

Effect of Ailanthi Radicis Cortex Extracts on Melanogenesis

Young Ho Cho[†]

Department of Pharmaceutical Engineering, Konyang University, Nonsan 320-711, Korea

Melanogenesis refers to the biosynthesis of melanin pigment in melanocytes. Melanogenesis is controlled by the intra- and extracellular environments. In the present study, to develop a new whitening agent, it was investigated the antioxidant activity and the inhibitory effect of Ailanthi Radicis Cortex extract on tyrosinase activity and on melanogenesis in the B16/F1 melanoma cells. The inhibition ratio of tyrosinase activity of ethylacetate fraction from Ailanthi Radicis Cortex was higher than that of arbutin. The ethylacetate fraction showed scavenging activities of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals and superoxide anion radicals in a dose dependent manner. The highest inhibitory activity of melanogenesis was also in ethylacetate fraction ($40.0 \pm 5\%$ at the concentration of 400 $\mu\text{g/ml}$). This study demonstrates that the Ailanthi Radicis Cortex extract might be used to be a potential agent for skin whitening.

Key Words: Ailanthi radicis Cortex, Antioxidant, Melanogenesis, Tyrosinase

서 론

인간의 피부 색깔은 인종, 성별, 나이, 신체부위, 건강 상태와 스트레스 정도, 심지어는 계절에 따라서도 다르다. 특히 피부의 색은 표피에 존재하는 melanocyte에서 생성되는 멜라닌의 양과 분포에 의해 결정적인 영향을 받고, 나머지는 진피의 혈관 속에 함유된 헤모글로빈과 피하조직의 카로틴의 양과 분포에 의해서 일부 영향을 받는다 (Quevedo et al., 1975; Hill et al., 1997). 멜라닌의 합성은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte의 소기관인 melanosome에서 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), dopachrome tautomerase (DCT) 등의 특이적인 효소의 연속적 산화반응에 의해 일어난다 (Marmol and Beermann, 1996). 지금까지 다양한 원인으로 검어진 피부를 개선시키기 위하여 자외선 차단 (Chew et al., 1987), 사이토카인 조절 (Morelli and Norris, 1993), 멜라닌 합성 저해 (Kumano et al., 1998), 타이로시나제 활성 저해 (Cabanés et al., 1994), 피부의 turn over 촉진 (Ortonne, 2006) 등의 기능을 가지는 미백제들이 개발되어 있으나, 피부 안전성, 제형 안정성 등의 문제로 사용되지 않거나 제한된 양만 사용되고 있

다. 특히 최근에는 안전성을 고려하여 천연물 유래의 미백연구가 활발히 이루어지고 있다 (NO et al., 1999; Jung et al., 2001; Lee et al., 2002).

생약제인 저백피 (Ailanthi Radicis Cortex)는 소테나무과 (Simarubaceae)의 가죽나무 (*Ailanthus altissima* Swingle)의 주피를 제거한 수피 또는 근피를 건조한 것으로 이질, 치질, 장풍 등에 효과가 있는 생약으로 알려져 있다. 저백피의 함유 성분에 대한 연구로는 isoquercitrin, canthin-6-one, canthin-6-one-3-oxide, quassin 등의 성분들이 보고되어 있으나 (Park, 2000), 저백피 추출물의 피부 미백 효과에 대한 생리기전이나 연구결과에 대해서는 알려진 바가 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 저백피가 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하고자 각 용매별 분획에 의한 tyrosinase 활성 저해 효과와 free radical 소거 활성을 검색하여 활성이 가장 높게 나타난 ethylacetate 분획을 B16/F1 melanoma 세포에 처리하여 멜라닌 생성 저해 효과를 측정하였고, 기능성 화장품의 천연 미백 소재로서의 이용 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

본 실험에 사용한 저백피는 서울 경동시장 내의 한약 건재상에서 구입하여 사용하였다. Tyrosinase 활성 저해 측정을 위해 사용된 mushroom tyrosinase, tyrosine 및

