여정자 헥산추출물의 멜라닌합성 억제효과

김대성[1] · 한규수[1] · 전병국[1] · 우원홍[1,2] · 문연자[3,4]*

1 : 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 2 : 한국전통의학연구소, 3 : 한의과대학 해부학교실, 4 : 환경과학연구소

Inhibitory Effect of *Fructus Ligustri Lucidi* Hexane Extract on Melanin Biosynthesis

Dae Sung Kim[1], Gyu Su Han[1], Byoung Kook Jeon[1], Won Hong Woo[1,2], Yeun Ja Mun[3,4]*

1 : Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, 2 : Research Center of Traditional Korean Medicine, 3 : Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, 4 : Institute of Environmental Science

The purpose of this study was to investigate the effects of *Fructus Ligustri Lucidi* (FLL) on the process of melanogenesis. Cell viability of B16F10 cells was measured by MTT assay and melanin content was assessed using the method of Hosoi with some modifications. Methanol extract of *Fructus Ligustri Lucidi* (MFLL) significantly inhibited melanin synthesis in a concentration-dependent manner, and it reduced the activity of tyrosinase, the rate-limiting melanogenic enzyme. Additionally, α-melanocyte stimulation hormone (α-MSH)-induced hyperpigmentation was down-regulated by MFLL. MFLL was fractionated by organic solvent. In the present study, Hexane extract of *Fructus Ligustri Lucidi* (HFLL) inhibited tyrosinase activity and melanin production of B16F10 cells in the absence or presence of α-MSH. Ethyl acetate, butanol and water layers did not affect tyrosinase activity and melanin production. Meanwhile ethyl acetate, butanol and water layers showed DPPH free radical scavenging activity. These results suggest that extract of FLL could be used as functional biomaterial in developing a skin whitening agent having the antioxidant activity.

Key words : *Fructus Ligustri Lucidi*, melanin, tyrosinase, depigmentation, α-MSH

서 론

태양에 노출된 멜라닌세포는 멜라닌 합성이 촉진되며, 합성된 멜라닌은 자외선을 차단하여 피부를 보호하는 이로운 작용을 하기도 하지만 과도한 멜라닌의 생성이나 분포 이상은 기미, 주근깨 및 피부반점을 형성하고 피부노화 및 피부암을 유발하는 것으로 알려져 있다[1-3]. 사람의 생체 내에서 필요한 에너지를 공급하기 위해 끊임없이 일어나는 생화학적 반응으로 인해 발생하는 활성산소는 세포의 구성성분을 비가역적으로 파괴한다고 알려져 있을 뿐만 아니라 노화나 암, 심혈관계 및 신경계 질환을 일으키는 것으로 알려져 있다[4,5].

멜라닌은 멜라닌 싹세포(melanoblasts)가 분화된 이후 멜라닌세포에서 일어나는 복잡한 과정을 통해 생성된다[6]. 멜라닌 생성은 tyrosine hydroxylase 활성과 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA) oxidase 활성을 갖고 있는 tyrosinase에 의해 아미노산의 일종인 tyrosine이 dopaquinone으로 전환되는 두 가지 다른 반응에 의해 시작된다[7,8]. Dopaquinone은 티올 그룹(thiol group) 존재 하에서 dopachrome으로 전환되며, tyrosinase related protein(TRP)-2는 dopachrome을 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid로 변환시킨다. 또한 TRP-1은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid를 indole-5,6-quinone-2- carboxylic acid로 전환시킨다[9,10]. 멜라닌 합성을 조절하기 위한 목적으로 멜라닌 합성초기에 작용하는 tyrosinase를 조절할 수 있는 물질에 대한 많은 연구가 진행되고 있으며[11-13], 최근에는 독성과 자극이 없고 전통적으로 사용되던 천연물을 이용한 멜라닌 합성 조절 물질의 개발에 많은 관심이 집중되고 있다.

본 실험에 사용된 여정자(*Fructus Ligustri Lucidi*)는 물푸레나무과(Oleaceae)에 속하는 광나무(Ligustrum japonjcum) 및 당

* 교신저자 : 문연자, 익산시 신용동 원광대학교 한의과대학 해부학교실

· E-mail : yjmun@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6942

· 접수 : 2010/07/26 · 수정 : 2010/08/06 · 채택 : 2010/08/09

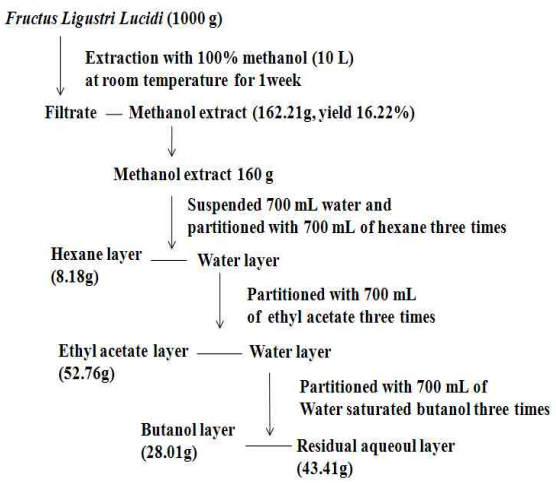
광나무(Ligustrum lucidum)의 익은 열매를 말린 것으로 주요성분으로는 올레아놀산, 아세트올레아놀산, 울손, 만니톨, 포도당, d-mannite, oleic acid, linoleic acid 등이 있다. 맛은 쓰고 달며 성질은 평(平)하고 간(肝), 신(腎) 이경(二經)에 작용한다. 또한 자음(滋陰), 보간익신(補肝益腎), 청열명목(淸熱明目) 등의 효능이 있어 골증로열(骨蒸勞熱), 요슬산연(腰膝酸軟), 수발조백(鬚髮早白), 두운(頭暈), 이명(耳鳴), 목혼(目昏)등의 병증을 치료한다 하였다[14].

