

삼릉추출물이 항산화와 멜라노제네시스에 미치는 영향

이경은[#] · 심관섭 · 김진화 · 박성민 · 이범천 · 윤여표* · Yong He Zhang** · 표형배
한불화장품 기술연구소, *충북대학교 약학대학, **Peking University

(Received October 14, 2004; Revised November 1, 2004)

Effects of the *Scirpi rhizoma* on Antioxidation and Melanogenesis

Kyung Eun Lee[#], Gwan Sub Sim, Jin Hwa Kim, Sung Min Park, Bum Chun Lee,
Yeo Pyo Yun*, Yong He Zhang** and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics Co. Ltd., 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk 369-830, Korea

*College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

**Department of Pharmacology, School of Basic Medical Science, Peking University, 38 Xueyuan Road, Beijing 100083, China

Abstract — Whitening effect, which decreases the skin pigmentation, is the one of important targets in cosmetics. This study was investigated the effects of *Scirpi rhizoma* on antioxidation and melanogenesis. *S. rhizoma* is a rhizome of *Scirpus fluviatilis* G. a perennial Cyperaceae species of wide occurrence in Asia, Europe, Africa and North America. *S. rhizoma* shown scavenging activities of free radicals and reactive oxygen species (ROS) with the IC₅₀ of 638 µg/ml against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and 21.7 µg/ml against superoxide radicals in the xanthine/xanthine oxidase system, respectively. *S. rhizoma* treatment (48 h) suppressed the biosynthesis of melanin up to 27% and reduced tyrosinase activity up to 31% at 100 µg/ml in B16 melanoma cells. *S. rhizoma* was also able to significantly inhibit tyrosinase and TRP-1 expression in protein level. These results suggest that *S. rhizoma* inhibited melanin biosynthesis by regulating tyrosinase activity and expression in B16 melanoma cells. Therefore *S. rhizoma* may be useful as new whitening agent due to the antioxidant effect and the inhibitory effect against melanogenesis.

Keywords □ *Scirpi rhizoma*, antioxidation, melanogenesis, tyrosinase

피부의 색은 피부 속에 존재하는 멜라닌의 함량에 의해 결정된다. 표피에 존재하는 멜라닌은 태양 광선으로부터 들어오는 자외선을 차단하는 색소로서 멜라닌이 국소적으로 과도하게 합성되거나, 노화 등에 의해 피부의 생리기능이 떨어지게 되면 멜라닌이 피부 표면에 침착되어 기미, 주근깨 및 다양한 색소 침착을 유발하게 된다.¹⁾ 이러한 멜라닌은 피부의 기저층에 존재하는 melanocyte에서 생합성 된다. 그러나 지나친 멜라닌의 생성은 미적으로나 피부 건강상 문제를 야기할 수 있다. 따라서 최근에는 멜라닌에 의한 피부 착색을 회피하거나 완화시키는 기능성 화장품들이 개발되고 있다.

멜라닌 생합성은 melanocyte에서 cascade 효소 반응에 의해 생성된다. 멜라닌은 melanocyte의 melanosome에서 합성되며,

melanosome에는 정상적인 멜라닌을 합성하는데 필요한 특이적인 효소들을 함유하고 있다. 이 효소들 중 가장 잘 알려진 것으로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1(TRP-1)과 dopachrome tautomerase(DCT) 등이 있다.^{2,3)} 이들 중 tyrosinase는 melanogenesis의 속도결정단계인 초기 반응에 작용하는 효소로서, tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPAquinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다. TRP-1은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid(DHICA)를 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화하는 효소이다. DCT는 초기에는 tyrosinase related protein-2(TRP-2)로 불려졌던 효소로서 Dopachrome을 DHICA로 이성화하는 효소이다. 멜라닌은 흑, 갈색의 eumelanin과 적, 노랑색의 pheomelanin이 있다. 특히 tyrosinase는 이들 두 가지 타입의 melanin 합성에 필요하며, TRP-1과 DCT는 eumelanin의 합성에 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있다.⁴⁾

기존의 미백 물질들은 작용 기전에 따라 자외선 흡수제나 산

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 043-879-2282 (팩스) 043-881-2128
(E-mail) ike@hanbul.co.kr

단제, vitamin C나 kojic acid, 알부틴^{5,6)} 등과 같은 tyrosinase 저해제, 활성 산소종을 소거하는 토코페롤 등으로 분류할 수 있다. 또한 식물 추출물, 상백피, 당귀, 고삼, 지엽, 금은화, 감초, 반하, 백작약, 음양곽^{7,8)} 등이 미백 효과가 있는 것으로 나타나고 있다.

