



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

비자 잎 열수추출물의  
멜라닌 생성 저해 효과

제주대학교 대학원

화 학 과

고 지 혜

2019년 8월

# 비자 및 열수추출물의 멜라닌 생성 저해 효과

지도교수 현 창 구

고 지 혜

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2019년 6월

고지혜의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원장

姜昌禧 

위 원

姜德珠 

위 원

玄昌久 

Anti-melanogenic Effects of  
*Torreya nucifera* Leaves

Ji-Hye Ko

(Supervised by Professor Chang-Gu Hyun)

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

2019. 6.

This thesis has been examined and approved by

Chang Hee Yang  
Duk Soo Chun  
CHANG-GU HYUN

2019. 06

Date

DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## ABSTRACT

*Torreya nucifera* is an evergreen tree of *Taxaceae*, and their seeds, leaves and stems have been used as edible and herbal materials in Korea. Previous studies have shown that *T. nucifera* has physiological activity such as antioxidant and anti-inflammatory effects. However, the effect of *T. nucifera* leaves on melanogenesis has not been studied yet. In this study, we used the B16F10 melanoma cells to confirm the efficacy of *T. nucifera* leaves water extract (TLWE). The present study,  $\alpha$ -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells were treated with various concentrations of TLWE (50, 100, and 200  $\mu$ g/mL). 200 nM  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) was also used as a negative control. The results showed that the TLWE reduced the melanin contents and cellular tyrosinase activity in a concentration dependent manner. It also inhibited the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinases (p38) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in mitogen-activated protein kinase (MAPKs) signaling pathway. As a result of HPLC analysis, catechin and *p*-coumaric acid which are known to have a whitening effect were observed. These results suggest that the TLWE has an anti-melanogenic effect. In addition, the safety of the TLWE was tested. The results of the heavy metal screening and skin irritation test showed that the TLWE was harmless to the human body even at higher concentrations than those used in the experiment. Therefore, we suggest that the *T. nucifera* leaves water extract can be used as a potential whitening ingredient.

Key words: *Torreya nucifera*, B16F10, Anti-melanogenesis

# 목 차

ABSTRACT .....	1
목차 .....	2
I.서론 .....	3
II.재료 및 방법 .....	7
1.시료 및 시약 .....	7
2.실험 방법 .....	8
2.1.비자 잎 열수추출물(TLWE) 제조 .....	8
2.2.비자 잎 열수추출물(TLWE)의 항산화 활성 .....	9
2.3.B16F10세포 내에서 비자 잎 열수추출물(TLWE)의 멜라닌 생성 저해 효과 .....	11
2.4.HPLC를 이용한 비자 잎 열수추출물(TLWE)의 지표 성분 분석 .....	15
2.5.안전성 평가시험 .....	19
3.통계처리 .....	20
III.결과 .....	21
1.비자 잎 열수추출물(TLWE)의 항산화 활성 .....	21
1.1.TLWE의 DPPH radical 소거 활성 .....	21
1.2.TLWE의 ABTS <sup>+</sup> radical 소거 활성 .....	23
2.B16F10 세포 내에서 비자 잎 열수추출물(TLWE)의 멜라닌 생성 저해 효과 .....	25
2.1.B16F10 세포 생존율에 대한 TLWE의 영향 .....	25
2.2.Melanin contents에 대한 TLWE의 영향 .....	27
2.3.세포 내 Tyrosinase activity에 대한 TLWE의 영향 .....	29
2.4.Western blot분석 .....	31
3.HPLC를 이용한 비자 잎 열수추출물(TLWE)의 지표 성분 분석 .....	40
4.안전성 평가시험 .....	42
4.1.중금속 검사 결과 .....	42
4.2.피부 첩포 안전성 평가시험 결과 .....	43
IV.고찰 .....	46
V.참고문헌 .....	48

## I. 서 론

멜라닌은 여러 동물의 피부나 눈 등의 조직에 존재하며 피부와 머리카락의 색을 결정하는 페놀류의 고분자 물질이다.[1,2] 멜라닌 생성은 유전적 요인, 호르몬 변화, 염증, 노화 및 자외선 노출 등의 요인이 생성에 관련되는 효소의 발현을 자극하여 촉진될 수 있다.[3]

멜라닌 합성은 melanocyte에서 일련의 효소 및 화학 반응을 통해 진행된다. 피부가 자외선에 노출되면 여러 melanocyte 성장 인자의 분비가 촉진되는데, 이 중 대표적인 멜라닌 세포 자극 호르몬은  $\alpha$ -MSH이다. 증가된  $\alpha$ -MSH가 멜라닌 세포 특이 수용체인 MC1R과 결합하여 하위 신호를 전달하는데, adenylate cyclase를 활성화 시켜 cAMP 수준을 증가시킨다. 증가한 cAMP는 PKA와 CREB를 인산화시켜 MITF의 발현을 증가시킨다.[4-7]

MITF는 멜라닌 생성 효소 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 의 강력한 전사 조절인자로서, 핵 내로 이동하여 DNA의 Tyrosinase, TRP 프로모터에 결합하여 각각의 유전자 발현을 증가시켜 멜라닌을 생성한다.[4,8,9]

Serine / threonine 계열의 MAPKs는 p38, JNK, ERK를 포함하는 멜라닌 합성 과정에서 중요한 인자이다. MAPKs는 MITF 단백질의 발현에 관여하는 것으로 보고되었다. p38과 JNK의 인산화는 MITF의 인산화를 저해하고 발현을 유도하여 멜라닌 생성을 증가시킨다. ERK의 인산화는 MITF의 serine73 부분을 인산화하여 MITF를 degradation 시켜 멜라닌 생성을 감소시킨다.[6,10-12]

이렇게 생성된 멜라닌은 주변 각질 세포로 이동한다. 표피까지 옮겨간 멜라닌은 우리 몸의 자유라디칼을 흡수하거나, 들어오는 자외선을 분산시켜 일정량 이상의 자외선을 차단하는 기능을 하여 유해한 자외선으로부터 피부를 보호하고 체온을 유지하는 기능을 한다. 그러나 멜라닌이 비정상적으로 많이 생성될 경우, 기미, 주근깨, 점 등과 같은 과색소침착증을 유발할 수 있으며 이는 일부 개인에게는 미용상의 문제로 받아들여질 수 있다. 따라서 멜라닌 생성 기전을 확인하고, 멜라닌 합성에 영향을 주는 사이토카인과 같은 신호 전달 물질을 조절하여 멜라닌의 생성을 억제하기 위한 연구가 진행되어왔다.

Kojic acid, arbutin, hydroquinone, 비타민 A, 비타민 C 및 이들의 유도체 등이

현재 미백 제품에 사용되고 있다[13]. 그러나 최근 피부와 화장품 제형에 대한 안정성 문제 등으로 인해 그 사용이 제한되고 있으며, 소비자들 또한 보다 안전한 천연 미백화장품을 선호하는 추세이다.

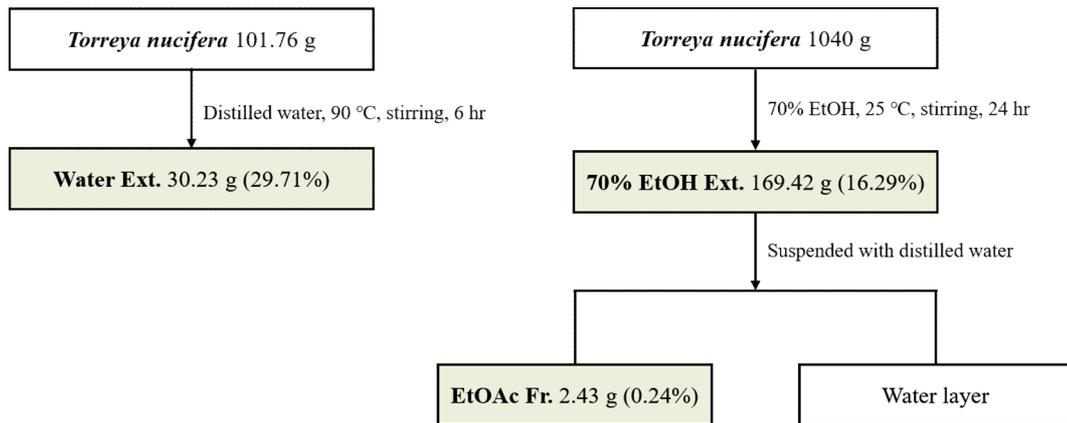
비자나무(*Torreya nucifera* (L.) Siebold & Zucc.)는 주목과의 상록침엽교목으로, 나뭇결이 곧고 단단하며 높이 25 m, 지름 2 m에 달한다. 줄기는 탄성이 강하고 가공이 쉬우며, 내부후성도 강해서 건축, 가구, 선박 등에 이용되며 바둑판, 장기판의 재목으로도 널리 쓰인다.[14]

해발 800 m 이하의 온대림에서 자라며 한국 남부지방과 일본에서 자생하고 있다. 특히 제주도 구좌읍 일대에 2,800 그루가 집단을 이루어 만들어진 비자림은 단일 수종의 숲으로는 세계 최대 규모이며, 천연기념물 374호로 지정되어 보호, 관리되고 있다.

