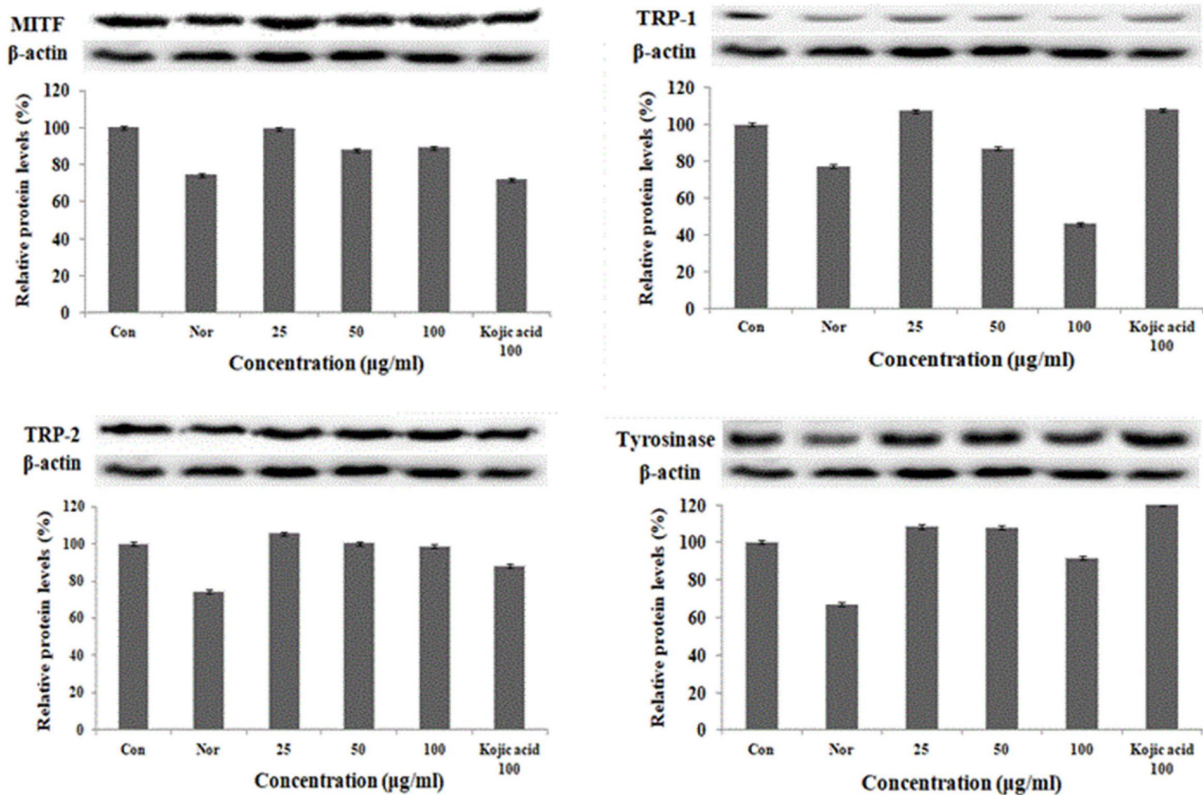


Fig. 5. MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase protein expression rate of extract from *Abies nephrolepis* MAX. Stem on melanoma cell (B16F10). B16F10 cells were incubated for 24 hr in DMEM, were treated with various concentrations of *Abies nephrolepis* MAX. Stem for 24 hr and then total protein was isolated. Con: control, in B16F10 cells treated with α-MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α-MSH. The results were expressed as the average of triplicate samples.