본 연구에 사용한 삼릉(*S. rhizoma*)은 형삼릉, 매자기, 흑삼릉이라고도 불리며, 외떡잎식물 벼목 사초과의 여러해살이풀로 아시아, 유럽, 아프리카, 북아메리카 등지에 분포한다. 지금까지 한 의에서는 통경약, 진통제, 건위약, 이뇨제, 정혈제 그 외에도 항암효과 등의 효능이 알려져 왔으나, 삼릉을 이용한 미백 작용에 대한 연구 결과는 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 삼릉 추출물이 항산화 효과와 멜라닌 생성에 어떤 영향을 미치는지 규명하고자 하였다.

실험 방법

시료의 추출

본 실험에서 사용한 삼릉(*S. rhizoma*)은 *Scirpus fluviatilis* G.의 뿌리줄기로 중국 북경대학에서 제공 받아 사용하였다. 삼릉 100 g을 분쇄하여 70% 에탄올 1 l로 환류하면서 3시간씩 2회 반복 추출하였다. 이를 감압 농축, 동결 건조하여 그 분말을 Dimethyl sulfoxide(DMSO)로 용해하여 사용하였다.

세포 및 시약

B16F1은 쥐의 melanoma 세포주로 서울대학교 한국 세포주은행에서 구입하였다. 구입한 세포는 5% fetal bovine serum (Bio Whittaker, USA), 1% penicillin-streptomycin(Gibco BRL, USA), 200 uM α -MSH(Sigma, USA)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, Actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology(CA)에서 구입하여 사용하였다.

DPPH radical 소거 효과

항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Aldrich, USA)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과를 측정하는 Blois법⁹⁾을 활용하였다. 0.1 mM DPPH 메탄올 용액에 동일량의 시료를 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후, 실온에 10분 동안 반응하였다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Superoxide radical 소거 효과

Xanthine/xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical 소거효과는 nitroblue tetrazolium(NBT) 방법에 의해 측정하였다.¹⁰⁾ 0.05 M Na₂CO₃ buffer(pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 삼릉추출물을 가한 후 25°C에서 10분간 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/ml xanthine oxidase를

가하고 25°C에서 25분 동안 반응 후, superoxide radical 소거효과를 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 생존율 측정

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 정량은 Mosmann¹¹⁾의 방법을 변형하여 실시하였다. B16 melanoma 세포를 1×10⁵ cells/well 농도로 24 well plate에 분주한 세포에 삼릉 추출물을 투여하고 24시간 동안 배양하였다. MTT 용액(5 µg/ml)을 첨가하고 3시간 후, 원심 분리하여 상등액을 제거하고 100 µl acid-isopropanol(0.04 N HCl in isopropanol)을 첨가한 후 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

멜라닌 정량

멜라닌 정량은 Yasunobu¹²⁾ 방법을 사용하였다. 6 well plate에 3×10⁵ cell/well로 세포를 분주하였고, 시료를 처리하고 48시간 동안 37°C CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포를 수집하여 세포수를 측정하고, 1200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 침전한 후, 1 ml homogenization buffer(50 mM Sodium phosphate pH 6.5, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF)로 용해시켰다. 여기서 얻은 pellet에 1 N NaOH(+10% DMSO) 200 µl를 첨가하고 vortex 후 405 nm에서 O.D₄₀₅ 값을 측정하였다. 멜라닌 표준품(Sigma, USA)으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 멜라닌 양을 산출하였다. 멜라닌은 단위세포(10⁴ cells)에서의 멜라닌 생성량을 비교하였다.

