

## 멜라닌 세포에서 홍차 열수추출물의 멜라닌 합성 저해능과 작용기전

최 소 영, 김 영 철<sup>1,\*</sup>, 장 병 수<sup>2,\*</sup>

대구미래대학교 메디컬스킨케어과, <sup>1</sup>계명대학교 대학원 공중보건학과,  
<sup>2</sup>한서대학교 보건학부 피부미용학과

## Inhibitory Efficacy of Black Tea Water Extract on Melanogenesis in Melan-a Cells and Its Action Mechanisms

So-Young Choi, Young-Chul Kim<sup>1,\*</sup>, Byung-Soo Chang<sup>2,\*</sup>

Department of Medical Skin Care, Daegu Mirae College, Gyeongbuk 712-716, Korea

<sup>1</sup>Department of Public Health, Graduate School, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Cosmetology, Hanseo University, Seosan 356-706, Korea

(Received August 7, 2011; Revised September 21, 2011; Accepted September 23, 2011)

### ABSTRACT

To evaluate the whitening effect of *Camellia sinensis* water extract (CSWE), CSWE was treated to melan-a cells. Total polyphenol contents and flavonoid contents of CSWE were 102 mg/g and 87 mg/g, respectively. The electron-donating ability of CSWE revealed a dose-dependent response, showing the excellent ability of 82% at 800 µg/mL, and which was higher than the arbutin (48%). The CSWE significantly ( $p < 0.001$ ) suppressed the melanin synthesis and the development of melanocyte dendrites was inhibited in a dose-dependent manner. The CSWE significantly ( $p < 0.001$ ) inhibited both intra-cellular and cell-extracted tyrosinase activities. And inhibitory efficacies of CSWE on both melanin synthesis and tyrosinase activity were significantly ( $p < 0.001$ ) higher than the arbutin. The tyrosinase protein expression was not influenced by arbutin treatment. However, CSWE treatment significantly ( $p < 0.001$ ) reduced it. Both arbutin and CSWE treatment did not influence on mRNA expressions of tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 and tyrosinase related protein-2.

**Keywords** : Black tea, Melan-a cell, Tyrosinase, Whitening

### 서 론

피부색을 결정하는 성분들은 멜라닌, 카로틴과 같은 색소 성분과 혈관의 분포, 각질층의 두께 등에 의해서 결정된다.

멜라닌은 피부색을 결정하는 주요한 색소로서 자외선에 의한 손상을 막고 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 제거하여 피부를 보호하는 역할을 한다. 만성적인 태양노출은 표피 기저층에 있는 멜라닌 세포에 의해 멜라닌 생성을 촉진시켜 흑피증, 또는 표피와 진피에 과다색소 침착을 일으

\* Correspondence should be addressed to Dr. Young-Chul Kim, Department of Public Health, Graduate School, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea. Ph.: (053) 580-5931, Fax: (053) 588-5233, E-mail: yckim@kmu.ac.kr and Byung-Soo Chang, Department of Cosmetology, Hanseo University, Seosan 356-706, Korea. Ph.: (041) 660-1584, Fax: (041) 660-1590, E-mail: bschang@hanseo.ac.kr

킨다.

멜라닌은 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2) 등의 일련의 효소반응에 의하여 생성되며 (Olivares & Solano, 2009), 멜라닌 생성의 주요 기전은 멜라닌 세포의 증식과 tyrosinase 효소 활성도의 증가이다. 멜라닌 생성에 있어 가장 중요한 역할을 하는 효소는 tyrosinase이며, 멜라닌 생합성에서 초기단계를 촉매하는 속도조절 인자로서, 이 효소에 의해 tyrosine이 3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA), DOPA quinone으로 변환되어 붉은계열의 eumelanin과 갈색계열의 pheomelanin이 합성된다 (Lopez et al., 1992). Eumelanin 형성의 중요한 다른 두 가지 효소는 TRP-1과 TRP-2이다. 멜라닌 생합성에 관여하는 인자로는 tyrosinase, dopachrome conversion factor, prostaglandin (PG), interferon (IFN), melanocyte stimulating hormone (MSH), vitamin D3, histamine 등이 있다 (Imokawa et al., 1982).

Tyrosinase 억제제로 알려진 하이드로퀴논, 코직산, 알부틴 등은 강한 미백효과를 가지고 있어 과색소침착 피부질환 치료에 사용되고 있으나 피부자극, 접촉성피부염 등과 같은 부작용을 일으킨다 (Ortonne & Passeron, 2005). 이로 인해 천연물에 대한 관심이 높아지면서 피부 친화적이고 안전한 미백소재로서 식물의 천연추출물을 이용한 미백 연구가 활발히 이루어지고 있다.

차는 잎 자체가 가지고 있는 고유의 향과 차 제조과정 중에 생성되는 독특한 향, 그리고 체내의 생리활성 작용이 탁월하여 기능성 식품으로도 수요가 증가하고 있다. 차에 함유되어 있는 대표적인 생리활성 물질인 카테킨류는 차잎 중에 함유되어 있는 폴리페놀 화합물의 75% 이상을 차지하고, 항산화 작용이 강한 것으로 알려져 있다. 차의 주요 카테킨류로는 EC (epicatechin), ECG (epicatechin gallate), EGC (epigallocatechin), EGCG (epigallocatechin gallate), GC (gallocatechin)의 5종류가 있으며, EC, EGC 등과 같은 유리형 카테킨은 온화한 쓴맛이 있는 떫은맛을 나타낸다 (Yamamoto et al., 2001). 차잎에 함유된 polyphenol oxidase에 의하여 산화된 정도에 따라 불발효차인 녹차, 반발효차인 우롱차·포종차, 발효차인 홍차로 구분된다. 불발효차는 항균 및 항산화 작용이 강하고, 혈소판 응집효과, 항암작용, 비타민 C의 함량이 높고, 반발효차는 알레르기 억제, 항산화작용이 높은 것으로 알려져 있다 (Rhi et al., 1993). 발효차는 위조, 유념하는 과정에서 카테킨류가 theaflavin류로 변화하고, 고급지방산이 산화분해되어 카보닐화합물이 증가하여 색, 맛, 향기 등의 특성과 체내의 생리활성 작용이 변화된다. Theaflavin은 홍차의 색을 구성하는 것에만 작용하는 것이 아니라 항산화 효과 (Friedman, 2007), LDL cholesterol 저하작용 (Tinahones et al., 2008), 암세포 증식방지 (Hollman et al., 1999), 혈압강화작용 (Hollman et al., 1999; Friedman, 2007), 면역력 향상

(Scalbert et al., 2005) 등의 기능성을 가진 것으로 밝혀졌다.