본 실험에서 여정자 메탄올추출물은 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성을 억제하였다. 이러한 효과가 어떤 물질에 의해 나타나는 것인지 알아보기 위한 일환으로 용매별 분획을 실시하여 tyrosinase 활성 및 멜라닌 합성 조절과 과색소침착시 미치는 영향 조사한 결과 여정자 헥산추출물이 B16F10 세포의 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성을 억제하였다. 또한 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물은 항산화 작용이 있는 것으로 나타났다.

재료 및 방법

1. 시료 추출

건조된 여정자 1,000 g에 100% 메탄올 10 ℓ를 가하여 7일 동안 실온에서 추출한 것을 거즈로 여과하고 감압 농축 하여 162.21 g(수율 16.22%)의 시료를 얻었다. 추출물 중 160 g을 물 700 ㎖에 녹인 다음 헥산(hexane) 층을 분리하는 과정을 3회 반복하였다. 얻어진 헥산 층을 합하여 감압 농축하여 헥산 추출물 8.18 g을 얻었다. 남은 수용액에 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 부탄올(n-butanol)을 넣고 동일한 방법으로 추출하였으며 감암 농축 후 동결건조 하였다. 각각 추출물은 에틸아세테이트 52.76 g, 부탄올 28.01 g을 얻었다. 물 분획물은 43.41 g을 얻었다. 용매별 분획 과정은 scheme 1에 나타내었다.



Scheme 1. Scheme of the organic solvent fractionation of *Fructus Ligustri Lucidi*.

2. 세포 생존율 측정

세포생존율 측정은 Mosmann의 방법[15]에 의하여 실시하였다. 24-well 배양 용기에 B16F10 세포를 5×10^3 개씩 분주하고 24시간 배양 후 여정자 추출물을 여러 농도로 처리한 다음 37℃, 5% CO_2 하에서 3일간 배양하였다. 배양 후 0.05 ㎎/㎖ MTT 용액을 넣어 3시간 배양한 다음 상층액을 제거하고, 형성된 formazan을 DMSO(1 ㎖)로 녹여서 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. Tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 등의 방법[16]으로 측정하였다. 6-well 배양용기에 B16F10 세포를 8×10^4 개씩 분주하여 24시간 배양한 후, 여정자 추출물을 처리하고 1시간 후 α-MSH(10 nM)를 처리하였다. 3일간 배양 후 PBS로 2회 세척하고, 5 mM EDTA가 포함된 0.1 M sodium phosphate buffer(SPB, pH 6.8) 1 ㎖에 1%(V/V) triton X-100과 0.1%(V/V) 0.1 M PMSF를 혼합한 lysis buffer를 200 ㎕씩 분주하고 세포를 수거하여 얼음에서 30분간 용해시킨 다음 4℃, 15,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford 시약으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 동량의 단백질 양을 계산하였으며, 계산된 단백질과 0.1 M SPB(pH 6.8)의 총량이 150 ㎕가 되도록 분주 하고 0.1%(W/V) L-DOPA를 50 ㎕씩 분주하여 37℃에서 1시간 반응시켰으며, 30분 간격으로 405 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

4. 멜라닌 합성양의 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등의 방법[17]을 변형하여 사용하였다. 직경 6 ㎝ 배양용기에 1.5×10^5 개씩 분주하여 24시간 배양한 후, 여정자 추출물을 처리하고 1시간 후 α-MSH(10 nM)를 처리한 다음 3일간 배양 하였으며, 각 군당 2×10^6 개씩 수거하여 lysis buffer(5 mM EDTA, 0.1 M SPB(pH 6.8), 0.1% triton X-100)로 세포를 용해하였다. 원심분리 하여 얻은 세포 침전물은 알코올로 세척한 후 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액으로 90℃에서 1시간 용해하여 405 nm로 흡광도를 측정하였다.

5. DPPH 라디칼 소거능

활성산소 소거능은 Blosis 방법[18]에 의한 DPPH 라디칼 소거법으로 측정하였다. 즉, 여정자 추출물을 메탄올에 녹여 준비하고, 메탄올에 녹인 0.3 mM DPPH 용액을 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 통계처리

실험 결과는 student's t-test를 이용하여 p-value를 구하였으며, $p<0.05$인 경우 *로 표기하였고 $p<0.01$인 경우 **(##)로 표기하여 유의성을 나타내었다.