*논문 접수: 2007년 10월 24일

수정재접수: 2007년 11월 30일

[†]교신저자: 조영호, (우) 320-711 충남 논산시 내동 대학로 119, 건양대학교 제약공학과

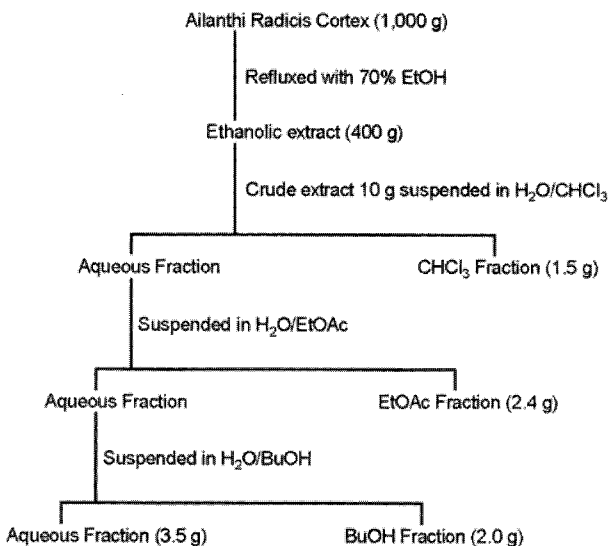
Tel: 82-41-730-5177, Fax: 82-41-735-9117

e-mail: micael@konyang.ac.kr

dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich 사 (USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 추출 및 분획에 사용된 유기 용매들과 그 외 각종 시약은 일급 및 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

2. 시료의 추출 및 분리

건조된 저백피 1 kg을 분쇄하여 70% 에탄올 수용액으로 3회 환류 추출하여 여과한 후, 감압 농축하여 에탄올 추출물 (400 g)을 얻었다. 얻어진 에탄올 추출물의 일부 (10 g)를 물에 분산시킨 후, chloroform (CHCl₃) 1 L로 분배 추출하여 CHCl₃ 분획을 얻고, 포화 NaCl 용액으로 back washing하고, 무수 Na₂SO₄로 탈수한 후, 감압 농축하여 1.5 g의 분획을 얻었다. 남은 물층에 대하여 ethyl acetate (EtOAc)와 수포화 부탄올 (aq BuOH)을 이용하여 CHCl₃ 분획과 같은 방법으로 탈수, 농축하여 EtOAc 분획 (2.4 g)과 수포화 부탄올 분획 (2.0 g)을 각각 얻었다. 남은 물층을 농축하여 3.5 g의 분획을 얻었다 (Scheme 1). 각각의 건조 분획을 DMSO에 녹여 농도를 조정하여 다음 시료로 사용하였다.



Scheme 1. Procedure for extraction and fractionation of Ailanthi Radicis Cortex.

3. 세포배양

B16F1은 생쥐의 melanoma 세포주로 서울대학교 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 구입한 세포는 5% fetal bovine serum (Bio Whittaker, USA), 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, USA), 200 µM α-MSH (Sigma-Aldrich Co.)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

4. Tyrosinase 활성 저해 측정

Tyrosinase 활성 저해 측정은 Choi 등 (1998)의 방법을 변형시켜 사용하였다. 96-well plate에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5), 1.5 mM tyrosine solution, 시료 용액의 혼합액에 tyrosinase 효소액 (1,200 units/ml)을 첨가하여 37°C에서 25분간 반응시켜 micro-plate reader (Bio-Tek Instruments, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosinase 활성 저해율을 구하였다. 각 반응은 3회 이상 측정하였다.

