



### 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



**저작자표시.** 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



**비영리.** 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



**변경금지.** 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

**저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.**

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

제주아그배

(*Malus micromalus* Makino)

추출물의 생리활성에 관한 연구



제주대학교 대학원

생명과학과

이 주 엽

2007년 8월

제주아그배  
(*Malus micromalus* Makino)  
추출물의 생리활성에 관한 연구

지도교수 김 세 재

이 주 엽

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2007년 8월

이주엽의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 \_\_\_\_\_ 印

위 원 \_\_\_\_\_ 印

위 원 \_\_\_\_\_ 印

제주대학교 대학원

2007년 8월

Studies on Biological Activities of the  
Extracts from *Malus micromalus* Makino

Ju-Yeop Lee

(Supervised by Professor Se-Jae Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree  
of Master of Science

2007 . 8 .

This thesis has been examined and approved.

---

Thesis director, Sun-Ryung Lee of life science

---

---

(Name and signature)

DEPARTMENT OF LIFE SCIENCE  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

# ABSTRACT

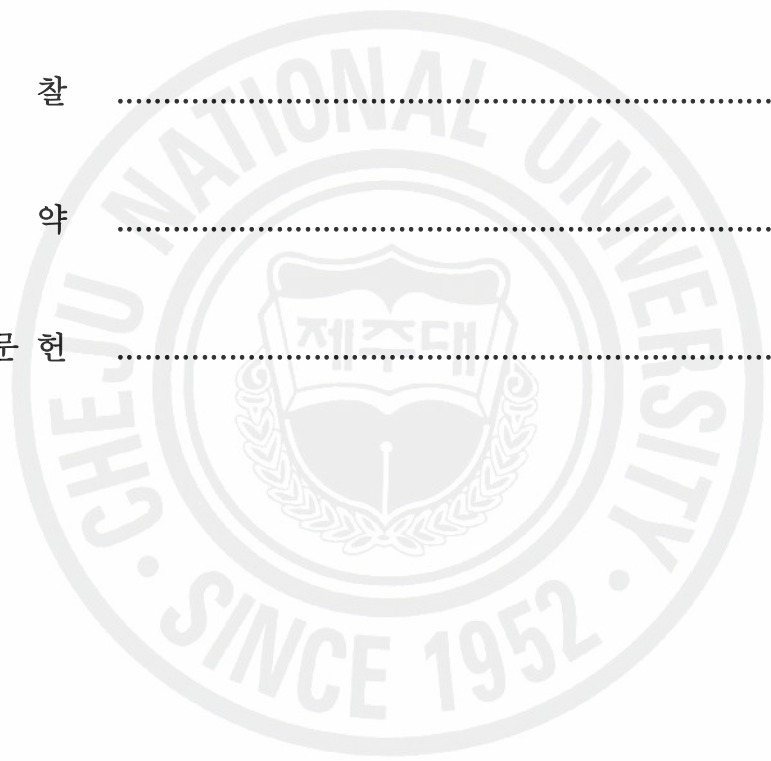
*Malus micromalus* Makino is a native plant to Jeju Island. In order to evaluate the usefulness of its extract as a functional biomaterial, we investigated several biological activities using the ethanol extract and its fractions from *M. micromalus* leaves. The ethanol extract showed strong antioxidant activities, such as DPPH scavenging activity ( $IC_{50}=16.1\mu\text{g}/\text{ml}$ ), nitric oxide (NO) scavenging activity ( $IC_{50}=901.2\mu\text{g}/\text{ml}$ ), superoxide scavenging activity ( $IC_{50}=42.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and xanthine oxidase inhibitory activity ( $2.7\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Its ethylacetate (EtOAc) fraction showed the strongest antioxidant activities among several fractions. The ethanol extract and its EtOAc fractions dose-dependently inhibited the NO production in a lipopolysaccharide-stimulated murine macrophage RAW 264.7 cells. They inhibited the expression of protein and mRNA of iNOS and COX-2 in a dose-dependent manner. Also, they inhibited tyrosinase activity and melanin content in Melan-a cells, through inhibition of expression of protein and mRNA of tyrosinase and TRP-1. These results suggest that extract of *M. micromalus* could be used as functional biomaterial in developing a skin whitening agent having the antioxidant and anti-inflammatory activity.

Key word : *Malus micromalus* , antioxidant activity, anti-inflammatory, melanogenesis.

# 목 차

|  |    |
|--|----|
| ABSTRACT .....                                       | i  |
| 목 차 .....  | ii |
| LIST OF TABLE .....                                  | iv |
| LIST OF FIGURES .....                                | v  |
| <br>   |    |
| I. 서 론 .....   | 1  |
| <br>   |    |
| II. 재료 및 방법 .....                                    | 4  |
| 1. 시료의 추출 .....                                      | 4  |
| 2. 세포 배양 .....                                       | 4  |
| 3. 항산화 활성 측정 .....                                   | 5  |
| 3-1. DPPH 자유유리기 소거 활성 측정 .....                       | 5  |
| 3-2. NO 소거 활성 측정 .....                               | 5  |
| 3-3. Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성 측정 ..... | 6  |
| 4. 세포 독성 측정 .....                                    | 6  |
| 5. NO 생성 억제 측정 .....                                 | 6  |
| 6. Melanin 함량 분석 .....                               | 7  |
| 7. 세포내 tyrosinase 활성 분석 .....                        | 7  |
| 8. 전기영동 및 Western blot 분석 .....                      | 8  |
| 9. RNA 분리 및 RT-PCR .....                             | 8  |
| 10. 통계학적 분석 .....                                    | 9  |
| <br>   |    |
| III. 결 과 .....                                       | 12 |
| 1. 제주아그배 추출물의 항산화 활성 .....                           | 12 |

|   |    |
|---|----|
| 1) DPPH 자유 유티기 소거 활성 .....                      | 12 |
| 2) NO 소거 활성 .....                               | 12 |
| 3) Xanthine oxidase 억제 및 Superoxide 소거 활성 ..... | 12 |
| 2. 제주아그배 추출물의 NO 생성 억제 활성 .....                 | 19 |
| 3. 제주아그배 추출물의 iNOS와 COX-2 단백질과 mRNA 발현 저해 ..... | 19 |
| 4. 세포 내의 Melanin 생성과 tyrosinase 저해 활성 .....     | 25 |
| 5. Melanin 생성에 관여하는 단백질 발현 저해 활성 .....          | 25 |
| 6. Melanin 생성에 관여하는 mRNA 발현 저해 활성 .....         | 26 |
| <br>  |    |
| IV. 고찰 .....                                    | 31 |
| <br>  |    |
| V. 요약 .....                                     | 34 |
| <br>  |    |
| VI. 참고 문헌 .....                                 | 35 |

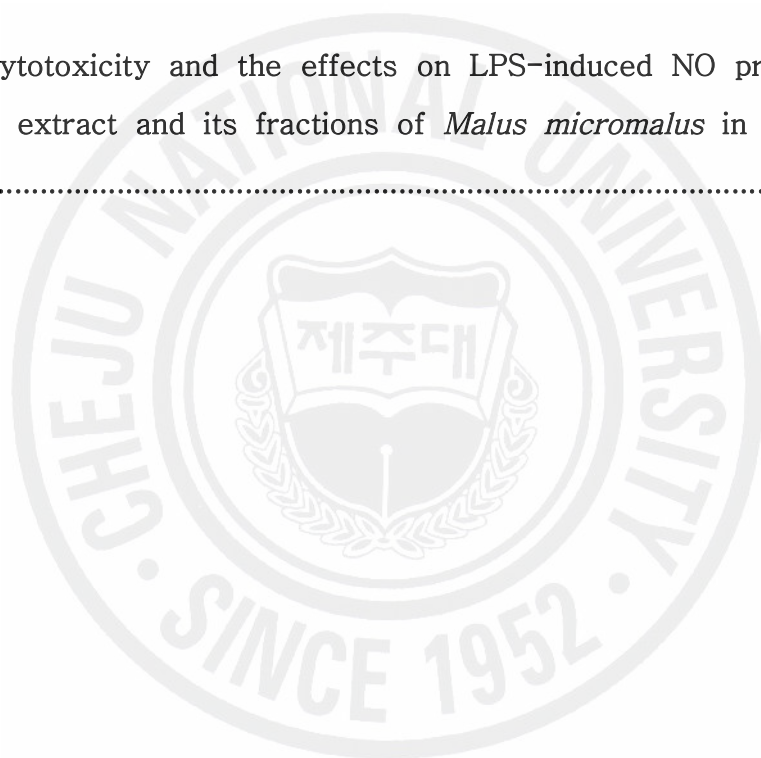


## LIST OF TABLES

Table 1. The primer sequences of the genes used in RT-PCR analysis and the expected size of their PCR products ..... 11

Table 2. Antioxidant activities of the ethanol extract and its fractions of *Malus micromalus* ..... 18

Table 3. Cytotoxicity and the effects on LPS-induced NO production of the ethanol extract and its fractions of *Malus micromalus* in RAW 264.7 cells ..... 21

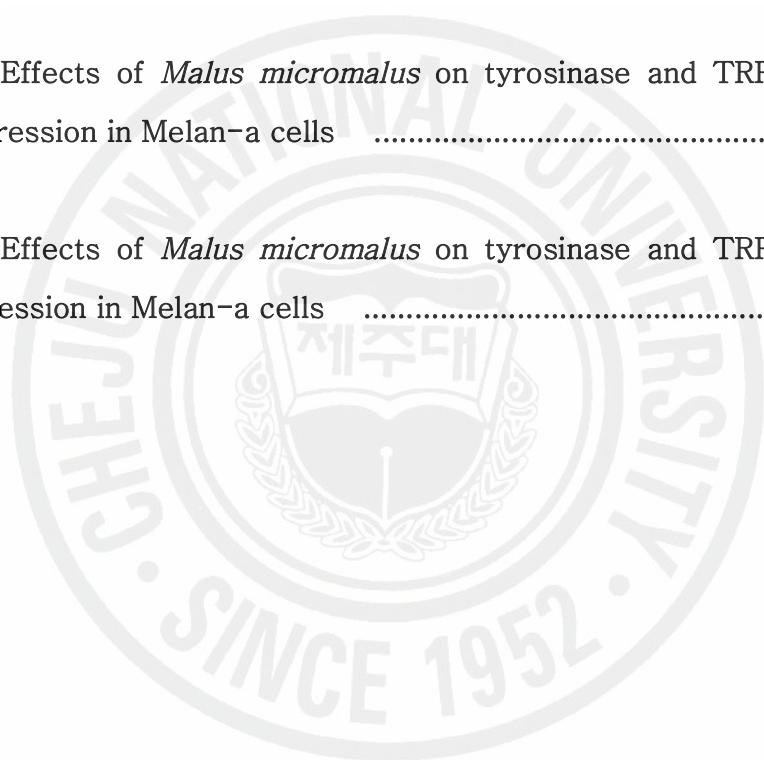




## LIST OF FIGURES

|  |    |
|--|----|
| Figure. 1. The fractionation using solvent partition from the ethanol extract of <i>Malus micromalus</i> .....   | 10 |
| Figure 2. The DPPH radical scavenging activity of the ethanol extract and its fractions of <i>Malus micromalus</i> .....   | 14 |
| Figure 3. The scavenging activity of the ethanol extract and its fractions of <i>Malus micromalus</i> on nitrite production in sodium nitropusside solution .... | 15 |
| Figure 4. The xanthine oxidase inhibitory activity of the ethanol extract and its fractions of <i>Malus micromalus</i> .....                                     | 16 |
| Figure 5. The superoxide radical scavenging activity of the ethanol extract and its fractions of <i>Malus micromalus</i> .....                                   | 17 |
| Figure 6. Effects of solvent fractions of <i>Malus micromalus</i> on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....                                   | 20 |
| Figure 7. Effects of <i>Malus micromalus</i> on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....  | 22 |
| Figure 8. Effects of <i>Malus micromalus</i> on the iNOS and COX-2 protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....                                    | 23 |

|  |    |
|--|----|
| Figure 9. Effects of <i>Malus micromalus</i> on the iNOS and COX-2 mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells ..... | 24 |
| Figure 10. Effects of <i>Malus micromalus</i> on melanin content in Melan-a cells .....                                    | 27 |
| Figure 11. Effects of <i>Malus micromalus</i> on cellular tyrosinase activity in Melan-a cells .....                       | 28 |
| Figure 12. Effects of <i>Malus micromalus</i> on tyrosinase and TRP-1, TRP-2 protein expression in Melan-a cells .....     | 29 |
| Figure 13. Effects of <i>Malus micromalus</i> on tyrosinase and TRP-1, TRP-2 mRNA expression in Melan-a cells .....        | 30 |