결 과

1. 여정자 메탄올추출물의 미백효능

1) 세포증식에 미치는 영향

B16F10 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 여정자 메탄올추출물(Methanol extract of *Fructus Ligustri Lucidi*; MFLL)을 12.5~200 ㎍/㎖의 농도로 처리하고, 3일간 배양하여 MTT assay를 실시하였다. 대조군을 100 ± 5.7%로 했을 때 12.5, 25, 50, 100, 200 ㎍/㎖에서 각각의 생존율은 95 ± 0.6%, 105 ± 8.6%, 102 ± 9.7%, 82 ± 0.8%, 57 ± 2.0%로 측정되었다(Fig. 1). 여정자 메탄올추출물 100 ㎍/㎖까지는 세포독성이 크지 않았지만 200 ㎍/㎖에서는 세포독성이 현저하게 증가하였다.

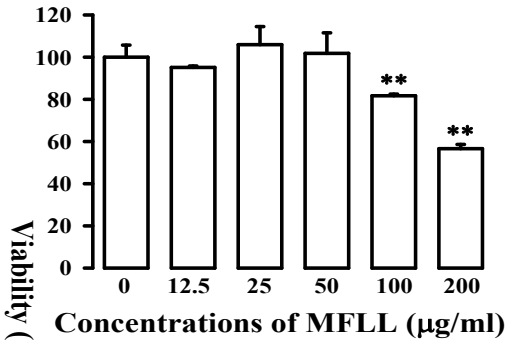


Fig. 1. Effect of methanol extract of *Fructus Ligustri Lucidi* (MFLL) on the cell viability in B16F10. Cells were plated at 5×10^3 cells/well and incubated in media containing from 12.5 to 200 ㎍/㎖ of MFLL for 72 hours. Cell viabilities were measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are means ± S.D. of three experiments performed in triplicate.

2) Tyrosinase 활성 억제 효과

멜라닌합성은 tyrosine을 DOPA로 전환 시키는 tyrosine hydroxylase와 DOPA를 DOPAquinone으로 전환시키는 DOPA oxidase로서 처음 두 단계의 반응을 촉매 하는 tyrosinase의 작용에 의해 시작된다. 기본적인 조건에서 배양된 B16F10 세포에 여정자 메탄올추출물을 50, 100 ㎍/㎖로 처리하고 3일간 배양한 후 tyrosinase 활성도를 측정하였다. 대조군 100 ± 3.9%와 비교하여 여정자 메탄올추출물 처리군은 각각 50 ㎍/㎖에서 84.6 ± 1.6%, 그리고 100 ㎍/㎖에서 62.6 ± 13.5%로 tyrosinase 활성이 현저하게 감소하였다(Fig. 2A). 또한 세포내 cAMP 경로를 활성화 시켜 tyrosinase 활성을 증가시키는 것으로 알려진 α-MSH를 처리하고 여정자 메탄올추출물이 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 실험 결과 α-MSH와 여정자 메탄올추출물 50 ㎍/㎖을 병용 처리한 군에서는 유의성이 나타나지 않았지만 100 ㎍/㎖을 병용 처리한 군에서는 α-MSH 단독 처리군(318.1 ± 47.1%)보다 tyrosinase 활성이 현저하게 감소한 194.1 ± 13.7%로 나타났다(Fig. 2A).

3) 멜라닌생성에 미치는 영향

여정자 메탄올추출물 50, 100 ㎍/㎖씩 처리하여 3일 동안 배양하고, 각 군당 2×10^6 개의 세포를 수집한 다음 멜라닌 합성양을 측정하였다. 실험 결과 대조군의 100 ± 11.7%와 비교하여 여정자 메탄올추출물을 처리한 경우 50 ㎍/㎖에서 86.9 ± 6.5%, 그리고 100 ㎍/㎖에서는 66.0 ± 4.9%로 멜라닌 양이 감소하였다. 또한 여정자 메탄올추출물 50, 100 ㎍/㎖과 α-MSH을 병용 처리하여 멜라닌 양을 측정한 결과 α-MSH 단일처리군은 348.0 ± 18.2%로 대조군에 비해 약 3.5배 증가하였고, α-MSH와 여정자 메탄올추출물 50, 100 ㎍/㎖를 병용처리한 군은 각각 281.7 ± 11.4%, 141.2 ± 13.7%로 현저하게 감소하였다(Fig. 2B).