비자나무의 종자, 잎, 줄기는 예로부터 식용 및 한방재료로 사용되어왔다. 비자나무의 성숙한 종자에서 종피를 제거한 것을 비자라 하는데 이는 식욕증진, 소화촉진, 변비 및 치질 등에 약리작용을 나타내며 구충제로도 이용되어왔다.[15,16] 이전 논문에 따르면 *T. nucifera*는 항산화, 항염증, 간 보호와 신경 보호 효과 등의 약리학적 효능이 보고되었다. 최근 국립산림품종관리센터에서는 비자나무를 미래 신약과 신소재 개발 등 다양한 산업에서 품종 개발 가능성이 높은 산림 작물로 선정하였다.[16,17]

그러나 비자 잎이 멜라닌 생성에 미치는 영향은 아직 보고되지 않았다. 본 논문에서, 우리는 B16F10 melanoma 세포를 사용하여 비자 잎 추출물의 효능을 연구하였다. 비자 잎을 추출 및 분획하여 3가지 시료를 제조하였다. 열수추출물(Water Ext.), 70 % EtOH 추출물(70 % EtOH Ext.), EtOAc 분획물(EtOAc Fr.) 3가지 시료에 대하여 항산화 활성 평가를 진행하였다.

본 연구에서는 비자 잎 추출물을 사용한 연구를 진행하였다. 비자 잎을 각각 열수, 70 % EtOH을 사용하여 추출하고 EtOAc로 분획하여 세 종류의 시료를 제조하였다.



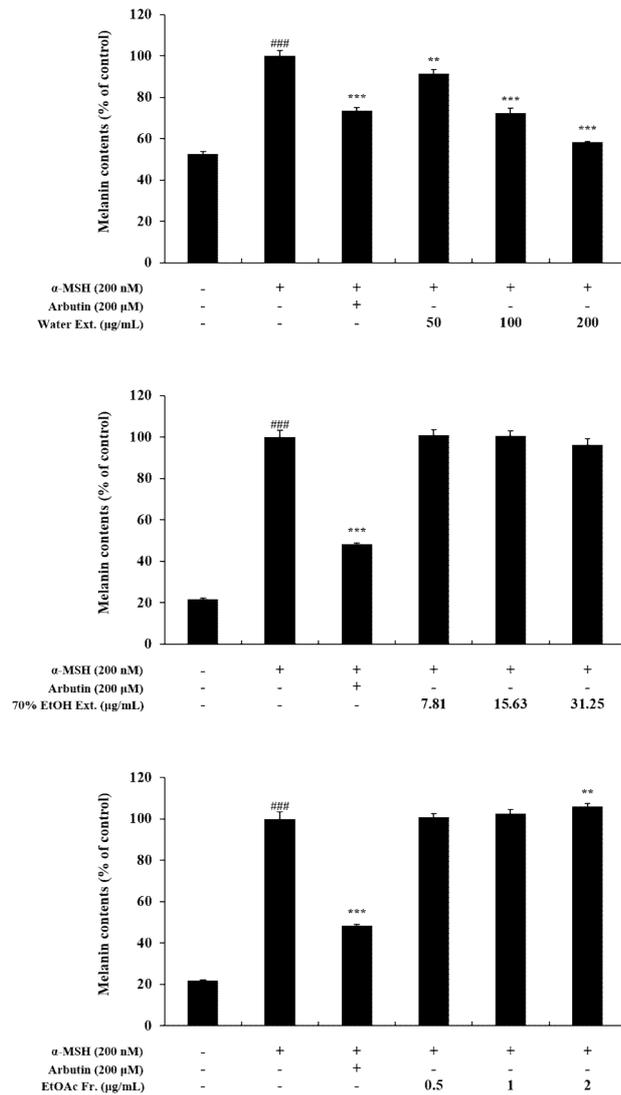
**Figure 1.** Extraction and solvent fraction of *T. nucifera* leaves.

열수추출물(Water Ext.), 70% EtOH 추출물(70% EtOH Ext.), EtOAc 분획물(EtOAc Fr.) 3가지 시료에 대한 항산화 활성을 확인한 결과, 모두 우수한 활성을 나타내었으나 열수추출물의 효능이 조금 더 좋은 것으로 나타났다.

**Table 1.** IC<sub>50</sub> values of TLWE on DPPH and ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity.

		Water Ext.	70% EtOH Ext.	EtOAc Fr.	Ascorbic acid
IC <sub>50</sub> (μg/mL)	DPPH	53.10	55.26	63.96	6.62
	ABTS	16.57	21.89	25.21	2.22

또한 B16F10 세포를 이용하여 독성이 없는 범위 내에서 시료가 멜라닌 생성에 미치는 영향을 평가하였다. (Figure 2) 그 결과, 열수추출물에서 멜라닌 생성이 농도 의존적으로 감소하여 미백 효능을 나타내었다. 따라서 본 논문에서는 비자외선 열수추출물(TLWE)에 집중하여 후속 실험을 진행하고, 멜라닌 생성 억제 기전을 확인하였다. 또한 화장품 기능성 원료로서의 개발 가능성을 확인하기 위하여 추가로 중금속 검사와 피부 첩포 안전성 평가를 진행하였다.



**Figure 2. Effects of (a) Water Ext, (b) 70 % EtOH Ext., (c) EtOAc Fr. on melanin production in B16F10 cells.**

Cells were treated with *T. nucifera* leaves extracts at a concentration without any cytotoxicity for 72 hours. α-MSH (200 nM) was used as the negative control and arbutin (200 μM) was used as the positive control. The melanin content is expressed as a percentage compared to the untreated control. The data are expressed as mean ± standard deviation (SD) at least four independent experiments. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. α-MSH, ###  $p < 0.001$  vs. control)

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 및 시약

본 연구에 사용된 비자 잎은 (주)아일랜드 에서 구입하여 실험에 사용하였다.

Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid, BCA protein assay kit는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), sodium hydroxide (NaOH), 및 protease inhibitor cocktail은 Merck (Darmstadt, Hesse, Germany)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)은 VWR (Radnor, Pennsylvania, U.S.A)에서 구입하였다. Western blot 실험용 항체 P-p38, T-p38, P-JNK, T-JNK, P-ERK, T-ERK, P-p105, T-p105, P-p65, T-p65, T-I $\kappa$ B- $\alpha$ ,  $\beta$ -actin은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase, MITF는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, U.S.A)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO), radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer, enhanced chemiluminescence (ECL) kit, 그리고 2X Laemmli sample buffer는 Biosesang (Sungnam, Gyeonggi-do, Korea)과 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)로부터 각각 구입하였다.

## 2. 실험 방법

### 2.1. 비자 잎 열수추출물(TLWE) 제조

가지에서 분리한 비자 잎을 세척 후 그늘에서 건조하여 분쇄하였다. 분쇄된 잎 101.76 g 에 3차 증류수 1.8 L를 넣고 90 °C 에서 6시간 동안 마그네틱 바로 교반하며 추출하였다. 이후 2번 여과하여 찌꺼기를 걸러내고, 감압농축기를 사용하여 용매를 제거하고 동결건조하여 분말 형태의 시료를 얻었다. 수득율은 29.7 % 였으며 실험에 사용되기 전 4 °C에서 보관하였다.



Figure 3. *Torreyia nucifera* leaves.

## 2.2. 비자 잎 열수추출물(TLWE)의 항산화 활성

### 2.2.1. DPPH radical 소거 활성

Blois의 방법[18]을 변형하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical에 대한 radical 소거 활성을 측정하였다. 다양한 농도로 희석한 비자 잎 추출물(Water Ext, 70 % EtOH Ext., EtOAc Fr.) 20  $\mu$ L에 0.2 mM DPPH(1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)용액 180  $\mu$ L를 첨가하였다. 10분간 암실에서 반응시킨 후 남아있는 DPPH free radical을 microplate reader (SUNRISE, TECAN Austria GmbH)를 통해 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성은 시료 용액의 첨가구와 무 첨가구 사이의 흡광도 차이를 다음과 같이 계산하여 나타내었다. 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{DPPH radical 소거 활성(\%)} = [ 1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}} ] \times 100$$

$A_{\text{sample}}$  : 517nm에서 sample과 DPPH의 흡광도

$A_{\text{blank}}$  : 517nm에서 sample 자체의 흡광도

$A_{\text{control}}$  : 517nm에서 DPPH의 흡광도

## 2.2.2. ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성

ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성은 Pellegrini 등의 방법[19]에 따라 측정하였다. 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate를 1 :1 비율로 혼합 후 암실에서 16 시간 동안 방치하여 radical을 형성하였다. Radical이 생성된 ABTS<sup>+</sup> 용액을 734 nm에서 흡광도가 0.70±0.02가 되도록 희석하였다. 희석된 ABTS<sup>+</sup> 용액 180 µL에 비자 잎 추출물(Water Ext, 70 % EtOH Ext., EtOAc Fr.) 20 µL를 첨가하여 실온에서 15분 동안 반응시키고, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{ABTS}^+ \text{ radical 소거 활성(\%)} = [ 1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}} ] \times 100$$

$A_{\text{sample}}$  : 517nm에서 sample과 ABTS<sup>+</sup>의 흡광도

$A_{\text{blank}}$  : 517nm에서 sample 자체의 흡광도

$A_{\text{control}}$  : 517nm에서 ABTS<sup>+</sup>의 흡광도

## 2.3. B16F10 세포 내에서 비자 잎 열수추출물(TLWE)의 멜라닌 생성 저해 효과

### 2.3.1. 세포 배양

B16F10 mouse melanoma 세포를 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 배양 배지로는 10 % Fetal Bovine Serum (FBS)와 1 % Penicillin/Streptomycin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)을 사용하였으며, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 조건에서 4일 간격으로 계대하며 배양하였다.