본 실험에 사용된 melan-a 세포는 C57BL/6 마우스로부터 유래된 검은 멜라닌 색소를 함유하고 장기간 계대가 가능하며 tyrosinase 효소량이 풍부해 멜라닌 합성이 활발하여 피부착색 연구에 많이 이용되고 있다 (Ko et al., 2010, 2011). 본 연구는 발효차인 홍차 열수추출물의 항산화능을 알아보고, melan-a 세포를 사용하여 멜라닌 합성 저해능, tyrosinase 활성 저해능 및 발현 저해능 등에 대한 실험을 통해 홍차 열수추출물의 피부미백 효능과 작용기전을 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

Dimethyl sulfoxide (DMSO), 2,6-di-tert-butylated hydroxytoluene (BHT), 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH), 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), tannic acid, L-tyrosine, ascorbic acid, diethylene glycol reagent는 Sigma 사 (USA), rutin은 ACROS 사 (USA)의 제품을 사용하였으며, 그 외 일반시약들은 특급품을 사용하였다. 실험 기기 중 시료추출은 초고속 감압 저온 추출기 (COSMOS-660, 경서 기계 산업, 한국)를 사용하였고, 세포주 배양은 CO<sub>2</sub> incubator (MCO-15AC, SANYO electric, Japan)를, 세포주 관찰은 inverted microscope (CKX41, Olympus, Japan)를 사용하였다.

### 2. 시료 조제

홍차를 600 g을 구입하여 증류수 6 L를 첨가하여 초고속 감압 저온 추출기로 2시간 정도 열수추출한 후 농축 용기에 담아 2 L로 농축하였다. 동결건조시켜 측정할 홍차 열수추출물의 수율 (yield)은 20%였다.

### 3. 중금속 성분 함량

중금속 성분의 함량은 식품공전의 미량성분 시험법 (KFDA, 2011)에 의하여 측정하였다. 홍차 열수추출물 동결건조 분말을 회화용기에 일정량 취하여 건식분해하여 ICP-MS (ELAN 9000, Perkin Elmer, USA)와 수은자동분석기 (MA-2, NIC, Japan)로 분석하였다.

### 4. In vitro 항산화능 실험

#### 1) 총 폴리페놀 함량

총 페놀화합물 함량은 Folin-Denis법 (Folin and Denis, 1912)에 의해 비색 정량하였다. 시료 1 mL에 folin-reagent 1 mL를 가하여 3분간 정지한 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL를 혼합하고

1시간 실온에서 방치하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량곡선은 tannic acid를 이용하여 작성하였다.

## 2) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Davis 변법(AOAC, 1995)을 이용하였다. 시료 용액 1 mL에 diethylene glycol reagent 10 mL 및 1 N NaOH 1 mL를 가하여 잘 혼합한 다음 37°C 수욕상에서 1시간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량곡선은 rutin을 이용하여 작성하였다.

## 3) 전자공여능

홍차 열수추출물에 대한 전자공여능은 Blois의 방법(Blois, 1958)으로 측정하였다. 동결 건조시킨 홍차 열수추출물의 분말을 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 µg/mL의 농도로 DMSO에 녹여 제조하고 1 mL를 test tube에 취하여  $4 \times 10^{-4}$  M의 DPPH 용액 4 mL를 가하여 60°C 수욕상에서 10초간 진탕하고 실온에서 20분 동안 방치한 후에 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물 무 첨가구에는 시료 대신 ethanol 1 mL를 첨가하여 동일하게 실험하고 추출물 첨가구에 대한 흡광도의 감소비율로 전자공여능을 나타내었다. 양성대조군으로 합성 항산화제인 BHT를 동일한 방법으로 실험하였다.

## 5. In vitro 세포주 실험

### 1) 세포주

C57BL/6 마우스에서 유래한 immortalized cell line인 melan-a 세포는 Dr. Bennett (Cancer Research Center, London, England)에게 분양 받아 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% P/S (penicillin/streptomycin), 200 nM TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)가 함유된 RPMI-1640 배지를 사용하여 37°C, 10% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 배양하였다.

### 2) MTT assay

Melan-a 세포를 10% FBS, 1% P/S, 200 nM TPA가 함유된 RPMI-1640 배지에 풀어 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 동안 안정화 시킨 후 실험에 사용하였다. Melan-a 세포를 96-well plate에 적정세포수 ( $0.5 \times 10^4$  cells/well)로 분주하고 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 다음 홍차 열수추출물을 농도별 (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL)로 희석시켜 200 µL씩 처리한 후 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양하였다. Plate를 1,000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 PBS로 1회 washing하고 MTT가 0.5 mg/mL 함유된 배지를 200 µL씩 넣은 후 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 3시간 배양하였다. Plate를 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 cell이 바닥에 가라앉게 한 다음 배지를 버리고 DMSO를 200 µL씩 넣고 plate shaker에서 15분간 cell을 녹여낸 다음 ELISA reader로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) 멜라닌 합성 저해능

Melan-a 세포를 10% FBS, 1% P/S, 200 nM TPA가 함유된 RPMI-1640 배지에 풀어 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 동안 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. Melan-a 세포를 96-well plate에 적정세포수 ( $2 \times 10^4$  cells/well)로 분주하고 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 다음 홍차 열수추출물을 농도별 (3.125, 6.25, 12.5, 25 µg/mL)로 희석시켜 500 µL씩 넣어 1차 물질 처리를 가하고 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 배양한 후 다시 2차 물질 처리와 72시간 배양한 후 1 N NaOH 용액을 100 µL씩 처리하여 멜라닌을 용해시켜 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4) Intra-cellular tyrosinase 활성 저해능

Melan-a 세포를 10% FBS와 1% P/S, 200 nM TPA가 함유된 RPMI-1640 배지에 풀어 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 동안 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. Melan-a 세포를 둥근 60φ cell culture dish에 적정세포수 ( $4 \times 10^5$  cells/well)로 분주하고 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양한 다음 홍차 열수추출물을 농도별 (3.125, 6.25, 12.5, 25 µg/mL)로 희석시켜 5 mL씩 넣고 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 얼음 위에 얹은 채로 1% triton X-100 용액을 200 µL씩 처리하여 용해시킨다. 그 후 e-tube에 옮겨 담고 4°C를 유지한 상태에서 10분 간격으로 vortex하면서 1시간가량 방치한 다음 4°C 14,000 rpm에서 20분간 원심분리한 상층액을 tyrosinase 활성 측정 용액으로 사용하였고 protein assay 용액 (Bio Rad, USA)으로 흡광도를 측정, 동량의 단백질 양을 계산하였다. 단백질 40 µg을 포함한 cell extract와 시험 물질을 총 100 µL가 되게 섞은 후 L-DOPA를 100 µL씩 처리한 다음 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에 넣고 490 nm에서 60분 후에 흡광도의 변화를 측정하였다.

