

미강 · 황칠 발효추출물이 B16F10 세포의 미백에 미치는 효과

최찬헌 · 안정은 · 정현우*

동신대학교 한의과대학

Study of Fermentation Extract Made from Rice Bran and Dendropanax on the Whitening Effects in B16F10 Cell Line

Chan Hun Choi, Jeong Eun An, Hyun Woo Jeong*

College of Korean Medicine, Dongshin University

The purpose of this study is to research the whitening effects of fermentation extract made from the Rice bran and Dendropanax(FRD) Fermentation conditions were as follows: 1) Dendropanax and Rice bran were blended in a ratio of 1 to 1, 2) a weight of sugar was 10% of the total weight, 3) an amount of enzyme was 0.1%, and 4) a temperature was 20°C. It has been fermented for 90 days. In order to observe the whitening effects of FRD, the author measured the cell viability and the inhibition rate of the melanin biosynthesis, the activity of tyrosinase and SOD (superoxide dismutase) in malignant melanoma, B16F10 cells. As a result, FRD significantly inhibited the cell viability of B16F10 in more than 500 µg/ml. FRD significantly suppressed the generation of melanin, and that induced by α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH) in more than 1,000 µg/ml. FRD significantly decreased the activity of tyrosinase and that induced by α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH) in more than 500 µg/ml. FRD did not change the activity of SOD in dose dependent manner. Therefore, the author considered that the fermentation extract made from a Rice bran and Dendropanax will be able to produce high value-added products, if used as a commercial. Therefore, the author considered that the fermentation extract made from a Rice bran and Dendropanax will be able to produce high value-added products, if used as a commercial.

keywords : Korean Dendropanax, Rice bran, Fermentation, Melanin, Tyrosinase, SOD

서 론

피부 노화¹⁾는 장년층으로 접어들면서 자외선, 흡연, 화학물질 등에 의해 피부의 위축이나 황색변화 그리고 주름 등이 나타나고, 그 중에 자외선에 의한 광노화는 거친 피부나 미세한 주름, 광선각 화증 그리고 멜라닌 생성에 의한 검은 반점 등이 나타난다²⁾. 특히, 자외선에 의해 멜라닌 세포 내의 티로시네이스가 활성화되어 멜라닌 색소가 증가³⁾하기 때문에 이를 치료하기 위해 레이저⁴⁾나 초음파⁵⁾를 이용한 연구, 황백⁶⁾이나 백작약⁷⁾등의 천연물을 이용한 연구 등이 다양하게 진행되고 있다.

또한 활성산소와 같은 산화적 스트레스는 피부의 광노화를 유발하고, 기미나 주근깨 등을 침착시키는 주요인으로 인식^{8,9)}되고 있어 미백과 관련되어 꾸준히 연구되고 있다¹⁰⁾.

미강 (Rice bran)은 벼의 도정과정 중 발생하는 부산물로서 인체에 유효한 폴리페놀 등의 성분이 함유되어 있어^{11,12)}, 미강 에탄올 추출물은 항산화 효과 및 멜라닌 생성에 관여하는 티로시네이스

에 대한 저해 효과가 우수하다고 보고되어 있다¹³⁾.

황칠나무 (Dendropanax mobifera Lev.)은 한국의 남부해안과 제주도에서만 자생하는 상록 활엽 교목¹⁴⁾으로 황칠을 이용한 실험적 연구를 살펴보면, 황칠수액이 멜라닌 합성 과정에서 티로시네이스 발현량을 감소시켜 멜라닌의 생합성을 억제한다¹⁵⁾고, 열수 추출한 황칠 추출물은 폴리페놀 함량과 플라보노이드 함량이 많아 항산화 효과 등이 우수하다고¹⁶⁾ 보고되어 있다.

식물계에 존재하는 천연 항산화 물질들은 식품 및 화장품 등에 널리 이용되고 있는데¹⁷⁾, 그 중 비타민, 플라보노이드, 폴리페놀, 안토시아닌 등 항산화성 물질들이 천연식물에서 발견됨에 따라 천연식물을 이용한 미백 효과 및 항산화제 탐색 등의 연구도 진행되고 있다¹⁸⁾.

이에 저자는 미강과 황칠을 1대1 비율로 혼합 발효한 추출물이 악성흑색종 세포주인 B16F10 cell에 미치는 미백 효과와 그 기전을 알아보기 위하여 세포생존율, 멜라닌 생합성을, 티로시네이스 활성을 및 Superoxide dismutase 유사활성도를 측정할 결과 유의

* Corresponding author

Hyun Woo Jeong, College of Korean Medicine, Dongshin University, Naju, Jeonnam 520-714, Republic of Korea

E-mail : hwdolsan@dsu.ac.kr ·Tel : +82-61-330-3524

Received : 2016/07/27 ·Revised : 2016/09/05 ·Accepted : 2016/10/17

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2016.10.30.5.301

Available online at http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm

성을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

이 연구는 미강과 황칠을 1대 1 비율로 배합한 후 설당을 총 중량의 10%, 발효 온도는 20°C 내외, 효소를 황칠, 미강, 설당 총량의 0.1%, 90일 동안 발효하였다. 발효시 사용된 효모는 한국생명공학연구원에서 분양받은 *Saccharomyces cerevisiae*(kctc no.7904)을, 초산균으로는 한국생명공학연구원에서 분양받은 *Acetobacter aceti* (kctc no.1010)를 사용하였다. 이와 같은 조건에서 발효된 미강-황칠 발효 추출물 50 mL을 원심분리하여 상층액을 얻은 후 동결건조기(일신, Korea)를 이용하여 동결건조 분말(Fermentation extract of Rice bran and Korean Dendropanax mixture, FRD) 3.6 g을 얻었다.