5. DPPH radical 소거 활성 측정

Free radical의 소거 작용은 Blois (1958)가 사용한 방법을 약간 변형하여 각 시료의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)에 대한 소거 효과를 측정하였다. 0.1 mM DPPH 메탄올 용액에 동일량의 시료를 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 이후 micro-plate reader로 565 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH radical의 소거 활성을 구하였다. 각 반응은 3회 이상 측정하였다.

6. Superoxide radical 소거 활성 측정

Superoxide radical의 소거 작용은 Furuno 등 (2002)의 방법에 따라 각 시료의 xanthine-xanthine oxidase system에 의해 생성된 superoxide radical을 소거하는 효과를 측정하였다. 0.05 M Na₂CO₃ buffer에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM nitroblue tetrazolium (NBT), 0.15% bovine serum albumin (BSA) solution과 시료를 각각 첨가하여 혼합한 다음, 25°C에서 10분간 반응하였다. 이후 각 tube에 xanthine oxidase (0.25 units/ml) 용액을 첨가하여 25°C에서 30분간 반응시킨 후 micro-plate reader로 565 nm에서 흡광도를 측정하여 superoxide radical의 소거 활성을 구하였다. 각 반응은 3회 이상 측정하였다.

7. 세포 생존율 측정

세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosmann (1983)의 방법을 변형하여 측정하였다. 96-well plate에 B16/F1 melanoma 세포를 2×10⁴ cells/well 농도로 접종한 후 각 well에 시료를 투여하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. MTT 용액 (5 µg/ml)을 첨가하고 4시간 후 원심분리하여 상등액을 제거하고

Table 1. Inhibition of tyrosinase activity by extracts from *Ailanthi Radicis Cortex*

Samples	Inhibition of tyrosinase activity (%) ¹⁾
Arbutin ²⁾	90.0±1.5*
EtOH extract	80.0±2.0*
CHCl ₃ fraction	20.0±2.5
EtOAc fraction	98.0±0.5*
BuOH fraction	60.5±1.5*
H ₂ O fraction	50.0±1.5*

¹⁾ Concentration for measuring the inhibition of mushroom tyrosinase activity was 500 µg/ml.

²⁾ Positive control. Results were expressed as % of control and data were mean ±SD of the minimum three determinations. *Significantly different from control group (**P*<0.05)

100 µl acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 micro-plate reader로 565 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

8. 멜라닌 정량

멜라닌 정량은 Hosoi 등 (1985)의 방법을 변형하여 사용하였다. 6-well plate에 3×10⁵ cells/well 농도로 세포를 접종한 후 시료를 처리하고 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포를 수집하여 세포수를 측정하고, 5분간 원심분리하여 얻은 세포 침전물을 1 ml homogenization buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, 1% triton X-100, 2 mM PMSF)로 용해시켰다. 여기서 얻은 pellet에 1 N NaOH (+10% DMSO) 용액을 200 µl를 첨가하여 용해시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 합성 멜라닌 (Sigma-Aldrich Co.)을 사용하여 작성된 표준 검량선에서 구하고, 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하였다. 멜라닌은 단위세포 (10⁴ cells)에서의 멜라닌 생성량을 비교하였다.

9. 자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성 검증은 Student's t-test로 하였으며, *P* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

1. Tyrosinase 활성 저해 효과

저백피 추출물의 용매별 분획에 대한 tyrosinase 활성

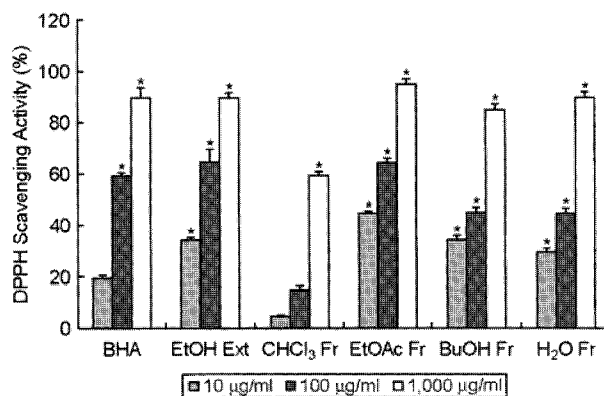


Fig. 1. Scavenging effects of various solvent extracts from *Ailanthi Radicis Cortex* on DPPH radical. BHA was used as the positive control. Results were expressed as % of control and data were mean ±SD of the minimum three determinations. *Significantly different from control group (**P*<0.05).