세포내 tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성 측정법은 Pawelek과 Pomerantz^{13,14)} 방법을 사용하였다. 6 well plate에 5×10⁵ cell/well로 세포를 분주하고 하루 동안 배양한 후 시료를 처리하였다. 24시간 후, 세포를 수집하여 용해시킨 후 0.2% L-DOPA가 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8)를 넣고 37°C에서 2시간 동안 배양하고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot analysis

시료를 48시간 처리한 B16 melanoma 세포를 RIPA buffer(10 mM sodium fluoride, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1 mM DTT, 500 uM sodium orthovanadate, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF)로 용해하고 원심 분리하였다. 여기서 얻은 상등액을 12% SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 이를 nitrocellulose membrane으로 이전시켰다. 이를 3% skim milk가 함유된 tris 완충용액에서 tyrosinase(sc-7833), TRP-1(sc-10443), TRP-2(sc-10452), actin(sc-1616) 항체와 각각 반응시킨 후, alkaline phosphatase가 결합된 항체를 가한 후, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate/nitro blue tetrazolium(BCIP/NBT)

을 가하여 발색시켰다. Western blot 결과는 Calibrated densitometer GS-800(Biorad, USA)를 이용하여 분석하였다.

자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

실험결과 및 고찰

DPPH radical 소거 효과

DPPH는 free radical의 안정된 모델로 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제정도를 예측 할 수 있다. 유해산소라 불리는 활성산소는 세포 생체막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화 지질을 축적함으로 인해 생체 기능이 저하되고 동시에 색소 침착, 노화 및 성인병 질환을 유발¹⁵⁾하는 것으로 알려져 있다. 또한 이에 따른 다양한 종류의 식물성분 및 추출물에 의한 항산화 작용이 보고되어 있다.^{16,17)} 삼릉추출물의 항산화 효과를 알아보기 위해 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정하였다. 삼릉추출물은 투여 농도 의존적으로 DPPH radical 소거작용을 나타냈다(Fig. 1). 삼릉추출물을 10, 100, 1000 µg/ml의 농도로 처리한 경우 각 DPPH radical 소거능은 10.7%, 18%, 67.5%로 나타났다. 양성 대조군으로는 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 butylated hydroxytoluene(BHT)를 이용하여 삼릉추출물의 항산화 효과와 비교하였다. 그 결과 BHT는 647 µg/ml에서 삼릉추출물은 638 µg/ml 농도에서 50%의 DPPH radical을 소거하였다.

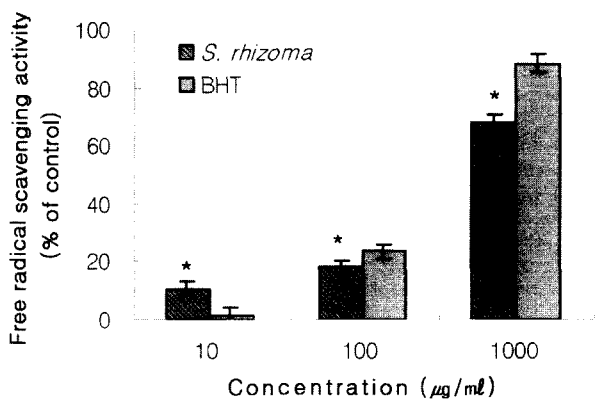


Fig. 1 – Anti-oxidant effect of *S. rhizoma* in the DPPH assay. A solution of 150 µl of 100 µM DPPH solution in methanol was gently mixed with 100 µl of *S. rhizoma* for 10 min and the absorbance was measured at 565 nm. Results are means±S.D. from 3 separate experiments. **p*<0.05 compared with control.

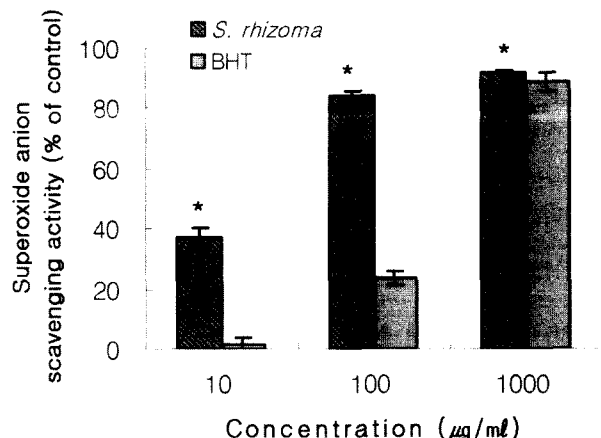


Fig. 2 – Anti-oxidant effect of *S. rhizoma* in the NBT assay. Superoxide radical was generated by a xanthine/xanthine oxidase system and measured by NBT reduction method. Results are means±S.D. from 3 separate experiments. **p*<0.05 compared with control.