### 2.3.2. 세포 생존율 평가

비자 잎 열수추출물(TLWE)의 세포 생존력을 확인하기 위하여 MTT assay를 진행하였다. B16F10 세포를 24 well plate 에  $0.8 \times 10^4$  cells/well로 500  $\mu$ L 분주하였다. 24시간 전배양 후 배지를 제거하고, 새 배지에 희석한 TLWE (50, 100, 200, 400, 800  $\mu$ g/mL)를 처리하였다. 72시간 후 배지를 제거하고, MTT 시약을 0.2 mg/mL 처리하였다. 4시간 후 생성된 보라색의 formazan 결정을 DMSO 로 용해시키고, 96 well plate에 200  $\mu$ L씩 옮겨 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 아무것도 처리하지 않은 대조군(Control)과의 백분율을 계산하여 나타내었다.

### 2.3.3. Melanin contents

TLWE가 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 Melanin contents assay를 진행하였다. 60 mm cell culture plate에 세포를  $0.4 \times 10^5$  cells/plate가 되도록 4 mL 분주하여 24시간 전배양하였다. TLWE (50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하고  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)를 200 nM 첨가하였다.  $\alpha$ -MSH는 음성 대조군으로, 200  $\mu\text{M}$  Arbutin은 양성 대조군으로 사용되었다. 72시간 배양 후 배지를 제거하고 RIPA buffer와 inhibitor cocktail (1 %)을 200  $\mu\text{L}$  넣어 4  $^{\circ}\text{C}$  에서 20분간 처리하여 세포를 용해시켰다. Cell scraper를 사용하여 용해된 세포를 긁어내고 microtube에 옮겨 담아 15000 rpm, 4  $^{\circ}\text{C}$  조건으로 20분간 원심 분리하였다. 분리된 pellet에 10 % DMSO가 첨가된 1N NaOH를 1 mL 넣어 90  $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 처리하였다. 이후 96 well plate에 200  $\mu\text{L}$ 씩 옮겨 담아 405 nm에서 흡광도를 측정하고, 결과를  $\alpha$ -MSH 처리군과의 백분율을 계산하여 나타내었다.

#### 2.3.4. 세포 내 Tyrosinase activity

60 mm cell culture plate에 세포를  $0.4 \times 10^5$  cells/plate가 되도록 4 mL 분주하여 24시간 전배양하였다. TLWE (50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하고  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)를 200 nM 첨가하였다.  $\alpha$ -MSH는 음성 대조군으로, 200  $\mu\text{M}$  Arbutin은 양성 대조군으로 사용되었다. 72시간 배양 후 배지를 제거하고 RIPA buffer와 inhibitor cocktail (1 %)을 200  $\mu\text{L}$  넣어 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 처리하여 세포를 용해시켰다. Cell scraper를 사용하여 용해된 세포를 긁어내고 microtube 에 옮겨 담아 15000 rpm, 4  $^{\circ}\text{C}$  조건으로 20분간 원심 분리하였다. BCA Protein assay kit를 사용하여 상층액의 단백질 함량을 측정하고, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 사용하여 단백질 농도가 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 가 되도록 희석하였다. 희석한 단백질 20  $\mu\text{L}$ 를 96 well plate에 넣고 2 mg/mL L-DOPA를 80  $\mu\text{L}$  첨가하였다. 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 배양 후 490 nm에서 흡광도를 측정하고, 결과를  $\alpha$ -MSH 처리군과의 백분율을 계산하여 나타내었다.

### 2.3.5. Western blot 분석

60 mm cell culture plate 에 세포를  $0.4 \times 10^5$  cells/plate가 되도록 4 mL 분주하여 72시간 전배양하였다. TLWE (50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하고  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)를 200 nM 첨가하여 24시간 배양하였다. 세포를 용해시켜 긁어내고 microtube에 옮겨 담아 15000 rpm, 4  $^{\circ}\text{C}$  조건으로 20분간 원심 분리하였다. BCA Protein assay kit를 사용하여 상층액의 단백질 함량을 측정하고 단백질 농도가 40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 가 되도록 희석하였다. 2x Laemmli sample buffer를 동일한 양만큼 첨가하고 100  $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 처리 후, SDS-PAGE gel에 각각 10  $\mu\text{L}$ 씩 loading하여 단백질을 분리하였다. PVDF membrane으로 transfer 후 5 % skim milk로 overnight blocking하여 불필요한 물질들이 검출되지 않도록 하였다. TBS-T (0.1 % Tween 20을 포함하는 Tris-buffered saline)를 사용하여 membrane 을 10분 간격으로 6회 세척 후 1차 항체(primary antibody)를 2시간 처리하였다. TBS-T로 6회 세척 후 2차 항체(secondary antibody)를 2시간 처리하였다. 다시 TBS-T로 6회 세척하고 ECL solution과 반응시켜 Chemidoc (Fusion solo 6S.WL, VILBER LOURMAT, France)으로 현상하였다. 결과를 housekeeping gene인  $\beta$ -actin 단백질 함량과 비교하여 그래프로 나타내었다.

## 2.4. HPLC를 이용한 비자 잎 열수추출물(TLWE)의 지표 성분 분석

분석에 사용된 High performance liquid chromatography (HPLC) 기기는 Alliance e2695 separations module과 2998 PDA dectctor (Waters, USA)를 사용하였으며, 데이터 분석 S/W는 Waters의 Empower system을 이용하여 분석하였다. HPLC 분석에 사용된 지표 물질 catechin과 *p*-coumaric acid는 농도별로 (0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 희석하여 표준검정곡선(**Figure 4**)을 작성하였으며, 각각 (Gottumukkala, R.V., et al., 2014)[20]과 (Karthikeyan, R., et al., 2015)[21]의 방법을 변형하여 분석을 진행하였다. 분석 및 용리 조건은 (**Table 2**, **Table 3**)에 나타내었다.

**Table 2. HPLC chromatographic conditions for Catechin.**

Control factor	Conditions		
Inject volume	10 $\mu$ L		
Column	YMC Triart C18 (5 $\mu$ m, 4.6 x 250 mm)		
Mobile phase	A : 0.01% phosphoric acid, B : acetonitrile		
Flow rate	1 mL/min		
Column temperature	30 $^{\circ}$ C		
Wavelength	280 nm		
Detector	2998 PDA (Waters, USA)		
Separation module	Alliance e2695 (Waters, USA)		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	89	11
	0.1	89	11
Gradient elution conditions	30	75	25
	35	75	25
	39	0	100
	40	89	11
	50	89	11

Table 3. HPLC chromatographic conditions for *p*-coumaric acid.

Control factor	Conditions
Inject volume	10 $\mu$ L
Column	YMC Triart C18 (5 $\mu$ m, 4.6 x 250 mm)
Mobile phase	Water : MeOH : acetic acid (64 : 34 : 1 v/v)
Flow rate	1 mL/min
Column temperature	25 $^{\circ}$ C
Wavelength	310 nm
Detector	2998 PDA (Waters, USA)
Separation module	Alliance e2695 (Waters, USA)

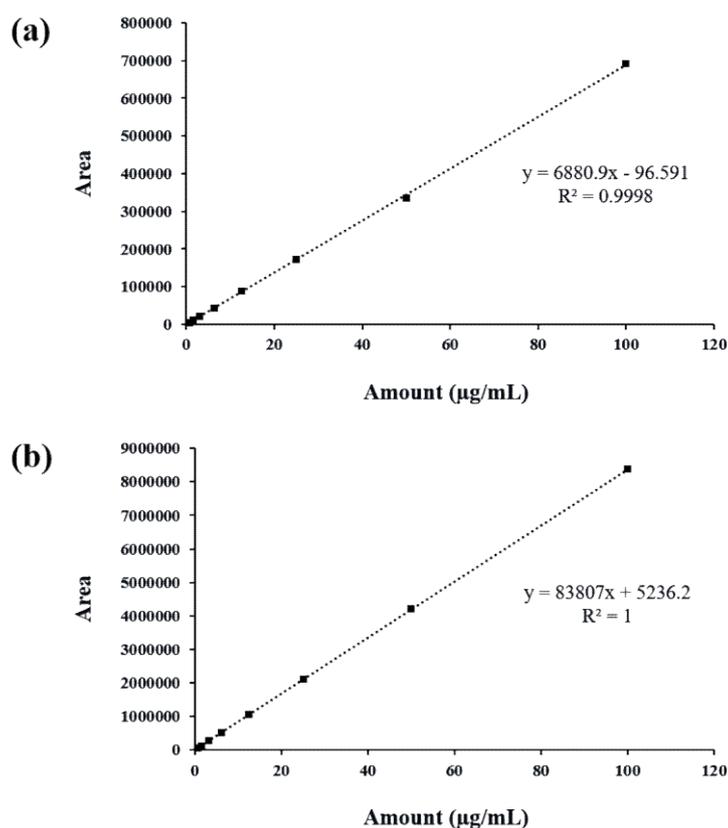


Figure 4. Calibration curve for quantification of (a) catechin, (b) *p*-coumaric acid standard.