이 연구에 사용한 시료는 인산 완충액(phosphate buffered saline, PBS)에 동결건조 분말을 녹여 0.22 µm의 필터(PALL, UK)로 걸러 멸균을 대신하였다.

2) 세포주

악성 흑색종(melanoma) 세포주인 B16F10 cell 은 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다. B16F10 세포주의 생육 배지는 DMEM(Gibco, USA)을 사용하였고, 배지에는 10% fetal bovine serum(Gibco, USA)와 Antibiotic-Antimycotic(Gibco, USA)을 첨가하였고, 실험기간 동안 B16F10 세포주는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2. 방법

1) 세포 생존율 측정

FRD가 B16F10 세포에 미치는 생존율은 EZ-Cytox Assay kit(Dogenbio, Korea)를 사용하여 측정하였다. B16F10 세포를 배양하여 96 well plate에 각 well당 5×10⁴ cells/well의 농도로 분주하고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양 후 FRD를 각 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/mL)로 처리한 후 24 시간 배양하였다. 그 후 EZ-Cytox용액 10 µL를 각 well에 처리한 후 2시간을 배양한 다음 Microplate Reader(Bio-rad, USA)를 사용하여 450 nm에서 측정하여 흡광도를 분석하였다.

2) 멜라닌 생합성을 측정

FRD가 멜라닌 생성에 미치는 영향은 Hosei 등의 방법¹⁹⁾을 참고하여 측정하였다. B16F10 세포주를 배양하여 24 well plate에 각 well당 3×10⁴ cells/well의 농도로 분주하고, 부착 및 안정화를 위하여 24 시간을 배양하였다. 배양이 끝난 다음 FRD를 각 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/mL)로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48 시간 배양하였다. 배양한 후 각 well를 PBS로 세척한 후 1 N NaOH 용액 400 µL를 첨가하고 60°C에서 1 시간 동안 용해 후 Microplate Reader를 사용하여 405 nm에서 측정하였다.

α-MSH(α-melanocyte stimulating hormone)으로 유도된 멜

라닌 생합성에 대한 FRD의 효과를 알기 위하여 FRD를 각 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/mL)로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양한 다음 α-MSH 100 nM를 처리하였다. 이후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48 시간 배양하였다. 배양 후 각 well를 PBS로 세척한 후 1 N NaOH 용액 400 µL를 첨가하고 60°C에서 1 시간 동안 용해한 후 Microplate Reader를 사용하여 405 nm에서 측정하였다.

3) 시험관 내 tyrosinase 활성을 측정

FRD가 티로시네이즈 활성에 미치는 효과는 Yagi 등의 방법²⁰⁾을 이용해 측정하였다. 10 mM L-DOPA 용액 0.2 mL와 0.175 M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 0.5 mL를 가한 후 FRD를 buffer에 녹이고 최종농도(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/mL)가 되도록 0.1 mL를 가한 후 mushroom tyrosinase(110 unit/mL) 0.2 mL를 첨가하여 37°C 에서 2 분간 반응한 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition(\%)} = [1 - \{(B-C)/(A-D)\}] \times 100$$

· A : 효소만 첨가된 반응 용액

· B : 효소와 시료가 모두 첨가된 반응 용액

· C : 시료만 첨가된 반응 용액

· D : 효소와 시료가 모두 첨가되지 않은 반응 용액

4) 세포 내 tyrosinase 활성을 측정

FRD가 세포 내 티로시네이즈 활성에 미치는 효과는 Martinez-Esparza 등의 방법²¹⁾을 이용해 측정하였다. B16F10 세포를 cell culture dish에 각 1.5×10⁶ cells/dish의 농도로 분주한 후, 부착 및 안정화를 위해 24 시간 동안 incubation한 다음 FRD 500 µg/mL로 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간을 추가로 배양하였다. 배양한 후, 세포를 1% Triton X-100을 함유한 10 mM PBS 100 µL에 현탁시킨 후 세포를 vortexing한 후 1,000 rpm에서 5 분 원심분리하여 상층액을 활성 측정 효소액으로 이용하였다. 티로시네이즈의 활성을 측정하기 위하여 96 well plate에 기질인 L-DOPA (2 mg/mL) 100 µL를 넣고, 효소액 40 µL를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1 시간 동안 반응한 후 Microplate Reader 를 사용하여 405 nm에서 측정하였다. 티로시네이즈의 활성 저해율은 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 계산하였다.

α-MSH로 세포 내 티로시네이즈 활성에 미치는 효과를 알기 위해 FRD 500 µg/mL와 arbutin 500 µg/mL를 처리하였다. 1 시간 후 α-MSH 100 nM를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 배양하였고, 24 시간 배양 후, 세포를 1% Triton X-100을 함유한 10 mM PBS 100 µL에 현탁시킨 후 세포를 vortexing한 후 1,000 rpm에서 5 분 원심분리하여 상층액을 활성 측정 효소액으로 사용하였다. 이후 실험방법과 저해율은 티로시네이즈의 활성 저해율과 동일하게 실시하였다.