Superoxide radical 소거 효과

Xanthine/xanthine oxidase의 효소에 의한 superoxide 음이온 저해작용은 superoxide 음이온 소거작용과 xanthine oxidase 효소 저해에 의해 나타난다.¹⁸⁾ Xanthine oxidase에 의해 형성되는 superoxide anion 생성저해의 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 양성 대조군으로는 BHT를 이용하여 삼릉추출물의 superoxide radical 소거효과를 비교하였다. 그 결과 삼릉추출물은 투여 농도 의존적으로 superoxide radical 소거작용을 나타내 10, 100, 1000 µg/ml의 농도로 처리한 경우 각 superoxide radical 소거능은 37%, 84.2%, 91.9%로 나타났다. IC₅₀은 21.7 µg/ml로 647 µg/ml을 나타낸 BHT에 비해 우수한 superoxide radical 소거효과를 나타내었다.

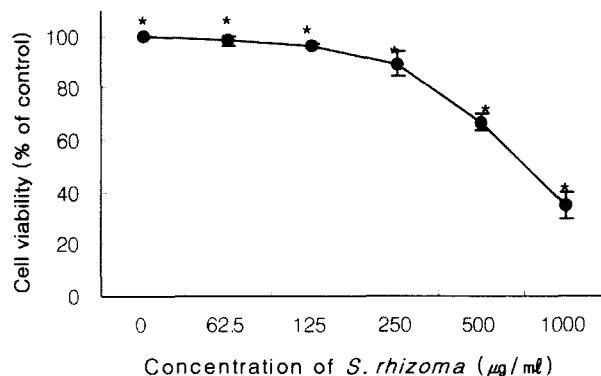


Fig. 3 – Relative cell viability of *S. rhizoma* on B16 melanoma cells by MTT assay. The cells were treated with various concentration of *S. rhizoma* for 24 h. The cell viability was measured by the MTT method. Data are normalized by taking 100% as a viability of non-treated cells. Results are means±S.D. from 3 separate experiments. **p*<0.05 compared with control.

세포독성

삼릉추출물의 세포독성측정과 더불어 실험에 사용될 농도 범위결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다. B16 melanoma 세포에 대한 삼릉추출물의 세포 독성을 측정된 결과, 삼릉추출물은 125 µg/ml 이하의 농도로 처리시 세포생존율이 90% 이상으로 나타났으며, 그 이상의 농도에서는 급격히 생존율이 저하되었다(Fig. 3). IC₅₀값은 506 µg/ml으로 나타났다.

멜라닌 생합성 저해 효과

삼릉추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 B16 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 양을 측정하였다. 세포에 삼릉추출물을 30, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 세포를 수집하여 멜라닌 양을 측정된 결과, 삼릉추출물 처리군 모두가 농도에 비례하여 멜라닌 합성이 저해됨을 확인하였다(Fig. 4). 양성 대조군으로 사용한 arbutin은 2 mg/ml에서 38% 멜라닌 감소 효과를 나타냈으나, 삼릉추출물은 arbutin보다 낮은 100 µg/ml 농도에서 27% 가량의 멜라닌 감소 효과를 나타냈다.

세포내 tyrosinase 저해 효과

Tyrosinase는 멜라닌 합성 과정에서 속도제한(rate-limiting) 효소이며 멜라닌 합성의 주요한 조절적 단계를 나타내는 효소이다. 삼릉추출물을 처리한 세포를 수집하여 용해시킨 후, 0.2% L-DOPA가 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8)를 넣고 37°C에서 배양한 후 흡광도를 측정하였다. Fig. 5의 결과와 같이 삼릉추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 tyrosinase의 활성이 저해되었으며, 특히 100 µg/ml 농도에서 31%