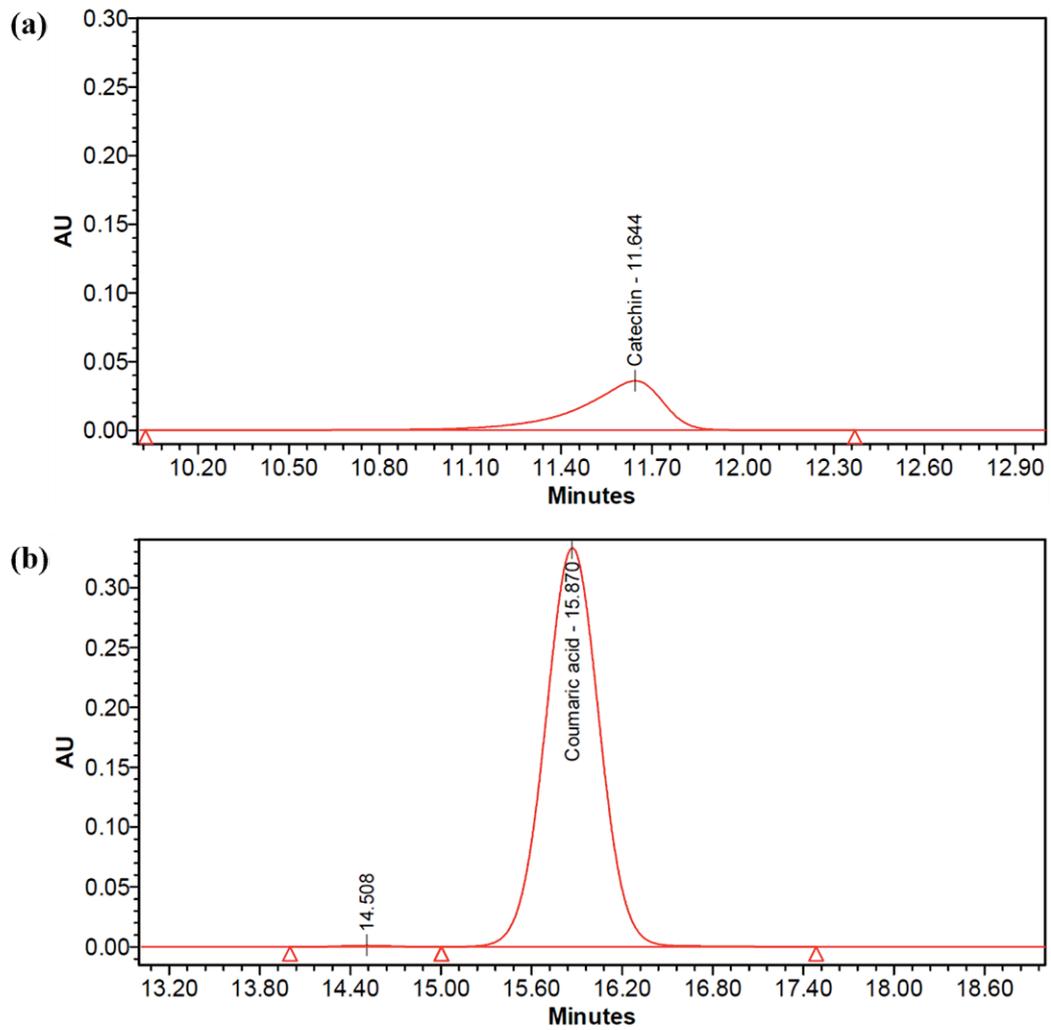


Figure 5. HPLC chromatogram of (a) catechin, (b) p-coumaric acid (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

## 2.5. 안전성 평가시험

### 2.5.1. 중금속 검사

제주대학교 생명과학기술혁신센터(RIC)에 의뢰하여 TLWE의 중금속 오염 여부를 검사하였다. TLWE를 용매에 녹이지 않은 분말 상태(10 g)로 제출하여 토양에서 검출될 수 있는 유독성 중금속인 납, 비소, 수은에 대한 검사를 진행하였다. 검사는 식품공전 제8.9.1.2, 제8.9.1.4와 제8.9.1.6에 의거하여 진행되었으며 결과를 <화장품 안전기준 등에 관한 규정(식품의약품안전처고시 제2019-27호)>에 따라 평가하였다.

### 2.5.2. 피부 첩포 안전성 평가시험

TLWE가 실제로 상용화될 경우 인체에 미치는 영향을 알아보기 위하여 24시간 피부 첩포를 통한 안전성 평가시험을 진행하였다. 이 테스트는 (주)대한피부과학연구소에 의뢰하여 진행되었다. TLWE를 squalene에 800 µg/mL 농도로 희석하여 시험에 사용하였다. 선정기준에 부합하는 피험자 30명을 선정하여 시험 부위를 70 % 에탄올로 닦아 건조시켰다. 피험자의 등에 15 µL의 시료를 Finn chamber에 도포 후 plaster로 고정하였다. 24시간 후 패치를 제거하고, 30분, 48시간, 72시간이 지난 후 관찰 결과를 피부과전문의가 판독하였다. 결과를 국제접촉피부염 연구회(ICDRG, International contact dermatitis research group)의 판정기준과 미국화장품협회(PCPC, Personal Care Products Council)의 안전성 평가 가이드라인을 응용한 기준(**Table 4**)에 따라 평가하였다. 피험자들의 피부 반응 점수를 이용하여 다음과 같이 자극지수를 계산하였다.

$$\text{자극 지수} = \frac{\Sigma \text{Irritation score at 24, 48 and 72 hr}}{\text{total number of observations}}$$

평균 자극 지수를 산출한 후 Draize Dermal Classification System 및 EPA (Environmental Protection Agency) Standard Procedure Dermal Classification System을 응용한 (Table 5)에 따라 자극성의 정도를 판정하였다.

**Table 4. Skin irritation score system.**

점수	Conditions
0(-)	No signs of inflammation, normal skin
0.5(±)	Doubtful or slight reaction
1(+)	Slight erythema
2(++)	Moderate erythema with or without partial edema or papules
3(+++)	Moderate erythema with diffuse edema
4(++++)	Intense erythema with diffuse edema with vesicles

**Table 5. Skin irritation judgment.**

자극 지수	자극성 평가
$0 \leq < 0.02$	무자극 no irritancy
$0.02 \leq < 0.25$	저자극 low irritancy
$0.25 \leq < 1$	경자극 slight irritancy
$1 \leq < 2.5$	중자극 moderate irritancy
$2.5 \leq$	강자극 severe irritancy

### 3. 통계처리

모든 실험결과는 student's t-test를 사용하여 통계적 유의성 및 p-value를 계산하였다(\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). 모든 실험은 각각 3번 이상 수행되었으며 평균 ± 표준 편차(SD)로 나타내었다.