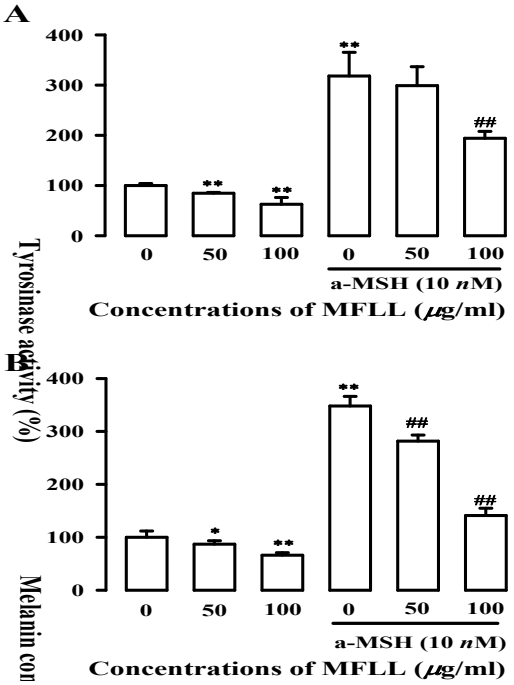


Fig. 2. MFLL inhibits basal and cAMP-induced tyrosinase activity (A) and Melanin synthesis (B) of B16F10 cells. B16F10 cells were incubated for 72 h with different concentrations MFLL plus 10 nM α-MSH or left untreated. Each determination was made in triplicate; the data represent means ± S.D. *P<0.05, **P<0.01 compared with the control and ##P<0.01 compared with only α-MSH.

2. 여정자 분획물의 미백효능

앞선 실험을 통해 여정자 메탄올추출물이 뛰어난 미백효능이 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 미백 효능을 유도하는 물질을 분리하기 위한 일환으로 용매별 분획을 실시하여 효능을 측정하였다.

1) 여정자 분획물이 세포증식에 미치는 영향

각각의 여정자 분획물이 B16F10 세포증식에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다. 여정자 헥산추출물(Hexane extract of *Fructus Ligustri Lucidi*; HFLL), 부탄올추출물(Butanol extract of *Fructus Ligustri Lucidi*; BFLL), 물추출물(water extract of *Fructus Ligustri Lucidi*; WFLL)은 12.5에서 50 ㎍/㎖까지, 에틸아세테이트추출물(Ethyl acetate extract of *Fructus Ligustri Lucidi*; EFLL)은 10에서 50 ㎍/㎖까지 처리하고 3일간 배양하였다. 세포생존율은 MTT를 처리하여 570 nm로 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었다(Fig. 3A, C, D). 여정자 헥산추출물, 부탄올추출물과 물추출물은 B16F10 세포독성이 없는 것으로 나타났다. 그러나 에틸아세테이트추출물은 10 ㎍/㎖에서 93.1 ± 6.9%, 12.5 ㎍/㎖에서 87.0 ± 4.2, 25 ㎍/㎖에서 41.0 ± 11.5%, 50 ㎍/㎖에서 17.7 ± 3.6%로 농도의존적인 세포독성을 보였다(Fig. 3B).

2) 여정자 분획물이 tyrosinase 활성에 미치는 영향

여정자 분획물들이 tyrosinase 활성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위하여, 각각의 분획물들을 농도별로 처리하고 3일

동안 배양한 세포를 용해시켜 tyrosinase 활성을 측정하였다. 실험 결과 여정자 헥산추출물은 대조군 100 ± 4.2%에 비해 25 ㎍/㎖에서 73.8 ± 3.7%, 50 ㎍/㎖에서 48.1 ± 2.6%로 tyrosinase 활성을 현저하게 억제시켰다. 반면 에틸아세테이트추출물, 부탄올추출물, 물추출물을 처리한 경우 tyrosinase 활성의 변화는 없었다.

cAMP 경로를 자극하는 α-MSH를 단독으로 처리했을 때 대조군 보다 108.5%증가한 208.5 ± 3.3%로 tyrosinase 활성이 증가하였다. 그러나 여정자 헥산추출물을 함께 처리하였을 때 25 ㎍/㎖에서 186.3 ± 1.7%, 50 ㎍/㎖에서 124.1 ± 5.7%로 유의성 있는 억제효과를 나타내었다. 또한 에틸아세테이트추출물을 처리한 경우 tyrosinase 활성이 α-MSH 단독 처리군의 352.9 ± 14.4%에 비해 10 ㎍/㎖에서 24.9% 감소한 328 ± 13.7%, 12.5 ㎍/㎖에서 39.5% 감소한 313.4 ± 6.2%로 측정되었으나 억제효과가 크지 않았다. 부탄올추출물, 물추출물은 tyrosinase 활성을 억제시키지 못하였다(Fig. 4A-D).