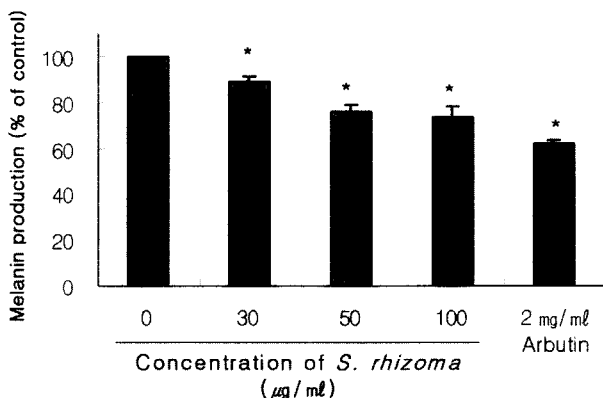


Fig. 4 – Effect of *S. rhizoma* on melanin production in B16 melanoma cells. The cells were incubated with *S. rhizoma* for 48 h. Melanin content is quantified by absorption at 405 nm calibrated with synthetic melanin as standard. *S. rhizoma* decreased the intracellular melanin contents at treated concentration. Results are means±S.D. from 3 separate experiments. **p*<0.05 compared with control.

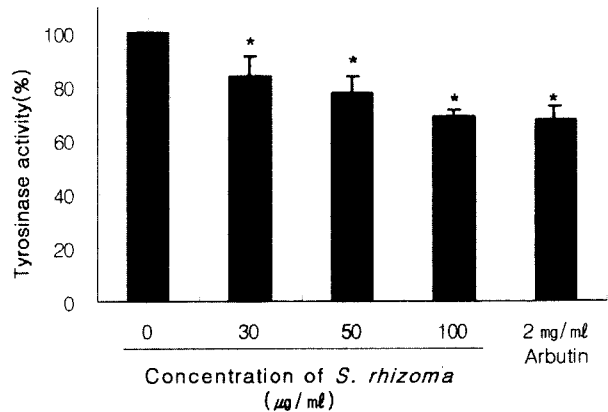


Fig. 5 – Effect of *S. rhizoma* on tyrosinase activity in B16 melanoma cells. The cells were incubated with *S. rhizoma* for 24 h. Results are means±S.D. from 3 separate experiments. **p*<0.05 compared with control.

가량의 저해 효과가 있는 것으로 나타났다.

Tyrosinase/TRP-1/TRP-2 단백질 발현 저해 효과

세포내 tyrosinase 저해 실험 효과로 미루어 볼 때, 삼릉추출물은 세포내 tyrosinase 활성을 저해하여 melanin 생성을 감소시켰다. 이러한 결과가 tyrosinase 발현과도 연관성이 있는지를

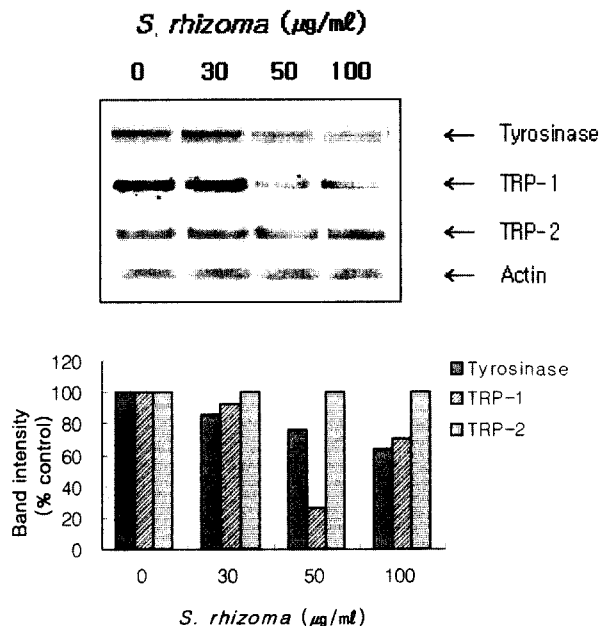


Fig. 6 – Effect of *S. rhizoma* on tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 expression in B16 melanoma cells. B16 cells were treated for 48 h with *S. rhizoma*. Solubilized total protein (30 µg) was electrophoresed in 12% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membrane. Specific detection of proteins was performed with the polyclonal antibody against tyrosinase, TRP-1 and TRP-2. Similar results were observed in three independent experiments.