# I. 서 론

천연물로부터 생리활성 물질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 질병에 대한 치료 및 예방제 또는 건강보조제로서 식물자원이 널리 이용되고 있다. 천연 항산화제로는  $\alpha$ -tocopherol, vitamin C, carotenoids, flavonoids 등이 알려져 있는데, 이러한 항산화 효과가 있는 물질들은 동식물에 널리 분포되어 있으며, 특히 많은 연구가 이루어진 분야는 식물성 물질이다. 식물 유래의 2차 대사산물들은 자유유리기 (free radical)와 활성산소의 생성을 억제하거나 제거시켜서 산화에 의한 세포손상을 방지한다는 것이 생체 실험결과 밝혀졌다 (Jeong 등, 2004; Kang 등, 2005). 지금까지 보고된 대부분의 천연 항산화제는 식물에서 유래된 것으로서 주로 폴리페놀 화합물인 것으로 알려져 있으며 (Pratt 등, 1992), 특히 flavonoids는 지질의 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 함으로써 노화방지, 암 및 심장질환 등을 예방하거나 지연하는 효과가 있어서 오늘날 식품, 의약품, 화장품 등 많은 분야에서 활용되고 있다 (Kim 등, 2005).

최근 고령화와 식생활의 변화에 따라 급성 염증질환과 류마티스관절염, 천식과 같은 만성 염증질환이 증가하는 추세이다. 염증 반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등과 같은 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상 부위를 수복 재생하려는 기전이다 (Kim, 1988). 염증을 일으키는 요인 중에서 세균에 의한 것이 가장 많으며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid(HETE), leukotriene과 같은 혈관생성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증이 유발된다. 그런데 지속적인 염증반응은 도리어 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등과 같은 질환의 요인이 되기도 한다 (Willoughby, 1971).

Nitric oxide (NO)는 NO synthases (NOSs)에 의해 L-arginine이 L-citrulline

으로 전환되면서 생성되는 유리기로, 체내 방어 및 신호전달, 혈관 확장 등의 2차 신호전달자로서 다양한 생리기능을 가진다 (Knowles 등, 1992; Monacada 등, 1991; Nathan, 1992; Palmer 등, 1988). NOSs는 물리화학적 성질에 따라 3종류의 동종 효소로 분류된다. 이 중에 neuronal NOS (nNOS)와 endothelial NOS (eNOS)는 세포에 지속적으로 존재하기 때문에 constitutive NOS로 분류되며 (Kawamata 등, 2000), 상대적으로 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포 등에서 lipopolysaccharide (LPS), interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) 및 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )등의 자극제들에 노출되는 경우에 발현되는 inducible NOS (iNOS)가 있다. iNOS에 의해 생산된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다 (An 등, 2002 ; Lee 등, 1998; Lee 등, 2000). 그리고 병리적인 원인에 의한 과도한 NO의 생성은 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등과 같은 생체에 유해한 작용을 나타낸다 (Cerutti, 1994; Scott 등, 2000). 각질형성세포 (Keratinocyte)에서 UV에 의해 생성된 NO가 인접한 melanocyte를 자극하여 수지상돌기 형성을 촉진하고, cGMP 경로를 경유하여 멜라닌 합성을 유도한다고 알려져 있다 (Cals-Grierson 등, 2004; Lassalle 등, 2003; Romero-Graillet 등, 1996).

동물의 조직 및 피부에 존재하는 멜라닌은 갈색과 검정색인 eumelanin과 노란색과 붉은색인 pheomelanin의 두 종류가 있다. 그리고 피부에 존재하는 melanocyte의 수 자체는 성별이나 인종에 따른 차이가 없으나, 흑인의 경우는 백인에 비하여 유전적으로 더 많은 멜라닌을 생성하고, 생성하는 멜라닌의 종류도 eumelanin의 비율이 더 높다. 멜라닌은 표피의 기저층과 진피의 연접부에 존재하는 melanocyte에서 tyrosinase를 핵심 효소로 이용하여 생합성 된다. 세포내 아미노산의 일종인 tyrosine이 tyrosinase에 의해 산화가 촉진되어 3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA)와 dopaquinone으로 전환되고 이후 tyrosinase 관련 단백질인 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase

(TRP-1)와 dopachrome tautomerase (TRP-2) 작용의 자동산화과정을 통해 멜라닌이 합성되어 melanosome이라는 과립이 형성된다 (Hearing 등, 1976, 1987; Prota 등, 1992). 생성된 멜라닌은 각질형성세포로 이동되어 자외선 등에 의한 피부의 노화나 일광각화증을 억제하여 피부를 보호하는 긍정적인 기능을 가지고 있는 반면에, 과잉생산에 의한 피부의 색소침착 및 멜라닌 전구물질들이 독성으로서 작용하는 등의 부정적인 기능을 동시에 가지고 있다 (Kameyama 등, 1993; Kaufman 등, 1991; Weixiong 등, 1997). 멜라닌 중 eumelanin이 인체 피부의 색소 침착과 피부의 흑화 현상의 원인물질로 알려져 있다. 그리고 여러 연구 보고에 의하면 melanin의 생합성은 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 뿐만 아니라,  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)와  $\alpha$ -MSH의 전구체인 pro-opiomelanocortin (POMC)도 melanocyte에 있는 melanocortin-1 (MC-1) 수용체에 결합하여 cAMP활성을 증가시켜 멜라닌 생성을 촉진시키고, NO<sup>-</sup>는 cGMP (cyclic guanosine monophosphate)경로를 통해 멜라닌 생성을 증가시킨다 (Romero-Graillet 등, 1997; Sungbin 등, 1998). 그리고 멜라닌 합성을 유도하는 인자에는 interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, TNF- $\alpha$ 와 같은 cytokine류, Endothelin-1 (ET-1), Basic fibroblast growth factor(bFGF)와 같은 성장 인자 그리고 염증 매개자 leukotriene, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)가 있다 (Morelli 등, 1993).

제주아그배 (*Malus micromalus* Makino)는 개아그배나무 또는 좀아그배나무라고도 하며, 제주도 한라산록에서 자생하는 낙엽관목이고 5~6월에 개화하여 9월에 열매가 열리는 식물이다 (이 등, 2001; 이, 2003). 정원수나 가구재로 활용이 되고 있고 과실은 하리(下痢) 치료에 효과가 있다고 알려져 있는 정도이며 그 생리활성에 대한 연구 보고는 없는 실정이다. 본 연구는 제주아그배가 기능성 생물 소재로서의 활용 가능성이 있는지를 평가하기 위하여 제주아그배 추출물의 다양한 생리활성을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료의 추출

제주아그배 건조물 360 g을 마쇄기로 갈아서 70% 에탄올(EtOH) 3 L에 침적하고, 실온에서 24시간 교반하여 침출시켰다. 침출시킨 시료를 감압 여과하여 잔사를 분리한 후 여액만을 취하였다. 이와 같은 방법으로 분리한 잔사에 대하여 동일하게 3회 반복 실시하였다. 이렇게 얻어진 여액을 40℃에서 회전농축기를 이용 농축하여 60.3 g을 수득하였다. 그리고 제주아그배 70% 에탄올 추출물 10 g을 증류수 0.5 L에 현탁시킨 후에, 각각 헥산 (*n*-Hexane, 0.5 L × 3), 에틸아세테이트 (ethylacetate, 0.5 L × 3), 부탄올 (*n*-Butanol, 0.5 L × 3), 물 (H<sub>2</sub>O)의 극성이 낮은 용매부터 극성이 높은 용매 순으로 순차적으로 용매 분획하여 4개의 분획물을 얻었고, 각각의 분획물을 동결 건조하여 시료로 사용하였다 (Figure 1). 헥산과 에틸아세테이트 분획물은 100% 에탄올로 녹였고, 부탄올과 물 분획물은 phosphate buffered saline (PBS)와 100% 에탄올 비율 1:1로 녹여서 실험하였다.

### 2. 세포 배양

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)으로부터 구입하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)과 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (GIBCO, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO, USA) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다. 마우스 멜라닌 생성 세포인 Melan-a 세포는 10% FBS과 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (GIBCO, USA)이 포함된 RPMI 1640 (GIBCO, USA) 배지를 사용하기 직전에 100 nM Phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA)를 첨가하여 37℃, 10% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다.

### 3. 항산화 활성 측정

#### 3-1. DPPH 자유유리기 소거 활성 측정

전자공여능(electron donating ability) 측정은 Blois 방법에 의한 DPPH 자유유리기 소거법에 따라 측정하였다 (Blois, 1958). 즉, 메탄올에 녹인 여러 농도의 시료를 96well plate에 100 µl씩 분주 하고 0.4 mM DPPH 용액을 동량 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 양성 대조군으로는 butylated hydroxy anisole (BHA), trolox를 사용하였다. DPPH 자유유리기 소거활성은 아래의 식으로부터 산출하였고 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)로 표시하였으며, 각 시료별로 3회 반복 실험 후 평균값을 구하였다.

$$\text{DPPH 자유유리기 소거활성(\%)} = (A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}} \times 100$$

$A_{\text{sample}}$  = 시료를 첨가한 반응액의 흡광도

$A_{\text{control}}$  = 시료대신 메탄올을 첨가한 반응액의 흡광도

#### 3-2. NO 소거 활성 측정

NO를 생성하는 물질인 sodium nitroprusside (SNP)를 사용하여 시료의 NO 소거 활성을 검색하였다 (Green 등, 1982; Marcocci L 등, 1994). 10 mM SNP 용액 100 µl에 시료를 농도별로 첨가하고 25℃에서 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응액과 동일한 양의 Griess 시약 [2.5% (v/v) phosphoric acid 에 1% (w/v) sulfanilamide와 0.1% (w/v) naphyl- ethylenediamine]을 첨가하였다. 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여, 잔존하는 아질산염(nitrite)의 양으로 NO 소거 활성을 산출하였다. NO 소거 활성은 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도 (IC<sub>50</sub>)로 표시하였다.

### 3-3. Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성 측정

Xanthine/xanthine oxidase에 의한 uric acid 생성은 290 nm에서 증가된 흡광도에 의해 측정하였고 (Noro 등, 1983), superoxide의 양은 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원방법으로 560 nm에서 측정하였다 (Cheng 등, 1998). 반응액은 각 시료의 여러 농도와 0.5 mM xanthine와 1 mM EDTA를 200 mM phosphate buffer (pH 7.5) 100  $\mu$ l에서 준비하였고 50 mU/ml xanthine oxidase를 첨가하여 uric acid의 생성을 유도하였다. Superoxide 소거활성은 위 반응액에 0.5 mM NBT를 첨가하여 반응시켰다. Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성은 각각 생성된 uric acid와 superoxide의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도 (IC<sub>50</sub>)로 표시하였다.