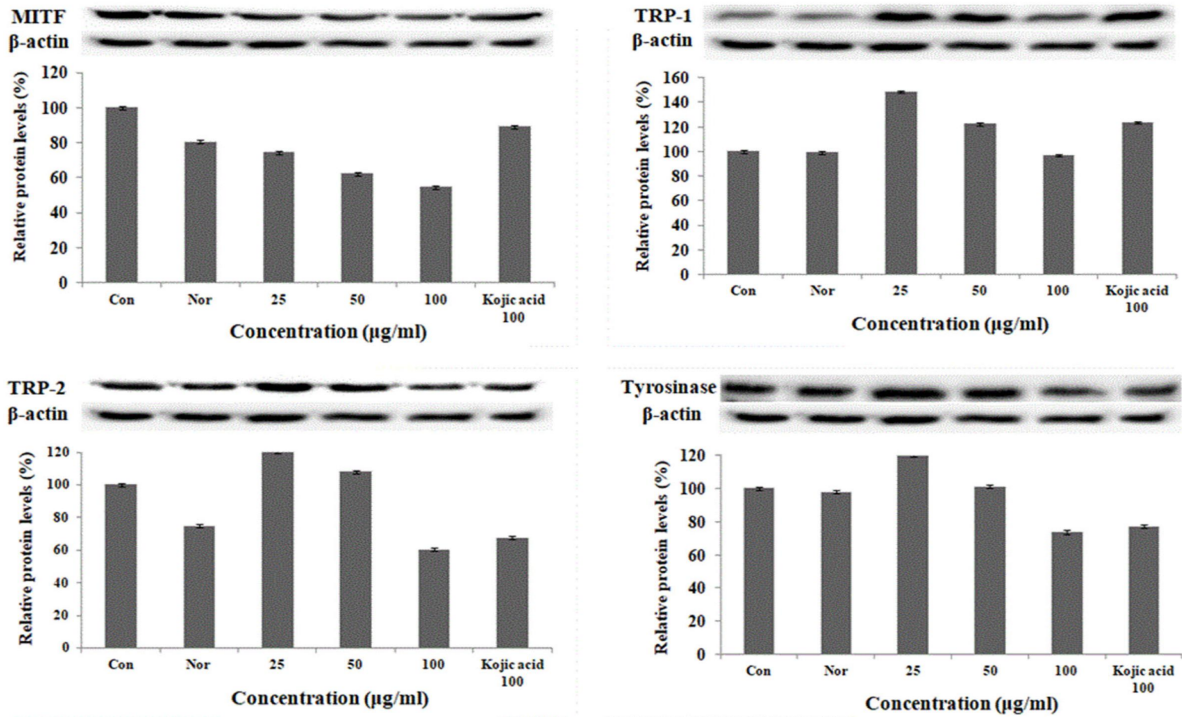


Fig. 6. MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase protein expression rate of extract from *Abies nephrolepis* MAX. Leaf on melanoma cell (B16F10). B16F10 cells were incubated for 24 hr in DMEM, were treated with various concentrations of *Abies nephrolepis* MAX. Leaf for 24 hr and then total protein was isolated. Con: control, in B16F10 cells treated with α -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α -MSH. The results were expressed as the average of triplicate samples.