5) Superoxide dismutase 유사활성도 측정

FRD의 SOD 유사활성도는 Marklund 등의 방법²²⁾에 따라 활성 산소종을 과산화수소(H₂O₂)로 전환하는 반응을 촉매하는 pyrogallol의 생성량을 측정하여 SOD 유사활성을 나타내었다. 양성대조군은 vitamin 500 µg/mL를 처리하였을 때의 SOD 유사활성

으로 하고, FRD 처리 후 나타난 SOD 유사활성을 알아보기 위하여 FRD 각 농도(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/ml)를 buffer에 녹여 10 µl씩 96 well plate에 첨가 후, 7.2 mM pyrogallol 10 µl 와 Tris-HCl Buffer(50 mM Tris aminomethane, 10 mM EDTA, pH 8.0) 150 µl을 첨가하여, 실온에서 10 분간 반응시키고, 1N HCl 50 µl을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 ELISA reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성도는 추출물 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{SOD}(\%) = (1 - A/B) \times 100$$

- A : 추출물 첨가구의 흡광도
- B : 추출물 무첨가구의 흡광도

3. 통계처리

수집된 데이터의 통계처리는 SigmaPlot 11.1 (www.systat.com)를 활용하여 one-way ANOVA 기법으로 처리하였고, 통계적 유의성은 Tukey 방법으로 사후검정하였다. p-value가 0.05 미만인 경우에만 유의한 것으로 인정하였다.

결 과

1. 세포생존율에 미치는 효과

FRD가 B16F10 세포의 생존율에 미치는 효과를 알아보기 위하여 세포주에 FRD를 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/ml)로 처리한 후, 24 시간 배양한 후 생존율을 측정하였다(Fig. 1). B16F10 세포주의 생존율은 FRD의 처리농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였고, 특히 500 µg/ml과 1,000 µg/ml을 처리하였을 때 처리하지 않았을 때보다 유의성 있게 세포생존율을 억제하였다.

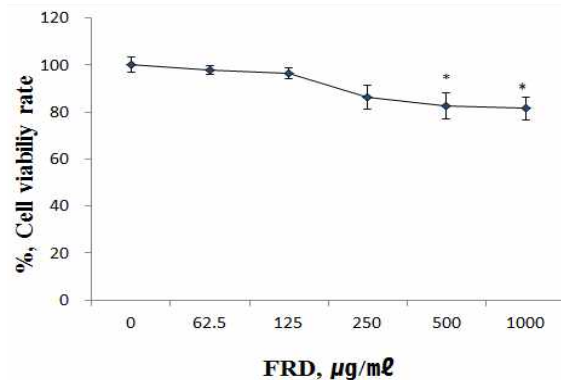


Fig. 1. Effects of FRD on cell viability rate in B16F10 cells. FRD : fermented extract made from Rice bran and Korean Dendorpanax (1:1) Results are presented as mean±SD (n=8). * : Statistically significance compared with non-treated group(0 µg/ml)(* ; P<0.05).

2. 멜라닌 생합성에 미치는 효과

FRD를 B16F10 세포주를 이용한 멜라닌 생성에 미치는 저해 효과를 알아보기 위하여 세포주에 FRD를 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/ml)로 처리한 다음 24 시간 배양한 후 측정된 결과 멜라닌 생합성율은 다음과 같았다(Fig. 2). 멜라닌 생성율은

FRD의 처리농도가 증가할수록 멜라닌 생성이 감소하는 경향을 보였고, 특히 FRD 1,000 µg/ml을 처리하였을 때가 처리하지 않았을 때보다 유의성 있게 멜라닌 생성을 억제하였다.

또한, FRD가 α-MSH에 의해 유도된 멜라닌 생합성율을 측정 한 결과 다음과 같았다(Fig. 3). 아무런 처리를 하지 않은 처리군의 멜라닌 생합성율을 100.00±1.79%라 하였을 때, α-MSH 유도에 의한 멜라닌 생합성율은 131.45±1.20%로 증가하였다. 그러나 α-MSH와 arbutin을 병용처리한 양성대조군의 멜라닌 생합성율은 121.38±1.58%로 α-MSH 단독처리하였을 때보다 감소하였고, α-MSH와 FRD 500 µg/ml을 병용처리하였을 때의 멜라닌 생합성율은 101.89±1.62%로 양성대조군보다도 유의성 있게 감소하였다.

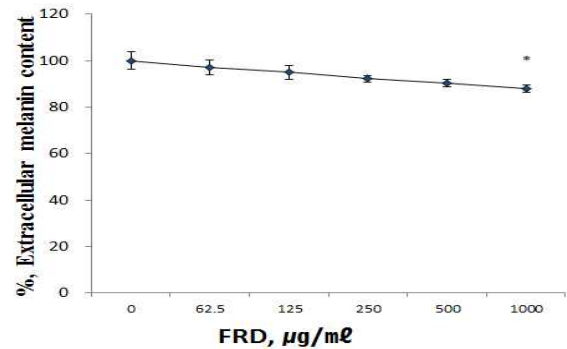


Fig. 2. Inhibitory effects of FRD on melanin production in B16F10 cells. FRD : fermented extract made from Rice bran and Korean Dendorpanax (1:1) Results are presented as mean±SD (n=4). * : Statistically significance compared with non-treated group(0 µg/ml)(* ; P<0.05).

