

갈만 추출물의 미백활성 및 기전 연구

김다은¹ · 황연실¹ · 장보윤¹ · 한지혜¹ · 김대성² · 김혜수² · 조형권² · 김성연^{1*}

¹원광대학교 약학대학 약품연구소, ²한풍제약

Whitening Effect and Mechanism of Aerial Part of *Pueraria lobata*

Da Eun Kim¹, Yeon Sil Hwang¹, Bo Yoon Chang¹, Ji Hye Han¹, Dae Sung Kim², Hye Soo Kim²,
Hyoung Kwon Cho² and Sung Yeon Kim^{1*}

¹Institute of Pharmaceutical Research and Development, College of Pharmacy, Wonkwang University,
460 Ikandae-ro, Iksan 570-749, Jeollabuk-do, Korea

²Hanpoong Pharm. CO., Ltd, 333-24 1st Palbok-dong, Deokjingu, Jeonju 561-841, Jeonbuk, Korea

Abstract – The purpose of this study was to evaluate the whitening effect of aerial part of *Pueraria lobata* and mechanisms. Aerial part of *Pueraria lobata*, dose-dependently reduced the melanin content. Aerial part of *Pueraria lobata*, significantly decreased cellular tyrosinase activity, while there was not any effect on tyrosinase in cell-free conditions. To elucidate the mechanisms behind the aerial part of *Pueraria lobata*, treated melanogenesis regulation, the expressions of melanogenesis related genes, proteins, and the activity of α -glucosidase were determined. Aerial part of *Pueraria lobata*, significantly inhibited gene and protein levels of MITF, tyrosinase and TRP-1. It suppressed the α -glucosidase, leading to inhibition on the maturation of tyrosinase. Also aerial part of *Pueraria lobata*, was observed to have the high antioxidant activity. These results suggested that whitening effect of aerial part of *Pueraria lobata*, should be due to the down-regulation of MITF, tyrosinase and TRP-1 expression and the intercepting maturation of tyrosinase through suppressing α -glucosidase. Another should be the high antioxidant activity. The findings show the possibility that aerial part of *Pueraria lobata*, can be used as a potential skin-whitening agent.

Key words – Aerial part of *Pueraria lobata*, Whitening, Antioxidant, Tyrosinase, Glucosidase

멜라닌은 동물, 식물에 널리 분포하는 페놀류 고분자화합물로 피부와 머리카락의 색상을 결정하는 주요인자이다. 일반적으로 멜라닌은 자외선이나 자유 라디칼과 같은 외부 자극 요인으로부터 피부 세포의 손상을 억제하기 위해 만들어진다.^{1,2)} 멜라닌이 과도하게 합성되면 피부 표면에 침착되어 기미, 주근깨 등 다양한 색소 침착을 유발하고 피부 노화를 촉진시킨다.³⁾

멜라닌은 tyrosine을 기질로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1(TRP-1), tyrosinase related protein-2(TRP-2)에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)와 DOPA quinone, DOPA chrome을 거쳐 생성된다. 따라서 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase, TRP-1과 TRP-2 활성 억제는 매우 중요한 부분이다.^{4,5)}

Kojic acid, hydroquinone, vitamin C, azelaic acid 등과 같은 미백제의 대부분은 안정성, 이취, 부작용, 세포독성 및 안전성 등의 이유로 제한적으로 사용되고 있다.⁶⁾

이러한 이유로 인체에 부작용이 적은 약용식물 및 천연물을 이용한 미백 소재 개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 닥나무 추출물, 유용성 감초 추출물은 식품의약품안전처에서 기능성 미백 원료로 고시 되었으며 삼백초, 당귀, 사삼, 울금, 인진쑥, 상백피 등이 미백효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다.⁷⁾ 최근에는 피부 미백 효과와 항산화작용, 피부노화 방지 등을 포함하는 복합적 기능평가 연구가 증가되고 있다.^{8,9)}

취(野葛, *Pueraria lobata* Ohwi)은 콩과에 속하는 덩굴성 다년식물로 한국, 중국, 일본 등을 포함한 극동아시아의 온대영역에 넓게 분포하여 야생하고 있다. 취는 예로부터 중요한 약용식물로 사용되어왔고, 해열작용, 폐경기 질환, 슬독 제거, 담즙과 위액의 분비 증가, 혈압저하작용, 심혈관계

*교신저자(E-mail): sungykim@wonkwang.ac.kr
(Tel): +82-63-850-6806

질병, 저산소증 보호효과 활성, 납 독성에 대한 보호작용 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 한약명으로는 사용부위에 따라 칩뿌리는 갈근(葛根), 꽃은 갈화(葛花), 열매는 갈곡(葛穀), 잎은 갈엽(葛葉), 덩굴은 갈만(葛蔓)이며 질병의 증상 및 치료 방법에 따라 각각 다르게 사용하여 왔다.¹³⁾

칩의 덩굴 부위인 갈만은 빠른 성장속도로 인하여 도로변 산림경관을 저해하고 생태계를 파괴하는 등 피해가 커서 이를 제거하기 위해 매년 많은 예산과 인력이 동원되는 등 폐자원으로 취급되고 있다. 최근 연구에 따르면 갈만은 간 보호효과와 골 질환예방의 효과가 있는 것으로 보고되어 유용 가치가 높은 소재이다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 그러나 산업화로 이어진 경우는 없다. 본 연구진은 선행된 연구에서 갈만 추출물이 daidzin, daidzein, genistin, genistein, puerarin 등의 isoflavonoid를 함유하고 있으며 미백효능을 나타냄을 확인하였다.¹⁷⁾ 본 연구는 갈만의 화장품 소재로서 산업적 이용 가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

시약 - Dulbecco modified eagle medium(DMEM), antibiotics(penicillin&streptomycin), phosphate-buffered saline (PBS), fetal bovine serum(FBS)은 Gibco BRL 사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), arbutin, acarbose, dimethyl sulfoxide(DMSO), 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine(L-DOPA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), α -glucosidase, α -melanocyte-stimulating hormone(α -MSH), mushroom tyrosinase, p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG)등 기타 분석급 시약은 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Tyrosinase, MITF(microphthalmia-associated transcription factor) 및 TRP-1 antibody는 Santa Cruz Biotechnology 사(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. Easy-Blue Total RNA extraction kit(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea), SOD assay kit(Dojindo, Japan), TaqMan RNA-to-Ct 1-Step Kit(Applied Biosystems, CA, USA)를 구입하여 사용하였다.

실험 재료 및 추출 - 본 실험에 사용한 갈만은 2015년 7월 전북 진안에서 채취하여, 한풍제약의 조형권박사가 검증한 후 사용하였으며 갈만표본(HP-10-075)은 한풍제약 표본실에 보관하고 있다.