### 4. 세포 독성 측정

시료가 세포의 생존율에 미치는 영향을 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)법에 의하여 측정하였다. 세포배양 후 배양액을 제거하고 MTT (Sigma) 용액 500  $\mu$ g/ml을 첨가하고 3시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) 200  $\mu$ l를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 농도에 대한 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포 독성 정도를 조사하였다. 세포독성은 다음 식에 의해 산출하여 TC<sub>50</sub> 값으로 평가하였고, 이때 TC<sub>50</sub>은 50%의 세포독성을 나타내는 농도이다.

$$\text{세포독성(\%)} = (\text{Control OD}_{570} - \text{Sample OD}_{570}) / \text{Control OD}_{570} \times 100$$

### 5. NO 생성 억제 활성

RAW264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여  $1.0 \times 10^5$  cells/ml로 조절한 후 48 well plate에 넣고 18시간 동안 배양하였다. 이 후



여러 가지 농도의 시료를 1시간 동안 전 처리한 후 LPS (100 ng/ml)를 가하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 nitrite의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100  $\mu$ l와 Griess 시약 100  $\mu$ l를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ )를 standard로 비교하였다.

## 6. Melanin 함량 분석

세포수를  $1 \times 10^5$  cells/ml이 되게 준비하여 24시간 동안 배양 후, 시료를 농도 별로 처리하였다. 24시간 마다 배지를 교체함과 동시에 시료를 재처리하면서 72시간을 배양하였다. 배양한 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 세포를 trypsin-EDTA를 이용하여 수집하였으며, 5000 rpm에서 원심분리하여 세포 침전물을 만들었다. 1 N NaOH 용액을 500  $\mu$ l를 첨가하여 56°C에서 1시간 동안 용해하였으며, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 7. 세포내 tyrosinase 활성 분석

세포수를  $1 \times 10^5$  cells/ml이 되게 준비하여 24시간 동안 배양 후, 시료를 농도 별로 처리하였다. 24시간 마다 배지를 교체함과 동시에 시료를 재처리하면서 72시간을 배양하였다. 배양한 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 세포를 trypsin-EDTA를 이용하여 수집하였으며, 수집된 세포에 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride와 1% Triton X-100을 함유한 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 100  $\mu$ l 처리하여 1시간 동안 4°C에서 보관하였다. 1시간 후, 4°C에서 15,000 rpm으로 15분간 원심분리 하고, 상등액을 취하여 세포내 tyrosinase 활성 분석에 이용하였다. 150  $\mu$ l의 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 기질로서 작용하는 5  $\mu$ l의 1.5 mM L-tyrosine과 10  $\mu$ l의 25 mM L-DOPA를 혼합한 후 세포에서 얻은 상등액 40  $\mu$ l를 처리하여 37°C 항온기에서 30분간 반응시켰다. 475 nm에서 흡광도를 측정하여 활성 값을 구하였다.

## 8. 전기영동 및 Western blot 분석

배양이 끝난 세포를 2~3회 PBS로 세척 후 100  $\mu$ l의 lysis buffer을 첨가하고, 30분 동안 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 단백질 농도는 BSA (Bovine serum albumin)을 표준화하여 Protein Assay Kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 정량하였다. 30~50  $\mu$ g의 단백질을 8~12% mini gel Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)로 변성 분리하고, 이를 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, USA)에 15V로 1시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (TBS (Tris-buffered saline) + 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간동안 실시하였다. 반응이 끝난 뒤에 1차 항체 (1: 500 - 1: 2000)가 들어있는 5% skim milk에서 1시간(25°C) 또는 24시간(4°C)동안 반응시킨 후, TTBS로 3회 세척하고 2차 항체 (1: 10000)와 상온에서 1시간 반응시킨 뒤에 TTBS로 5회 세척하여 enhanced chemiluminescence 방법으로 각 band의 영상을 얻었다.

## 9. RNA 분리 및 RT-PCR

### 1) RNA 분리

배양이 끝난 세포를 2~3회 PBS로 세척 후 total RNA 추출은 TRIzol-reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 분리하였다. 세포에 TRIzol-reagent를 첨가하여 균질화한 후, 클로로포름을 첨가하여 원심분리(12,000 rpm, 15min)하였다. 상등액에 동량의 이소프로판올을 첨가하여 원심분리(12,000 rpm, 10min)하여 RNA를 침전시키고 75%의 diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리된 에탄올로 세척한 후, 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에 녹였다. 260 nm의 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, A260/A280 nm의 비율이 1.6~1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다.

## 2) RT-PCR

cDNA 합성은 Improm-II<sup>TM</sup> cDNA kit (Promega, USA)를 이용하였고, 1 µg의 total RNA를 oligo (dT) primer, dNTP (0.5 µM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 Improm-II<sup>TM</sup> reverse transcriptase (2 U)로 25°C 5분, 37°C 60분, 그리고 70°C에서 10분간 heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase chain reaction (PCR)은 합성된 cDNA로부터 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, iNOS, COX-2, β-actin를 증폭시키기 위하여 1 µl cDNA, 4 µM의 5'과 3' primer, 10× buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 µM dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 unit Taq polymerase (Promega, USA)를 섞고 3차 증류수로 최종 25 µl로 맞춘 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때 PCR 조건은 94°C/30초, 50~55°C/45초, 72°C/45초 20~25회이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다. RT-PCR에서 사용된 primer는 Table 1와 같다.

## 10. 통계학적 분석

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험 결과이며, 이들의 평균 (mean)과 표준오차 (standard error, SE)를 산출하였으며, student's *t*-test로 통계학적 유의성을 검증하였다.

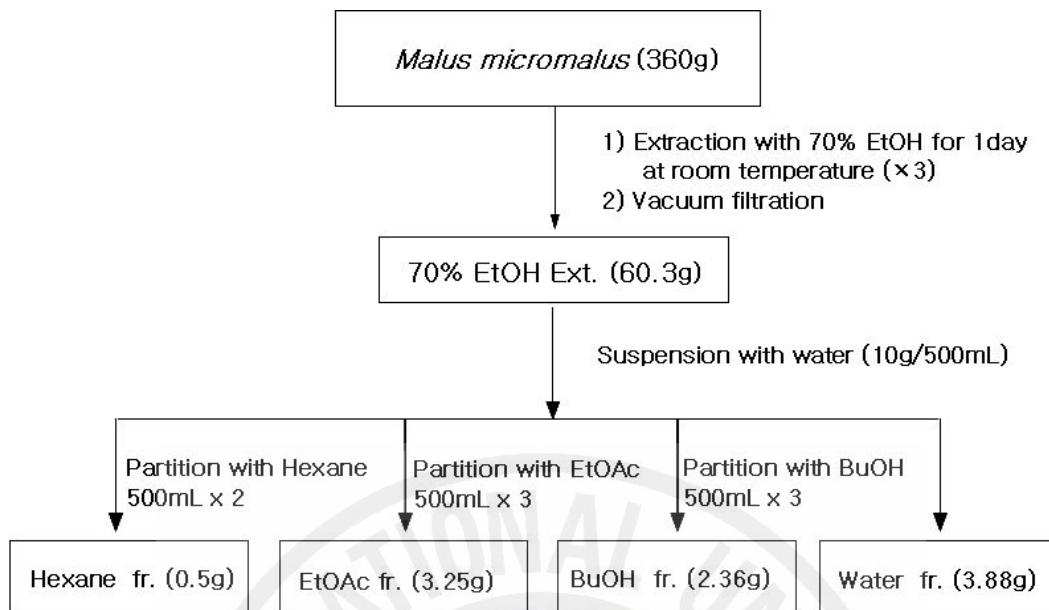


Figure. 1. The fractionation using solvent partition from the ethanol extract of *Malus micromalus*.

Table 1. The primer sequences of the genes used in RT-PCR analysis and the expected size of their PCR products.

| Gene           | Primer sequences                                | Fragment size(bp) |
|----------------|---|-------------------|
| Tyrosinase     | Forward 5`-GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT-3`       | 510               |
|                | Reverse 5'-TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC-3'       |                   |
| TRP-1          | Forward 5'-GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC-3'       | 290               |
|                | Reverse 5'-AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT-3'       |                   |
| TRP-2          | Forward 5'-GGA TGA CCG TGA GCA ATG GCC-3'       | 1200              |
|                | Reverse 5'-CGG TTG TGA CCA ATG GGT GGC-3'       |                   |
| iNOS           | Forward 5'-CCC TTC CGA AGT TTC TGG CAG CAG C-3' | 497               |
|                | Reverse 5'-GGC TGT CAG AGC CTC GTG GCT TTG G-3' |                   |
| COX-2          | Forward 5'-CAC TAC ATC CTG ACC CAC TT-3'        | 696               |
|                | Reverse 5'-ATG CTC CTG CTT GAG TAT GT-3'        |                   |
| $\beta$ -actin | Forward 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3' | 350               |
|                | Reverse 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3' |                   |

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 제주아그배 추출물의 항산화 활성

##### 1) DPPH 자유 유리기 소거 활성

제주아그배 에탄올 추출물 및 각각의 용매 분획물을 시료로 사용하여 DPPH 자유유리기 소거 활성을 측정한 결과, IC<sub>50</sub> 값은 에탄올 추출물과 hexan 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물, 물 분획물에서 각각 16.1 µg/ml과 541.2 µg/ml, 1.23 µg/ml, 12.2 µg/ml, 80.9 µg/ml을 나타내었다 (Table 2, Figure 2). 이 중 에틸아세테이트 분획물이 대조군인 butylated hydroxy anisole (BHA, IC<sub>50</sub>=4.1 µg/ml)와 Trolox (IC<sub>50</sub>=7.1 µg/ml) 보다 높은 활성을 보였다 (Table 2).

##### 2) NO 소거 활성

제주아그배 에탄올 추출물 및 각 분획물을 시료로 사용하여 NO 소거 활성을 산출하였다. NO 소거 활성의 IC<sub>50</sub> 값은 에탄올 추출물과 hexan 분획물, 에틸아세테이트 분획물에서 각각 901.2 µg/ml과 861.5 µg/ml, 584.9 µg/ml을 나타내었고 (Table 2, Figure 3), 부탄올과 물 분획물에서의 NO 소거 활성은 1 mg/ml에서 20~30% 정도를 나타냈다.

##### 3) Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성

제주아그배 에탄올 추출물 및 각 분획물의 xanthine oxidase 억제활성은 xanthine oxidase 억제제로 알려진 allopurinol을 양성 대조군으로 사용하여 비교하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 제주아그배 에탄올 추출물 및 각 분획물 모두 xanthine oxidase 억제활성을 보였고, 그 중 에탄올 추출물

( $IC_{50}=42.6 \mu\text{g/ml}$ )과 에틸아세테이트 분획물 ( $IC_{50}=4.91 \mu\text{g/ml}$ )에서 높은 활성을 보였다 (Table 2, Figure 4). 그리고 superoxide 소거활성 또한 제주아그배 에탄올 추출물 ( $IC_{50}=2.7 \mu\text{g/ml}$ ) 및 각 분획물에서 모두 억제활성을 보였고 그 중 에틸아세테이트 분획물 ( $IC_{50}=0.61 \mu\text{g/ml}$ )에서는 양성 대조군 allopurinol ( $IC_{50}=2.11 \mu\text{g/ml}$ ) 보다 높은 활성을 보였다 (Table 2, Figure 5).