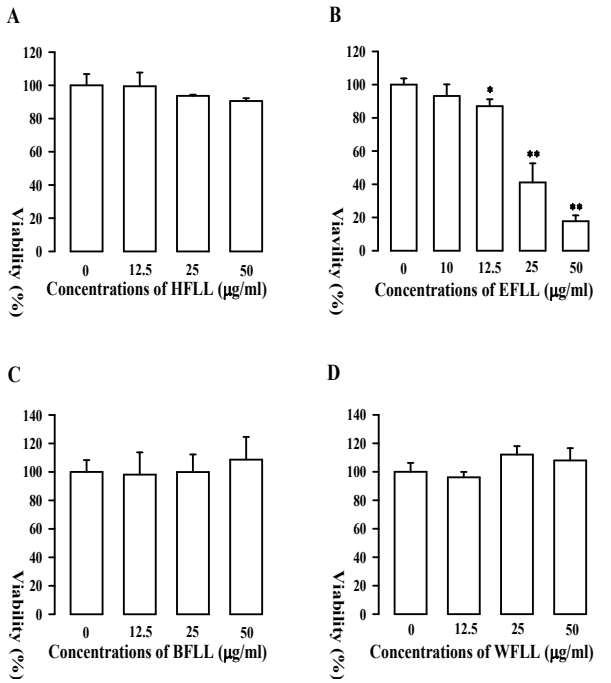


Fig. 3. Effects of Hexane fraction of *Fructus Ligustri Lucidi* (HFLL) (A), EtOAc fraction of *Fructus Ligustri Lucidi* (EFLL) (B), BuOH fraction of *Fructus Ligustri Lucidi* (BFLL) (C), and Water fraction of *Fructus Ligustri Lucidi* (WFLL) (D) on the cell viability. Cells were plated at 5×10^3 cells/well and incubated in media containing from all fractions for 72 hours. Cell viabilities were measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are means ± S.D. of three experiments performed in triplicate. *P<0.05 and **P<0.01 compared with the control.

3) 여정자 분획물이 멜라닌 생성에 미치는 영향

멜라닌 합성 초기단계에서 중요한 역할을 하는 tyrosinase 활성은 여정자 헥산추출물에 의해 효과적으로 억제되었다. 따라서 tyrosinase에 의해 촉매 되는 반응의 최종 산물인 멜라닌의 양을 측정하고자 하였다. B16F10 세포에 여정자 헥산추출물과 에틸아세테이트, 부탄올, 물 추출물을 각각 농도별로 처리하고 3일 동안 배양하였다. 배양된 세포로부터 멜라닌 함량을 측정한 결과 여정자 헥산추출물은 대조군 100 ± 3.8% 보다 25 ㎍/㎖에서 82.4 ± 9.0%, 50 ㎍/㎖에서 68.3 ± 1.6%로 멜라닌 합성 양을 감소시켰다(Fig. 5A). 또한 에틸아세테이트, 부탄올 추출물 처리군은 멜라닌 합성이 감소되었으나 유의성이 없었다. 반면에 물추출물 처리군은 멜라닌 합성을 증가시켰으나 유의성은 없었다(Fig. 5B-D).

α-MSH 10 nM 과 여정자 헥산, 부탄올, 물 추출물 25, 50 ㎍/㎖ 그리고 여정자 에틸아세테이트추출물 10, 12.5 ㎍/㎖을 병용처리하고 3일 동안 배양한 후 2×10^6 개의 세포를 수거하여 세포내 멜라닌 함량을 측정하였다. α-MSH 단독 처리군은 대조군에 비해 231.8 ± 16.5%로 멜라닌 합성 양이 증가한 반면 여정자 헥산추출물을 함께 처리한 경우 25 ㎍/㎖에서 203.7 ± 5.0%, 50 ㎍/㎖에서 121.7 ± 6.3%로 현저하게 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 5A). 다른 분획물인 에틸아세테이트, 부탄올 추출물은 α-MSH로 증가된 멜라닌 합성을 감소시키지 못하였으며, 물추출물은 50 ㎍/㎖에서 α-MSH 단독 처리군 보다 약간 증가시켰지만 유의성은 없었다(Fig. 5B-D).

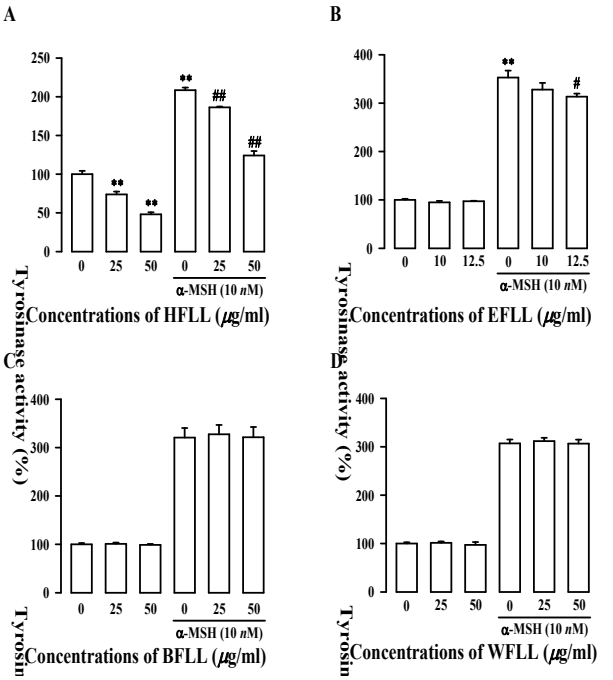


Fig. 4. Effect of HFLL (A), EFLL (B), BFLL (C), and WFLL (D) on the tyrosinase activity in the absence or presence of α-MSH. The effect on tyrosinase activity was tested with several concentrations of all fractions plus α-MSH or left untreated for 3 days. Results are expressed as percent of control. Each column represents the means ± S.D. of triplicate determinations. **P<0.01 compared with the control and #P<0.05, ##P<0.01 compared with only α-MSH.