### 5) Cell-extracted tyrosinase 활성 저해능

Melan-a 세포를 10% FBS와 1% P/S, 200 nM TPA가 함유된 RPMI-1640 배지에 풀어 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 동안 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. Melan-a 세포를 둥근 60φ cell culture dish에 적정세포수 ( $4 \times 10^5$  cells/well)로 분주하고 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 배양한 다음 PBS로 세척한 다음 얼음 위에 얹은 채로 1% triton X-100 용액을 200 µL씩 처리하여 용해시킨다. 그 후 e-tube에 옮겨 담고 4°C를 유지한 상태에서 10분 간격으로 vortex하면서 1시간가량 방치한 다음 4°C 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액 50 µL, 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) 49 µL, 홍차 열수추출물을 농도별 (3.125, 6.25, 12.5, 25 µg/mL)로 1 µL를 혼합한 후 1시간 동안 방치하였다. 여기에 L-DOPA를 100 µL씩 처리한 다음 37°C, 10% CO<sub>2</sub> incubator에 넣고 490 nm에서 60분 후에 흡광도의

**Table 1.** Nucleotide sequence of the primers and expected size of PCR products

Items	Primers	Expected size (bp) <sup>1)</sup>	
Tyrosinase	F <sup>2)</sup> (5'→3') R <sup>3)</sup> (5'→3')	CAT TTT TGA TTT GAG TGT CT TGT GGTAGT CGT CTT TGT CC	1192
TRP-1 <sup>4)</sup>	F (5'→3') R (5'→3')	GCT GCAGGA GCC TTC TTT CTC AAG ACGCTG CAC TGC TGG TCT	268
TRP-2 <sup>5)</sup>	F (5'→3') R (5'→3')	GGA TGACCG TGA GCA ATG GCC CGG TTGTGA CCA ATG GGT GCC	1044
MITF-M <sup>6)</sup>	F (5'→3') R (5'→3')	TAC AGA AAG TAG AGG GAG GAG GAC TAAG CAC AGT TGG AGT TAA GAG TGA GCA TAG CC	326
β-Actin	F (5'→3') R (5'→3')	ACCGTG AAA AGA TGA CCC AG TACGGA TGT CAA CGT CAC AC	528

<sup>1)</sup>bp: basepair; <sup>2)</sup>F: forward; <sup>3)</sup>R: reverse; <sup>4)</sup>TRP-1: tyrosinase-related protein-1; <sup>5)</sup>TRP-2: tyrosinase-related protein-2; <sup>6)</sup>MITF-M: microphthalmia-associated transcription factor-M

변화를 측정하였다.

#### 6) Western blotting assay

시료를 처리하여 배양한 melan-a 세포를 1% Nonidet P-40, 0.01% SDS 및 protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany)을 함유한 0.1 M Tris-HCl (pH 7.2) 완충용액에서 초음파 처리하여 세포용해물 (lysate)을 만들었다. 세포 용해물의 단백질 농도는 혈청 알부민을 표준물질로하여 Pierce protein assay kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA)를 사용하여 측정하였다. 단백질 10 µg을 10% polyacrylamide 겔에서 전기영동법으로 분리한 후, 니트로셀룰로오스 막에 blotting하여 Dr. Vincent J. Hearing으로부터 제공받은 PEP7 (1 : 10000 희석, anti-tyrosinase), PEP1 (1 : 10000 희석, anti-TRP1), PEP8 (1 : 10000 희석, anti-TRP2)을 첨가하여 배양하였다. 그 다음, membrane을 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1 : 1000 희석 Amersham, Bucks, UK)를 첨가하여 배양하였다. Immunoreactive band는 ECL Western blotting detection reagents (Amersham, Bucks, UK)를 사용하여 chemiluminescence에 의해 검출하였다.

#### 7) RT-PCR assay

Total RNA는 제조사에서 제공된 지시에 따라 Trizol-Reagent (Invitrogen, aylsbad, CA)를 이용해 분리하였다. Total RNA 5 µg을 40 µL 용량에서 M-MLV RT 5× 배지의 8 µL, 10 mM dNTPs의 3 µL, 10,000 U RNase inhibitor 0.45 µL, 50,000 U M-MLV 역전사효소 (Promega, Madison, USA) 0.3 µL 그리고 50 pmol/µL oligo dT (Bioneer, Chungbuk, Korea) 1.5 µL를 이용해 역전사하였다. Single stranded cDNA는 5 × green Go Taq flexi buffer 4 µL, 10 mM dNTPs 0.4 µL, 500 U Taq polymerase 0.1 µL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega, Madison, USA) 1.2 µL와 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF-M, β-Actin의 specific sense와 antisense primer의 각각 20 pmol/L 0.4 µL를 사용하여 PCR로 증폭하였다. PCR에 사용한 primer

**Table 2.** Heavy metal contents for black tea water extract

Sample	Constituents			
	Pb	As	Hg	Cd
Black tea water extract	0.935	0.102	N.D*	0.016

\*Non-Detected. Unit: ppm

Maximum permissible level (KFDA): Pb 5 ppm, As 3 ppm, Hg 0.2 ppm, Cd 0.3 ppm

sequences와 expected size는 Table 1과 같다. Primer는 내부 표준물질로 β-Actin (51°C, 30 cycle), 실험물질로 tyrosinase (56°C, 28 cycle), TRP-1 (56°C, 28 cycle), TRP-2 (64°C, 28 cycle), MITF-M (54°C, 30 cycle)을 사용하였다. PCR 산물을 1.2% agarose gel에 전기영동시킨 후 분석하였다.