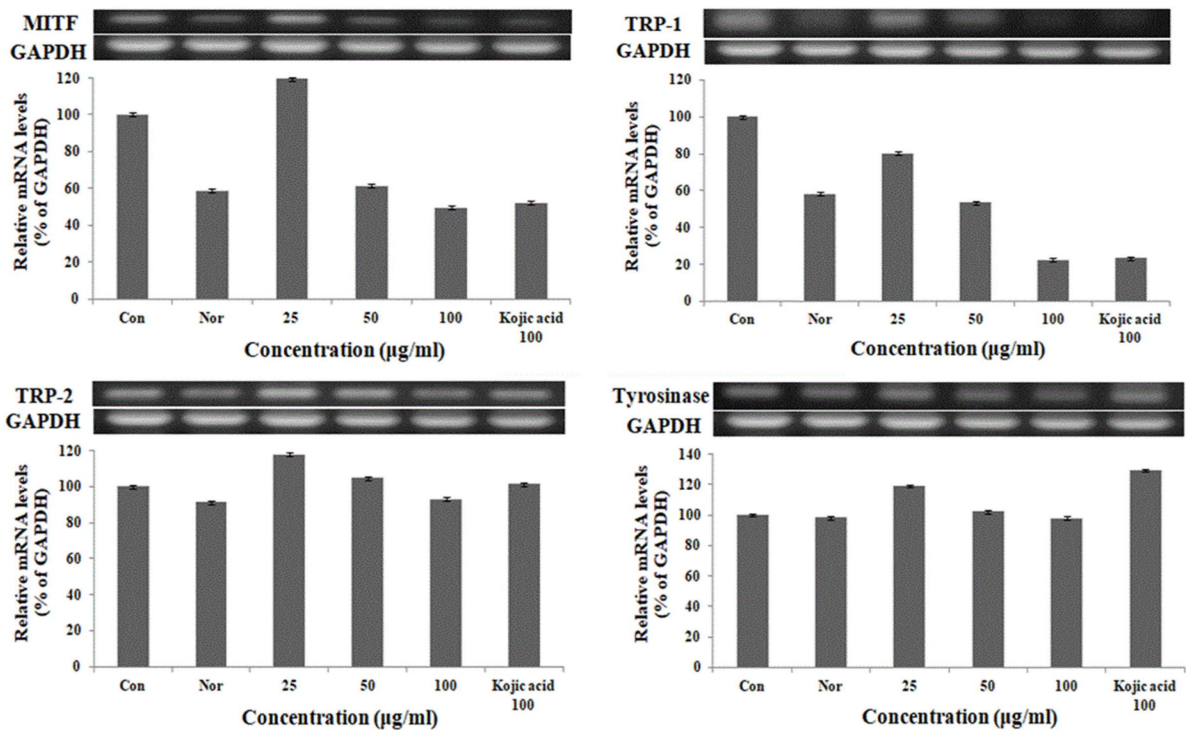


Fig. 7. MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase mRNA expression rate of extract from *Abies nephrolepis* MAX. Stem on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were incubated in DMEM for 24 hr. The cells were treated *Abies nephrolepis* MAX. Stem extract of 25, 50 and 100 µg/ml concentrations for 24 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with α -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α -MSH. The results were expressed as the average of triplicate samples.