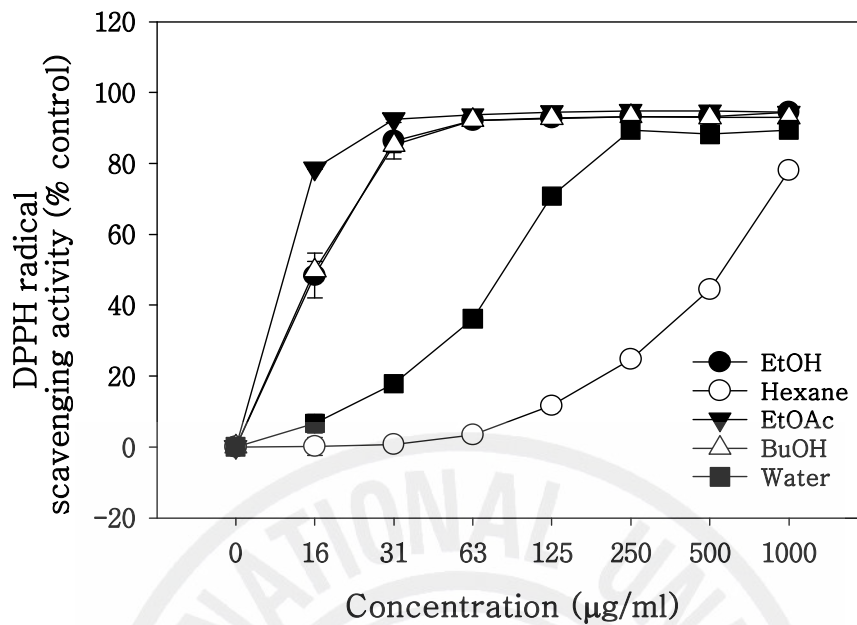


Figure 2. The DPPH radical scavenging activity of the ethanol extract and its fractions of *Malus micromalus*.

The data expressed as means  $\pm$  S.E. of three determinations. (●: 70% EtOH extract, ○: Hexane fraction, ▼: EtOAc fraction, △: BuOH fraction, ■: Water fraction )



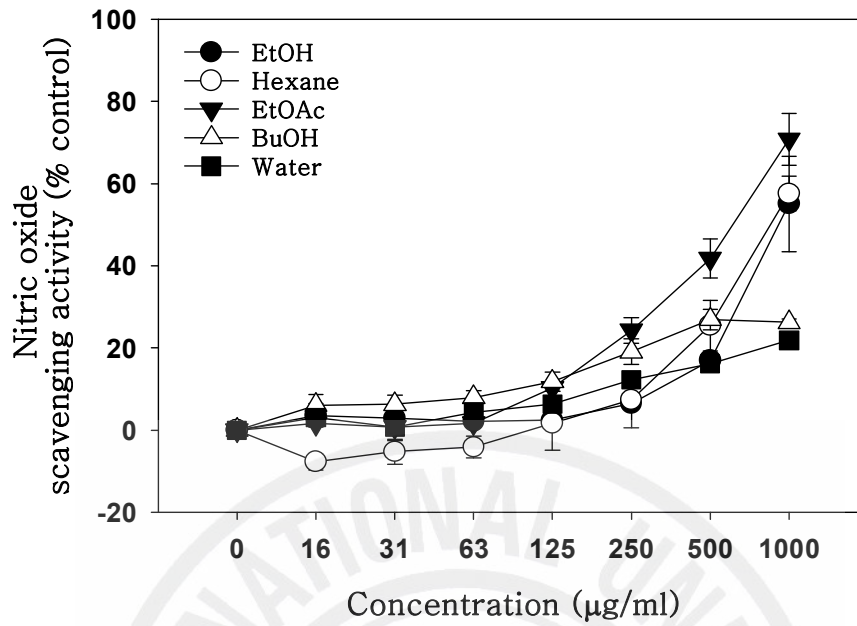


Figure 3. The scavenging activity of the ethanol extract and its fractions of *Malus micromalus* on nitrite production in sodium nitropusside solution.

The data expressed as means  $\pm$  S.E. of three determinations. (●: 70% EtOH extract, ○: Hexane fraction, ▼: EtOAc fraction, △: BuOH fraction, ■: Water fraction )

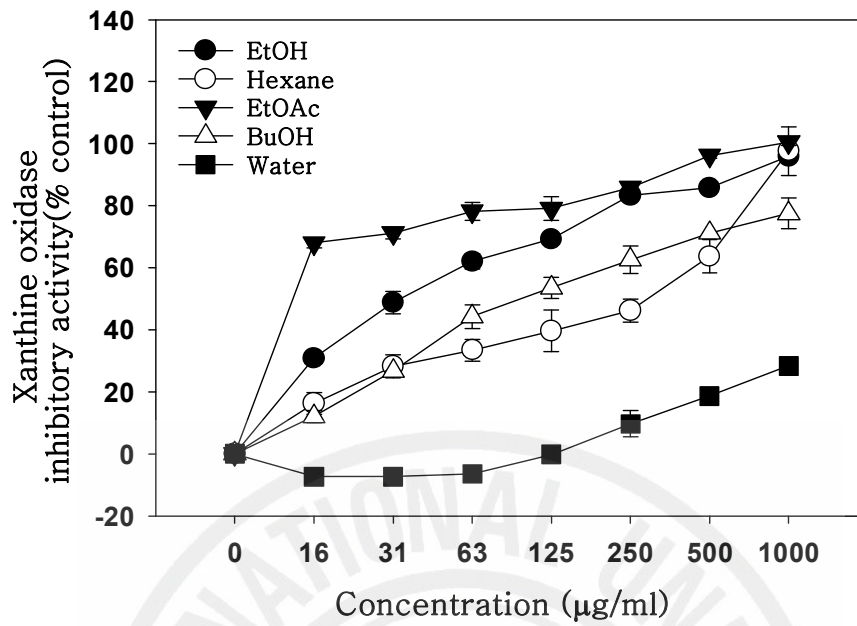


Figure 4. The xanthine oxidase inhibitory activity of the ethanol extract and its fractions of *Malus micromalus*.

The data expressed as means  $\pm$  S.E. of three determinations. (●: 70% EtOH extract, ○: Hexane fraction, ▼: EtOAc fraction, △: BuOH fraction, ■: Water fraction )

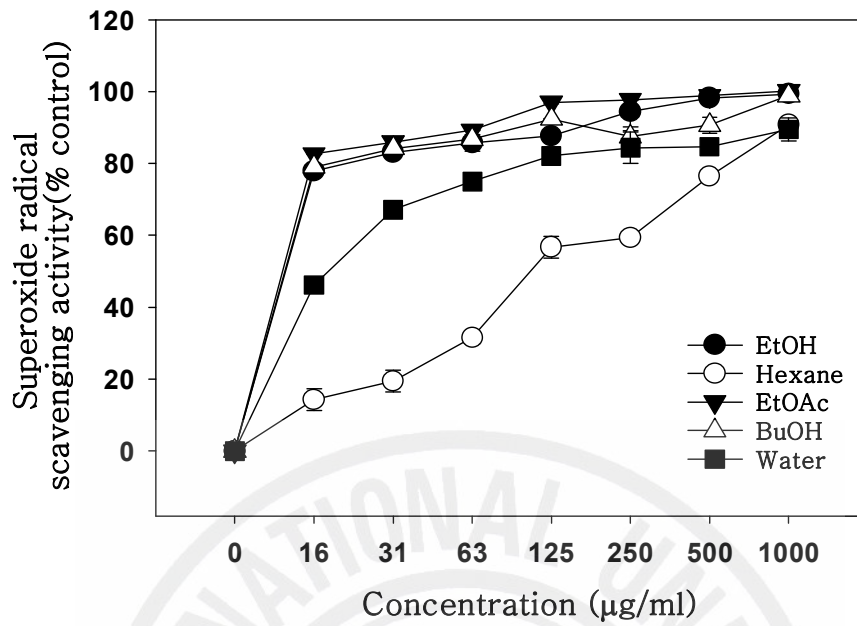


Figure 5. The superoxide radical scavenging activity of the ethanol extract and its fractions of *Malus micromalus*.

The data expressed as means  $\pm$  S.E. of three determinations. (●: 70% EtOH extract, ○: Hexane fraction, ▼: EtOAc fraction, △: BuOH fraction, ■: Water fraction )

Table 2. Antioxidant activities of the ethanol extract and its fractions of *Malus micromalus*.

| Treatment         | IC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>1)</sup> |                                  |                                     |                                  |
|-------------------|--|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
|                   | DPPH radical scavenging activity       | Nitric oxide scavenging activity | Xanthin oxidase inhibitory activity |                                  |
|                   |  |                                  | Uric acid generation inhibitory     | Superoxide generation inhibitory |
| Ethanol extract   | 16.12 ± 1.67                           | 901.18 ± 74.61                   | 42.55 ± 11.51                       | 2.73 ± 0.26                      |
| Hexane fraction   | 541.29 ± 34.20                         | 861.49 ± 35.00                   | 278.07 ± 73.75                      | 129.6 ± 5.76                     |
| EtOAc fraction    | 1.23 ± 0.26                            | 584.95 ± 88.71                   | 4.91 ± 0.11                         | 0.61 ± 0.08                      |
| BuOH fraction     | 15.24 ± 0.76                           | >1000                            | 96.95 ± 5.18                        | 3.31 ± 0.21                      |
| Water fraction    | 80.93 ± 1.49                           | >1000                            | >1000                               | 16.59 ± 0.47                     |
| Trolox            | 4.13 ± 1.10                            | >1000                            | N/A                                 | N/A                              |
| BHA <sup>2)</sup> | 7.03 ± 1.21                            | >1000                            | N/A                                 | N/A                              |
| Allopurinol       | N/A                                    | N/A                              | 1.91 ± 0.21                         | 2.11 ± 0.91                      |

<sup>1)</sup> IC<sub>50</sub> values were calculated from regression lines using different concentration in triplicate experiments.