## 결 과

### 1. 중금속 함량

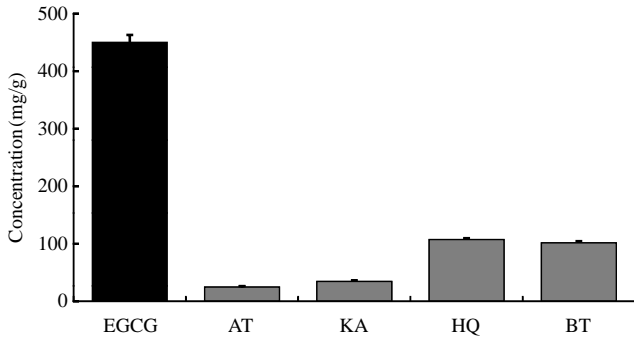
홍차 열수추출물의 중금속 성분 함량은 납이 0.935 ppm, 비소가 0.102 ppm, 카드뮴이 0.016 ppm, 수은은 불검출 되어 모두 한국식품의약품안전청 기준치 이하로 나타나 화장품 소재로 사용이 가능하였다.

### 2. 총 폴리페놀 함량

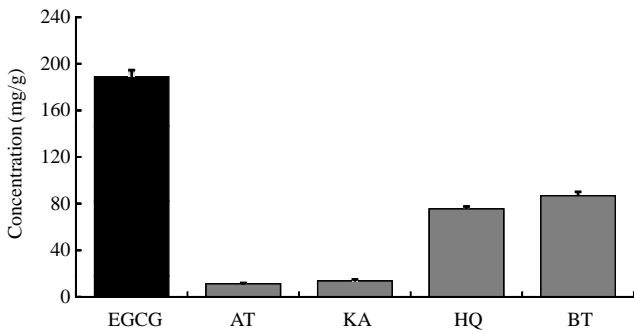
차류의 지표 성분으로 알려진 EGCG는 450.2 mg/g으로 매우 높았으며, 홍차 열수추출물은 101.5 mg/g이었다. 합성 미백제인 알부틴, 코직산, 하이드로퀴논은 각각 24.6, 34.4, 107.3 mg/g이었다.

### 3. 총 플라보노이드 함량

EGCG가 188.9 mg/g으로 가장 높았고, 홍차 열수추출물



**Fig. 1.** Total polyphenol contents of test compounds. Values are mean  $\pm$  SD of 3 measurements. EGCG: epigallocatechin gallate, AT: arbutin, KA: kojic acid, HQ: hydroquinone, BT: black tea.



**Fig. 2.** Total flavonoid contents of test compounds. Values are mean  $\pm$  SD of 3 measurements.

은 86.7 mg/g이었다. 알부틴, 코직산, 하이드로퀴논은 각각 11.1, 13.6, 75.4 mg/g이었다.

4. 전자공여능

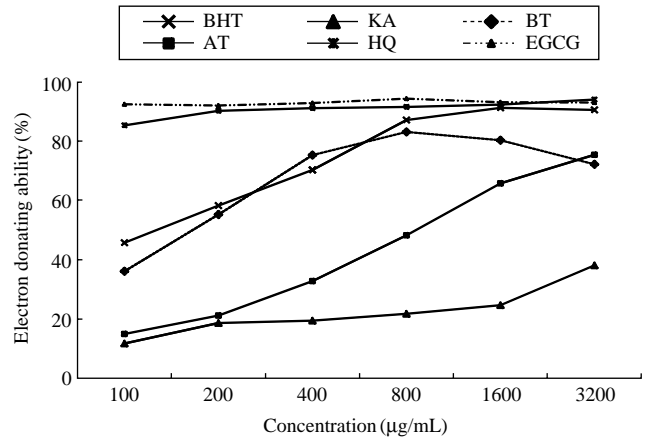
800  $\mu$ g/mL 농도에서 EGCG와 양성대조군인 BHT는 각각 94.2, 85.5%였고, 홍차 열수추출물은 81.7%였다. 알부틴, 코직산, 하이드로퀴논은 각각 48.2, 21.8, 91.4%였다.

5. MTT assay

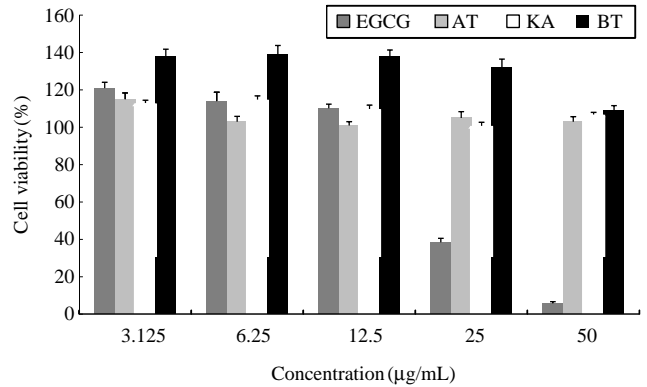
알부틴, 코직산, 홍차 열수추출물 처치군은 50  $\mu$ g/mL에서 모두 100% 이상의 성장율을 보여 melan-a 세포에 대해 독성이 미미한 것으로 나타났으며, 최대허용농도 (maximum permissible level, MPL)는 50  $\mu$ g/mL 이상으로 확인되었다. 반면, EGCG 처치군은 12.5, 25  $\mu$ g/mL에서 각각 110.2, 38.5% 성장율을 보여 최대허용농도는 12.5  $\mu$ g/mL인 것으로 확인되었다.

6. 세포의 형태 관찰

Melan-a 세포의 형태학적 관찰에서 시료를 처치하지 않



**Fig. 3.** Electron donating abilities of test compounds. Values are mean of 3 measurements. BHT: 2,6-di-tert-butylate hydroxytoluene.