갈만 10 kg을 30 mm로 파쇄한 다음 추출기에 넣고 10배의 30% 에탄올을 넣어 90~100°C에서 3시간 추출하였다. 추출액을 1 μ m 크기의 마이크로필터를 이용하여 여과하고 잔사를 동일 조건으로 2차 추출하여 여과 후 60°C이하에서 감압농축과 건조를 통해 건조물 2.3 kg(수율 23%)을 얻었다. 건조물에 적당량의 물과 에틸아세트산을 넣어 분획 후 에

틸아세트산 층을 농축 및 건조하여 분말 0.157 kg(수율 1.57%)을 얻었다. 지표성분 분석을 위해 갈만 추출물 분말 0.5 g을 메탄올 50 ml에 넣어 환류냉각기를 달고 수욕에서 2시간 환류 추출한 다음 여과한 액에 메탄올을 추가해 100 ml로 만든 후 메탄올로 5배 희석하여 만들었다. Puerarin과 daidzin 10 mg에 메탄올을 넣어 100 ml로 만들어 표준액으로 사용하였다. 컬럼은 Capcell Pak C18, UG 120(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m, Shiseido, Japan)를 사용하였다. 이동상은 물과 메탄올 3:1 비율로 조제하였고 유속은 1 ml/min, 컬럼 온도는 30°C, 파장은 254 nm로 측정하였다.

세포 생존율 측정 - B16F10 melanoma 세포는 한국세포주은행(KCLB, Korean Cell Line Bank, Korea)로부터 분양받아 사용했으며, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 10% FBS와 1% antibiotics를 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다. 세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법¹⁸⁾에 따라 측정하였다. 배양된 세포를 96 well plate에 5 \times 10³ cells/well이 되게 200 μ l 분주하고 24시간 후에 시료를 10, 25, 50, 100, 200 μ g/ml 농도로 처리하고 24, 48시간 배양하였다. 배양 후 1 mg/ml MTT용액을 넣어 3시간 동안 37°C 배양한 후 상층액을 제거하고 formazan 침전물에 200 μ l DMSO를 넣어 약 10분간 방치한 후 540 nm의 파장에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 계산하였다.

멜라닌정량 - B16F10 세포를 6 well plate에 3 \times 10⁴ cells/well이 되게 분주하고 24시간 후에 100 nM α -MSH를 처리하고 24시간 배양 후 시료를 농도 별로 처리하고 48시간 배양하였다. 배지를 제거하고 PBS buffer로 2회 세척 한 다음 1 \times 10⁶의 세포를 회수하였다. 회수된 세포에 메탄올 500 μ l로 세척 후 4°C, 3000 rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 제거 하여 1 N NaOH 400 μ l를 넣어 90°C에서 1시간 반응시킨 뒤 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 첨가구와 α -MSH 처리구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

Mushroom tyrosinase 저해활성 측정 - Tyrosinase에 대한 반응기질로 사용하기 위하여 0.01% L-DOPA를 제조하였다. 반응 효소로 작용하는 mushroom tyrosinase는 2,500 units/ml의 tyrosinase를 준비하였다. 0.1 M 인산완충액(pH 6.8) 160 μ l, 각 농도별 시료 10 μ l, 0.01% L-DOPA 20 μ l, tyrosinase 10 μ l를 넣고 혼합 한 후 2 분후 475 nm microplate reader로 흡광도를 측정하였다. 무첨가구는 시료 대신 0.1 M 인산완충액을 사용하였고, 양성대조군으로는 tyrosinase 저해제로 알려진 kojic acid를 사용하였다.

Mushroom tyrosinase activity(%)=(A/B) \times 100

A: 시료 첨가구의 흡광도, B: 시료 무첨가구의 흡광도

세포 내 tyrosinase 저해활성 분석 - 멜라닌 정량과 동일한 실험 조건으로 세포를 처리 후 배지를 제거하고 PBS

buffer로 세척한 뒤 세포를 수거하였다. Lysis buffer(0.1 M SPB pH 6.8, 5 mM EDTA, 1% triton X-100, 0.1 M phenylmethyl sulfonyl fluoride) 200 μ l 첨가하여 얼음에 30 분 동안 방치 후 4°C 1,3000 rpm으로 30분간 원심분리 한 다음 상층액을 얻었다. 단백질은 Bradford법으로 정량하였다. 각각의 세포용해액은 well 당 30 μ g과 0.1 M SPB buffer의 총량이 150 μ l가 되도록 96 well plate에 넣은 후 0.1% L-DOPA 용액을 50 μ l을 혼합하고 37°C에서 60분간 방치한 후 475 nm microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

Western Blot Analysis – B16F10 세포를 6 well plate에 3×10^4 cells/well이 되게 분주하고 24시간 후 α -MSH(100 nM)를 처리하고 24시간 후 시료를 처리하여 48시간 동안 배양하였다. PBS로 세척 후 RIPA buffer 넣고 얼음에서 30 분간 용해하고, 4°C, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 상층액에서 얻은 단백질은 Bradford method로 정량하였다. 30-50 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE 전기영동 하여 nitrocellulose membrane을 이용하여 transfer하였다. 5% skim milk으로 1 시간 blocking 한 후 멜라닌 생성에 관여하는 유전자인 tyrosinase, MITF, TRP-1 primary antibody와 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH을 희석하여 4°C에서 16 시간 이상 반응시킨 다음 PBST로 세척한 후 primary-specific HRP conjugate secondary antibody를 실온에서 2시간 동안 반응시키고 PBST로 세척한 후 ECL 용액으로 발광시켜 FluorChem E system image analyzer(Cell Biosciences, Santa Clara, CA)를 이용하여 band의 사진을 촬영하였다.

Real-time PCR – Western blot과 동일한 방법으로 처리한 세포를 eszy-Blue Total RNA extraction kit로 mRNA를 추출 후, ND-1000 spectrophotometer(NanoDrop Technology, USA)를 사용하여 정량하였다. 300-500 ng/ μ l의 시료 mRNA, primer 및 TaqMan RNA-to-Ct™ 1-Step Kit를 사용하여 제조회사의 시험방법대로 시행하여 ABI step one plus(Applied biosystem, USA) 기기에서 48°C에서 15분, 95°C에서 10분 1회, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분으로 40~60 회 반복하여 threshold cycle 값을 측정하였다.¹⁷⁾