<sup>2)</sup> Butylated hydroxyl anisole

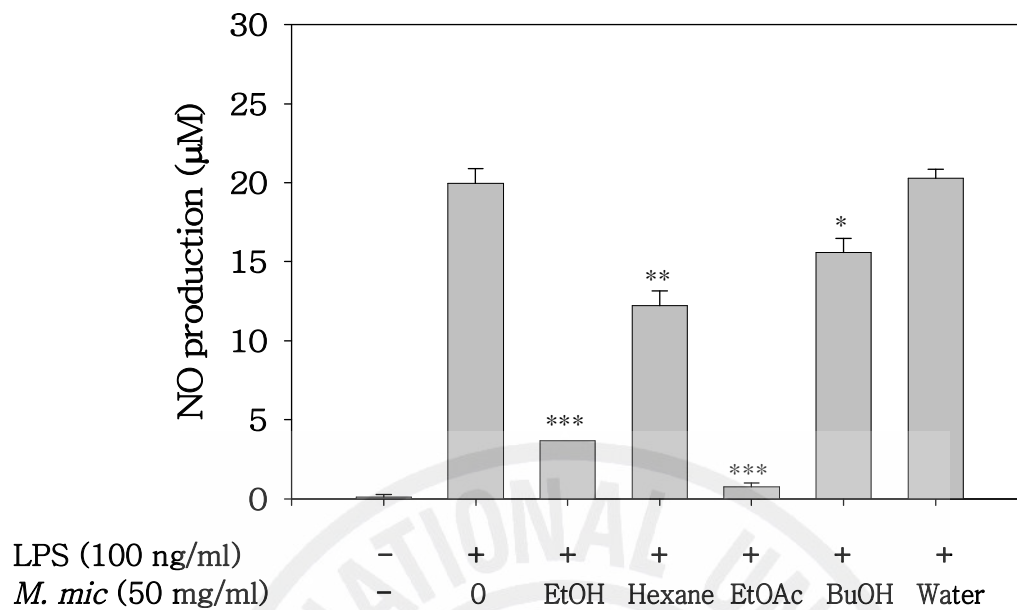
N/A : Not assay

## 2. 제주아그배 추출물의 NO 생성 억제 활성

RAW 264.7 세포에서 제주아그배 에탄올 추출물과 그 분획물의 NO 생성 억제 활성을 분석하여 IC<sub>50</sub> 값과 50%의 세포독성을 나타내는 농도인 TC<sub>50</sub> 값을 산출하였으며, 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 100 ng/ml의 LPS와 제주아그배 에탄올 추출물과 그 분획물을 50 µg/ml 농도로 처리하였을 때, LPS 단독 처리군에서 NO 생성량이 19.95 µM로 생성되었으나 제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물에서 각각 NO 생성량이 3.57 µM, 0.74 µM로 현저히 감소한 것을 확인할 수 있다 (Figure 6). 제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 NO 생성량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 7). 같은 농도로 처리하였을 때 세포독성은 나타나지 않았다. 제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물에서의 NO 생성 억제율에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 각각 16.7 µg/ml, 4.1 µg/ml 이었다 (Table 3).

## 3. 제주아그배 추출물의 iNOS와 COX-2 단백질과 mRNA 발현 저해

제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물의 NO 생성 저해 활성이 iNOS와 COX-2 단백질의 감소에 의한 것임을 확인하기 위해 western blot과 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. LPS를 단독처리 하였을 때 iNOS 단백질 발현양이 증가하는 것을 확인하였으며, 제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 처리하였을 때 iNOS 단백질은 농도 의존적으로 감소하였다 (Figure 8). RT-PCR로 분석한 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 또한 농도 의존적인 감소를 나타냈다 (Figure 9). 에틸아세테이트 분획물을 50 µg/ml을 처리한 군에서 iNOS의 mRNA 발현양이 LPS만을 처리한 실험군에 비하여 약 80% 정도의 감소된 mRNA 발현양을 보였다.



**Figure 6.** Effects of solvent fractions of *Malus micromalus* on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The productions of NO was assayed from culture supernatant of RAW 264.7 cells ( $1.5 \times 10^5$  cells/ml) stimulated by LPS (100 ng/ml) in the presence of testing samples (50 µg/ml). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  compared with LPS alone-treated cell.

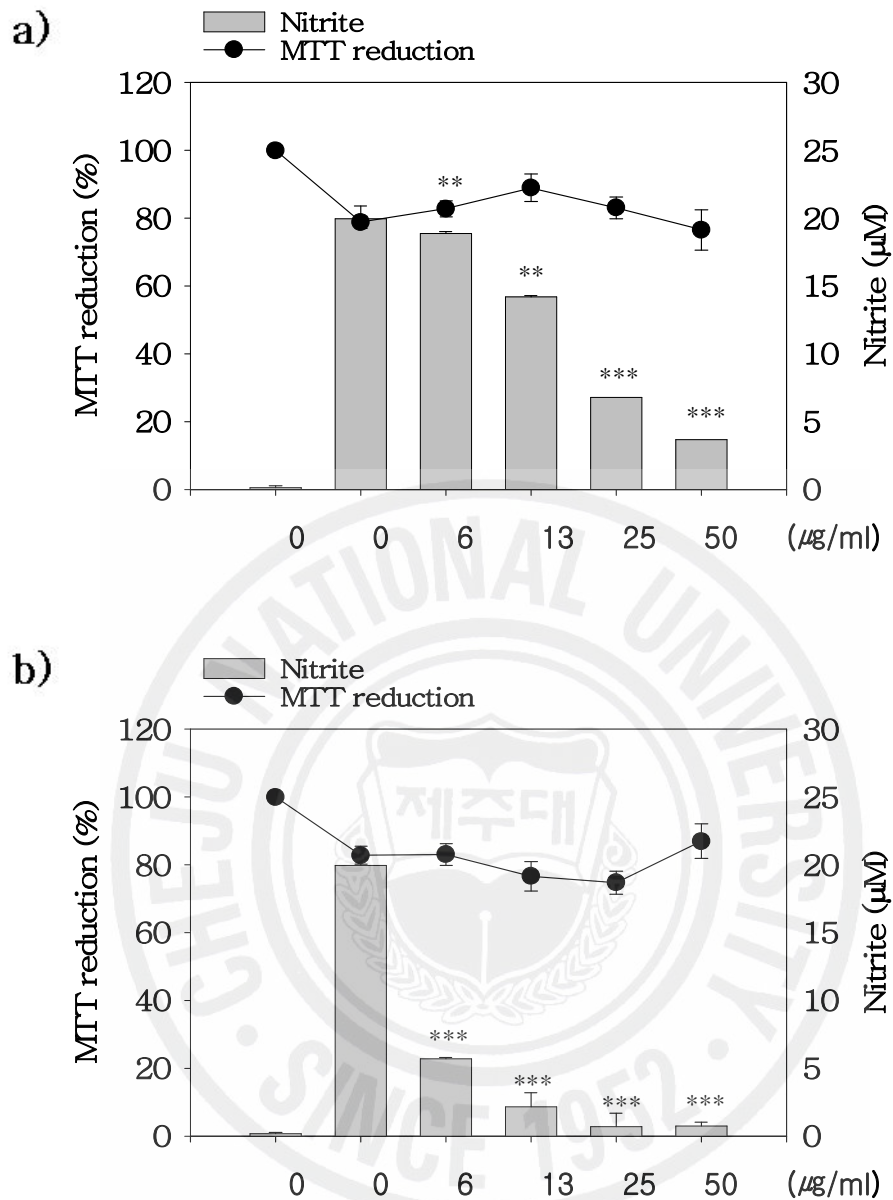
Table 3. Cell toxicity and the effects on LPS-induced NO production of the ethanol extract and its fractions of *Malus micromalus* in RAW 264.7 cells.

| <i>Malus micromalus</i> | TC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (μg/ml) | IC <sub>50</sub> <sup>2)</sup> (μg/ml) | Selectivity index <sup>3)</sup> |
|-------------------------|--|--|---------------------------------|
| EtOH extract            | >50                                    | 16.7 ± 0.5                             | >2.9                            |
| Hexane fraction         | >50                                    | >50                                    | >1                              |
| EtOAc fraction          | >50                                    | 4.1 ± 0.8                              | >12.2                           |
| BuOH fraction           | >50                                    | >50                                    | >1                              |
| Water fraction          | >50                                    | >50                                    | >1                              |

<sup>1)</sup> TC<sub>50</sub> is the concentration producing 50% toxicity in RAW 264.7 cells.

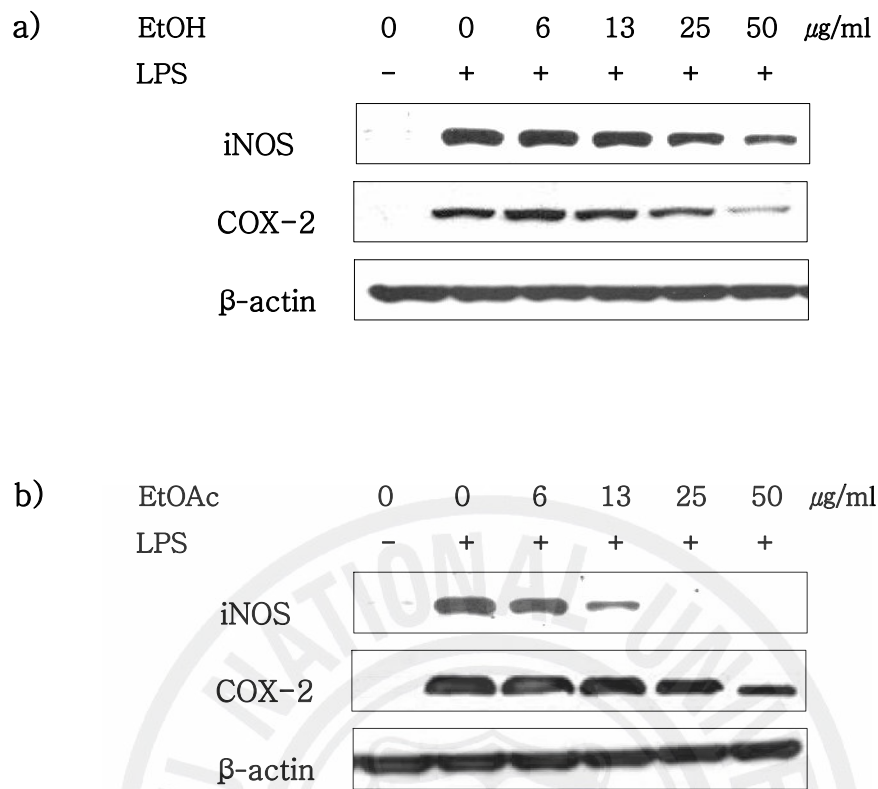
<sup>2)</sup> IC<sub>50</sub> is the concentration producing 50% inhibition of NO production in RAW 264.7 cells.

<sup>3)</sup> Selectivity Index=TC<sub>50</sub> / IC<sub>50</sub>

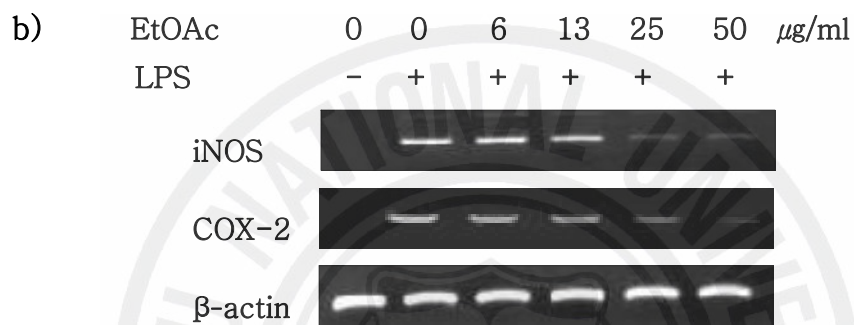
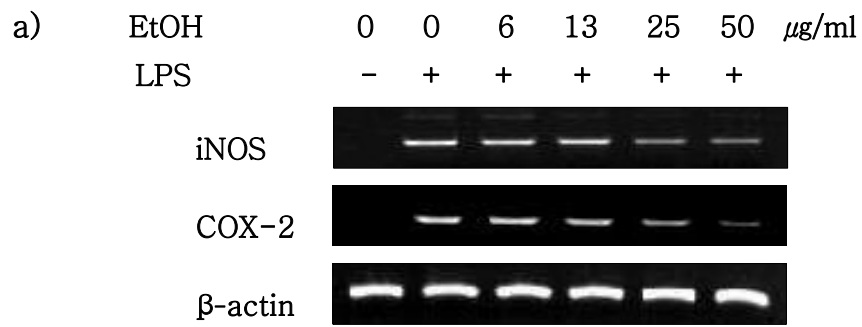


**Figure 7.** Effects of *Malus micromalus* on the NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (a) Cells were treated with LPS (100 ng/ml) alone or LPS plus the indicated concentration of EtOH extract for 24h. (b) Cells were treated with LPS (100 ng/ml) alone or LPS plus the indicated concentration of EtOAc fraction for 24h. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p< 0.001 compared with LPS alone-treated cell.