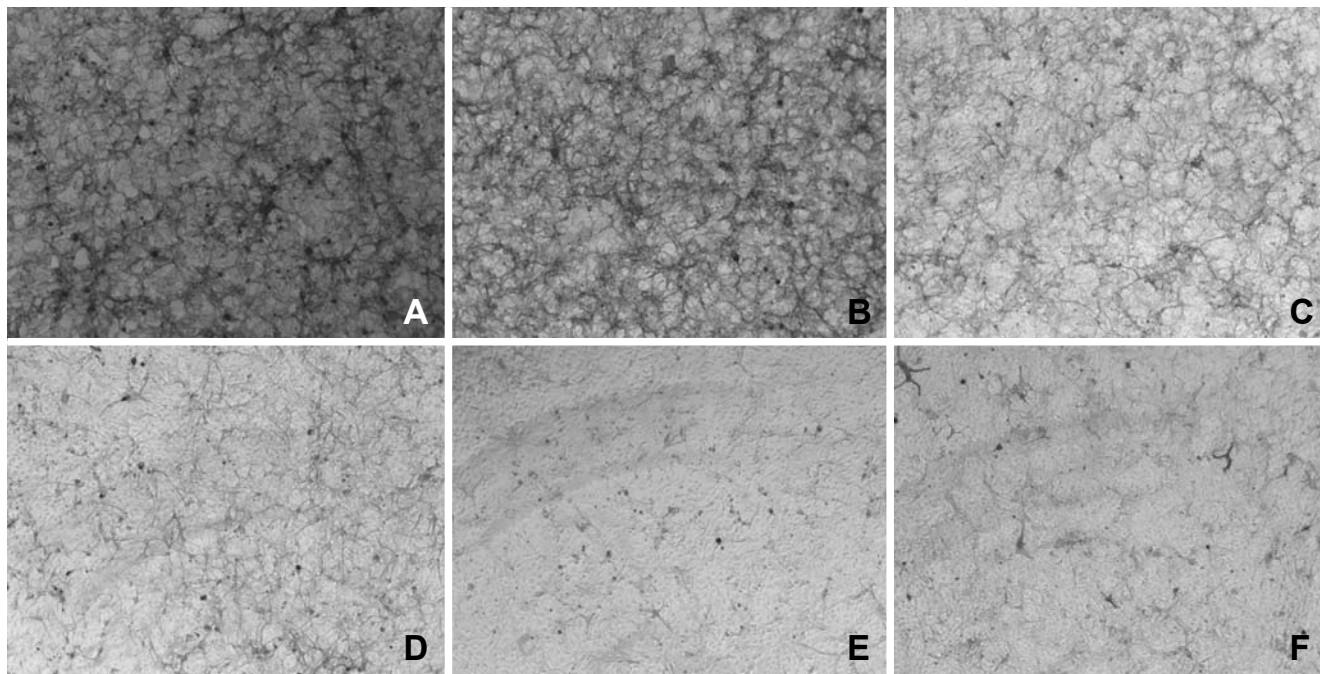


**Fig. 4.** Cell viabilities of test compounds in melan-a cells. Values are mean  $\pm$  SD of 3 measurements.

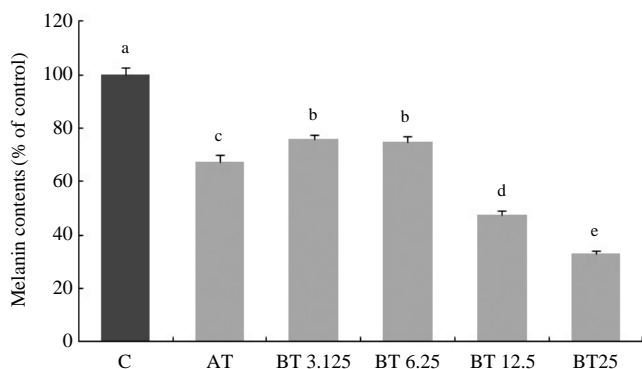
은 대조군은 수지상 돌기의 발달과 함께 멜라닌 합성이 많이 되어 검게 보였으며, 홍차 열수추출물 처치군은 대조군에 비해 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 억제되어 희게 관찰되었다. 멜라닌 색소 침착 정도와 수지상 돌기의 발달은 코직산 > EGCG > 알부틴 > 홍차 열수추출물 처치군 순으로 높게 나타났다.

7. 멜라닌 합성 저해능

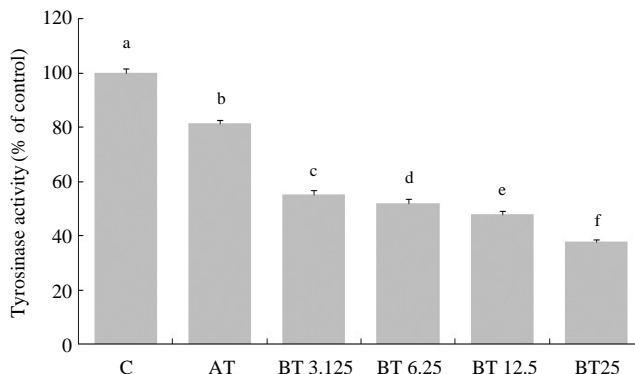
멜라닌 합성 저해능을 알아보기 위해 melan-a 세포에 홍차 열수추출물을 농도별로 처리 한 후 멜라닌의 양을 측정하였다. 시료를 처치하지 않은 대조군과 비교할 때 양성 대조군인 알부틴 처치군은 25  $\mu$ g/mL에서 멜라닌 합성저해능이 32.7% 유의하게 ( $p < 0.001$ ) 높았고, 홍차 열수추출물 처치군은 3.125, 6.25, 12.5, 25  $\mu$ g/mL 농도에서 각각 24.3, 25.0, 52.3, 66.9% 유의하게 ( $p < 0.001$ ) 높았다.



**Fig. 5.** Morphological observation of melan-a cells treated with test compounds.  $\times 200$ . A: control B: kojic acid 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , C: EGCG 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , D: arbutin 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , E: black tea 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , F: black tea 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Fig. 6.** Inhibitory effects of test compounds on melanin synthetic abilities in melan-a cells. Values are mean  $\pm$ SD of 3 measurements. Different values are significantly ( $p < 0.001$ ) different by ANOVA and Duncan's multiple range tests. Treated concentration for AT is 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and those for BT are from 3.125 to 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



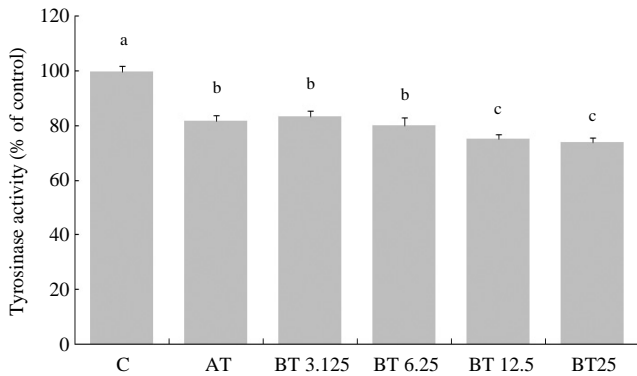
**Fig. 7.** Inhibitory effects of test compounds on intra-cellular tyrosinase activities in melan-a cells at 60 minutes after treatment. Values are mean  $\pm$ SD of 3 measurements. Different values are significantly ( $p < 0.001$ ) different by ANOVA and Duncan's multiple range tests. Treated concentration for AT is 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and those for BT are from 3.125 to 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