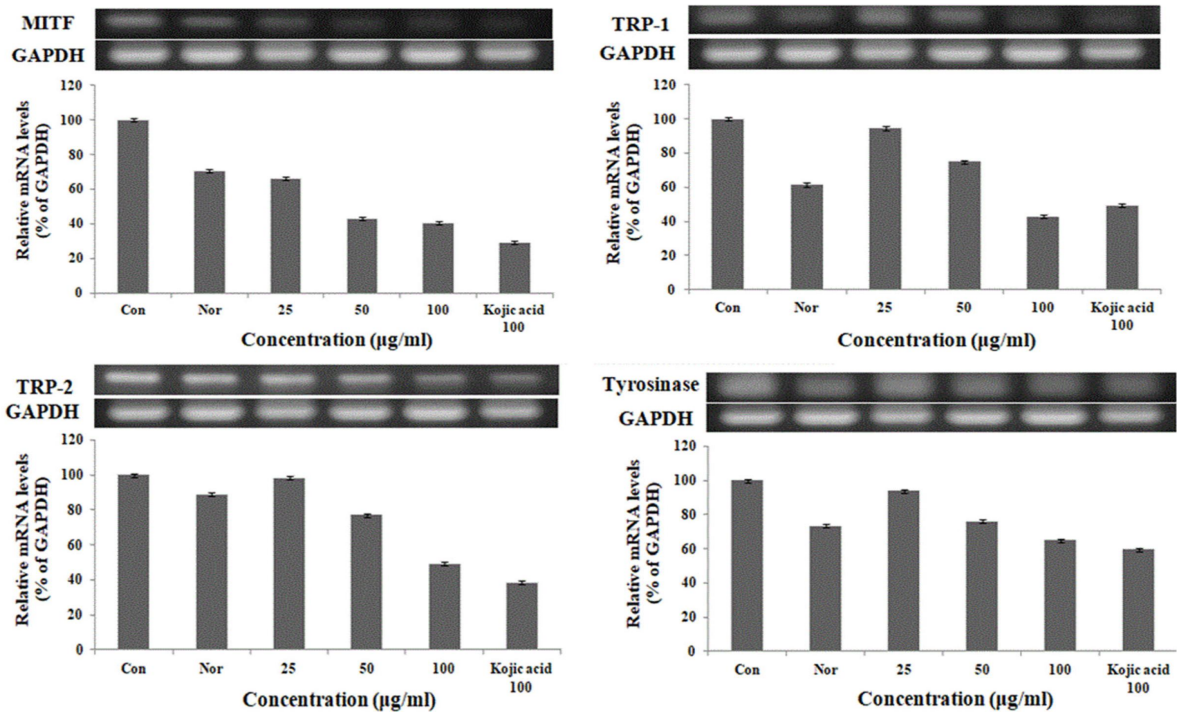


Fig. 8. MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase protein expression rate of extract from *Abies nephrolepis* MAX. Leaf on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells (1×10^6 cells) were incubated in DMEM for 24 hr. The cells were treated *Abies nephrolepis* MAX. Leaf extract of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ concentrations for 24 hr. Con: control, in B16F10 cells treated with α -MSH, Nor: normal, in B16F10 cells not treated with α -MSH. The results were expressed as the average of triplicate samples.

멜라노마 세포(B16F10)에서의 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 단백질 발현에 미치는 영향

분비나무 줄기와 잎 추출물에 대한 미백관련 인자인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 인자의 단백질 발현 억제 효과를 측정하기 위해 Western blot을 진행하였다. 그 결과를 Fig. 5~Fig. 6에 나타내었다. 이때 β -actin이 세포의 다양한 조건에서도 발현의 정도 차이가 매우 적어 house keeping gene인 positive control로 사용하였으며, B16F10 세포에 추출물을 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 처리하였다. MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 단백질 발현은 농도가 증가함에 따라 단백질 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다. 특히 분비나무 줄기 추출물은 TRP-1과 tyrosinase 인자에서, 분비나무 잎 추출물은 MITF의 인자에서 대조군인 kojic acid 보다 단백질 발현 억제가 우수한 것을 확인할 수 있었다.

멜라노마 세포(B16F10)에서 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA 발현에 미치는 영향

분비나무 줄기와 잎 추출물의 미백관련 인자인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 인자의 mRNA 발현 억제 효과를 측정하기 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 이때 GAPDH를 세포의 다양한 조건에서도 발현의 정도 차이가 매우 적은 house keeping gene인 positive control로 사용하였으며, mRNA 발현 억제를 Fig. 7~Fig. 8과 같이 확인하였다.

B16F10 cell에 분비나무 추출물을 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 처리하였다. 그 결과, MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 인자는 추출물의 농도가 높아질수록 mRNA 발현양이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 분비나무 줄기 추출물은 tyrosinase의 인자에서 모든 농도구간이 대조군인 kojic acid 보다 mRNA 발현 억제가 우수한 것을 확인할 수 있었다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1120.
2. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, H. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
3. Choi, C. S., Song, E. S., Kim, J. S. and Kang, M. H. 2003. Antioxidative activities of *Castanea crenata* Flos. methanol extracts. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **35**, 1216-1220.
4. Choi, S. Y., Kim, Y. C. and Chang, B. S. 2011. Inhibitory