α -Glucosidase 저해활성 측정 – 0.1 M phosphate buffer (pH 6.9)로 0.5 unit/ml의 α -glucosidase와 5 mM pNPG를 각각 용해시켜 효소와 기질 용액으로 준비하였다. 효소 용액 20 μ l, 각 농도별 시료 10 μ l 및 0.1 M phosphate buffer 120 μ l 넣고 섞은 다음, 37°C에서 15분 동안 배양한 후 기질용액 20 μ l 넣고 37°C에서 15분 반응시켰다. 0.2 M Na₂CO₃를 80 μ l를 넣어 반응을 정지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 반응으로 생성된 nitrophenyl의 함량을 정량하여 처리하지 않은 대조구와 비교하여 효소 활성을 계산하였다.¹⁹⁾

DPPH radical 소거활성 – DPPH를 이용하여 시료의 라

디칼 소거효과(radical scavenging effect)를 측정하는 Blois 법²⁰⁾을 활용하여 측정하였다. 메탄올에 녹인 0.2 mM DPPH 용액을 시료용액과 1:1로 섞은 후 차광, 실온에서 30분간 방치하였다가 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 vitamin C를 사용하였으며 DPPH radical 소거활성은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity(\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A: 시료 첨가구의 흡광도, B: 시료 무첨가구의 흡광도

Superoxide Radical 소거효과 측정 – Superoxide dismutase (SOD) 유사활성은 SOD assay kit-WST(Dojindo, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 시료를 농도별로 희석하여 96 well plate에 20 μ l씩 분주한 후, WST working solution을 200 μ l을 넣고 혼합하였다. Enzyme working solution을 20 μ l을 첨가하여 37°C에서 20분간 incubation 한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군 실험은 효소 대신 20 μ l dilution buffer를 넣었으며, SOD radical 소거활성은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Superoxide radical scavenging activity(\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A: 시료 첨가구의 흡광도, B: 시료 무첨가구의 흡광도

통계처리 – 모든 실험값은 평균 \pm 표준편차로 표기하였고 통계분석은 SigmaPlot version 10.0(Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) 사용하여 Student's *t*-test로 처리하였으며, 유의성은 *p* 값이 0.05 이하인 경우를 기준으로 판정하였다.

결 과

멜라닌 정량 – 산업적 제조단위로 얻어진 갈만의 지표 성분 puerarin과 daidzin을 HPLC로 분석한 결과, 각각 평균 134.4 \pm 42.5, 153.8 \pm 29.5 mg/g을 함유하고 있었다(Fig. 1). 갈만 이 B16F10세포의 세포생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 농도별로 24, 48시간 처리 결과 갈만은 10, 25, 50 μ g/ml 처리 시 B16F10 세포생존율이 80% 이상으로 나타났지만 100, 200 μ g/ml 농도에서 세포독성으로 인해 60% 이하로 급격히 생존율이 저하되었다(Fig. 2). 따라서 50 μ g/ml 농도 이하에서 세포관련 실험을 진행하였다.

α -MSH로 멜라닌 생성을 유도한 후 갈만이 멜라닌생성에 미치는 영향을 조사 하였다. 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. α -MSH 단일처리군은 무처리군과 비교하여 멜라닌 생성이 증가되었고 이를 100%로 계산하여 멜라닌 생성 억제 정도를 비교하였다. 양성대조군으로 사용한 arbutin 100 μ M에서는 13.3% 멜라닌 생성을 억제하였으며, 갈만은 α -MSH에 의해 증가된 멜라닌 생성을 농도 의존적으로 감소시켰다. 25와 50 μ g/ml에서 각각 50, 61.6% 멜라닌 생성 억제

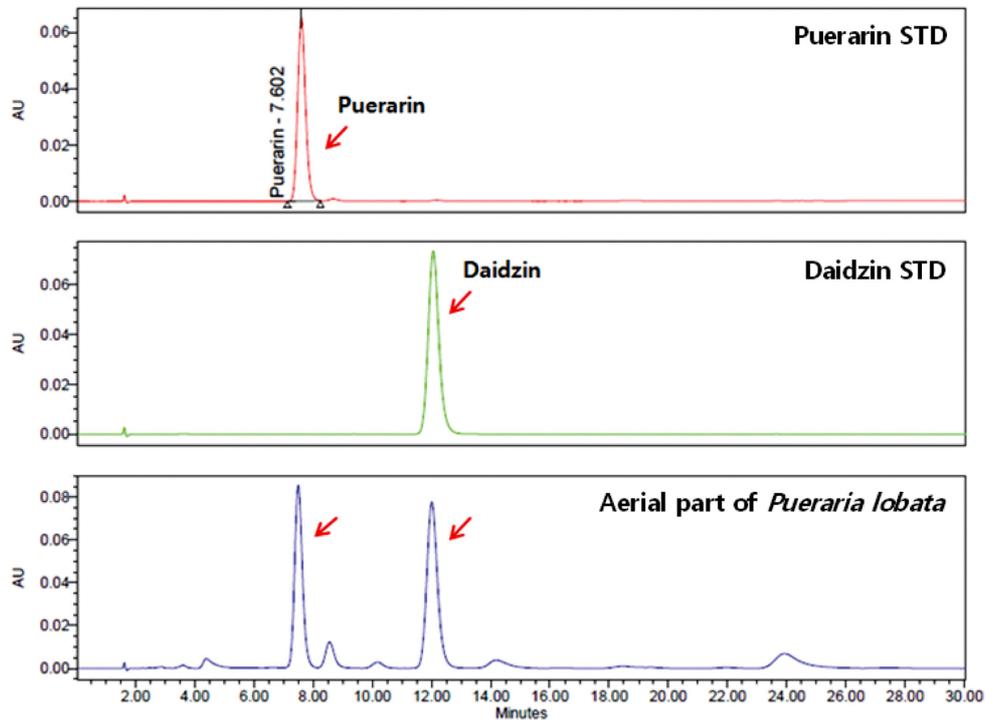


Fig. 1. High performance liquid chromatogram of puerarin, daidzinin and from aerial part of *Pueraria lobata* (APPL), at 254 nm.

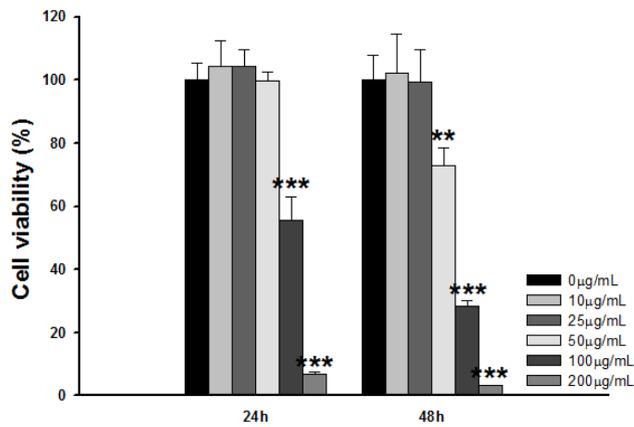


Fig. 2. Concentration-dependent effects of APPL on the cell viability. The B16F10 cells were treated with various concentrations of APPL. Data are means±S.D. ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared to control.