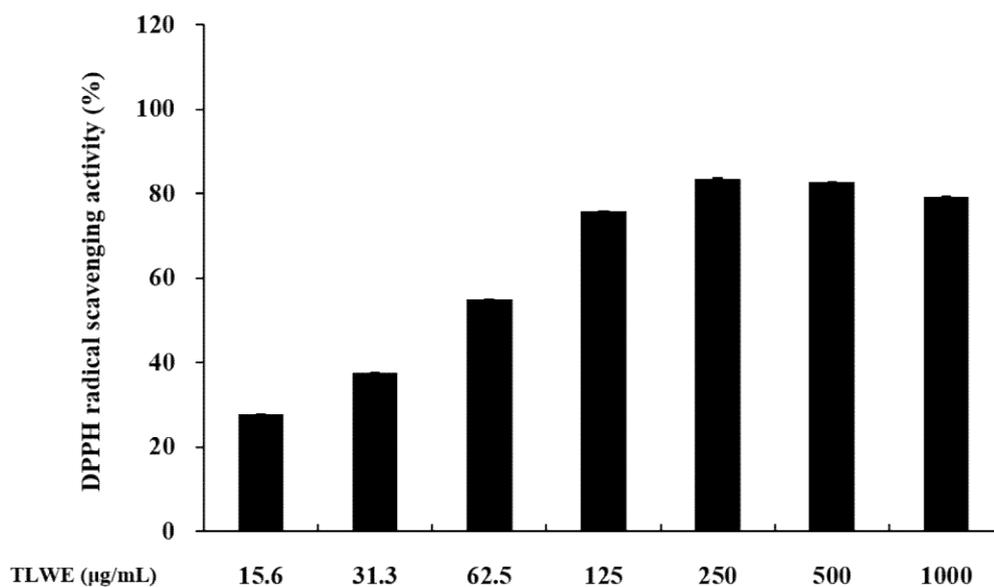
### III. 결 과

#### 1. 비자 잎 열수추출물(TLWE)의 항산화 활성

##### 1.1 TLWE의 DPPH radical 소거 활성

인체에서 free radical의 유해한 영향을 방지하기 위한 항산화 물질에 대한 관심이 증가하고 있다. DPPH radical 소거 활성 실험은 비교적 간단하면서 널리 사용되는 항산화 활성 측정법으로, 비교적 안정한 DPPH radical 화합물이 항산화 물질로부터 전자나 수소를 제공받아 DPPH-H로 환원되면서 보라색이 탈색되는 원리를 이용한 것이다.[22]

비자 잎 열수추출물(TLWE)에 대하여 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과, 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 250  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 84 %의 radical 소거 활성을 나타내었으며, 이후 농도에서는 더 이상 활성이 증가하지 않고 비슷한 경향을 나타내었다.



**Figure 6. Effects of TLWE on DPPH radical scavenging activity.**

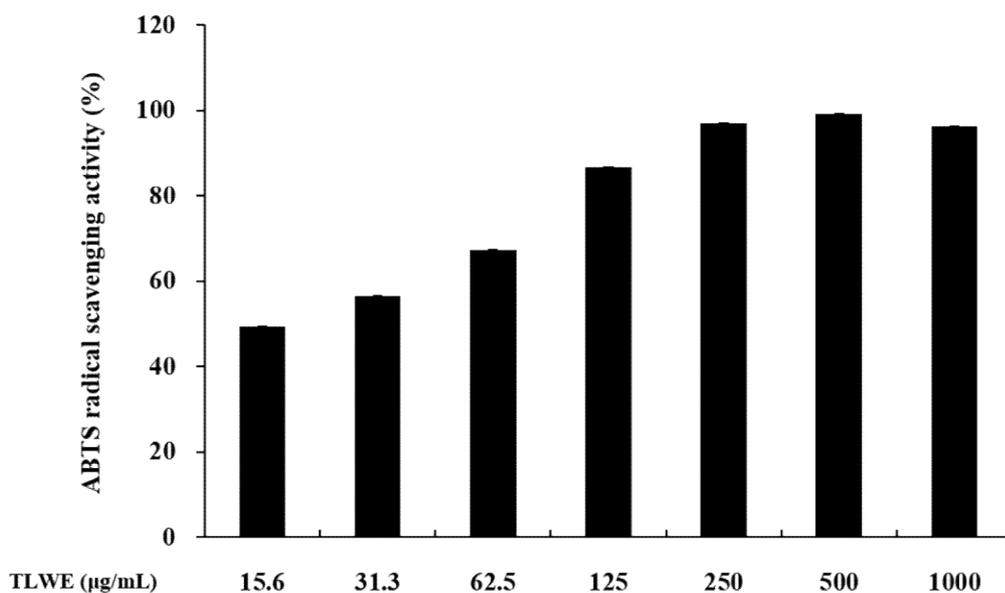
TLWE (15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL) were reacted with DPPH reagent for 15 min. The percentage of the control group was calculated and shown as a graph. Ascorbic acid was used as a positive control. The data are expressed as mean ± standard deviation (SD) at least four independent experiments.

\* IC<sub>50</sub> values : TLWE = 53.10 µg/mL, Ascorbic acid (Positive control) = 6.62 µg/mL

## 1.2. TLWE의 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성

ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성 실험은 앞서 서술한 DPPH radical 소거 활성 실험과 비슷한 원리이지만, 전체적인 free radical을 소거하는 DPPH radical 소거 활성법과 달리 cation radical을 제거하는 능력을 확인하는 방식이라는 차이점이 있다.[23] 또한 DPPH 실험법은 주로 소수성 물질의 항산화능을 확인하는 방법이고, ABTS<sup>+</sup> 실험법은 친수성과 소수성 물질의 항산화능을 모두 측정할 수 있는 방법이라는 차이가 있다.[24-26]

비자 잎 열수추출물(TLWE)에 대하여 ABTS<sup>+</sup> radical 소거 활성을 측정하였다. 그 결과 농도 의존적으로 항산화 활성이 증가하는 것을 확인하였으며, 특히 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 96 %의 높은 항산화 효능을 나타내었다. 이후 농도에서는 활성이 더 이상 증가하지 않고 비슷한 경향을 나타내었다.



**Figure 7. Effects of TLWE on ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activity.**

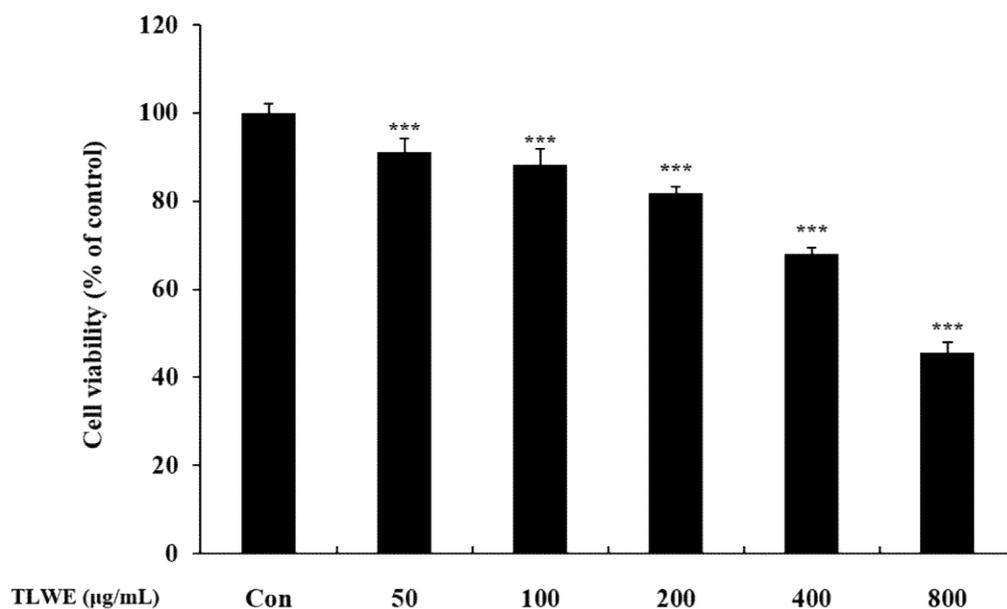
TLWE (15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL) were reacted with ABTS<sup>+</sup> reagent for 15 min. The percentage of the control group was calculated and shown as a graph. Ascorbic acid was used as a positive control. The data are expressed as mean ± standard deviation (SD) at least four independent experiments.

\* IC<sub>50</sub> values : TLWE = 16.57 µg/mL, Ascorbic acid (Positive control) = 2.22 µg/mL

## 2. B16F10 세포 내에서 비자 잎 열수추출물(TLWE)의 멜라닌 생성 저해 효과

### 2.1. B16F10 세포 생존율에 대한 TLWE의 영향

B16F10 세포에 농도별로 희석한 TLWE (50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하여 72시간 배양 후, 세포 생존율을 확인하였다. 결과를 아무것도 처리하지 않은 대조군(Control)과 비교하여 백분율로 나타내었다. TLWE는 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 82 %의 세포생존율을 나타내었다. 따라서 독성을 나타내지 않는 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 농도를 사용하여 후속 실험을 진행하였다.