저해 효과는 tyrosine를 기질로 이용하여 측정하였으며, 그 결과를 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 보는 바와 같이 저백피 에탄올 추출물의 tyrosinase 활성 저해는 80.0±2.0%로 우수하였다. 저백피 에탄올 추출물을 유기용매 chloroform, ethylacetate, BuOH, H₂O로 분획한 유기용매 분획물의 tyrosinase 활성 저해는 각각 20.0±2.5, 98.0±0.5, 60.5±1.5 및 50.0±1.5%로 나타나 사용한 유기용매 중 ethylacetate 분획물이 가장 우수한 활성 저해 효과를 나타내었으며, 동일 농도 arbutin의 90.0±1.5%와 비슷한 tyrosinase 활성 저해 효과를 나타내었다 (Table 1).

2. DPPH radical 소거 효과

DPPH는 free radical의 안정된 모델로 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제 정도를 예측할 수 있다. 기존에 널리 알려진 합성 항산화제인 3-*t*-butyl-4-hydroxy-anisole (BHA)를 대조군으로 하여 저백피 분획물에 대하여 DPPH법에 의한 free radical 소거 활성을 측정된 결과, Fig. 1에 나타낸 바와 같이 저백피 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거 활성은 10, 100, 1,000 µg/ml에서 각각 35.0±0.5%, 65.0±5.0%, 90.0±2.0%로 우수하였으며, 대조군으로 사용된 동일 농도의 BHA의 20.0±0.5%, 60.0±0.5%, 90.0±3.5%와 비슷하거나 우수한 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다. 또한, 저백피 에탄올 추출물을 유기용매 chloroform, EtOAc, BuOH, H₂O로 분획한 유기용매 분획물들은 투여 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성을 나타내었으며, 사용한 유기용매 중 EtOAc 분획이 가장 우수한 소거 활성을 나타내었다 (Fig. 1). 상기의 결과로

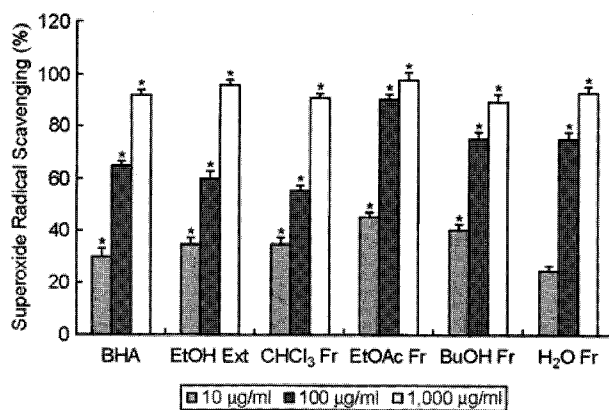


Fig. 2. Scavenging effects of various solvent extracts from Ailanthi Radicis Cortex on superoxide radical. BHA was used as the positive control. Results were expressed as % of control and data were mean \pm SD of the minimum three determinations. *Significantly different from control group ($P < 0.05$).

불 때 저백피 EtOAc 분획의 free radical 소거 활성은 단일 성분인 BHA보다 우수한 효과를 가지는 것으로 밝혀졌다.