켜 양성대조군으로 사용된 arbutin보다 뛰어난 효과를 보였다.

Tyrosinase 저해활성 측정 - Mushroom tyrosinase에 갈만을 50, 100, 200, 500 μg/ml 농도로 처리한 후 효소의 활성에 미치는 영향을 알아보았다. 양성대조군으로 사용된 kojic acid의 경우 농도 의존적으로 mushroom tyrosinase의 활성을 억제시키는 경향을 나타냈다. 그러나 갈만의 경우 mushroom tyrosinase에 대한 저해활성을 보이지 않았다(Fig. 4A).

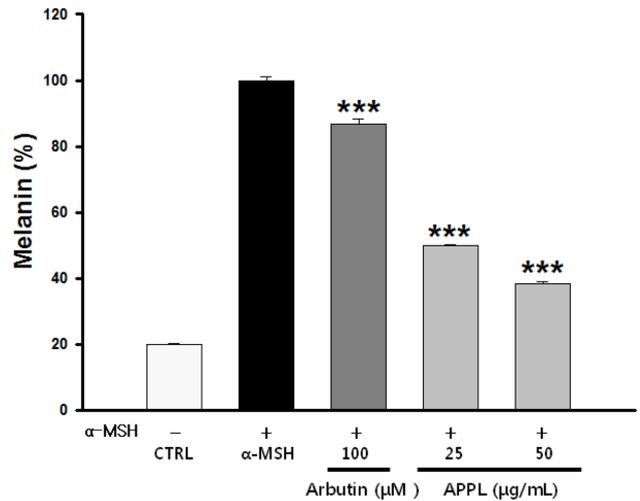


Fig. 3. Effect of APPL on melanogenesis in B16F10 cells. The cells were stimulated with α-MSH and incubated with APPL or arbutin as a positive control. Data are means±S.D. ****p*<0.001 compared to cells stimulated with α-MSH.

갈만이 mushroom tyrosinase에 영향을 미치지 않는 것과 달리 세포 내(B16F10) tyrosinase 활성 측정 결과, α-MSH 단일처리군 대비 갈만 25와 50 μg/ml에서 각각 10.4, 55.7%의 농도 의존적인 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다(Fig. 4B).

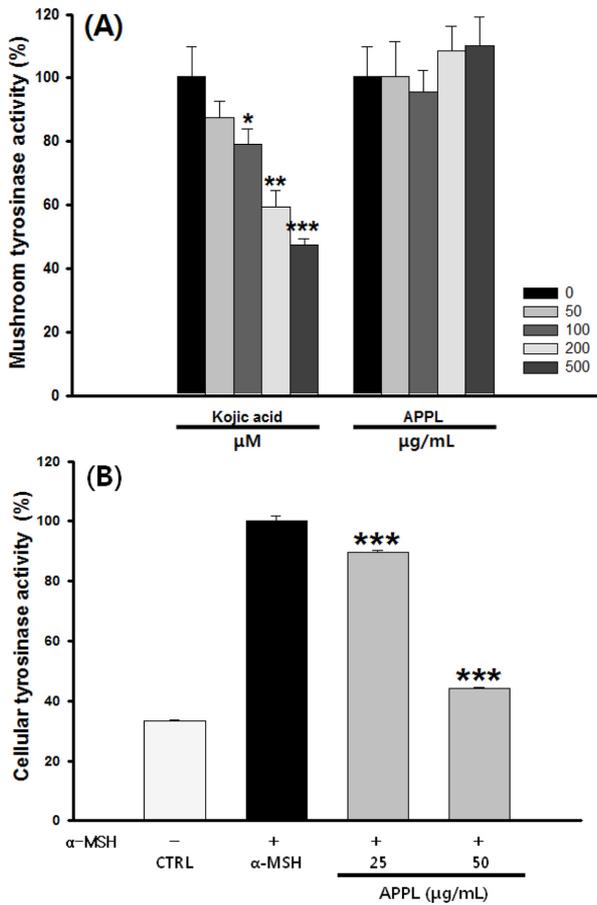


Fig. 4. Inhibitory effects of APPL on (A) mushroom tyrosinase and (B) cellular tyrosinase activity. Tyrosinase activity was assessed by measuring the absorbance at 475 nm. Kojic acid was used as a positive control. Data are means±S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control (A) or cells stimulated with α -MSH (B).

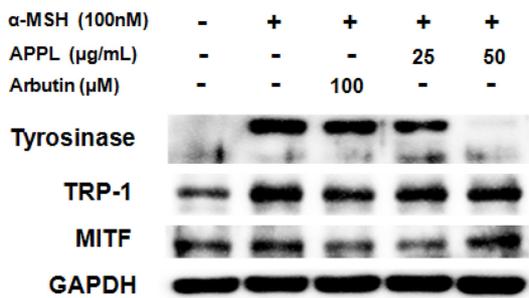


Fig. 5. Effects of APPL on the melanogenic related to cells stimulated with α -MSH proteins expression, tyrosinase, TRP-1 and MITF. B16F10 cells were stimulated with α -MSH and incubated with APPL or arbutin as a positive control. GAPDH was used as an internal standard.

Western Blot을 이용한 미백관련 단백질의 발현 분석 – 갈만이 B16F10 세포에 멜라닌 생성과정과 관련된 단백질의 발현을 조절하는지 조사하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이