3. 여정자 분획물의 DPPH 라디칼 소거능

체내의 산화 반응은 활성 산소에 의한 것이며 자유 라디칼의 자동 산화 반응에 의해 진행되고, 수소를 받음으로써 반응이 종결된다. 그러므로 항산화제는 자동 산화반응에서 수소를 주는 능력 즉 환원력이 큰 물질이다. DPPH는 항산화 물질의 환원력을 측정하는데 가장 널리 쓰이는 것이다. 따라서 여정자 분획물의 항산화 효과는 DPPH 라디칼 소거능을 사용하여 평가하였다.

실험 결과 여정자 헥산추출물은 DPPH 라디칼 소거능이 나타나지 않았다. 반면에 에틸아세테이트추출물은 200 ㎍/㎖에서 53.2 ± 6.8%, 부탄올추출물은 100 ㎍/㎖에서 56.3 ± 6.3%, 물추출물은 400 ㎍/㎖에서 62.8 ± 2.3%의 DPPH 라디칼 소거 활성을 보였다 (Fig. 6).

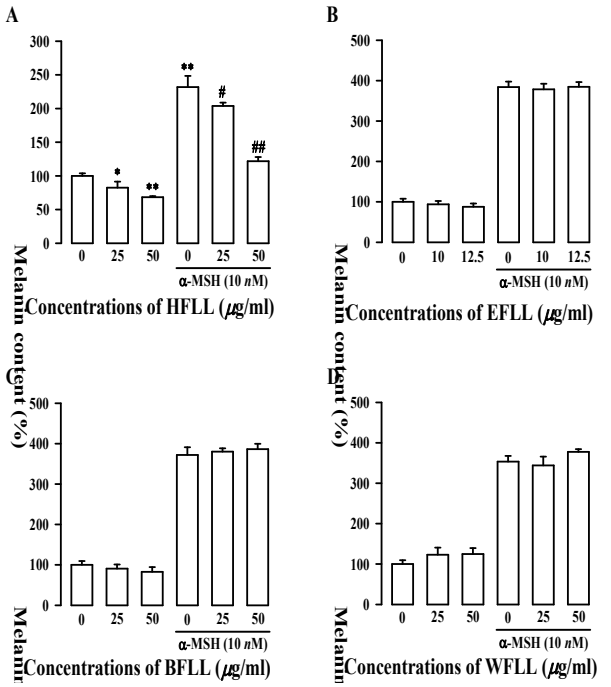


Fig. 5. Effect of HFLL (A), EFLL (B), BFLL (C), and WFLL (D) on the Melanin synthesis in the absence or presence of α-MSH. The effect on Melanin content was tested with several concentrations of all fractions plus α-MSH or left untreated for 3 days. Results are expressed as percent of control. Each column represents the means ± S.D. of triplicate determinations. **P<0.01, **P<0.01 compared with the control and #P<0.05, ##P<0.01 compared with only α-MSH.

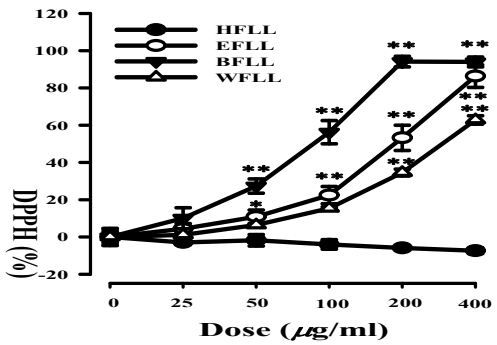


Fig. 6. DPPH radical scavenging activity of solvent fractions of FLL. The values are expressed as optical density and each column represents the mean ± S.D. of at least three experiments performed in triplicate. *P<0.05 and **P<0.01 compared with control. HFLL: Hexane fraction, EFLL: EtOAC fraction, BFLL: BuOH fraction, WFLL: H_2O fraction.

고 찰

멜라닌의 과잉 생산은 기미, 주근깨 등을 형성하고, 피부노화를 촉진하며 피부암 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 부정적인 작용을 예방하거나 치료하려는 목적으로 tyrosinase 활성 억제에 효과가 있는 미백제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 기존의 몇 가지 멜라닌 합성 억제제가 활성 및 안전성에 문제점을 가지고 있는 것으로 밝혀지면서 환경 친화적이고 피부 안정성이 우수한 한방화장품의 개발이 활발해지고 있다. 현재까지 천연물에서 분리된 멜라닌 생성 억제 물질로는 감초에서 분리된 formononectin, glabrene, glabridin, glabrol, 누룩곰팡이(Aspergillus oryzae)의 이차대사산물인 kojic acid, 우바우르시엽(Uvae Ursi Folium)의 arbutin 상백피의 oxyresveratrol, dihydromoriin, artocarbene, 4-prenyloxyresveratrol 등이 알려져 있다[19-22]. 그 외에도 더덕[23], 천화분[24], 백출[25], 사삼[26], 인진쑥[27], 교맥[28] 등의 식물추출물이 멜라닌 합성 억제효능이 있다고 보고되었다.