3. Superoxide radical 소거 효과

Xanthine oxidase에 의해 형성되는 superoxide anion에 대한 소거 효과는 Fig. 2에 나타난 바와 같이 저백피 에탄올 추출물을 10, 100, 1,000 µg/ml의 농도로 처리한 경우 각각의 superoxide radical 소거능은 35.0 \pm 2.0%, 60.0 \pm 2.5%, 96.0 \pm 1.5%로 대조군으로 사용된 동일농도의 BHA의 30.0 \pm 3.0%, 65.0 \pm 1.5%, 92.0 \pm 2.0%와 비슷한 우수한 superoxide radical 소거 효과를 나타내었다. 또한, 저백피 에탄올 추출물의 유기용매 분획들도 투여 농도 의존적으로 superoxide radical 소거 활성을 나타내었으며, 사용한 유기용매 중 EtOAc 분획이 가장 우수한 소거 활성을 나타내었다 (Fig. 2).

4. 세포독성

가장 강한 활성을 보인 EtOAc 분획을 100 µg/ml에서 1,000 µg/ml까지 다양한 농도로 처리하고, 48시간 배양한 후에 MTT 방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 EtOAc 분획을 최고 800 µg/ml 처리 시에도 세포 생존율이 90% 이상으로 나타났으며, 그 이상의 농도에서는 생존율이 저하되는 것으로 나타났다. 따라서 EtOAc 분획은 이 농도 범위에서 세포독성이 거의 없는 것으로 사료되어 멜라닌 생합성 저해 실험은 이 농도 범위를 기준으로 하여 실시하였다.

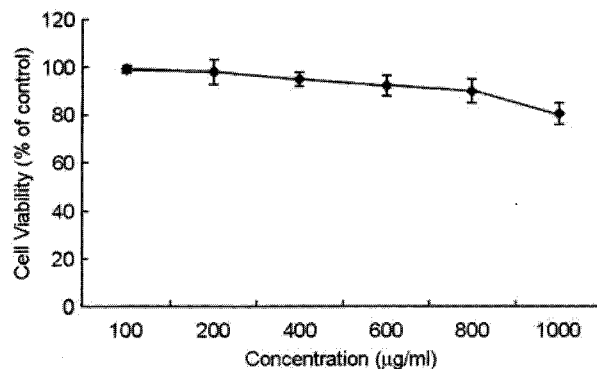


Fig. 3. Effects of EtOAc fraction from Ailanthi Radicis Cortex on the viability of B16/F1 melanoma cells. Results were expressed as % of control and data were mean \pm SD of the minimum three determinations.

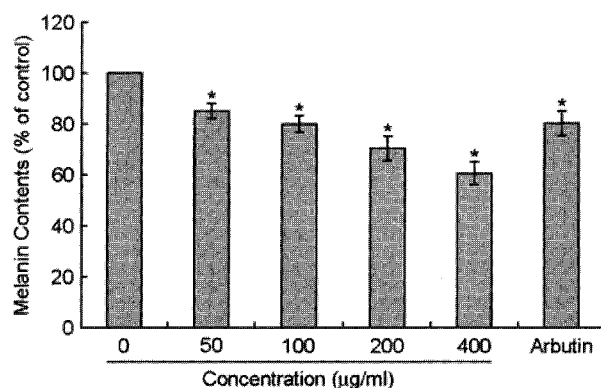


Fig. 4. Inhibitory effects of EtOAc fraction from Ailanthi Radicis Cortex on melanin production in B16/F1 melanoma cells. Results were expressed as % of control and data were mean \pm SD of the minimum three determinations. *Significantly different from control group ($P < 0.05$).