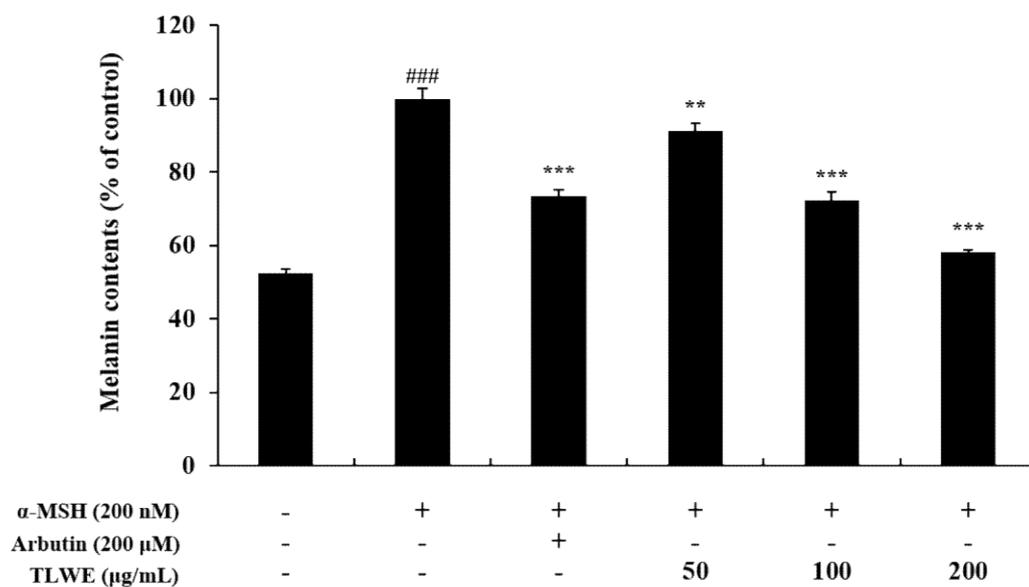


**Figure 8. Effects of TLWE on cell viability in B16F10 cells.**

The cells were treated with TLWE (50, 100, 200, 400, 800 µg/mL) for 72 hr. The data are expressed as mean ± standard deviation (SD) at least four independent experiments. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. control)

## 2.2 Melanin contents에 대한 TLWE의 영향

$\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)로 자극된 세포에 TLWE (50, 100, 200,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하여 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하였다. 음성 대조군으로 사용된  $\alpha$ -MSH는 아무것도 처리하지 않은 대조군(Control)과 비교하여 멜라닌 생성을 증가시켰다. 그러나 TLWE를 함께 처리하자 멜라닌 생성량이 농도의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서  $\alpha$ -MSH 처리군에 비해 42 % 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 이 결과는 TLWE가 멜라닌 생성을 농도의존적으로 감소시킴을 보여준다.

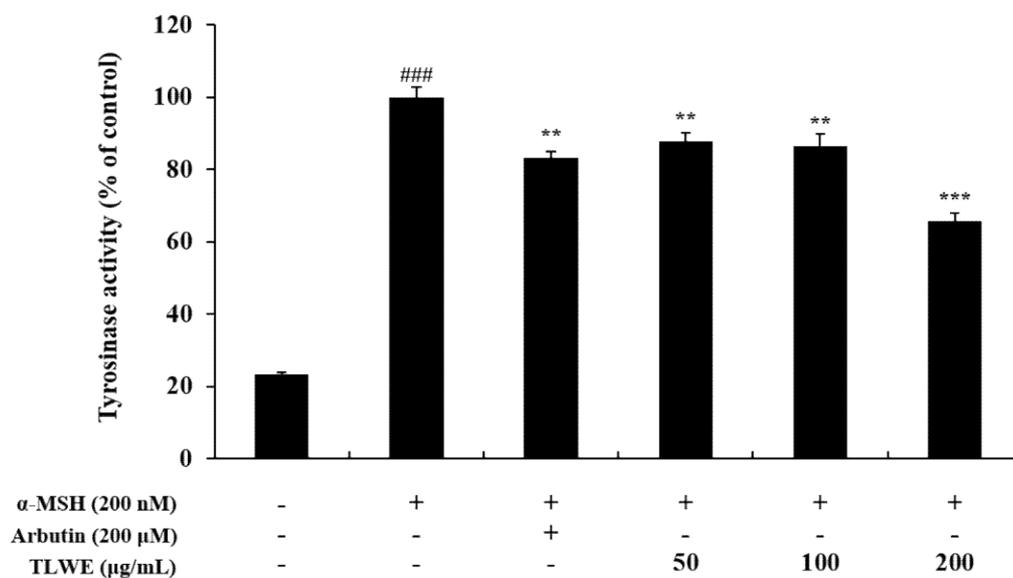


**Figure 9.** Effects of TLWE on melanin production in B16F10 cells.

The cells were treated with TLWE (50, 100, 200 μg/mL) for 72 hr. α-MSH (200 nM) was used as the negative control and arbutin (200 μM) was used as the positive control. The melanin content is expressed as a percentage compared to the untreated control. The data are expressed as mean ± standard deviation (SD) at least four independent experiments. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. α-MSH, ###  $p < 0.001$  vs. control)

### 2.3 세포 내 Tyrosinase activity에 대한 TLWE의 영향

$\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)로 자극된 세포에 TLWE (50, 100, 200,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하여 세포의 Tyrosinase 발현과 활성화에 미치는 영향을 확인하였다. 음성 대조군으로 사용된  $\alpha$ -MSH는 아무것도 처리하지 않은 대조군 (Control)과 비교하여 Tyrosinase 활성을 약 5배 증가시켰다. 그러나 TLWE를 함께 처리하였을 때 Tyrosinase 활성이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서  $\alpha$ -MSH 처리군에 비해 34 % 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 이 결과는 TLWE가 Tyrosinase의 발현과 활성을 농도 의존적으로 감소시킴을 나타낸다.



**Figure 10. Effects of TLWE on tyrosinase activity in B16F10 cells.**

The cells were treated with TLWE (50, 100, 200  $\mu$ g/mL) for 72 hr.  $\alpha$ -MSH (200 nM) was used as the negative control and arbutin (200  $\mu$ M) was used as the positive control. Tyrosinase activity is expressed as a percentage compared to the untreated control. The data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) at least four independent experiments. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs.  $\alpha$ -MSH, ###  $p < 0.001$  vs. control)

## 2.4. Western blot 분석

### 2.4.1. 멜라닌 생성 관련 효소들에 대한 TLWE의 영향

이상의 결과는 TLWE가 B16F10 세포에서 멜라닌 생성을 억제하는 효과가 있음을 증명한다. 따라서 본 연구에서는 TLWE가 B16F10 세포에서 어떠한 신호전달경로를 통하여 멜라닌 생성을 억제하는지를 Western blot 분석으로 확인하였다.

먼저 TLWE가 멜라닌 생성 관련 효소들인 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 세 가지 효소 모두  $\alpha$ -MSH 단독 처리군에서는 단백질 발현이 증가하였으나 TLWE와 동시에 처리한 경우에는 단백질량이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

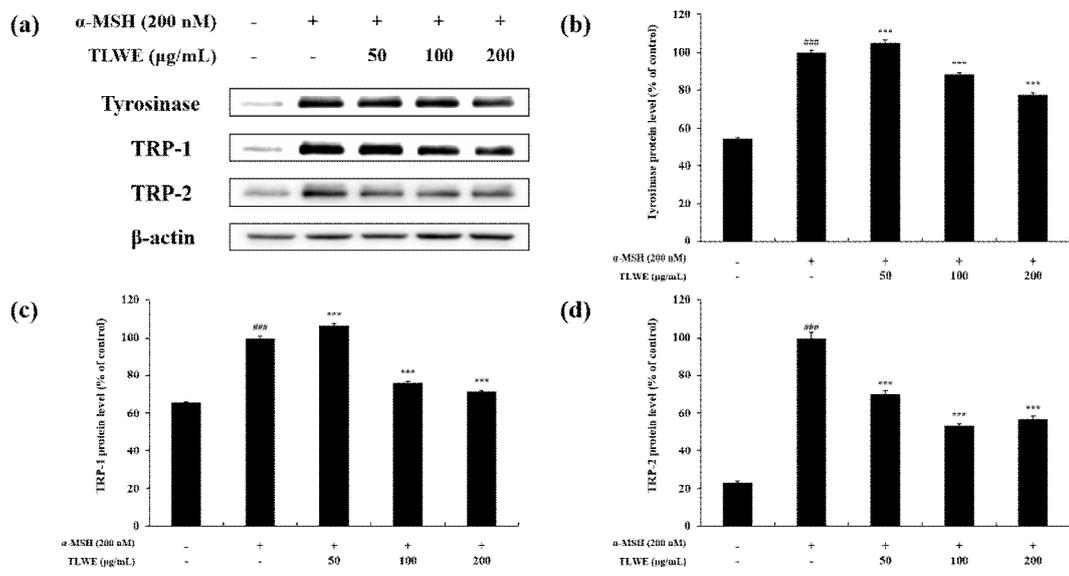
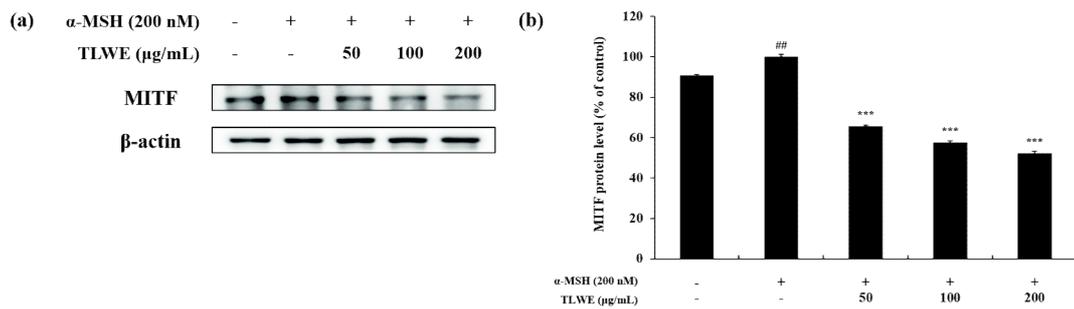


Figure 11. Effects of TLWE on Tyrosinase, TRP-1, TRP-2,  $\beta$ -actin expression in B16F10 cells.