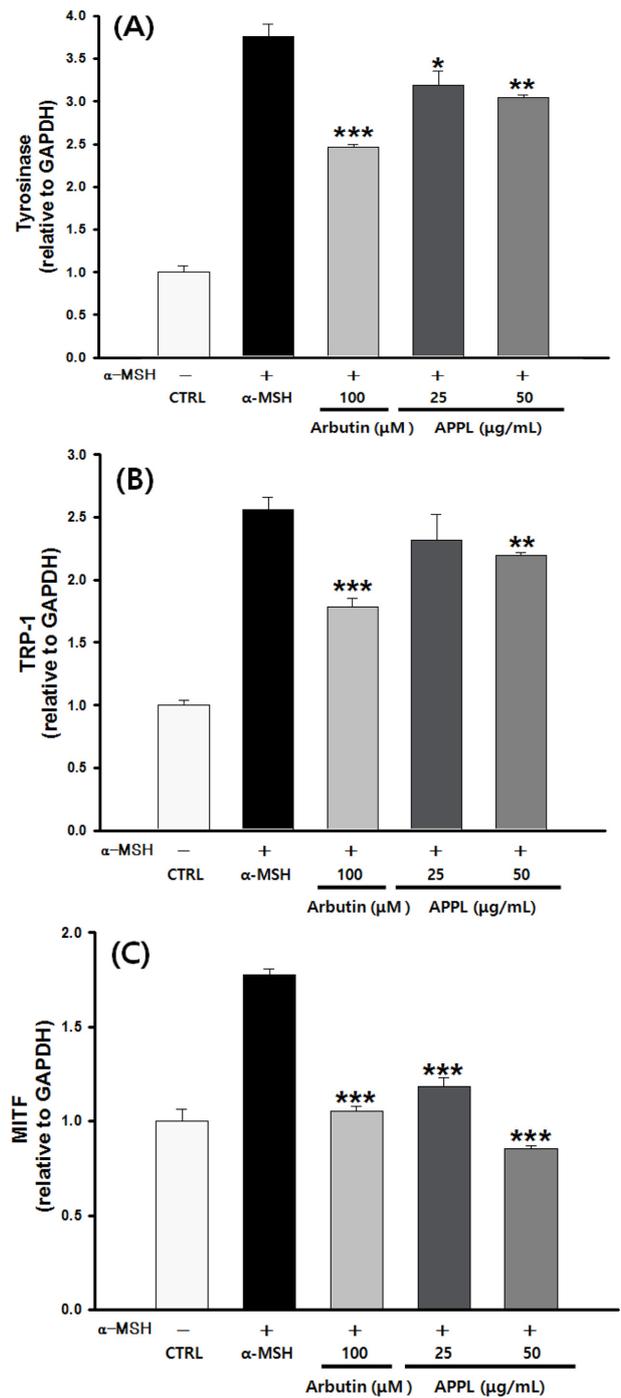


Fig. 6. Effects of APPL on mRNA expression of (A) tyrosinase, (B) TRP-1 and (C) MITF. B16F10 cells were stimulated with α -MSH and incubated with APPL or arbutin as a positive control. GAPDH was used as an internal standard. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to cells stimulated with α -MSH.

α -MSH 처리군은 무처리군에 비하여 TRP-1, tyrosinase와 MITF 발현이 현저히 높아졌다. 갈만을 처리 한 경우 α -MSH 처리로 증가된 TRP-1과 tyrosinase 발현을 농도 의존적으로

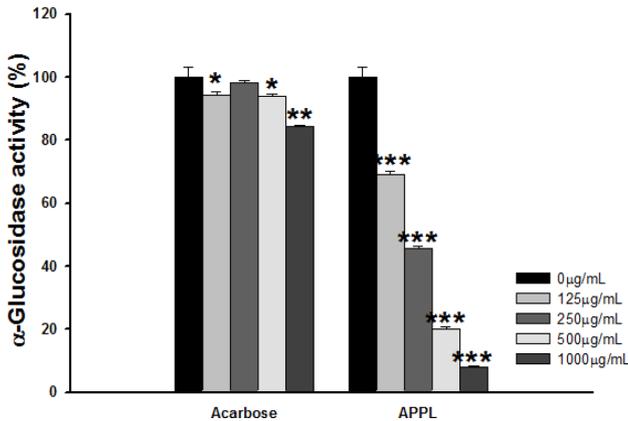


Fig. 7. Inhibitory effect of APPL on α -glucosidase activity. α -Glucosidase activity was assessed by measuring the absorbance at 405 nm. Acarbose was used as a positive control. Data are means \pm S.D. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared to control.

감소시켰다. 특히 tyrosinase 발현은 양성대조군인 arbutin 100 μM 군과 비교했을 때 현저히 억제하였다. MITF 발현은 25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 arbutin군과 비교했을 때 동등 수준으로 감소시켰다.

Real-time PCR을 이용한 미백관련 mRNA 발현 분석 – 갈만이 MITF, TRP-1, tyrosinase의 mRNA에 미치는 영향을 분석한 결과, tyrosinase mRNA 발현은 25와 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 α -MSH 대비 각각 15.2, 19.2%의 발현 감소율을 보였다. TRP-1 mRNA 발현 감소율은 갈만 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 9.4, 14.2%, MITF mRNA 발현은 33.4, 52.1%로 높은 감소율을 나타내었다. 50 $\mu\text{g/ml}$ 에 대한 MITF의 mRNA 발현 감소는 arbutin 100 μM 보다 더욱 큰 것으로 관찰되었다(Fig. 6).

α -Glucosidase 저해활성 측정 – 갈만이 tyrosinase 활성화 이후 단계에 미치는 영향을 확인하고자 번역 후 변형 단계에서 작용하는 α -glucosidase의 활성을 측정하였다. 갈만과 α -glucosidase에 기질인 pNPG를 넣고 반응을 시킨 결과, Fig. 7에서 보이는 것처럼 갈만은 농도 의존적으로 α -glucosidase의 활성을 억제시켰다.

갈만에 의한 α -glucosidase의 활성은 125 $\mu\text{g/ml}$ 에서 31.1%, 250 $\mu\text{g/ml}$ 에서 54.3%, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 79.8%, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 92.1%가 저해되었으며, IC_{50} 이 247.8 $\mu\text{g/ml}$ 으로 관찰되었다.

항산화 활성 – 갈만의 항산화 효과를 알아보기 위하여 DPPH법을 이용하여 항산화 효과를 측정한 결과(Fig. 8A) 저농도인 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 14.9%의 소거활성을 보였으며 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 47.6, 55.6% 소거활성을 보였다. 양성대조군인 vitamin C(Vit C) 50 μM 에서는 82.8%의 소거활성을 보였다.

Superoxide radical 소거 실험에서 vitamin E 유사체인

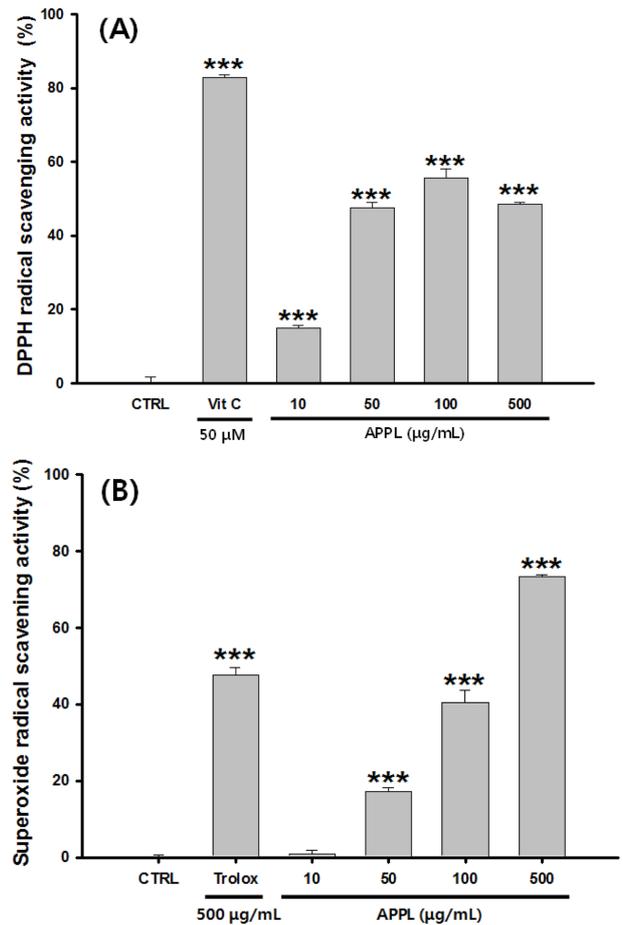


Fig. 8. Anti-oxidant activities of APPL on the various radicals determined by (A) DPPH radical scavenging activity and (B) SOD radical scavenging activity. Vitamin C (A) and trolox (B) were used as positive controls. Data are means \pm S.D. *** p <0.001 compared to control.