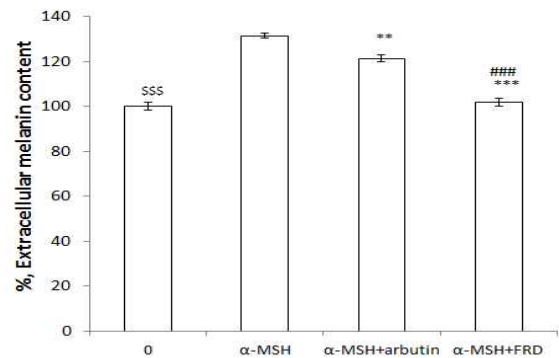


Fig. 3. FRD Inhibits melanin production in α-MSH stimulated B16F10 cells. α-MSH : group that treated α-melanocyte stimulating hormone 100 nM. α-MSH + arbutin : group that treated α-MSH 100 nM and arbutin 500 µg/ml. α-MSH + FRD : group that treated α-MSH 100 nM and FRD. FRD : fermented extract made from Rice bran and Korean Dendorpanax (1:1). Results are presented as mean±SD (n=4). ** : Statistically significance compared with α-MSH-treated group(** ; P<0.01). *** : Statistically significance compared with α-MSH-treated group(*** ; P<0.001). ### : Statistically significance compared with α-MSH+Arbutin-treated group(### ; P<0.001). \$\$\$: Statistically significance compared with α-MSH-treated group(\$\$\$; P<0.001).

3. 시험관 내 tyrosinase 활성도에 미치는 효과

FRD가 티로시네이즈 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 FRD를 농도별(0, 62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/ml)로 처리한 후

티로시네이즈 활성을 측정하였다(Fig. 4). 티로시네이즈 활성은 FRD의 처리농도가 증가할수록 티로시네이즈 활성이 감소하는 경향을 보였고, 특히 500 µg/ml과 1,000 µg/ml 를 처리하였을 때의 티로시네이즈 활성이 FRD를 처리하지 않았을 때보다 유의성 있게 감소하였다.

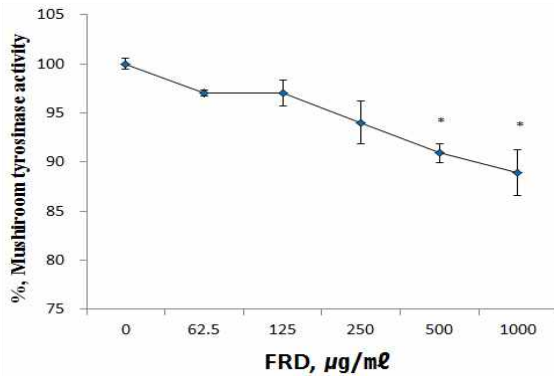


Fig 4. The effects of FRD on tyrosinase activity in vitro. FRD : fermented extract made from Rice bran and Korean Dendorpanax (1:1) Results are presented as mean±SD (n=4). * : Statistically significance compared with non-treated group(0 µg/ml)(* ; P<0.05).

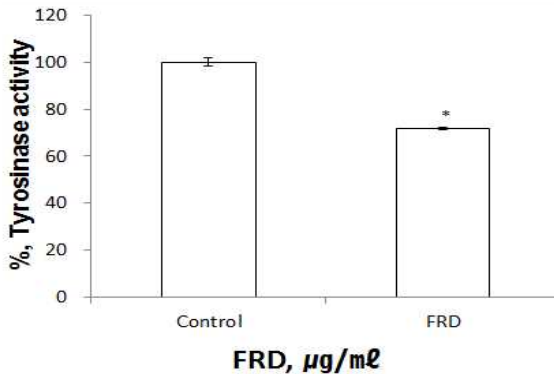


Fig. 5. Inhibitory effects of FRD on tyrosinase activity in B16F10 cells. Control : non-treated group. FRD : fermented extract made from Rice bran and Korean Dendorpanax (1:1) Results are presented as mean±SD (n=6). * : Statistically significance compared with control group(0 µg/ml)(* ; P<0.05).

4. 세포 내 tyrosinase 활성에 미치는 효과

FRD가 세포 내 티로시네이즈 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 B16F10 세포에 FRD 500 µg/ml로 처리한 다음 티로시네이즈 활성을 측정하고 결과 다음과 같았다. 아무런 처리를 하지 않은 처리군의 티로시네이즈 활성을 100.00±1.79%라 하였을 때, FRD를 처리하였을 때의 티로시네이즈 활성은 71.65±0.50%로 유의성 있게 억제하였다(Fig. 5).