The cells were treated with TLWE (50, 100, 200  $\mu$ g/mL) for 24 hr.  $\alpha$ -MSH (200 nM) was used as the negative control. (a) Protein levels were determined by western blotting. (b) Tyrosinase, (c) TRP-1, (d) TRP-2 were expressed as a percentage compared to the value of the  $\beta$ -actin. The data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) at least four independent experiments. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs.  $\alpha$ -MSH, ###  $p < 0.001$  vs. control)

#### 2.4.2. MITF 발현에 미치는 TLWE의 영향

MITF는 tyrosinase 유전자 프로모터의 M-box에 결합하여 멜라닌 생성 효소 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 단백질 생성을 증가시킨다.[4,8,9] TLWE가 MITF 단백질의 발현에 미치는 영향을 western blot 분석으로 확인하였다.  $\alpha$ -MSH 단독 처리군에서는 단백질 발현이 증가하였으나 TLWE와 동시에 처리한 경우에 단백질이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 TLWE가 MITF의 발현을 농도의존적으로 감소시킴으로써 멜라닌 생성 효소의 발현을 저해하는 것을 나타낸다.



**Figure 12. Effects of TLWE on MITF,  $\beta$ -actin expression in B16F10 cells.**

The cells were treated with TLWE (50, 100, 200  $\mu$ g/mL) for 22 hr.  $\alpha$ -MSH (200 nM) was used as the negative control. (a) Protein levels were determined by western blotting. (b) MITF was expressed as a percentage compared to the value of the  $\beta$ -actin. The data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) at least four independent experiments. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs.  $\alpha$ -MSH, ##  $p < 0.01$  vs. control)

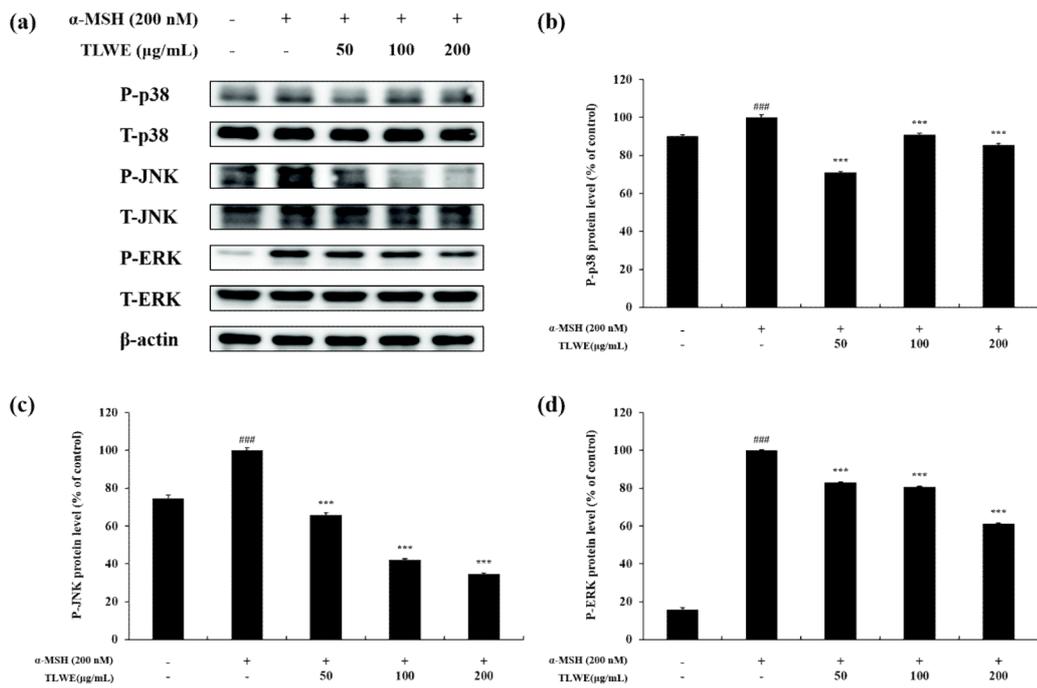
### 2.4.3. MAPKs 신호전달 경로에 대한 TLWE의 영향

Serine/threonine 계열의 MAPKs는 p38, JNK, ERK를 포함하며, MITF 단백질의 발현에 관여하는 멜라닌 생합성 과정에서 중요한 인자이다. p38과 JNK의 인산화는 MITF의 인산화를 저해하고 발현을 유도하여 멜라닌 생성을 증가시킨다. ERK의 인산화는 MITF의 serine73 부분을 인산화하여 MITF를 degradation시켜 멜라닌 생성을 감소시킨다.[6,10-12]

TLWE가 MAPKs 단백질의 발현에 미치는 영향을 western blot을 이용하여 확인하였다(**Figure 13**). Total form인 T-p38, T-JNK, T-ERK는 TLWE의 처리와 무관하게 일정한 단백질 함량을 나타내었으나 인산화된 P-p38, P-JNK, P-ERK는 TLWE 처리 후 단백질 함량이 변화하는 것을 확인할 수 있었다. P-p38은 TLWE를 처리하였을 때  $\alpha$ -MSH 단독 처리군에 비해 감소하였으나, 농도 의존적인 변화는 나타내지 않았다. P-JNK와 P-ERK는  $\alpha$ -MSH를 처리하였을 때 증가하였으나, TLWE를 동시에 처리하였을 때 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

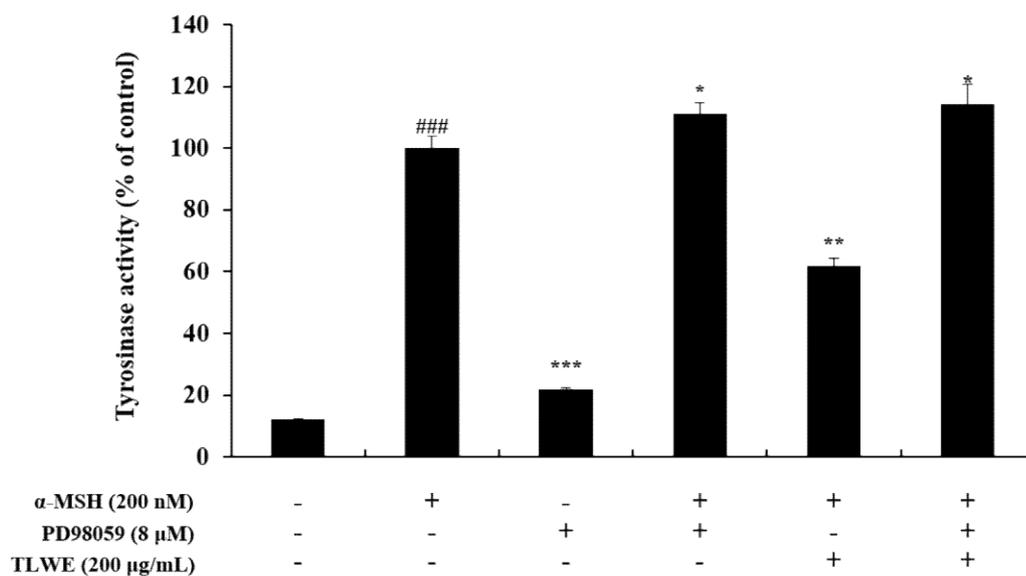
이러한 결과는 P-p38과 P-JNK가 감소하는 일반적인 멜라닌 생성 저해 메커니즘과 일치하며, P-ERK는 일반적인 경향과 다른 결과를 나타냈다. 따라서 정확한 신호 전달 경로를 알아보기 위하여 ERK의 인산화 저해제(PD98059)를 처리하여 tyrosinase activity를 확인하였다(**Figure 14**).

ERK 인산화 저해제(PD98059)는 단독으로 처리하였을 때와  $\alpha$ -MSH와 동시에 처리하였을 때 tyrosinase 활성을 증가시켰다.  $\alpha$ -MSH로 자극시킨 세포에 TLWE를 처리하였을 때 TLWE의 영향으로 활성이 감소하였으며, 저해제를 동시에 처리하자 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 TLWE가 ERK 신호전달경로의 영향을 받으며, ERK의 인산화를 저해함으로써 멜라닌 생성을 증가시킴을 나타낸다. 그럼에도 불구하고 TLWE가 나타내는 미백 효과는 p38과 JNK 인산화의 영향과, 아직 밝혀지지 않은 또다른 경로로 인해 나타나는 것으로 예상된다.