8. Intra-cellular tyrosinase 활성 저해능

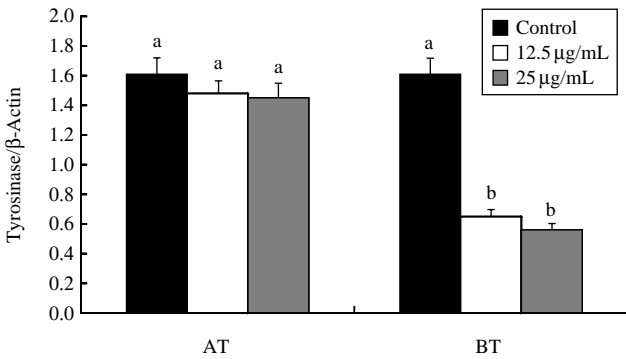
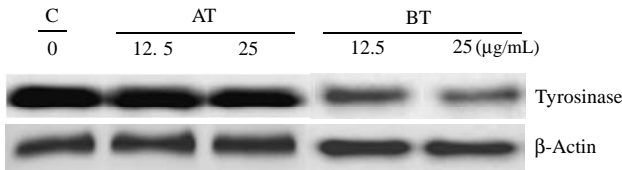
멜라닌 세포에 시료를 처리하여 tyrosinase 활성 저해능을 측정하고 결과 홍차 열수추출물 처리군은 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 3.125, 6.25, 12.5, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각 45.0, 47.9, 52.2, 62.4% 유의하게 ( $p < 0.001$ ) 높았고, 양성대조군인 알부틴 처리군은 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 18.7% 유의하게 ( $p < 0.001$ ) 높았다.

9. Cell-extracted tyrosinase 활성 저해능

세포 추출물에 홍차 열수추출물을 처리하여 tyrosinase 활성 저해능을 측정하고 결과 홍차 열수추출물 처리군은 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 3.125, 6.25, 12.5, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각 16.4, 19.8, 24.8, 25.8% 유의하게 ( $p < 0.001$ ) 높았고, 양성대조군인 알부틴 처리군은 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 18.0% 유의하게 ( $p < 0.001$ ) 높았다.



**Fig. 8.** Inhibitory effects of test compounds on cell-extracted tyrosinase activities in melan-a cells at 60 minutes after treatment. Values are mean  $\pm$  SD of 3 measurements. Different values are significantly ( $p < 0.001$ ) different by ANOVA and Duncan's multiple range tests. Treated concentration for AT is 25  $\mu$ g/mL and those for BT are from 3.125 to 25  $\mu$ g/mL.



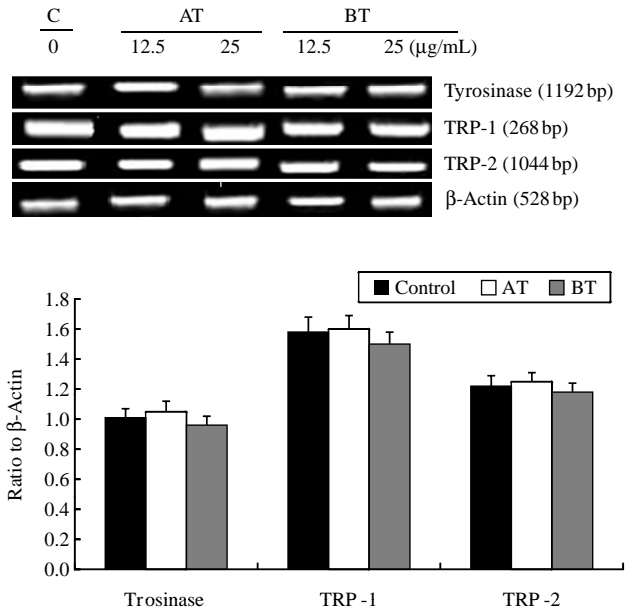
**Fig. 9.** Effects of test compounds on tyrosinase protein expression in melan-a cells. Values are mean  $\pm$  SD of 3 measurements. Different values are significantly ( $p < 0.001$ ) different by ANOVA and Duncan's multiple range tests.

10. Tyrosinase 단백질 발현

양성대조군인 알부틴은 tyrosinase 단백질 발현에 유의한 영향을 미치지 않았고 홍차 열수추출물 처치군은 시료를 처치하지 않은 대조군에 비해 12.5, 25  $\mu$ g/mL 농도에서 각각 59.7, 65.3% 유의하게 ( $p < 0.001$ ) 저해시켰다.

11. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA 발현

홍차 열수추출물과 양성대조군인 알부틴 모두 tyrosinase,



**Fig. 10.** Effects of test compounds on mRNA expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in melan-a cells. Values are mean  $\pm$  SD of 3 measurements. Treated concentration is 25  $\mu$ g/mL.

TRP-1, TRP-2 mRNA 발현에 영향을 미치지 않았다.

고찰

피부에 과도한 자외선의 노출은 다량의 활성산소종(ROS)을 생성하여 멜라닌세포를 자극시켜 tyrosinase의 활성을 높임으로써 과다 색소침착을 일으키고, 아울러 세포의 산화적 손상을 초래하여 지질과산화, 항산화효소 활성 저해 및 암 등을 유발시킨다(Zhaorigetu et al., 2003). 최근의 연구보고에 의하면, 식물에서 정제한 천연추출물들은 페놀류를 비롯한 플라보노이드류, 테펜류 등 다양한 화합물을 함유하고 있어 DPPH 라디칼 소거능이나 SOD 유사활성과 같은 항산화효과를 비롯하여 항균, 항암작용에 탁월한 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다(Hah et al., 2005; Gates et al., 2007). 페놀성 화합물은 천연물에 많이 함유되어 있는 성분으로 자유 라디칼을 소거하는 역할을 하며, 페놀성 화합물인 플라보노이드나 페놀산 및 안토시아닌 등의 총량인 총 페놀화합물은 DPPH 라디칼 소거활성과 같은 항산화 활성에 주요한 인자로 작용한다(Jeong et al., 2009). DPPH는 안정한 라디칼을 갖는 물질로서 항산화 물질과 만나면 라디칼이 소거·탈색되어 항산화 활성을 검증하는 데 사용된다. 본 연구에서 DPPH 라디칼 소거능 측정으로 전자공여능을 알아본 결과 800  $\mu$ g/mL 농도에서 홍차 열수추출물은 81.7%로 EGCG (94.2%), BHT (85.5%) 보다 다소 낮았으나 알부틴 (48.2%) 보다는 월등히 높게 나타나 우수한 항산화능이 확인되었다.