FRD가 α-MSH 유도에 의한 티로시네이즈 활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 B16F10 세포에 α-MSH와 함께 FRD 500 µg/ml를 병용처리한 다음 티로시네이즈 활성을 측정하고 결과 다음과 같았다(Fig. 6). 아무런 처리를 하지 않은 처리군의 티로시네이즈 활성을 100.00±1.95%라 하였을 때, α-MSH유도에 의하여 티로시네이즈 활성은 159.52±2.17%로 증가하였고, α-MSH와

arbutin을 병용처리한 양성대조군의 티로시네이즈 활성은 134.80±3.55%로 α-MSH 단독처리하였을 때보다 감소하였다. 또한 α-MSH와 FRD 500 µg/ml를 병용처리하였을 때의 티로시네이즈 활성은 99.82±0.94%로 α-MSH 단독 처리군과 양성대조군보다 유의성 있게 감소하였다.

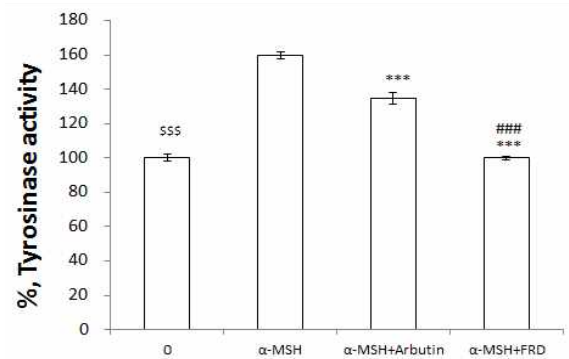


Fig. 6. The effects of FRD and α-MSH on tyrosinase activity in B16F10 cells. α-MSH : group that treated α-melanocyte stimulating hormone 100 nM. α-MSH + arbutin : group that treated α-MSH 100 nM and arbutin 500 µg/ml. α-MSH + FRD : group that treated α-MSH 100 nM and FRD. FRD : fermented extract made from Rice bran and Korean Dendorpanax (1:1). Results are presented as mean±SD (n=4). *** : Statistically significance compared with α-MSH-treated group(*** ; P<0.001). ### : Statistically significance compared with α-MSH+Arbutin-treated group(* ; P<0.001). \$\$\$: Statistically significance compared with α-MSH-treated group(\$\$\$; P<0.001).

5. Superoxide dismutase 유사활성에 미치는 효과

FRD가 SOD 유사활성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 FRD를 농도별(62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/ml)로 처리한 다음 SOD 유사활성을 측정하고 결과 다음과 같았다(Fig. 7). FRD가 SOD 유사활성에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 양성대조군으로 vitamin C 500 µg/ml를 처리한 SOD 유사활성을 100.00±1.99%라 하였을 때, FRD를 농도별로 처리하였을 때의 SOD 유사활성은 양성대조군보다는 낮았고, 농도 의존적 경향성은 확인되지 않았으나 SOD 유사활성은 유사하게 나타났다.

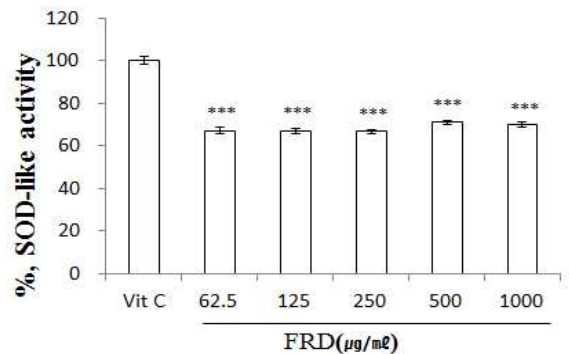


Fig. 7. Superoxide dismutase-like activity of FRD depending on concentration. Vit C : vitamin C 500 µg/ml treated group. FRD : fermented extract made from Rice bran and Korean Dendorpanax (1:1). Results are presented as mean±SD (n=8). *** : Statistically significance compared with Vit C treated group (*** ; P<0.001).

고찰

노화란 한 생물, 개체에서 시간의 진행에 비례하여 일어나는 점진적이고 내적인 퇴행성 변화로 구조적·기능적 변화가 초래되어 외부환경에 대해 반응하는 능력이 떨어지는 현상을 의미한다²³⁾. 피부노화를 촉진하는 요인 중 내적인 요인은 유전적 프로그램에 의해 일어나는 현상으로서²⁴⁾ 피부의 위축, 황색변화, 주름, 늘어짐 등이 나타나고²⁵⁾, 외적인 요인은 자외선, 흡연, 바람, 화학물질 등이 있으나 자외선에 의한 광노화가 가장 중요한 요인이다. 광노화로 나타나는 임상적 증상은 거친 피부, 미세한 주름, 혈관확장, 광선각화증 등이다²⁶⁾.

두릅나무과에 속하는 황칠나무 (*Dendropax mobifera* Lev.)는 세계에서 한국의 해남, 완도와 같은 남부 해안 지역과 제주도에서만 자생하는 상록 활엽 교목이다¹⁴⁾. 황칠을 이용한 최근의 연구로는 이 등¹⁵⁾이 황칠수액이 멜라닌 합성 과정에 관여하는 티로시네이스 발현량을 감소시켜 멜라닌의 생합성을 억제한다고 하였고, 문¹⁶⁾은 에탄올보다는 열수로 추출하였을 때 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 많아 항산화 효과가 우수하다고 하였으며, 모 등²⁷⁾은 황칠나무 잎의 ethyl acetate 분획 추출물이 멜라닌 생성 억제와 항산화 효과가 있어 기능성 소재의 화장품으로 개발할 가능성이 있다고 하였다.