trolox를 양성 대조군으로 사용하였으며 실험 결과는 Fig. 8B로 나타내었다. 갈만의 SOD 활성은 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 17.3, 40.4, 73.3%로 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, trolox는 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 47.7% 소거활성을 보였다. 사용된 최고 농도에서는 trolox보다 25%이상 높은 항산화 효과를 나타내었다.

고 찰

자연주의 친환경의 열풍을 타고 생약으로부터 산업적 활용을 위한 원료 개발 연구에 관심이 높아지고 있다. 더 나아가 원료로부터 분리한 flavonoid와 flavonoid 배당체 등의 항산화 효과, 항바이러스, 항노화 및 미백효과 등 다양한 효능관련 연구가 진행되고 있다.²¹⁾ 특히 삶의 질적인 측면에서 피부의 미백과 노화방지에 대한 사회적 수요의 증가에 따라 이를 위한 활성물질을 찾는 노력은 증가하고 있다.

취의 뿌리, 줄기, 꽃 등은 극동아시아 지역에서 오랫동안 다양한 용도로 사용되어왔다. 취의 뿌리인 갈근은 항산화 효과, 알콜성 간 손상 보호 효과, 해독작용, 면역력 증강, 골다공증, 암세포 증식 저해 효과 등이 보고되어 있다.²²⁻²⁴⁾ 갈근에 함유된 유효한 성분은 isoflavonoid 계열의 daidzein, daidzin, puerarin, puerarin-7-xyloside 등이 있으며, 갈화에는 kakkatin1, kakkalide, irisolidone, daidzein 등의 성분이 포함되어 있다. 갈만은 daidzein, daidzin, 3-methoxydaidzein, formononetin, ononin, calycosin, 6-O-acetyl genistein, puerarin 등 12종의 isoflavonoid가 보고되어 있다.²⁵⁻²⁸⁾

이들 isoflavonoid 중 puerarin, daidzein, genistein 등은 MITF를 경유하여 미백효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.^{29,30)} 또한 본 연구실의 실험실적 선행연구를 통하여 갈만에서 daidzin, genistin, glycitin과 비배당체 daidzein, genistein, glycitein와 puerarin이 함유되어 있음을 확인하였으며 이들이 포함된 추출물은 항산화효과 및 멜라닌 생성 억제효능을 나타내었다.¹⁷⁾

멜라닌은 자외선이나 α -MSH의 자극 등에 의해 생성이 증가될 수 있다. α -MSH는 MC1R(melanocortin receptor 1)과 결합하고 신호전달 단백질인 adenylate cyclase를 활성화하여 cyclic AMP(cAMP)를 증가시킨다. 연속적으로 protein kinase A(PKA)를 통해 cAMP responsive element binding protein(CREB)을 활성화시킨다. 활성화된 CREB는 MITF 단백질의 발현을 증가시켜 tyrosinase 유전자의 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다.³¹⁾ 산업적유효성을 평가하기 위하여 대량제조된 갈만 추출물은 puerarin과 daidzin을 지표성분으로 표준화하였다. α -MSH로 B16F10 세포를 자극시켜 멜라닌생성을 유도 한 후 멜라닌정량을 통한 갈만의 미백효과를 확인한 결과 농도 의존적인 멜라닌 감소를 하였으며 실험에 사용된 최고 농도에서는 50%이상의 멜라닌생성 억제효과를 확인하였다.

갈만의 미백기전을 밝히기 위해 멜라닌 생성 과정 중 초기속도를 결정하는 역할을 하는 tyrosinase의 활성에 미치는 영향을 확인하였다. Tyrosinase는 tyrosine을 DOPA로 전환시키고 DOPA는 DOPA-quinone으로 전환시키며 또 DOPA chrom에서 유도된 5,6-dihydroxyindole(DHI)이 indole-5,6-quinone으로 변환되는 과정에 관여하여 인체 내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도결정단계에 관여하는 효소로서 많은 미백 성분이 이 효소를 억제 하는 작용기전을 가지고 있다.³²⁾ 갈만은 mushroom tyrosinase에 대한 저해활성 효과는 없었다. 그러나 세포내 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 확인한 결과, 농도 의존적인 유의적 억제효과를 나타내었다. 이러한 결과는 kojic acid나 arbutin과 같은 많은 미백물질의 작용기전인 tyrosinase의 직접적인 활성억제에 의하여 멜라닌 합성을 저해하는 것이 아닌 tyrosinase에 간접적인 영향을 통해 활성의 저하와 멜라닌 생성을 억

제하는 것이라 추측할 수 있다.

멜라닌합성 과정에 관여하는 주요 인자인 tyrosinase와 TRP-1의 전사조절과 갈만의 미백 작용의 관련성을 확인하는데 중요 전사조절인자인 MITF에 미치는 영향을 확인하였다. 천연물 유래의 성분이 MITF의 저해를 통해 melanin 색소 생성을 억제할 수 있음이 보고되었다.³³⁾ 갈만이 MITF와 TRP-1, tyrosinase의 mRNA 및 단백질 발현에 미치는 영향을 확인한 결과 MITF, TRP-1과 tyrosinase 단백질 및 mRNA 발현을 억제시키는 것을 확인하였다. 이는 갈만의 MITF 발현 억제를 통하여 tyrosinase와 TRP-1의 mRNA 전사억제에 의한 단백질 발현이 감소되고, 더 나아가 멜라닌 생성 억제로 이어지는 것이라 판단된다.