최근의 연구에서 홍차 추출물이 BHT보다도 전자공여능이 높게 나타났다는 보고도 있다(Kang, 2011).

차잎 중에는 폴리페놀 성분이 10~25%로 비교적 많이 함유되어 있으며, 폴리페놀은 항산화작용과 과산화지질 생성 억제에 의한 노화방지 등 다양한 생리활성이 있는 것으로 알려져 있다(Amarowicz et al., 1995). 홍차와 오롱차는 제조공정 중에 카테킨류가 polyphenol oxidase의 작용에 의해 산화, 축합으로 특유한 적홍색이나 빨간색의 폴리페놀을 갖는다(Lee & Son, 2002). 또한 토코페롤, 아스코르브산 및 각종 유기산과의 상승작용 및 갈색화 반응 생성물도 항산화작용을 나타낸다고 보고된 바 있다(Son & Kim, 1994). 플라보노이드는 폴리페놀성 2차 대사산물로서 불포화 지방산의 자동산화 과정 중 발생하는 peroxy radical과 반응하여 사슬 반응을 종료시킴으로써 항산화 작용을 나타낸다(Kim et al., 2009). 본 연구에서 홍차 열수추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 101.5, 86.7 mg/g로 나타나 양성대조군으로 사용한 알부틴(24.6, 11.1 mg/g)에 비해 월등히 높게 나타났다. 알부틴은 캘리포니아 Buckeye 과일로부터 분리한 하이드로퀴논의 천연  $\beta$ -배당체로서, 알부틴의 더욱 강력한 합성  $\alpha$ -배당체형 및 합성 디옥시알부틴은 매우 효과적인 tyrosinase 억제제이며 하이드로퀴논과 비교할 때, 디옥시알부틴은 더 지속적인 탈색을 유발하고 자극성이 약한 것으로 알려져 있어(Battaini et al., 2000), 알부틴은 미백 연구에서 양성대조군으로 많이 사용되고 있다.

홍차 열수추출물이 우수한 항산화능을 지닌 것으로 확인되어 melan-a 세포주를 사용하여 멜라닌합성 저해능을 평가하였다. MTT assay법은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 시약이 세포내로 흡수된 후 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase에 의해 formazan을 형성하는데 이 물질의 세포내 축적은 미토콘드리아의 활성, 넓게는 세포의 활성을 의미하는 것으로서 세포의 생장율을 측정하는 대표적인 방법이다. 본 연구에서 홍차 열수추출물과 알부틴 처치군은 50  $\mu$ g/mL에서 모두 100% 이상의 생장율을 보여 melan-a 세포에 대해 독성이 미미하였으며, 최대허용농도는 50  $\mu$ g/mL 이상으로 확인되었다. 반면, 차류 지표성분으로 사용되고 있는 EGCG의 최대허용농도는 12.5  $\mu$ g/mL으로 나타나 melan-a 세포에 대해 독성이 있는 것으로 확인되었다.

세포의 형태와 멜라닌 생성 정도를 도립현미경으로 관찰한 결과, 시료를 처치하지 않은 대조군은 수지상 돌기가 발달하였고 멜라닌 합성 증가로 검게 보였으며, 홍차 열수추출물 처치군은 멜라닌 합성과 수지상돌기 발달에 높은 억제 효능을 보여 희게 관찰되었다. 멜라닌 색소 침착 정도와 수지상 돌기의 발달은 코직산>EGCG>알부틴>홍차 열수추출물 처치군 순으로 높게 나타나 홍차 열수추출물이 멜라닌 합성 저해능이 탁월한 것으로 확인되었다.

멜라닌 합성 저해능을 보다 객관적으로 확인하기 위하여 홍차 열수추출물을 25  $\mu$ g/mL 이하로 농도별로 처치 한 후 멜라닌의 양을 측정된 결과, 25  $\mu$ g/mL 농도에서 홍차 열수추출물 처치군은(66.9%)은 양성대조군인 알부틴(32.7%)보다 유의하게( $p < 0.001$ ) 높았다. 이러한 멜라닌 합성 저해능이 tyrosinase 활성 저해능에 기인하는지를 확인하기 위해 tyrosinase 활성을 측정하였다. 세포내 tyrosinase 활성 저해능의 경우, 25  $\mu$ g/mL 농도에서 홍차 열수추출물 처치군(62.4%)은 양성대조군인 알부틴(18.7%)보다 유의하게( $p < 0.001$ ) 높았고, 세포 추출물을 이용한 tyrosinase 활성 저해능도 25  $\mu$ g/mL 농도에서 홍차 열수추출물 처치군(25.8%)은 양성대조군인 알부틴(18.0%)보다 유의하게( $p < 0.001$ ) 높은 수치를 보여 홍차 열수추출물이 tyrosinase 활성을 억제시켜 멜라닌 합성을 감소시킴을 확인할 수 있었다.

홍차 열수추출물의 멜라닌 합성 저해 기전을 추가적으로 확인하기 위해 멜라닌 합성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase 효소의 단백질 발현정도를 western blotting을 이용하여 확인하였다. 양성대조군인 알부틴은 tyrosinase 단백질 발현에 유의한 영향을 미치지 않았고 홍차 열수추출물 처치군은 시료를 처치하지 않은 대조군에 비해 12.5, 25  $\mu$ g/mL 농도에서 각각 59.7, 65.3% 유의하게( $p < 0.001$ ) 저해시켰다.