미강(Rice bran)은 벼의 도정과정 중 발생하는 부산물로서 단백질, 셀룰로스 등의 식이섬유와 지방을 함유하고 있으며, 인체에 유익한 폴리페놀 등의 성분이 풍부하게 함유되어 있어 영양적 가치가 높은 식품이다^{11,12)}. 최근에 폴리페놀 성분과 헤미셀룰로스 및 펙틴 등의 성분이 면역기능 활성화 및 항암작용이 있다는 연구들^{28,29)}이 발표되면서 미강에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데 그 대표적인 것을 살펴보면 다음과 같다. 김³⁰⁾은 미강이 항산화 효과가 우수하고, 염증 병태모델에서도 항염 효과를 나타내 화장품 개발 시 기능성 소재로 다양하게 활용될 수 있다고 하였고, 전 등¹³⁾은 미강 에탄올 추출물이 우수한 항산화 효과와 함께 멜라닌 생성에 관여하는 티로시네이스에 대한 저해 효과가 있어 피부의 미백 효과가 있음을 제시하였다. 또한, 남³¹⁾은 미강이 발효하면 총 폴리페놀 함량을 현저하게 증가되어 superoxide dismutase(SOD) 활성 등 항산화 효과가 활발해진다고 보고하였고, 최 등³²⁾은 황칠과 미강을 9대1 비율로 배합해 발효시킨 추출물이 티로시네이스의 활성을 저해함으로써 멜라닌 생성을 억제하고, 자외선 등의 산화적 스트레스에 대한 방어적인 효과도 있다 하였다. 이에 본 저자는 미강과 황칠을 각각 1대1 비율로 혼합하여 발효시킨 추출물 FRD가 악성 흑색종 세포주인 B16F10 세포에 미치는 미백효과와 기전을 알아보기 위하여 세포생존율, 멜라닌 생합성을, tyrosinase 활성 및 SOD 유사활성도를 측정하였다.

FRD의 B16F10 세포의 생존율에 미치는 효과를 관찰한 결과, FRD 500 µg/ml 이상을 처리하였을 때 B16F10 세포의 생존율을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 1).

사람의 피부색은 여러 원인 중 멜라닌에 의해 결정적인 작용을 하는데³³⁾, 멜라닌은 생체 고분자물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이며 사람의 머리카락과 피부색을 이루는 색소 중의 하나이다³⁴⁾.

표피에 존재하는 멜라닌은 태양광선으로부터 들어오는 자외선을 차단하는 색소로서 자외선에 피부가 노출될 경우 자외선 흡수에 의한 세포손상을 방어하기 위한 수단으로 멜라닌 색소가 생성된다³⁵⁾. 그리하여 자외선에 과도하게 노출되거나 α-MSH에 의하여 멜라닌이 생성될 수 있으며³⁶⁾, 멜라닌이 국소적으로 과도하게 합성되거나 노화 등에 의해 피부의 생리기능이 떨어지게 되면 멜라닌이 피부표면에 침착되어 기미, 주근깨 및 다양한 색소침착을 유발하게 된다³⁴⁾.

FRD의 B16F10 세포주의 생존율에 효과가 있어 멜라닌 생성에 미치는 효과를 관찰한 결과, FRD 1,000 µg/ml을 처리하였을 때 아무런 처리하지 않았을 때보다 유의성 있게 멜라닌 생성을 억제하였고(Fig. 2), α-MSH로 유도된 멜라닌 생합성 저해율은 α-MSH를 처리하였을 때 증가되었던 멜라닌 생성보다 α-MSH와 arbutin를 병용처리하였을 때 유의성 있게 감소하였으며, α-MSH와 FRD 500 µg/ml을 병용처리하였을 때에는 α-MSH 단독처리 했을 때 그리고 α-MSH와 arbutin를 병용처리하였을 때보다 멜라닌 생성을 유의성 있게 억제하였다(Fig. 3). FRD가 자외선이나 호르몬 변화에 의해 나타나는 멜라닌의 생성에 관여하고 있음을 보여주는 결과로 천연 미백물질로 본 시료가 사용될 수 있음을 보여주고 있다.

멜라닌은 티로신이 티로시네이스의 작용에 의해 여러 가지 물질로 대사되는 과정 중에 최종적으로 합성하기 때문에³⁷⁾ 멜라닌의 생성효소인 티로시네이스의 합성이 억제되거나 그 활성이 저해되며 멜라닌 생성이 감소된다³⁸⁾. 그러므로 티로시네이스 억제제인 resorcinol과 ascorbic acid와 그 유도제 그리고 arbutin 등이 미백 첨가제로 소량만이 이용되고 있다³⁹⁾.