생성된 tyrosinase는 α -glucosidase에 의해 당이 수식될 때 활성형의 tyrosinase로 전환되게 된다. α -glucosidase 저해제는 tyrosinase를 급속하게 folding시켜 copper가 없는 불활성화된 형태로 melanosome으로 이동시켜 멜라닌합성을 저해한다고 알려져 있다.³⁴⁾ 갈만은 α -glucosidase 활성을 농도 의존적으로 저해하였다. 갈만이 번역 후 활성화를 위한 tyrosinase의 glucose trimming 과정을 저해함으로써 tyrosinase의 glycosylation 반응을 억제할 가능성이 있는 것으로 판단된다.³⁵⁾

자외선 등에 의해 발생된 활성산소는 피부색소형성을 촉진하게 되는데 항산화물질에 의한 활성산소 소거 반응이 멜라닌색소 형성억제에 효과적이라는 연구보고가 있어 다양한 종류의 라디칼에 대한 항산화 활성을 확인하였다.³⁶⁾ DPPH radical 소거법은 항산화물질의 전자공여능을 이용한 항산화 측정법으로 주로 tocopherol, ascorbate, flavonoid 화합물과 aromatic amine 화합물의 항산화능 측정에 많이 사용되는 방법으로 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 탐색하는데 많이 이용되고 있다.³⁷⁾ SOD는 세포에 유해한 oxygen radical을 과산화수소로 전환시키는 촉매작용을 하는 효소로, SOD에 생성된 과산화수소는 peroxidase나 catalase에 의하여 생체 내에서 무해한 물 분자와 산소분자로 전환시켜 활성산소로부터 생체를 보호하는 기능으로 알려져 있다.³⁸⁾ 갈만의 항산화 효과는 측정된 모든 방법에서 농도 의존적인 증가를 보였으며 SOD유사활성측정법에 의한 항산화 효과는 양성대조군과 비교했을 때 그 이상의 항산화 효과를 확인하였다.

갈만을 실험실 수준 추출물에서 산업생산 추출물로 제조 단위를 높여 미백효능을 확인한 결과 동등이상의 효능을 보여 향후 산업적인 미백소재로 활용이 가능 할 것으로 판단 된다.

결 론

본 연구에서는 갈만의 미백효과를 확인하기 위해서 30%

주정추출물의 ethyl acetate 분획물의 세포독성, tyrosinase 저해 활성, melanin 생성 억제 활성, α -glucosidase 저해 활성, MITF, TRP-1과 tyrosinase의 단백질 및 유전자 발현 억제 효과 및 항산화 활성 등을 조사하였다. 멜라닌정량 결과 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 억제하였고 arbutin보다 뛰어난 효과를 보였다. 갈만의 mushroom tyrosinase 저해활성 측정결과 저해효과가 없었으나, 세포 내 tyrosinase 활성은 농도 의존적인 감소가 관찰되었다. 갈만의 MITF, TRP-1과 tyrosinase의 단백질 및 mRNA 발현억제를 확인한 결과 MITF, TRP-1과 tyrosinase 단백질 및 mRNA 발현측정에서도 3가지 인자 모두 발현이 억제됨으로써 미백 효능을 나타낼 수 있음을 확인할 수 있었다. α -glucosidase 저해 활성 측정결과 농도 의존적으로 α -glucosidase의 활성을 억제시켜 전사와 번역이후 단계에서도 갈만이 작용함이 관찰되었다.

갈만의 항산화 활성은 DPPH법, SOD유사활성측정법을 사용하여 확인하였고 모든 방법에서 농도 의존적으로 항산화효과를 보였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 갈만의 미백효과는 MITF, TRP-1과 tyrosinase의 mRNA 발현 및 단백질의 번역을 억제함으로써 멜라닌 생성 주요효소의 작용을 억제하고, tyrosinase의 α -glucosidase 저해제로 작용하여 tyrosinase의 번역 후 수식을 억제하여 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 판단된다. 더불어 강력한 항산화효과는 갈만의 미백작용의 효과를 극대화 시킬 수 있는 것으로 예상되며, 갈만은 미백 기능성 소재로서의 산업적 활용가치가 높은 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 경제협력권산업 육성사업(과제번호: R0004539)의 지원에 의하여 수행된 결과입니다.

인용문헌

- Jun, H. J., Lee, J. H., Cho, B. R., Seo, W. D., Kang, H. W., Kim, D. W. and Lee, S. J. (2012) Dual inhibition of γ -Oryzanol on cellular melanogenesis: inhibition of tyrosinase activity and reduction of melanogenic gene expression by a protein kinase A-dependent mechanism. *J. Nat. Prod.* **75**: 1706-1711.
- Yoon, N. Y., Eom, T. K., Kim, M. M. and Kim, S. K. (2009) Inhibitory effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on mushroom tyrosinase activity and melanin formation in mouse B16F10 melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 4124-4129.
- Jin, M. H., Jeong, E. T., Kim, M. S., Song, H. J., Kwak, T. J., Park, S. G. and Lee, S. M. (2011) The effects of polydatin isolated from *Polygonum cuspidatum* on melanogenesis and wrinkle formation. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **37**: 327-335.
- Ye, Y., Chou, G. X., Wang, H., Chu, J. H. and Yu, Z. L. (2010) Flavonoids, apigenin and icariin exert potent melanogenic activities in murine B16 melanoma cells. *Phyto-medicine* **18**: 32-35.
- Lee, S. Y., Jun, H. J., Lee, I. C. and Lee, J. Y. (2013) Down-regulation of tyrosinase, MITF, TRP-1, and TRP-2 expressions by *Juniperus rigida sieb.* in murine B16F10 melanoma. *J. Life. Science* **23**: 1445-1453.
- Seo, E. J., Hong, E. S., Choi, M. H., Kim, K. S. and Lee, S. J. (2010) Antioxidant and skin whitening effects of *Rhmannus yoshinoi* extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**: 750-754.
- 김은화 (2006) 천연 추출물을 이용한 미백화장품 개발 동향에 관한 연구, *대한피부미용학회지* **4**: 195-203.
- Kim, K. Y. and Lee, N. K. (2014) Herbal extracts research trend that have effects on melanin production and control. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **12**: 453-461.
- Kim, D. M., Kim, K. H., Sung, N. Y., Jung, P. M., Kim, J. S., Kim, J. K. and Kim, J. K. (2011). Effects of gamma irradiation on the extraction yield and whitening activity of polysaccharides from *Undaria pinnatifida* sporophyll. *Korean J. Food Sci. Technol.* **40**: 712-716.
- Kayano, S. I., Matsumura, Y., Kitagawa, Y., Kobayashi, M., Nagayama, A., Kawabata, N. and Kitada, Y. (2012) Isoflavone C-glycosides isolated from the root of kudzu (*Pueraria lobata*) and their estrogenic activities. *Food Chem.* **134**: 282-287.
- Wu, Y., Wang, X. and Fan, E. (2012) Optimisation of ultrasound-assisted extraction of puerarin and total isoflavones from *puerariae lobatae* radix (*Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi) with response surface methodology. *Phytochem. Anal.* **23**: 513-519.
- Lee, E. J., Kwon, J. E., Kim, S. J. and Park, T. H. (2013) Isoflavones and biotransformed dihydrodaidzein production with in vitro cultured callus of Korean wild arrowroot *Pueraria lobata*. *J. Plant Biotechnol.* **40**: 217-223.
- Kim, C. S., Ha, H. K., Kim, H. J., Lee, J. H. and Song, K. Y. (2002). *Pueraria lobata* Ohwi as an osteoporosis therapeutics. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**: 710-718.
- Chang, B. Y., Lee, D. S., Lee, J. K., Kim, Y. C., Cho, H. K. and Kim, S. Y. (2016) Protective activity of kudzu(*Pueraria thunbergiana*) vine on chemically-induced hepatotoxicity: in vitro and in vivo studies. *BMC complementary and alternative medicine* **16**: 1-9.
- Keung, W. M. and Vallee, B. L. (1998) Kudzu root: an ancient Chinese source of modern antidipsotropic agents. *Phytochemistry* **47**: 499-506.
- Tanaka, T., Tang, H., Yu, F., Michihara, S., Uzawa, Y., Zaima, N. and Kawamura, Y. (2011) Kudzu(*Pueraria lobata*) vine ethanol extracts improve ovariectomy-induced bone loss in female mice. *J. Agric. Food Chem.* **59**: 13230-13237.
- Han, E., Chang, B., Kim, D., Cho, H. and Kim, S. (2015)