멜라닌 합성 저해 기전을 유전자 수준에서 알아보기 위해 멜라닌 합성 주요 관련 효소인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2에 대한 유전자 발현 정도를 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. TRP-1과 TRP-2는 tyrosinase와 40~45%의 아미노산의 동질성을 지니고 있으며, tyrosinase의 기능을 안정화시킴으로써 멜라닌 생성에 중요한 역할을 담당한다(Land & Riley, 2000). 홍차 열수추출물과 알부틴 모두 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA 발현에 영향을 미치지 않았다. 이와 같은 결과는 홍차 열수추출물이 멜라닌세포에서 tyrosinase 생합성을 저해시키기 보다는 tyrosinase 단백질 발현량을 줄이고 tyrosinase 활성을 감소시켜 멜라닌 합성을 저해시키는 것으로 사료된다. 본 연구를 통하여, 홍차 열수추출물은 항산화능이 우수하고 melan-a 세포에 낮은 독성을 보였으며 멜라닌 합성 저해능을 확인함으로써 미백 화장품 천연물 소재로서 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Amarowicz R, Shahidi F: Antioxidant activity of green tea catechins in a beta-carotene-linoleate model system. *J Food Lipids* 2 : 47-56, 1995.
- AOAC: Association of official analytical chemists official methods of analysis (12th). Washington DC, AOAC, 1995.
- Battaini G, Monzani E, Santagostini L, Pagliarini R: Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes



- by kojic acid. *J Biol Inorg Chem* 5(2) : 262-268, 2000.
- Blois MS: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181 : 1199-1200, 1958.
- Folin O, Denis W: On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biochem Chem* 12 : 239-249, 1912.
- Friedman M: Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol Nutr Food Res* 51(1) : 116-134, 2007.
- Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, Vivo ID, Rosner B, Hankinson SE: A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 121(10) : 2225-2232, 2007.
- Hah DS, Kim CH, Kim GS, Kim EG, Kim JS: Antioxidant effects of traditional medicinal plants on lipid peroxidation. *Kor J Ver Res* 45(3) : 341-350, 2005.
- Hollman PC, Feskens EJ, Katan MB: Tea flavonols in cardiovascular epidemiology. *Proc Soc Exp Biol & Med* 220(4) : 198-202, 1999.
- Imokawa G, Mishima Y: Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by properties in tyrosinases induced by glucosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res* 42(5) : 1994-2002, 1982.
- Jeong CH, Kang ST, Joo OS, Lee SC, Shin YH, Shim KH, Cho SH, Choi SG, Heo HJ: Phenolic content, antioxidant effect and acetylcholinesterase inhibitory activity of korean commercial green, puer, oolong, and black teas. *Kor J Food Preserv* 16(2) : 230-237, 2009. (Korean)
- Kang KO: Physiological and antioxidant activities of green, oolong and black tea extracts. *J East Asian Soc Dietary Life* 21(2) : 243-249, 2011. (Korean)
- KFDA: Examination methods for trace elements (Official Law of Food 2011-32). Seoul, KFDA, 2011. (Korean)
- Ko JA, Lee JS, Kim YC: The antioxidative ability and melanin synthesis-promoting ability of *Epimedium koreanum* water extract in vitro test. *J Cosmetol Sci* 6(3) : 279-286, 2010. (Korean)
- Ko JA, Park EY, Kim SN, Kim YC: The effect of *Epimedium koreanum* water extract on the enzymes and factor relevant to melanin synthesis in vitro test. *J Invest Cosmetol* 7(1) : 45-52, 2011. (Korean)
- Land EJ, Riley PA: Spontaneous redox reactions of dopaquinone and the balance between the eumelanin and pheomelanin pathways. *Pigment Cell Res* 13 : 273-277, 2000.
- Lee HS, Son JY: Antioxidant and synergist effect of extract isolated from commercial green, oolong and black tea. *Kor J Food & Nutr* 15(4) : 377-381, 2002. (Korean)
- Lopez J, Tudela R, Varon F, Carmona G, Canovas FG: Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J Biol Chem* 267 : 381-390, 1992.
- Olivares C, Solano F: New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell Melanoma Res* 22(6) : 750-760, 2009.
- Ortonne JP, Passeron T: Melanin pigmentary disorders: treatment update. *Dermatol Clin* 23(2) : 209-226, 2005.
- Rhi JW, Shin HS: Antioxidant effect of aqueous extract obtained from green tea. *Kor J Food Sci Technol* 25 : 759-763, 1993.
- Scabert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L: Dietary polyphenols and the prevention of disease. *Crit Rev Food Sci & Nutr* 45(4) : 287-306, 2005.
- Son JY, Kim DH: Effects of caffeic acid on the antioxidant activity of Maillard reaction products. *Food Biotechnol* 3 : 144, 1994.
- Tinahones FJ, Rubio MA, Garrido-Sanchez L, Ruiz C, Gordillo E, Cabrerizo L, Cardona F: Green tea reduces LDL oxidability and improves. *J Am Coll Nutr* 27(2) : 209-213, 2008.
- Yamamoto M, Sano M, Matsuda N, Miyase T, Kawamoto K, Suzuki N, Yoshimura M, Tachibana H, Hakamata K: The change of epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl) gallate content in tea of different varieties, tea of crop and processing method. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 48 : 64-68, 2001.
- Zhaorigetu S, Yanaka N, Sasaki M, Watanabe H, Kato N: Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse. *J Photochem Photobiol B: Biol* 71 : 11-17, 2003.

#### < 국문초록 >

홍차 열수추출물의 멜라닌 합성 저해능과 작용기전을 알아보기 위해 in vitro 실험으로 항산화능을 확인한 후, melan-a 세포를 사용하여 멜라닌 합성 저해능, tyrosinase 활성 저해능 및 발현 저해능 등에 대한 실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다. (1) 항산화능 실험에서 홍차 열수추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 각각 102, 87 mg/g으로 양성대조군인 알부틴 (25, 11 mg/g)보다 높았고, 전자공여능 역시 800 µg/mL에서 82%로 알부틴 (48%)보다 높았다. (2) Melan-a 세포 실험에서 홍차 열수추출물은 수지상돌기의 발달과 멜라닌 생합성을 효과적으로 저해하였고, 멜라닌 합성 저해능과 tyrosinase 활성 저해능이 알부틴보다 유의하게 ( $p < 0.001$ ) 높았다. (3) Tyrosinase 단백질 발현 저해능 실험에서 알부틴은 발현에 유의한 영향을 미치지 않은 반면, 홍차 열수추출물은 발현을 유의하게 ( $p < 0.001$ ) 저해하였다. (4) 유전자 발현 저해능 실험에서 알부틴과 홍차 열수추출물 모두 tyrosinase, TRP-1과 TRP-2의 mRNA 발현에 영향을 미치지 않았다. 본 연구를 통하여, 홍차 열수추출물은 우수한 항산화능과 함께 멜라닌 합성 저해능을 확인하였으며, 이는 tyrosinase의 생합성을 저해시키기 보다는 tyrosinase 단백질 발현량을 줄이고 tyrosinase 활성을 감소시킴으로써 멜라닌 합성을 저해시키는 것으로 사료된다.