**Figure 8.** Effects of *Malus micromalus* on iNOS and COX-2 protein expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (a) Cells were pretreated with EtOH extract on for 1 h, and EtOH extract or control untreated cells were incubated with LPS (100 ng/ml) for 24 h. (b) Cells were pretreated with EtOAc fraction on for 1 h, and EtOAc fraction or control untreated cells were incubated with LPS (100 ng/ml) for 24 h. The cells were lysed, and the lysates were analyzed by western blot using an anti-iNOS or anti-COX-2 antibodies.



**Figure 9.** Effects of *Malus micromalus* on the iNOS and COX-2 mRNA expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (a) Cells were pretreated with EtOH extract for 1 h, and EtOH extract or control untreated cells were incubated with LPS (100 ng/ml) for 24 h. (b) Cells were pretreated with EtOAc fraction for 1 h, and EtOAc fraction or control untreated cells were incubated with LPS (100 ng/ml) for 24 h. Total RNA was subjected to RT-PCR.

#### 4. 세포 내의 멜라닌 생성과 tyrosinase 저해 활성

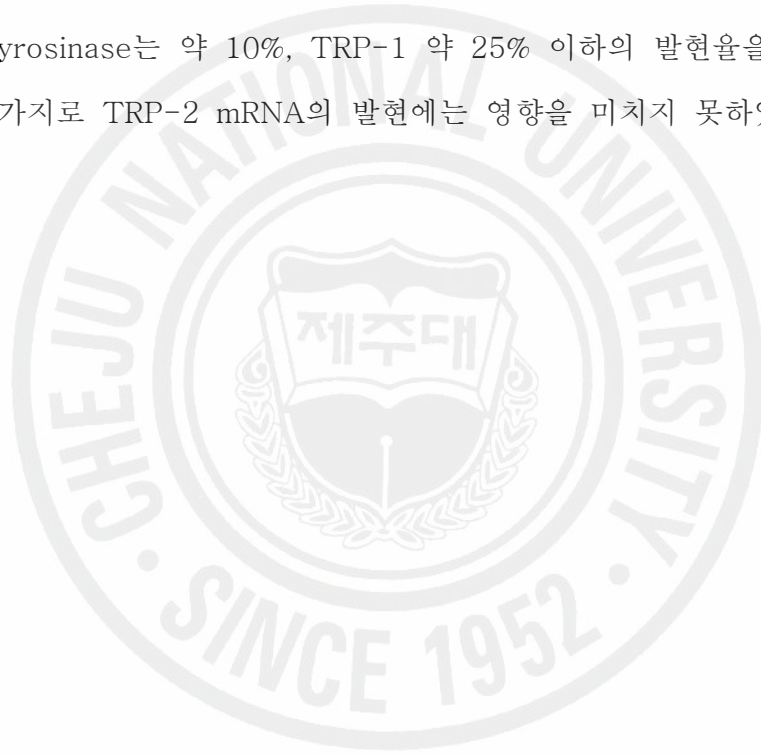
Melan-a 세포에서 독성을 보이지 않는 농도에서 제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물의 멜라닌 억제 효과를 시험하였다. 그리고 본 실험은 tyrosinase 활성억제 효과로 인하여 멜라닌 생성 과정의 최종 산물인 멜라닌 생성의 억제를 확인하기 위한 실험이다. 먼저 세포 내의 멜라닌 생성 억제를 보기 위해서 제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 멜라닌 생성이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 10). 에틸아세테이트 분획물에서 멜라닌 생성 억제율에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 38.2 µg/ml 이었다. 또한 세포 내의 tyrosinase의 억제 활성을 보기 위해 위와 동일한 농도별로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 세포내 tyrosinase 활성이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 11). 제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물에서의 tyrosinase 활성 억제율에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 각각 22.8 µg/ml, 17.9 µg/ml 이었다.

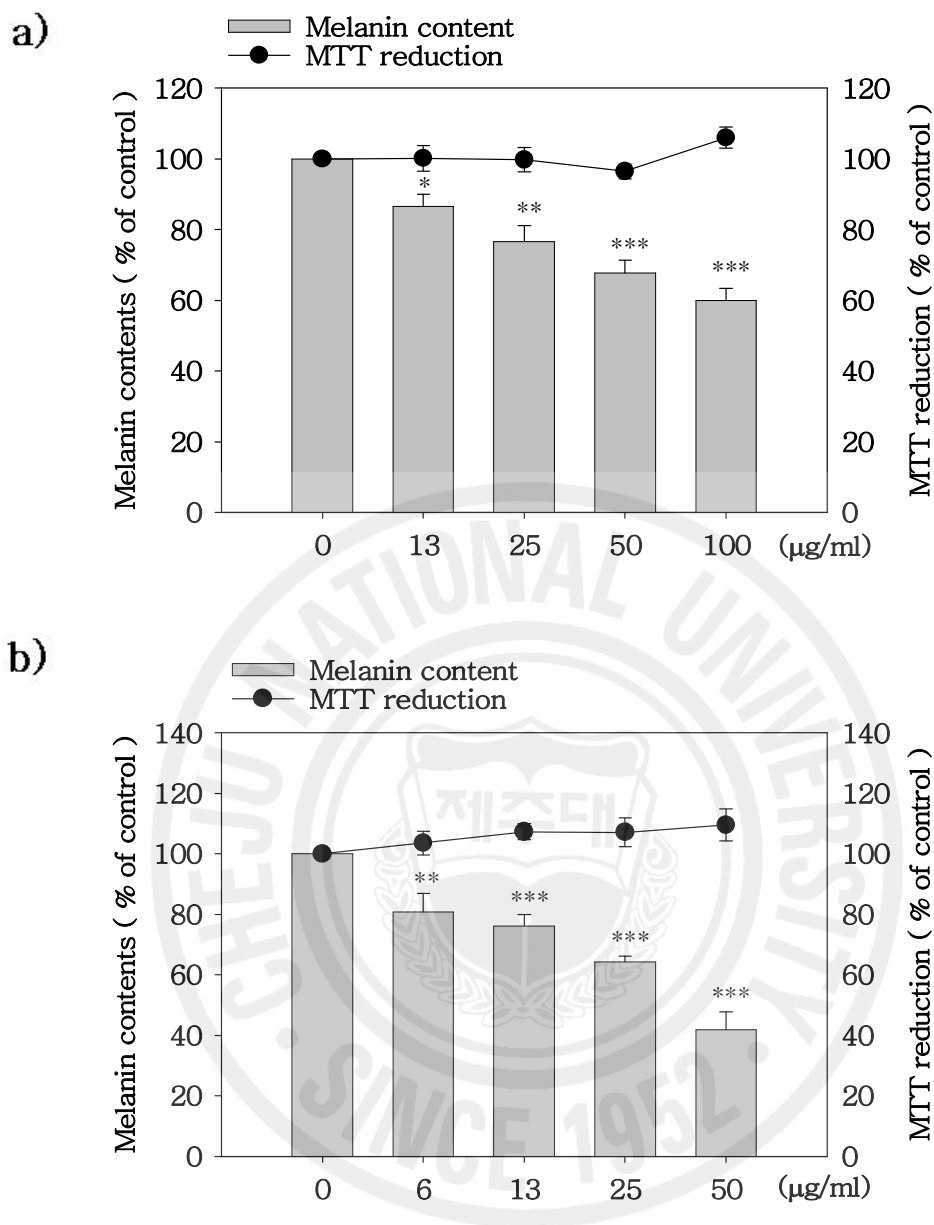
#### 5. 멜라닌 생성에 관여하는 단백질 발현 저해 활성

Melan-a 세포에서 독성을 보이지 않는 농도에서 제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물의 멜라닌 억제 효과가 단백질 발현 억제에 의한 것인지를 알아보았다. 멜라닌 생성에 주요한 효소로 알려진 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질의 발현 양상을 보기 위해 western blot을 실시하였다. 그 결과 제주아그배 에탄올 추출물이 tyrosinase, TRP-1 단백질의 발현양이 농도 의존적인 감소를 보였다. 그러나 TRP-2의 발현에는 영향을 미치지 못하였다 (Figure 12). 제주아그배 에탄올 추출물의 분획물 중에서는 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 억제 경향을 보였다 (Figure 12).

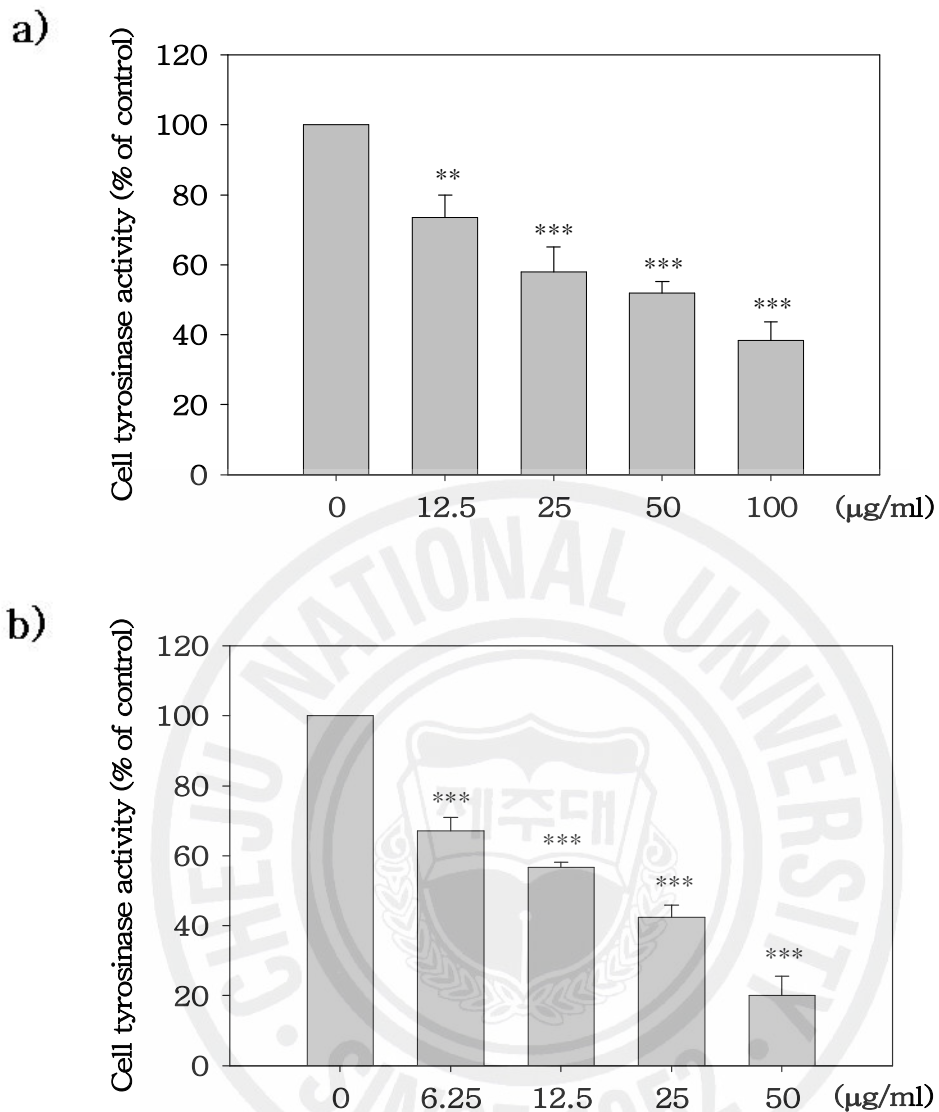
## 6. 멜라닌 생성에 관여하는 mRNA 발현 저해 활성

제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물의 멜라닌 저해 활성이 tyrosinase, TRP-1 mRNA의 감소에 의한 것임을 확인하기 위해 RT-PCR을 실시한 결과 tyrosinase, TRP-1 mRNA의 발현양이 농도 의존적인 감소를 보였다. 또한 tyrosinase, TRP-1 mRNA의 발현양을 정량화하여 분석한 결과 에틸아세테이트 분획물을 50 µg/ml을 처리한 군은 시료를 처리하지 않은 군과 비교하였을 때 tyrosinase는 약 10%, TRP-1 약 25% 이하의 발현율을 보였다. 단백질과 마찬가지로 TRP-2 mRNA의 발현에는 영향을 미치지 못하였다 (Figure 13).