- Melanogenesis inhibitory effect of aerial part of *Pueraria thunbergiana* in vitro and in vivo. *Arch. Derm. Res.* **307**: 57-72.
18. Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942.
 19. Kim, J. E., Joo, S. I., Seo, J. H. and Lee, S. P. (2009) Anti-oxidant and α -glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvents and enzymes. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**: 989-995.
 20. Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**: 1199-1200.
 21. Kang, K. A., Han, S. S., Lee, M. H. and Kim, Y. J. (2008) Screening of inhibitory effects of an oriental herb on melanogenesis. *Journal of East-West Nursing Research* **14**: 74-80.
 22. Baek, M. R., Choi, Y. H., Yoo, D. S., Kim, M. R., Choi, S. U., Hong, K. S. and Ryu, S. Y. (2009) Anti-proliferative components in the roots extract from *Pueraria thunbergiana*. *Kor. J. Pharmacogn.* **40**: 46-50.
 23. Lukas, S. E., Penetar, D., Berko, J., Vicens, L., Palmer, C., Mallya, G. and Lee, D. Y. W. (2005) An extract of the Chinese herbal root kudzu reduces alcohol drinking by heavy drinkers in a naturalistic setting. *Alcohol Clin Exp Res.* **29**: 756-762.
 24. Wang, X., Wu, J., Chiba, H., Umegaki, K., Yamada, K. and Ishimi, Y. (2003) Puerariae radix prevents bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab.* **21**: 268-275.
 25. Kim, D. K., Jang, D. S., Kim, J. S. and Kim, J. H. (2009) Genetic variations and phylogenetic relationship of and *Pueraria lobata* Ohwi(Fabaceae) and related taxa by RAPD markers. *Korean J. Plant Res.* **22**: 446-453.
 26. Prasain, J. K., Jones, K., Kirk, M., Wilson, L., Smith-Johnson, M., Weaver, C. and Barnes, S. (2003) Profiling and quantification of isoflavonoids in kudzu dietary supplements by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 4213-4218.
 27. Jang, D. S., Kim, J. M., Lee, Y. M., Kim, Y. S., Kim, J. H. and Kim, J. S. (2006). Puerariafuran, a new inhibitor of advanced glycation end products(AGEs) isolated from the roots of *Pueraria lobata*. *Chem. Pharm. Bull.* **54**: 1315-1317.
 28. Zhang, D., Ren, Y., Dai, S., Liu, W. and Li, G. (2009) Isoflavones from vines of *Pueraria lobata*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **34**: 3217-3220.
 29. Park, W. S., Kwon, O., Yoon, T. J. and Chung, J. H. (2014). Anti-graying effect of the extract of *Pueraria thunbergiana* via upregulation of cAMP/MITF-M signaling pathway. *J. Dermatol. Sci.* **75**: 153-155.
 30. Park, J. S., Kim, D. H., Lee, J. K., Lee, J. Y., Kim, D. H., Kim, H. K. and Kim, H. C. (2010). Natural ortho-dihydroxyisoflavone derivatives from aged Korean fermented soybean paste as potent tyrosinase and melanin formation inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* **20**: 1162-1164.
 31. Kim, K. S., Kim, J. A., Eom, S. Y., Lee, S. H., Min, K. R. and Kim, Y. (2006) Inhibitory effect of piperlonguminine on melanin production in melanoma B16 cell line by downregulation of tyrosinase expression. *Pigment Cell Res.* **19**: 90-98.
 32. Cho, E. J., Ju, H. M., Jeong, C. H., Eom, S. H., Heo, H. J. and Kim, D. O. (2011) Effect of phenolic extract of dry leaves of *Lespedeza cuneata* G. Don on antioxidant capacity and tyrosinase inhibition. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **29**: 358-365.
 33. Kim, S. S., Kim, M. J., Choi, Y. H., Kim, B. K., Kim, K. S., Park, K. J. and Hyun, C. G. (2013) Down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expressions by citrus press-cakes in murine B16F10 melanoma. *Asian Pac J Trop Biomed.* **3**: 617-622.
 34. Negroiu, G., Branza-nichita, N., Petrescu, A. J. and Petrescu, S. M. (1999) Protein specific N-glycosylation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 in B16 mouse melanoma cells. *Biochem. J.* **344**: 659-665.
 35. Choi, H., Ahn, S., Chang, H., Cho, N. S., Joo, K., Lee, B. G. and Hwang, J. S. (2007) Influence of N-glycan processing disruption on tyrosinase and melanin synthesis in HM3KO melanoma cells. *Experimental dermatology* **16**: 110-117.
 36. Jo, Y. N., Jeong, H. R., Jeong, J. H. and Heo, H. J. (2012) The skin protecting effects of ethanolic extracts of eggplant peels. *Korean J. Food Sci. Technol.* **44**: 94-99.
 37. Choi, C. S., Song, E. S., Kim, J. S. and Kang, M. H. (2003) Antioxidative activities of *Castanea crenata* Flos. methanol extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**: 1216-1220.
 38. Reddy, M. K. and Labhasetwar, V. (2009) Nanoparticle-mediated delivery of superoxide dismutase to the brain: an effective strategy to reduce ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.* **23**: 1384-1395.

(2016. 12. 06 접수; 2016. 12. 19 심사;
2016. 12. 21 게재확정)