FRD의 시험관 내 티로시네이스 활성율은 처리농도가 고농도(500 µg/ml 이상) 일 때 유의성 있게 감소하였고(Fig. 4), 세포 내 티로시네이스 활성율도 FRD 500 µg/ml을 처리하였을 때 아무런 처리를 하지 않았을 때보다 유의성 있게 감소하였다(Fig. 5). 또한 FRD이 α-MSH로 유도된 티로시네이스 활성율을 관찰한 결과(Fig. 6), α-MSH와 FRD 500 µg/ml을 병용처리한 군의 티로시네이스 활성율이 α-MSH 단독처리군과 α-MSH와 arbutin를 병용처리한 양성대조군 모두에 비해 티로시네이스 활성율이 유의성 있게 억제되었다. 이는 FRD가 티로시네이스의 활성을 저해하여 멜라닌의 생성을 감소시켰고, 이러한 결과는 FRD가 arbutin의 티로시네이스 활성 저해 효과보다 우수해 미백 첨가제로 사용될 수 있음을 다시 한번 보여주는 결과라고 판단된다.

성인병 질환은 활성산소와 관련이 깊어 이를 조절할 수 있는 SOD, glutathione peroxidase 등의 항산화성 효소와 vitamin C, glutathione 등의 항산화성 물질들이 연구되고 있다⁴⁰⁾. 그 중 SOD 유사활성물질은 효소가 아니지만 주로 phytochemical에 속하는 저분자 물질로서 SOD와 유사한 역할을 하면서 생체를 보호하며 노화 억제와 함께 산화적 장애를 방어할 수 있다고 보고되어 있다⁴¹⁾. 또한 산화적 스트레스는 피부의 광노화를 유발⁴²⁾하고, 기미나 주근깨 등을 침착⁴³⁾시키는 주요인으로 피부세포 내 SOD를 비롯한 catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소의 기능을 저해한다⁴²⁾. 이러한 이유로 FRD의 SOD 유사활성에 미치는 영향을 관찰한 결과, FRD를 처리한 처리군의 SOD 유사활성도는 vitamin C를 처리하였을 때보다 유의하게 감소하였지만 처리농도에 비례해

서는 SOD 유사활성도가 유사하여 FRD가 SOD 유사활성에 직접적으로 관여하지 않는 것으로 판단된다.

이상의 결과, 미강과 황칠을 1대1 비율로 혼합하여 발효한 추출물은 티로시네이즈의 활성을 저해해 멜라닌 생성을 억제하기 때문에 미백 첨가제로 사용할 수 있는 산업적 가치가 있을 것으로 생각된다.

결 론

미강과 황칠을 1대1 비율로 배합한 후 발효한 추출물이 미백에 미치는 효과와 기전을 알아보기 위하여 흑색종 세포주인 B16F10 세포를 이용하여 세포생존율, 멜라닌 생합성을, 티로시네이즈 활성을 및 SOD 유사활성도를 측정된 결과를 분석해 보면 미강과 황칠 시료는 일정농도에서 B16F10 세포의 생존율의 억제와 멜라닌 생성을 유의성 있게 억제하였다. 또한 티로시네이즈의 활성 억제에 효과가 관찰되었으며 SOD 유사활성도는 감소하는 결과가 관찰되었다. 이러한 결과를 종합해 보면 미강과 황칠을 1대1 비율로 배합한 후 발효한 추출물은 일정수준 이상의 미백효과가 보여지며 이를 기반으로 미백 기능성 제품의 개발이나 차후 연구를 진행할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청 지원 산학연협력기술개발사업의 일환으로 진행되었음.

References

- Glogau, R.G. Physiologic and structural changes associated with aging skin. *Dermatol Clin.* 15: 555-559, 1997.
- Lewis, A.B., Gendler E.C. Resurfacing with topical agents. *Semin Cutan Med Surg.* 15: 139-144, 1996.
- Choi, H.Y. The Effect of Topical Ascorbic Acid on Epidermal Melanocytes in UV-irradiated Black Mice. *Ewha medical journal*, 9: 187-196, 1988.
- Seo, M.J. A Study of Heat Transfer Simulation for the Laser Treatment of Skin Aging. The Graduate School of Dongguk University, 2012.
- Lee, S.W. The effect of ultrasound on aged skin. The Graduate of School Yonsei University, 2002.
- Bae, I.S. Inhibitory Effects of Phellodendrin cortex Water Extract on Skin Aging: Its Usefulness as Cosmetic Materials. The Graduate of School Keimyung University, 2009.
- Kwon, M.H. Peonia japonica Extract Suppresses Skin Aging in Hairless Mice. The Graduate School Keimyung University, 2008.
- Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J.D., Yan, L.J., Amers, B.N. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4337-4341, 1995.
- Won, Y.H., Hur, S.Y., Lee, S.C., Chunn, I.N., Kim, Y.P. Clinical and Histopathologic Study of Malignant Melanoma(1980-1990.4). *Korean Journal of Dermatology* 29(2):193-202, 1991.
- KFDA. Development of evaluation techniques on cosmeceuticals using natural : evaluation techniques of whitening and anti-oxidative cosmetics using natural products contained tannin and related phenolic compounds, *KFDA*: 5-12, 2004.
- Saunders, R.M. The properties of rice bran as a food stuff. *Cereal Foods Worlds* 35(7):632-635, 1990.
- Aoe, S., Oda, T., Tatsumi, T., Yamauchi, M., Ayano, Y. Extraction of soluble dietary fibers from defatted rice bran. *Cereal Chem.* 70(4):423-425, 1993.
- Jeon, S.B., Jeon, J.A, Jeong, B.G. Anti-oxidative Activities and Tyrosinase Inhibition Ability of Rice Bran Ethanol Extract. *J. Kor. Soc. Cosm.* 16(2):602-606, 2010.
- Ahn, D.K., Illustrated book of Korean Medicinal Herbs, Seoul, Kyohak, p 349, 1998.
- Lee, M.K., Lee, I.S., Lee, J.S. For the Utilization of Native Plant Resources as High-value Materials: Evaluation on Demelanizing Activity of Dendropanax Morbifera in Bogildo. *The journal of Korean Island.* 25(4):227-240, 2013.
- Moon, C.G. Antioxidant Activity of Dendropanax morbifera Lev. The Graduate School of Advanced Industrial Technology, Inje Univ, 2007.
- Block, G., Langseth, L. Antioxidant Vitamins and Disease Prevention. *Food Technology* 48: 80-85, 1994.
- Park, E.Y., Kim, Y.C. Effectiveness of White Tea Water Extract on Skin Whitening Using in vitro Test. *J. Kor. Soc. Cosm.* 15(2):611-617, 2009.
- Hosoi, J., Abe, E., Suda, T., Kuroki, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α . 25-Dihydroxyvitamin D3 and Retinoic Acid. *Cancer Res.* 45(4):1474-1478, 1985.
- Yagi, A., Kanbara, T., Morinobu, N. The effects of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Med.* 3981: 517-519, 1986.
- Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J.A., Garcia-Borron, J.C. Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* 255: 139-146, 1998.