**Figure 10. Effects of *Malus micromalus* on the melanin content in Melan-a cells.** Melan-a cells were cultured for 72hrs inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When it passed for 24 hrs, media were exchanged and (a) EtOH extract and (b) EtOAc fractions were retreated. Melanin content is quantified by absorption at 475nm. Results are means  $\pm$  S.D. from 3 separate experiments. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  compared with control.



**Figure 11.** Effects of *Malus micromalus* on the tyrosinase activity in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 72hrs inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When it passed for 24 hrs, media were exchanged and (a) EtOH extract and (b) EtOAc fractions were retreated. Tyrosinase activity is quantified by absorption at 475nm. Results are means  $\pm$  S.D. from 3 separate experiments. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  compared with control.

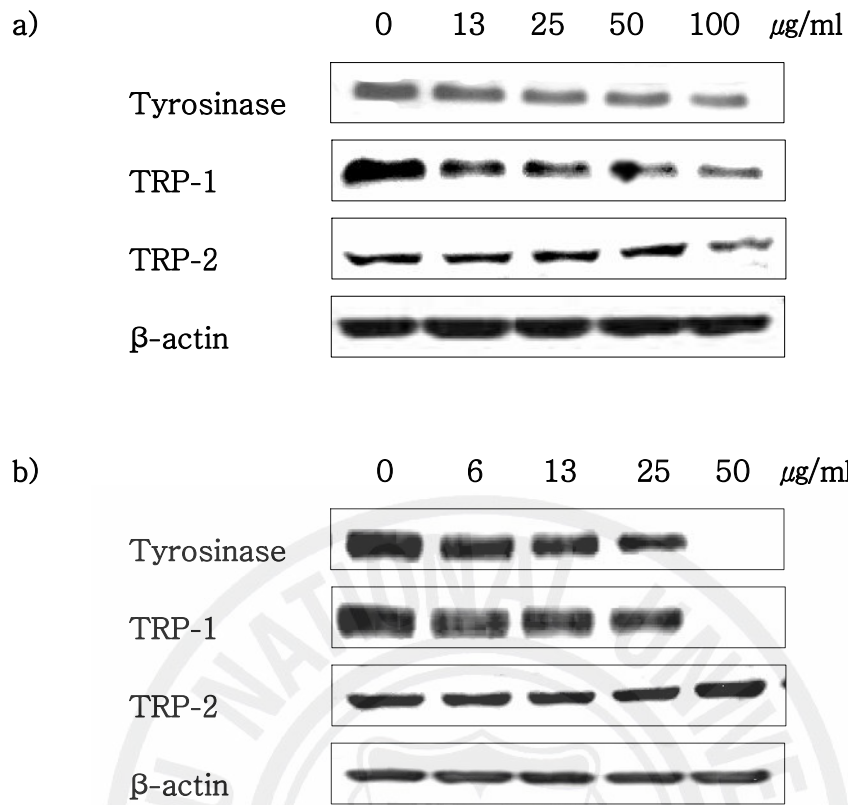


Figure 12. Effects of *Malus micromalus* on the tyrosinase and TRP-1, TRP-2 protein expression in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 72hrs inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When it passed for 24hrs, media were exchanged and (a) EtOH extract and (b) EtOAc fractions were retreated.

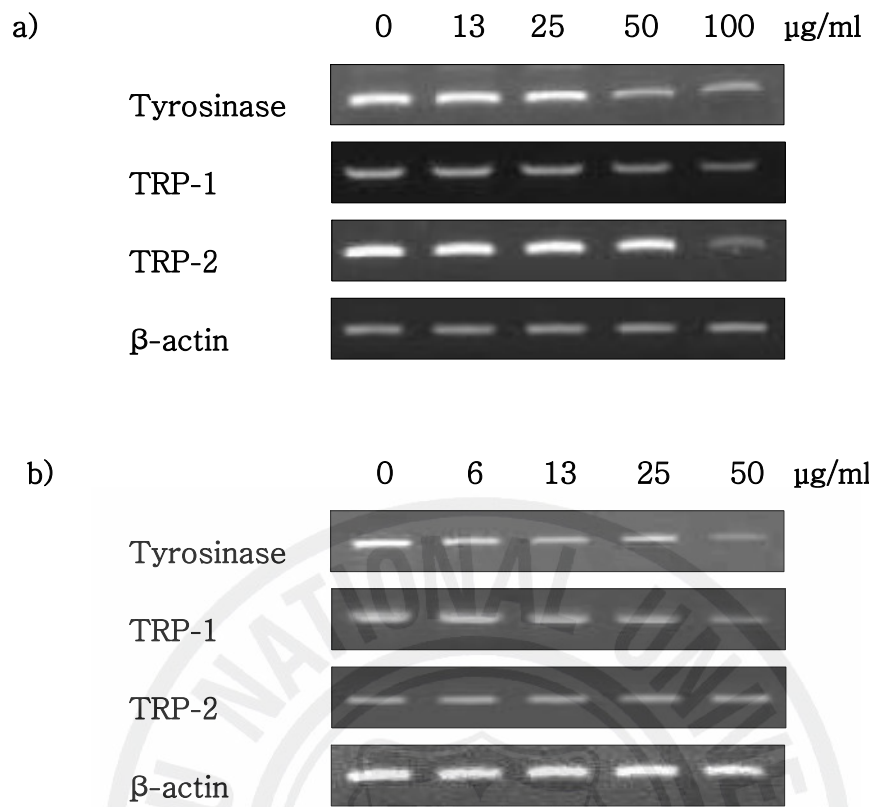


Figure 13. Effects of *Malus micromalus* on the tyrosinase and TRP-1, TRP-2 mRNA expression in Melan-a cells. Melan-a cells were cultured for 72hrs inducing melanogenesis with TPA 100 nM. When it passed for 24 hrs, media were exchanged and (a) EtOH extract and (b) EtOAc fractions were retreated. Total RNA was subjected to RT-PCR.



## IV. 고 찰

본 연구는 제주에 자생하고 있는 제주아그배의 생리활성, 즉 항산화 효과와 항염 효과, 멜라닌 생성 저해효과를 알아보려고 수행하였다.

제주아그배의 항산화 활성을 측정하고자 DPPH 자유유리기 활성, NO 소거 활성, xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성을 에탄올 추출물과 그 분획물에서 비교 분석하였다. 제주아그배 에탄올 추출물 (DPPH 소거활성  $IC_{50}$  값, 16.1  $\mu\text{g/ml}$ ; NO 소거활성  $IC_{50}$  값, 901.2  $\mu\text{g/ml}$ ; superoxide 소거활성 및 Xanthine oxidase 억제 활성  $IC_{50}$  값, 42.5  $\mu\text{g/ml}$ , 2.7  $\mu\text{g/ml}$ )은 좋은 항산화 활성을 보였고, 그 분획물 중에서는 에틸아세테이트 분획물이 항산화 활성 실험 모두에서 높은 소거활성을 나타내었다. 특히 DPPH 자유유리기 소거 활성 ( $IC_{50}=1.23 \mu\text{g/ml}$ )에서 양성 대조군인 BHA ( $IC_{50}=4.1 \mu\text{g/ml}$ )와 Trolox ( $IC_{50}=7.1 \mu\text{g/ml}$ )보다 높은 활성을 보였다. 또한 superoxide 소거 활성 ( $IC_{50}=0.61 \mu\text{g/ml}$ )도 양성 대조군 allopurinol ( $IC_{50} =2.11 \mu\text{g/ml}$ ) 보다 높은 활성을 보였다.

항산화 기능을 가지고 있는 녹차의 폴리페놀 (polyphenol) 성분, 상황추출물 (curcumin), 로즈마리 (rosemary: *Rosmarinus officinalis* Linn) 등이 염증반응을 억제하는 항염증제로 사용되고, 이들 항염증제는 염증반응을 일으키는 활성산소를 소거시키기도 한다 (Parahad 등, 1998; Al-Sereiti 등, 1999; Kuttan 등, 1987). 따라서 항산화 활성이 좋은 제주아그배의 추출물의 항염증 효과를 탐색하기 위하여 대식세포 모델을 이용하였다. LPS로 자극한 마우스 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 NO 활성과 세포독성간의 상대적 비교지수인 선택지수를 이용하여 탐색한 결과 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물이 2.9와 12.2로 가장 높은 상대적 NO 생성 억제 활성을 보였다. 그리고 NO 생성 억제율에 대한  $IC_{50}$  값은 각각 16.7  $\mu\text{g/ml}$ , 4.1  $\mu\text{g/ml}$  으로 나타났다. 이런 결과를 기초로 하여 대식세포에서 NO 활성에 관여하는 인자의 상관관계를 분석하고자 iNOS의 발현 변화를 NO 활성과 비교하였다.

제주아그배의 에탄올 추출물의 NO 감소가 iNOS 단백질 감소에 의한 것임을 확인한 결과, 시료를 처리한 RAW 264.7 세포에서 iNOS 단백질이 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 iNOS 단백질의 억제가 mRNA의 감소로 인한 것인지 조사하고자, RT-PCR을 통해 iNOS 의 mRNA 발현을 조사한 결과, 단백질과 마찬가지로 농도 의존적인 mRNA 발현 감소를 볼 수 있었다.

RAW 264.7 세포에서 NO 생성은 COX-2를 활성화하여 PGE<sub>2</sub>와 같은 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다 (Lee 등, 1998; Bennett 등, 1977). 제주아그배의 에탄올 추출물을 농도 별로 처리하였을 때 유의적으로 COX-2 단백질과 mRNA 발현이 농도 의존적으로 억제하였다. 분획물 중에서는 NO 활성화와 세포독성간의 상대적 비교지수인 선택지수가 높았던 에틸아세테이트 분획물이 에탄올 추출물보다도 NO, iNOS, COX-2의 억제 정도가 더 좋은 경향을 나타내었다.