5. 멜라닌 생합성 저해 효과

저백피 EtOAc 분획이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 B16/F1 melanoma 세포를 이용하여 최종 산물인 멜라닌 양을 측정하였다. B16/F1 melanoma 세포에 저백피 EtOAc 분획을 50, 100, 200, 400 µg/ml의 농도로 처리하고 48시간 배양한 다음 멜라닌 생성량을 측정하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 EtOAc 분획 처리군에서 투여 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 저해됨을 확인하였다. 특히 양성 대조군으로 사용된 arbutin은 400 µg/ml 농도에서 20.0 \pm 5.0%의 멜라닌 생성 저해 효과를 나타낸 반면에 저백피 EtOAc 분획의 경우 arbutin과 동일 농도에서 2배 정도 높은 40.0 \pm 5.0%의 멜라닌 생성 저해 효과를 나타내었다. Melanocytes와 melanoma cells에서의 멜라닌 합성은 tyrosinase에 의해 조절되는 일련의 효소적

반응에 의해 관리되며, tyrosine을 기질로 하여 dopa를 생성시키고 다시 dopaquinone으로 산화시키는 연속적인 효소적 산화가 진행된 후 각 생성물의 중합반응에 의해 이루어진다 (Englaro et al., 1995). 저백피 EtOAc 분획을 B16/F1 melanoma 세포에 처리시 비처리군에 비해 멜라닌 생성이 감소하는 경향을 보이는 것은 EtOAc 분획의 tyrosinase 활성 저해와 우수한 항산화 작용에 의해 멜라닌 합성의 초기 단계인 일련의 산화반응이 억제되어 최종 산물인 멜라닌 합성이 감소되는 것으로 사료된다.

따라서 향후 저백피 성분의 분리·정제 및 임상 시험 등의 보강 연구를 통해 저백피를 이용한 tyrosinase 활성 저해 효과와 멜라닌 생성을 효과적으로 저해하는 새로운 미백원료 개발이 가능할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958. 181: 1199-1200.
- Cabanes J, Chazarra S, Garci-Carmona F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J Pharm Pharmacol*. 1994. 46: 982-985.
- Chew S, DeLeo VA, Harber LC. An animal model for evaluation of topical photoprotection against ultraviolet A (320~380 nm) radiation. *J Invest Dermatol*. 1987. 89: 410-414.
- Choi BW, Lee BH, Kang KJ, Lee ES, Lee NH. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor J Pharmacogn*. 1998. 29: 237-242.
- Englaro W, Rezzonico R, Durand-Clement M, Lallemand D, Ortonne JP, Ballotti R. Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J Biol Chem*. 1995. 270: 24315-24320.
- 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.
- Hill HZ, Li W, Xin P, Mitchell DL. Melanin: a two edged sword? *Pigment Cell Res*. 1997. 10: 158-161.
- 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*. 1985. 45: 1474-1478.
- Jung GD, Yang JY, Song ES, Par JW. Stimulation of melanogenesis by glycyrrhizin in B16 melanoma cells. *Exp Mol Med*. 2001. 33: 131-135.
- Kumano Y, Sakamoto T, Egawa M, Iwai I, Tanaka M, Yamamoto I. In vitro and in vivo prolonged biological activities of novel vitamin C derivative, 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G), in cosmetic fields. *J Nurc Sci Vitaminol*. 1998. 44: 345-359.
- Lee SH, Choi SY, Kim H, Hwang JS, Lee BG, Gao JJ, Kim SY. Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin synthesis. *Biol Pharm Bull*. 2002. 25: 1045-1048.
- Marmol VD, Beermann F. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett*. 1996. 381: 165-168.
- Morelli JG, Norris DA. Influence of inflammatory and cytokines on human melanocyte function. *J Invest Dermatol*. 1993. 100: 191S-195S.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J Immunol Methods*. 1983. 65: 55-63.
- No JK, Song DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, Chung HY. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sciences*. 1999. 65: 241-246.
- Ortonne JP. Retinoid therapy of pigmentary disorders. *Dermatol Ther*. 2006. 19: 280-288.
- Park JH. The encyclopedia of medicinal plants. 2000. pp. 4. Shinil press. Seoul, Korea.
- Quevedo WC, Fitzpatrick TB, Pathak MA, Jimbow K. Role of light in human skin color variation. *Am J Phys Anthropol*. 1975. 43: 393-408.