확인하기 위해 tyrosinase 항체를 이용하여 western blot을 수행하였다. 또한 TRP-1, TRP-2 발현에 대한 western blot도 함께 수행하였다(Fig. 6). 그 결과 삼릉추출물은 tyrosinase, TRP-1의 발현을 저해하는 것으로 나타났다. 하지만 TRP-2의 발현량에는 영향을 미치지 않았다. 또한 이에 대한 density를 측정한 결과, tyrosinase의 발현이 100 µg/ml 농도에서 36%, TRP-1의 발현은 30% 가량 저해됨을 확인하였다.

결 론

본 연구에서는 삼릉 추출물의 항산화효과 및 B16 melanoma 세포에서의 melanogenesis에 미치는 영향을 관찰하였다. 삼릉 추출물의 DPPH와 superoxide radical 소거효과는 처리농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 소거효과를 나타냈으며, 각각 IC₅₀ 값이 638 µg/ml(DPPH), 21.7 µg/ml(superoxide radical)로 우수한 항산화 효과를 나타내었다. B16 melanoma 세포주에서는 100 µg/ml 농도를 처리한 실험군에서 멜라닌 생합성이 27% 감소되었다. 또한 세포내에 존재하는 tyrosinase 활성을 31% 저해하였으며, tyrosinase 단백질 발현량도 36% 감소, TRP-1도 30% 감소시켰다. 하지만 TRP-2에 대한 저해 효과는 나타나지 않았다. 삼릉 추출물은 항산화 효과가 우수하며, tyrosinase 활성 억제와 단백질 발현 억제를 통해 멜라닌 생합성 감소 효과를 나타내는 것으로 보인다. 따라서 이를 우수한 미백 소재로 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

문 헌

- Hill, H. Z., Li, W., Xin, P. and Michell, D. L. : Melanin : a two edged sword? *Pigment Cell Res.* **10**(3), 158 (1997).
- Cabanes, J., Chazarra, S. and Garcia-Carmona, F. : Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm Pharmacol.* **46**(12), 982 (1994).
- Veronique del Marmol and Friedrich Beermann. : Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation. *FEBS Letters* **381**, 165 (1996).
- Hearing, V. J. and Tsukamoto, K. : Biochemical control of melanoenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Dermatol.* **4**, 24 (1999).
- Higuchi, M., Miura, Y., Boohena, J., Kinoshita, Y., Yamamamoto, Y., Yushimura, I. and Yamaha, Y. : Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts. *Planta. Med.* **59**, 253 (1993).
- Ryu, K. Y., Kang, W. S., Kim, Y. H., Jang, H. D., Hong, J. T., Yoo, H. S. and Yun, Y. P. : Antioxidative effects of the rhizoma of *Rhodiola sa halinensis*. *Yakhak Hoeji.* **42**(3), 312 (1998).
- Park, J. H., Shin, Y. G., Baek, S. K., Lee, U. K., Chung, H. and Park, Y. I. : Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs. *Yakhak Hoeji.* **41**(4), 518 (1997).
- Lee, S. H., Park, J. S., Kim, S. Y., Kim, J. J. and Chung, S. R. : Isolation of Inhibitory components on tyrosinase activity from the back of paeonia moutan. *Yakhak Hoeji.* **42**(4), 353 (1998).
- Blois, M. S. : Antioxidation determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199 (1958).
- Furuno, K., Akasako, T. and Sugihara, N. : The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 19 (2002).
- Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methos.* **65**, 55 (1983).
- Yasunobu, O., Tomoko, K., Yuri, O., Hitoshi, M., Yoshiko, K., Yoko, F., Masamitsu, I., Ytaka, Y., Yoshitane, K. and Hiromu, S. : Development of a novel zinc complex as whitening agent in a new concept. *ASCS.* **6th**, 69 (2003).
- Pawelk, J. : Melanoma cells in culture. *Methods Enzymol.* **58**, 564 (1978).
- Pomerantz, S. H. : Separation, purification, and properties of two tyrosinases from hamster melanoma. *J. Biol. Chem.* **238**, 2351 (1963).
- Kitahara, A., Matsumoto, U., Ueda, H. and Ueoka, R. : Aremarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of γ -irradiated methyl linolate. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 2208 (1992).
- Hatano, T. : Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-Tannins and related poly-phenols. *Natural Medicines.* **49**, 357 (1995).
- Masaki, H., Sakaki, S., Atsumi, T. and Sakurai, H. : Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 162 (1995).
- Kuppasamy, P. and Zweier, J. L. : Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **264**, 9880 (1989).