피부에 발생하는 활성산소는 멜라닌 합성과정에 관여하여 멜라닌 합성을 증가시킨다. 따라서 항산화제는 멜라닌 합성을 증가시키는 것으로 보고된 활성산소를 소거시키는 기능을 통해 멜라닌 생성을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 생각되어 왔다. 항산화 작용이 있는 ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol 등은 임상실험 결과 자외선에 의해 유도되는 흑화과정을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Tobin 등, 1998; Bernadette 등, 1998). 멜라닌은 비교적 안정한 물질인 tyrosine을 기질로 일련의 효소반응을 거쳐 합성되며, 이 과정 중 tyrosinase는 속도조절효소 (rate-limiting enzyme)로 피부의 색소생성을 조절하는 많은 연구의 대부분이 tyrosinase의 효소적 조절에 초점이 맞추어져 있다. 실제로 kojic acid, arbutin 등의 물질은 tyrosinase 저해작용과 항산화 작용에 의해 멜라닌 생성을 감소시킨다고 보고된 바 있다 (Sandra 등, 2001; Sakuma 등, 1999; Chakraborty 등, 1998). 위 실험을 토대로 제주아그배의 에탄올 추출물의 멜라닌 생성 저해 활성을 알아보기 위해 멜라닌 생성 세포인 Melan-a 세포를 이용하여 합성되는 멜라닌 함량 분석과 멜라닌 생성에서 핵심 효소로 작용하는 tyrosinase의 활성을 보

았다. 이 결과 항산화 활성 및 항염 활성과 마찬가지로 멜라닌 함량과 tyrosinase의 활성이 농도 의존적으로 감소하였다.

각질형성세포에서 생성된 NO가 cGMP 경로를 통하여 멜라닌 생성을 증가시키고, Tyrosinase와 TRP-1을 증가시키고 Tyrosinase 활성의 mRNA 발현을 유도하는 과정에 관여하는 것으로 보고되어 있다 (Romero-Graillet 등, 1996, 1997; Sasaki 등, 2000). 멜라닌 저해 효과가 tyrosinase와 TRP-1 단백질의 감소에 의한 것임을 확인한 결과, 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 tyrosinase와 TRP-1 단백질의 억제제 mRNA 발현 감소로 인한 것인지를 조사하고자, RT-PCR을 통해 조사한 결과 단백질과 마찬가지로 감소 경향을 볼 수 있었다.

멜라닌 합성 과정에서 TRP-2는 dopachrome을 carboxylated derivative인 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 전환시키는 기능을 한다 (Solano F 등, 1992). TRP-2 단백질과 mRNA 발현을 확인한 결과, TRP-2 단백질과 mRNA 발현이 농도에 관계없이 일정하였다. 그러므로 제주아그배 추출물은 TRP-2와 상관없이 tyrosinase와 TRP-1의 mRNA 발현을 감소시키므로서 멜라닌 합성을 저해하는 것으로 볼 수 있다. 그리고 제주아그배 추출물의 분획물 중에서는 에틸아세테이트 분획물이 에탄올 추출물과 같은 경향을 나타내었다. 이것은 멜라닌 합성을 저해하는 물질이 에틸아세테이트 분획물에 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구를 통하여 제주아그배 추출물이 활성산소 등 자유기에 의해 발생하는 여러 만성질환 발병을 지연시키고 나아가서는 예방하는 기능성 소재로서의 활용 가능성을 보여주고 있다. 또한, 항산화 및 항염증 효과와 관련된 미백 관련 기능성 화장품 소재로서의 활용가치도 있다고 사료된다.

## V. 요 약

본 연구에서는 제주도에 자생하는 제주아그배 (*Malus micromalus* Makino)의 산업적 활용 가능성을 평가하기 위하여 제주아그배 잎 추출물의 생리활성을 조사하였다. 제주아그배 에탄올 추출물은 매우 높은 항산화 활성 (DPPH 소거활성 IC<sub>50</sub> 값, 16.1 µg/ml; NO 소거활성 IC<sub>50</sub> 값, 901.2 µg/ml; superoxide 소거활성 및 xanthine oxidase 억제 활성 IC<sub>50</sub> 값, 42.5 µg/ml, 2.7 µg/ml)을 나타내었다. 제주아그배 에탄올 추출물의 분획물중에서는 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물은 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 또한 이들은 iNOS 와 COX-2의 단백질과 mRNA 발현을 효과적으로 억제하였다. 그리고 멜라닌 생성 세포인 Melan-a 세포에서 제주아그배 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물은 tyrosinase와 TRP-1의 단백질과 mRNA 발현 억제를 통해 멜라닌 합성을 농도 의존적으로 억제하였다. 본 연구 결과는 제주아그배 추출물이 항산화 및 항염증 활성을 가지는 미백 관련 기능성 소재로서의 활용가치가 있음을 보여준다.

## VI. 참 고 문 헌

김창중 (1988) 병태생리학. 계축문화사 p47

박창걸, 이상필, 손은주 (2002) 기능성화장품. 한국과학기술정보연구원

이영노, 이경서, 신용만 (2001) 제주야생식물도감. 교학사 p238

이창복 (2003) 원색대한식물도감. 향문사 p572

이한영 (2004) 천연물 화장품. 한국생물공학회 생물공학 News p36-41

장경희, 노석선 (2004) 미백효과가 있는 천연물에 대한 고찰. 대전대학교 한의학  
연구소 논문집

현선희 (2007) 제주자생식물 추출물의 생리활성. 제주대학교

Al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P (1999) Pharmacology of rosemary  
(*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J  
Exp Biol* 37: 124-130

An SJ, Pae HO, Oh GS, Choi BM, Jeong S, Jamg SI, Oh H, Kwon TO,  
Song CE, Chung HT (2002) Inhibition of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6  
productions and NF- $\kappa$ B activation in lipopolysaccharide-activated  
RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated  
from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). *International  
Immunopharmacology* 2: 1173-1181

- Bennett A, Del Tacca M, Stamford IF, Zebro T (1977) Prostaglandins from tumors of human large bowel. *Br J Surg* 35: 882-884
- Bernadette EK, Marianne D, Bernhard P (1998) Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E). *J Am Acad Dermatol* 38: 45-48
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200
- Cals-Grierson MM and Ormerod AD (2004) Nitric oxide function in the skin. Elsevier Inc 10: 179-193
- Cerutti PA (1994) Oxy-radicals and cancer. *Lancet* 344(8926): 862-863
- Chakraborty AK, Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M (1998) Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 11(4): 206-212
- Cheng ZJ, Kuo SC, Chan SC, Ko FN, Teng CM (1998) Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. *Biochim Biophys Acta* 1392: 291-199
- Eisinger M, Marko O (1982) Selective proliferation of normal human melanocytes *in vitro* in the presence of phorbol ester and cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2018-2022
- Gordon PR, Mansur CP, Gilchrist BA (1989) Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J*

Invest Dermatol 92: 565-572

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and (15N) nitrate in biological. Fluids Anal Biochem 126: 131-136

Halaban R, Langdon R, Birchall N, Cuono C, Baird A, Scott G, Moellmann G, McGuire J (1988) Basic fibroblast growth factor from normal human keratinocyte is a natural mitogen for melanocytes. J Cell Biol 107: 1611-1619

Hearing VJ, Jimenez M (1987) Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigment. Int J Biochem 19(12), 1141-1144

Hearing VJ and Ekel TM (1976) Mammalian tyrosinase. J Biochem 157: 549-557

Jeong SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baeg NI (2004) Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. J Korea Soc Appl Biol Chem 47: 135-140

Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishi-yama S (1993) Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1), dopachrome tautomerase (TRP-2) and a melanogenic inhibitor. J Invest Dermatol 100: 126-132

- Kang IH, Cha JH, Han JH, Lee SW, Kim HJ, Kwon SH, Han IH, Hwang BS, Whang WK (2005) Isolation of anti-oxidant from domestic *Crataegus pinnatifida* Bunge leaves. *Kor J Pharmacogn* 36: 121-128
- Kaufman RJ, (1991) Vector used for expression in mammalian cells. *Meth. In. Enzymol* 205: 87-92
- Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K (2000) Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Junen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med* 28: 217-226
- Kim EC, Ahn SY, Hong ES, Li GH, Kim EK, Row KH (2005) Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect. *J Korean Ind Eng Chem* 16: 348-353
- Knowles RG and Mocada S (1992) Nitric oxide as signal in blood vessels. *TIBS* 17: 399-402
- Kuttan R, Sudheeran PC, Josph CD (1987) Tumeric and curcumin as topical agents in cancer therapy. *Tumori* 28: 29-31
- Lassalle MW, Igarashi S, Sasaki M, Wakamatsu K, Ito S, Horikoshi T (2003) Effects of melanogenesis-inducing nitric oxide and histamine on the production of eumelanin and pheomelanin in cultures human melanocytes. *Pigment Cell Res Fed* 16(1): 81-4
- Lee HJ, Jeong YS, Ryu SY, Ryu JH (1998) Inhibition of nitric oxide synthesis by 8-epi-xanthatin in activated RAW 264.7 cells. *Yakhak*



Hoeji 42(5): 540-543

Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee KY, Han JW, Lee HW (2000) Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol* 406: 301-309

Marcocci L, Maguire JJ, Droy-Lefaix MT, Packer L (1994) The nitric oxide scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 748-755

Monacada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142

Morelli JG and Norris DA (1993) Influence of inflammatory mediators and cytokines on human melanocyte function. *J. Invest. Dermatol* 100, 191S-195S

Nathan C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064

Noro T, Oda Y, Miyase T, Ueno A, Fukushima S (1983) Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Dafne genkwa*. *Chemical Pharmaceutical bulletin* 31: 3984-3987

Palmer RM, Ashton DS, Monacada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666

Pratt DE, Huang MT, Ho ST, Lee CY (1992) Phenolic compounds in food and their effects on health(II), antioxidants and cancer prevention. Washington DC p54-71

Prota G (1992) Melanin and melanogenesis. Academic Press, New York

Parahad R, Sanford KK, et al. (1998) Protective action of plant polyphenols on radiation-induced chromatid breaks in cultured human cells. *Anticancer Res* 18: 3263-3266

Romero-Graillet C, Aberdam E, Biagoli N, Massabni W, Ortonne JP, Ballotti R (1996) Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J Biol Chem* 271: 28052-28056

Romero-Graillet C, Aberdam E, Clement M, Ortonne JP, Bailotti R (1997) Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J Clin Invest* 00: 635-642

Sakuma K, Ogawa M, Sugibayashi K, Yamada K, Yamamoto K (1999) Relationship between tyrosinase inhibitory action and oxidation-reduction potential of cosmetic whitening ingredients and phenol derivatives. *Arch Pharm Res.* 22(4): 335-9

Sandra ML, Nico PS, Monique VV, Pennings EM, Stan P, Johannes WM. Simons, Albert AS (2001) Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. *J. Photochemistry and Photobiology B. Biology* 61: 106-113

- Sasaki M, Horikoshi T, Uchiwa H, Miyachi Y (2000) Up-regulation of tyrosinase gene by nitric oxide in human melanocytes. *Pigment Cell Res* 13(4): 248-52
- Scott MG and Hancock RE (2000) Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Rev Immunol* 20: 143-149
- Solano F, Aroca P, Salinas C, Gracia-Borrón JC, Lozano JA (1992) Regulation of final phase of melanogenesis. *Eur J Biochem* 208: 155-163
- Sungbin Im, Moro O, peng F, Medrano EE, Cnelius J, Babcock G, Nordlund JJ, Abdel-Malek ZA (1998) Activation of the cyclic AMP pathway by  $\alpha$ -melanotropin mediated the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer Res* 58: 47-54
- Tobin D, van Hogerlinden M, Toftgard R (1998) UVB-induced association of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1/TNF receptor-associated factor-2 mediates activation of Rel proteins. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* Jan 95: 565-569
- Weixiong L. and Helene ZH. (1997) Induced melanin reduces mutation and cell killing in mouse melanoma. *Phytochem. Phytobiol* 65: 480-484
- Willoughby DA (1971) Human arthritis applied to animal models. Towards a better therapy. *Annals of the Rheumatic Diseases* 34: 471-478