본 실험에 사용된 여정자의 주요성분은 올레아놀산, 아세트올레아놀산, 울손, 만니톨, 포도당, d-mannite, oleic acid, linoleic acid 등이 있다. 올레아놀산 성분은 간 보호 작용, 강심 이뇨작용을 일정하게 나타내고 화학요법이나 방사선 치료를 한 후에 적어진 백혈구수를 늘이는 작용을 나타낸다. 여정자에 대한 연구로는 여정자 물추출물이 대식세포에서 TNF-α의 분비를 유도하여 NO의 생성을 증가시킨다고 하였다[29]. 또한 여정자는 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 항산화 활성에서 비타민 C, E와 합성항산화제인 butylated hydroxytoluene(BHT)와 유사한 수준으로 나타났다고 하였으며, 혈관운동성에 미치는 영향에 대한 실험 결과 혈관이완효과가 있다고 보고되었다[30]. 여정자 에탄올추출물은 mesenchymal stem cell의 osteogenic differentiation을 강화시켜 골형성을 자극한다고 하였다[31].

본 연구에서는 여정자 메탄올추출물이 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하였다. 여정자 메탄올추출물은 B16F10 세포에서 tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 억제하였으며, 멜라닌 합성 양 또한 현저하게 억제시켰다. 게다가 α-MSH로 유도된 과색소침착시 증가된 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성 또한 유의성 있게 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 미백효과를 나타내는 물질을 알아보기 위한 일환으로 용매별 분획을 실시하였다.

각각의 분획물들이 B16F10 세포 분화에 어떠한 영향을 미치는지 조사한 결과 헥산추출물과 부탄올, 물 추출물은 세포독성이 없는 것으로 나타났으며, 에틸아세테이트 추출물은 농도의존적인 세포독성을 나타내었다. 또한 각각의 분획물들이 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 여정자 헥산추출물은 농도 의존적으로 세포내 tyrosinase 활성을 억제하였으며, 멜라닌 생성 또한 현저하게 감소시켰다. 그러나 에틸아세테이트, 부탄올, 물 추출물은 tyrosinase 활성이나 멜라닌 생성에 일부 영향을 주었지만 유의성은 없었다. 과색소침착시 여정자 분획물이 미치는 영향을 알아보고자 α-MSH로 자극하여 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성을 조사한 결과 여정자 헥산추출물은 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성을 강력하게 억제하였다. 반면 다른 분획물인 에틸아세테이트, 부탄올, 물 추출물에서는 유의성 있는 억제효과가 나타나지 않았다.

최근 들어 인간의 수명이 증가함에 따라 노화 및 각종 퇴행성 질환과 심혈관계 질환 등의 질병에 대한 관심이 커지고 있으며, 그 원인이 활성 산소에 기인된 것이라는 보고가 있다[32]. 생체 내에서 에너지 생산을 위한 대사 과정 중 발생하는 활성 산소는 불안정하고 반응성이 매우 강하여 세포의 구성 성분인 지질, 단백질, 당 및 DNA 등을 손상시킨다. 특히 피부는 자외선에 의한 광학적 반응을 통해 활성 산소종을 생성하는데, 이러한 활성 산소종은 피부의 항산화 방어체계의 균형을 붕괴시켜 피부 세포 및 조직의 손상, 피부 탄력 감소와 주름살 및 기미 주근깨 등의 피부 노화, 세포 사멸 등을 초래한다. 이러한 활성 산소종에 대한 방어체계를 향상 시켜준다면 노화를 지연시키고 각종 질병을 예방하는데 기여할 것이다. 본 실험에서는 항산화 물질의 환원력을 측정하는데 가장 널리 쓰이는 DPPH를 사용하여 여정자 분획물을 대상으로 환원력을 평가 하였다. 헥산추출물은 환원력이 거의 나타나지 않았으며 물추출물은 농도 증가에 따른 환원력 증가가 크지 않았지만, 다른 분획물은 농도 증가에 따른 환원력이 비례적으로 증가하였다. 환원력은 부탄올추출물에서 가장 강력하였으며, 그 다음이 에틸아세테이트추출물로 나타났다. 이러한 결과는 여정자 메탄올추출물의 부탄올 및 에틸아세테이트 분획에 항산화 물질을 포함하고 있음을 나타내는 것이다.

이상의 결과 여정자 메탄올추출물은 멜라닌 합성 억제효과가 있었으며, 이러한 효과를 나타내는 물질이 헥산 분획 층에 존재하는 것으로 생각된다. 또한 부탄올, 에틸아세테이트, 물 추출물은 우수한 DPPH 라디칼 소거능을 보여주었다. 따라서 여정자 추출물은 미백효과와 함께 항산화효과를 나타내는 천연물질로서 기능성 화장품개발의 우수한 후보 물질이 될 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2009학년도 원광대학교 교비지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