- efficacy of black tea water extract on melanogenesis in Melan-a cells and its action mechanisms. *Kor. J. Microscopy* **41**, 169-177.
5. Fitzpatrick, T. B. and Brestnach, A. S. 1963. The epidermal melanin unit system. *Dermatol. Wochenschr.* **147**, 481-489.
 6. Halaban, R., Langdon, R., Birchall, N., Cuono, C., Baird, A., Scott, G., Moellmann, G. and McGuire, J. 1988. Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J. Cell Biol.* **107**, 1611-1619.
 7. Han, H. S., Park, J. H., Choi, H. J., Son, J. H., Kim, Y. H., Kim, S. and Choi, C. 2004. Biochemical analysis and physiological activity of perilla leaves. *J. Kor. Soc. Food Cult.* **19**, 94-105.
 8. Imokawa, G. and Mishima, Y. 1980. Isolation and characterization of tyrosinase inhibitors and their differential action on melanogenic subcellular compartments in amelanotic and melanomas. *Br. J. Dermatol.* **103**, 625-634.
 9. Imokawa, G. and Mishima, Y. 1981. Biochemical characterization of tyrosinase inhibitors using tyrosinase binding affinity chromatography. *Br. J. Dermatol.* **104**, 531-539.
 10. Jeong, Y. J. 2011. Kinetic Analysis on Tyrosinase Inhibition Activity of Whitening Agents. Master's Thesis Dissertation, *Soongsil Univ.* Seoul, Korea.
 11. Kang, Y. H., Park, Y. K. and Lee, G. D. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Kor. J. food Sci. Technol.* **28**, 232-239.
 12. Kim, E. H. 2006. A study of whitening cosmetics from natural products. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **4**, 195-204.
 13. Kim, Y. E., Yang, J. W., Lee, C. H. and Kwon, E. K. 2009. ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of *Tricholoma matsutake* sing. (Pine Mushroom). *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 555-560.
 14. Lee, J. Y., Im, K. R., Jung, T. K. and Yoon, K. S. 2013. The Inhibitory Effects of *Alnus Japonica* Steud. Extract on Melanogenesis. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **39**, 159-166.
 15. Park, H. C., Lee, J. H., Lee, G. G. and Um, G. J. 2015. Environmental features of the distribution areas and climate sensitivity assesment of Korean Fir and Khinghan Fir. *J. EIA.* **24**, 260-277.
 16. Parvze, S., Kang, M., Chung, W. S., Cho, C., Hong, M. C., Shin, M. K. and Bae, H. 2006. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother. Res.* **20**, 921-934.
 17. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
 18. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. 1987. Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. *Planta Med.* **53**, 515-517.

초록 : 미백활성을 가진 분비나무(*Abies nephrolepis* MAX.) 추출물의 화장품 소재로써 연구

오민정¹ · 엄현지¹ · 채정우² · 이진영^{1*}

(¹호서대학교 화장품생명공학부, ²경기도산림환경연구소)

본 연구에서는 분비나무의 생리활성 및 미백 활성을 검증하여 화장품 소재로써의 가능성을 검증하였다. 분비나무 추출물의 항산화 효과를 확인하기 위해 전자공여능을 측정된 결과, 분비나무 줄기와 잎 추출물 모두 농도 의존적으로 활성이 증가하여 각각 1,000 µg/ml 농도에서 89.4%, 90.9%의 높은 전자공여능을 나타내었다. ABTS⁺ radical scavenging activity assay 측정 결과, 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하였으며, 두 추출물 모두 1,000 µg/ml에서 약 90% 이상의 활성을 나타내었다. 미백 효과를 알아보기 위해 tyrosinase 저해 활성을 측정된 결과, 분비나무 줄기와 잎 추출물은 1,000 µg/ml에서 각각 48.5%, 31.1%의 저해율을 나타냈으며 농도가 증가함에 따라 저해활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. MTT assay를 통해 세포 생존율을 확인한 결과, 멜라노마 세포(B16F10)에서 농도구간이 500 µg/ml 일 때 분비나무 줄기와 잎 추출물은 98.3%, 94.4%의 생존율을 나타내었다. 이에 따라 세포 관련 실험을 세포의 생존율이 100%에 가까운 25, 50, 100 µg/ml 농도로 진행하였다. B16F10 세포에 분비나무 추출물을 처리하여 단백질 발현을 측정된 결과, 분비나무 줄기 추출물은 TRP-1과 tyrosinase, 분비나무 잎 추출물은 MITF의 인자에서 대조군인 kojic acid 보다 단백질 발현 억제가 우수한 것을 확인할 수 있었다. B16F10 세포에 분비나무 추출물을 처리하여 mRNA 발현을 측정된 결과, 농도가 높아질수록 mRNA 발현량이 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 분비나무 줄기 추출물은 tyrosinase의 인자에서 모든 농도구간이 대조군인 kojic acid 보다 mRNA 발현 억제가 우수한 것을 확인할 수 있었다. 이에 따라 분비나무 추출물의 우수한 미백활성을 확인하였고, 기능성 활성이 우수하여 화장품 천연물 및 기능성 소재로써의 응용가능성을 확인할 수 있었다.