22. Marklund, S., Marklund, G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biol. Chem.* 47: 468-474, 1974.
23. Korean Dermatological Association : *Dermatology*, Seoul, Yeo Moongak, p 23, 1994.
24. Gendler, E.C. Topical treatment of the aging face. *Dermatol Clin.* 15: 561-567, 1997.
25. Glogau, R.G. Physiologic and structural changes associated with aging skin. *Dermatol Clin.* 15: 555-559, 1997.
26. Lewis, A.B., Gendler, E.C. Resurfacing with topical agents. *Semin Cutan Med Surg.* 15: 139-144, 1996.
27. Mo, J.H., Oh, S.J. Tyrosinase Inhibitory Activity and Melanin Production Inhibitory Activity of the Methanol Extract and Fractions from *Dendropanax moribifera* Lev. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* 11(2):275-280, 2013.
28. Jariwalla, R.J. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. *Drugs Exp Clin Res.* 27(1):17-26, 2001.
29. Ryan, E.P. Bioactive food compound and health properties of rice bran. *JAVMA.* 238(5):593-600, 2011.
30. Kim, M.H. Antioxidative, Anti-inflammatory Effects of Rice Bran Extracts and Its Cosmetic Application. Department of Cosmetic Science Nambu University, 2012.
31. Nam, Y.H. Preparation and Quality Characteristics of Fermented rice bran using Lactic acid bacteria, Department of Food Science and Technology. The Graduate School, Catholic University of Daegu, 2011.
32. Choi, C.H., An, J.E., Lim, S.S., Jeong, H.W. Effects of Vinegar Fermentation of Korean *Dendropanax* and Rice Bran Mixture on the Activity of Tyrosinase and Anti-Oxidant in B16F10 Cell Line, *Korean Journal of Oriental Physiology&Pathology*, 22(2):273-280, 2015.
33. Lee, H.S., Yoon, J.N. Inhibitory Activity of Advanced Glycation Endproducts(AGE) Formation of Edible Plants for Development of Anti-Wrinkle Ingredients. *Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39(2):186-192, 2010.
34. Prota, G., "Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals", *J. Invest. Dermal* 75: 122-126, 1980.
35. Wang, K.H., Lin, R.D., Hsu, F.L., Huang, Y.H., Chang, H.C., Huang, C.Y., Lee, M.H. Cosmetic application of selected traditional Chinese herbal medicines. *J. Ethnopharmacol.* 106: 353-359, 2006.
36. Sulaimon, S., Kitchell B, *The Biology of Melanocytes. Veterinary Dermatology* 14(2):57-65, 2003.
37. Lee, J.Y., An, B.J. Whitening and Anti-wrinkling Effects of Fractions from *Prunus persica* Flos. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 40(4):364-370, 2012.
38. Gupta, A.K., Gover, M.D., Nouri, K., Taylor, S. The treatment of melasma : a review of clinical trials. *J. Am. Acad. Dermatol.* 55(6):1048-1065, 2006.
39. Ando, S.O., Ando, Y.S., Mishima, Y. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* 100: 150-155, 1993.
40. Mavelli, L., Ciriolo, M.R., Rotilio, G., De Sole, P., Castorino, M., Stabile, A. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in oxidative hemolysis. A study of Fanconi's anaemia erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 106: 286-290, 1982.
41. Kitani, K., Minami, C., Yamamoto, T., Kanai, S., Ivy, G.O., Carrillo, M.C. Pharmacological interventions in aging and age-associated disorders : potentials of propargylamines for human use. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959: 295-307, 2002.
42. Liu, T.H., Beckman, J.S., Freeman, B.A., Hogan, E.L., Hsu, C.Y. Polyethylene glycolconjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J. Physiol.* 256: H589-H593, 1990.