1. Bell, A.A., Weeler, M.H. Biosynthesis and function of fungal melanin, Ann Rev Phtophathol 24: 411-451, 1986.
2. Chen, J.S., Wei, C., Marshall, M.R. Inhibition mechannism of Kojic acid on polyphenol oxidase. J Agric Food Chem 39: 1897-1901, 1991.
3. Urabe, K., Aroca, P., Tsukamoto, K., Mascagna, D., Paulumbo, A., Prota, G., Hearing, V.J. The inherent cytotoxicty of melanin precursors. Biochim Biophys Acta 221: 272-281, 1994.
4. Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., Harman. D. Oxygen radicals and human disease. Ann Intern Med 107: 526-545, 1987.
5. Adelman, R., Saul, L.R., Ames, N.B. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. Proc Natl Acad Sci USA 85: 2706-2708, 1998.
6. Slominski, A., Tobin, D.J., Shibahara, S., Wortsman, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. Physiol Rev 84(4):1155-1228, 2004.
7. Ferguson, C.A., Kidson, S.H. The regulation of tyrosinase gene transcription. Pigment Cell Res 10(3):127-138, 1997.
8. Hearing, V.J., Tsukamoto, K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. FASEB J 5(14):2902-2909, 1991.
9. Tsukamoto, K., Jackson, I.J., Urabe, K., Montague, P.M., Hearing, V.J. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. EMBO J 11(2):519-526, 1992.
10. Boissy, R.E., Sakai, C., Zhao, H., Kobayashi, T., Hearing, V.J. Human tyrosinase related protein-1 (TRP-1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1. Exp Dermatol 7(4):198-204, 1998.
11. Ando, S., Ando, O., Suemoto, Y., Mishima, Y. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor. J Invest Dermatol 100: 150-155, 1993.
12. Imokawa, G., Mishima, Y. Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glycosilation inhibitors within malignant melnoma. Cancer Res 42: 1994-2002, 1982.
13. Masuda, M., Tejima, T., Suzuki, T. Skin lighteners. Cosmetics & Toiletries 111: 65-77, 1996.
14. 신민교. 임상 본초학, 영림사, 서울 p 279, 1990.
15. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65(1-2):55-63, 1983.
16. Martínez-Esparza, M., Jiménez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J.A., García-Borrón, J.C. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. Eur J Biochem 255(1):139-146, 1998.
17. Hosoi, J., Abe, E., Suda, T., Kuroki, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res 45(4):1474-1478, 1985.
18. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use a stable free radical. Nature 26: 1199-1200, 1958.
19. Nerya, O., Vaya, J., Musa, R., Izrael, S., Ben-Arie, R., Tamir, S. Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. J Agric Food Chem 51(5):1201-1207, 2003.
20. Kahn, V. Effect of kojic acid on the oxidation of DL-DOPA, norepinephrine, and dopamine by mushroom tyrosinase. Pigment Cell Res 8(5):234-240, 1995.
21. Chakraborty, A.K., Funasaka, Y., Komoto, M., Ichihashi, M. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. Pigment Cell Res 11(4):206-212, 1998.

22. Shin, N.H., Ryu, S.Y., Choi. E.J., Kang, S.H., Chang, I.M., Min, K.R., Kim, Y. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. Biochem Biophys Res Commun 243(3):801-803, 1998.
23. 이승연, 김진만, 오현철, 임숙정, 황충연, 문연자, 우원홍. 더덕추출물이 멜라닌생성에 미치는 영향. 대한한의학 방제학회지 10(2):199-211, 2002.
24. 문연자, 이성원, 임숙정, 송채석, 이관순, 임규상, 우원홍. 천화문 수추출물이 B16 흑색종 세포의 멜라닌 생성 억제 효과. 한국전통의학지 10(2):149-159, 2000.
25. 천현자, 최은영, 윤성찬, 남항우, 백승화, 우원홍. 백출의 에탄올 추출물에 의한 melanin 생성 억제 효과. 약학회지 45(3):269-275, 2001.
26. 임난영, 권강주, 김윤석, 백순기, 임주락, 문연자, 우원홍. 사삼메탄올 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과. 동의생리병리학회지 18(3):747-753, 2004.
27. 신기돈, 김대성, 이장천, 문연자, 우원홍, 이영철. 인진 에탄올 추출물이 α-MSH로 유도된 과색소 형성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 23(3):574-580, 2009.
28. 노성택, 김대성, 이성진, 박대중, 이장천, 임규상, 우원홍, 문연자. 교맥 에탄올 추출물의 피부 미백기전 연구. 동의생리병리학회지 21(5):1243-1249, 2007.
29. 이광석, 송봉근, 김형균, 이언정. 여정자가 대식세포 탐식능에 미치는 영향. 대한한의학학회지 17(2):227-236, 1996.
30. 강승호, 김은영, 류미라, 김동일. 대한한방부인과학회지 20(2):83-96, 2007.
31. Li, G., Zhang, X.A., Zhang, J.F., Chan, C.Y., Yew, D.T., He, M.L., Lin, M.C., Leung, P.C., Kung, H.F. Ethanol extract of Fructus Ligustri Lucidi promotes osteogenesis of mesenchymal stem cells. Phytother Res 24(4):571-576, 2010.
32. Chi, H.Y., Kim, K.H., Kong, W.S., Kim, S.L., Kim, J.A., Chung, I.M., Kim, J.T. Antioxidant activity and total phenolic compound of P. eryngii spp. extracts. Kor J Crop Sci 50: 216-219, 2005.