**Figure 13. Effects of TLWE on MAPKs and  $\beta$ -actin expression in B16F10 cells.**

The cells were treated with TLWE (50, 100, 200  $\mu$ g/mL) for 15 min.  $\alpha$ -MSH (200 nM) was used as the negative control. (a) Protein levels were determined by western blotting. (b) P-p38, (c) P-JNK, (d) P-ERK were expressed as a percentage compared to the value of the  $\beta$ -actin. The data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) at least four independent experiments. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs.  $\alpha$ -MSH, ###  $p < 0.001$  vs. control)



**Figure 14. Effects of TLWE and ERK inhibitor (PD98059) on tyrosinase activity in B16F10 cells.**

The cells were treated with TLWE (200  $\mu$ g/mL) and PD98059 (8  $\mu$ M) for 72 hr.  $\alpha$ -MSH (200 nM) was used as the negative control. Tyrosinase activity is expressed as a percentage compared to the untreated control. The data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) at least four independent experiments. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs.  $\alpha$ -MSH, ###  $p < 0.001$  vs. control)

#### 2.4.4. cAMP 신호전달 경로에 대한 TLWE의 영향

TLWE가 또다른 멜라닌 생성 신호전달경로인 cAMP 경로의 영향을 받는지 확인하기 위하여, AKT와 PKA 인산화 저해제를 처리하여 tyrosinase 활성을 측정하였다.

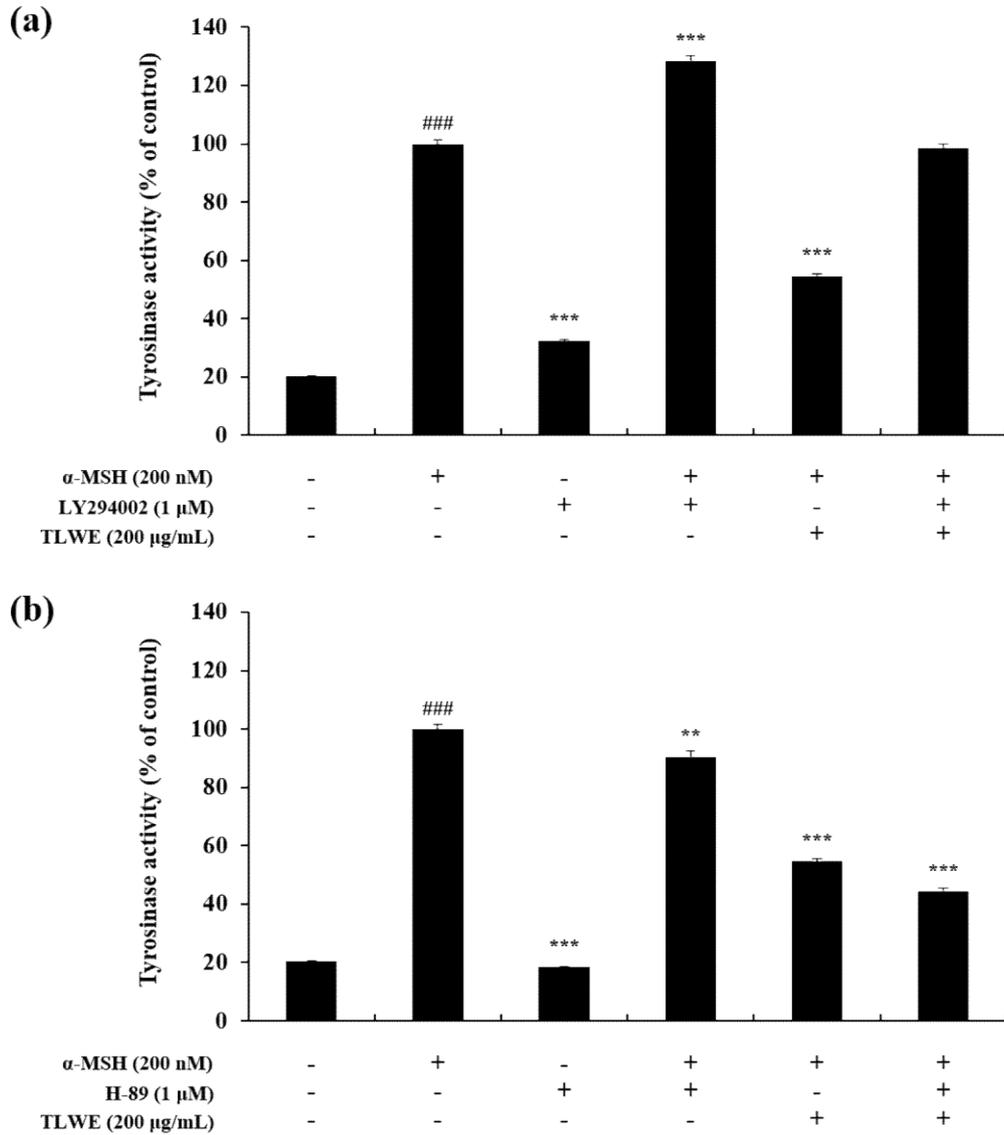
cAMP 신호전달 경로에 속하는 AKT의 인산화는 GSK3 $\beta$ 의 발현을 저해하여 MITF 발현을 억제하고, 결과적으로 멜라닌 생성을 감소시킨다. 또한 인산화된 AKT는 MITF를 인산화하여 멜라닌 생성을 감소시키는 것으로 알려졌다.[7] 따라서 TLWE가 AKT의 인산화에 미치는 영향을 알아보기 위해 AKT 인산화 저해제(LY294002)를 처리하여 tyrosinase activity를 측정하였다. (**Figure 15a**)

AKT 인산화 저해제(LY294002)는 단독으로 처리하였을 때와  $\alpha$ -MSH와 동시에 처리하였을 때 tyrosinase 활성을 증가시켰다.  $\alpha$ -MSH로 자극시킨 세포에 TLWE를 처리하였을 때 TLWE의 영향으로 활성이 감소하였으며, 저해제를 동시에 처리하자 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 TLWE가 AKT의 인산화에 영향을 받을 수 있음을 나타낸다.

PKA의 활성은 CREB를 인산화시켜 MITF의 전사를 유도하고, 멜라닌 생성을 증가시키는 것으로 알려졌다.[5] 따라서 TLWE가 PKA의 인산화에 미치는 영향을 알아보기 위해 PKA 인산화 저해제(H-89)를 처리하여 tyrosinase activity를 측정하였다. (**Figure 15b**)

PKA 인산화 저해제(H-89)는 단독으로 처리하였을 때와  $\alpha$ -MSH와 동시에 처리하였을 때 tyrosinase 활성을 약간 감소시켰다.  $\alpha$ -MSH로 자극시킨 세포에 TLWE를 처리했을 때 TLWE의 영향으로 활성이 감소하였으며, 저해제와 함께 처리하자 tyrosinase 활성이 더욱 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 TLWE가 PKA의 인산화에 영향을 받을 수 있음을 나타낸다.

따라서 TLWE는 AKT와 PKA에 관여하는 cAMP 신호전달 경로를 통하여 멜라닌 생성을 조절하는 것으로 예상된다.



**Figure 15. Effects of TLWE and (a) AKT inhibitor (LY294002), (b) PKA inhibitor (H-89) on tyrosinase activity in B16F10 cells.**

The cells were treated with TLWE (200  $\mu$ g/mL) and (a) LY294002 (1  $\mu$ M), (b) H-89 (1  $\mu$ M) for 72 hr.  $\alpha$ -MSH (200 nM) was used as the negative control. Tyrosinase activity is expressed as a percentage compared to the untreated control. The data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) at least four independent experiments. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs.  $\alpha$ -MSH, ###  $p < 0.001$  vs. control)

### 3. HPLC를 이용한 비자 잎 열수추출물(TLWE)의 지표 성분 분석

HPLC를 통한 지표 성분 분석은 추출물 내 활성성분 확인을 위해 사용할 수 있는 방법이다. 이전 연구에서 비자 잎 추출물의 구성 성분으로 밝혀진 catechin과 [27], 식물에서 일반적으로 발견되는 페놀 화합물인 *p*-coumaric acid[3]를 표준물질로 사용하여 HPLC 분석을 진행하였다.

Catechin은 잘 알려진 플라보노이드 중 하나이며, 자연적으로 다양한 과일, 녹차, 적포도주 등에 분포되어 있다. catechin 유도체는 항산화, 항염증과 같은 광범위한 생물학적 효능을 가지고 있으며[28], B16F10 세포에서 멜라닌 생성 관련 효소인 Tyrosinase 발현을 억제하여 미백 효능을 나타내는 것으로 밝혀졌다[29]. *p*-coumaric acid는 자연계에서 가장 풍부한 이성질체이다. L-tyrosine 과 구조적으로 매우 유사하며, (Figure 16)  $\alpha$ -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 L-tyrosine과 경쟁적으로 작용하여 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 보고되었다 [30].

HPLC 분석 결과, TLWE (50 mg/mL) 에서 지표물질로 사용된 catechin (299.84  $\mu$ g/mL)과 *p*-coumaric acid (4.85  $\mu$ g/mL)가 검출되었다. (Figure 17) 따라서 TLWE의 멜라닌 생성 저해 활성은 이러한 미백 활성을 나타내는 물질들을 함유하기 때문으로 사료된다.

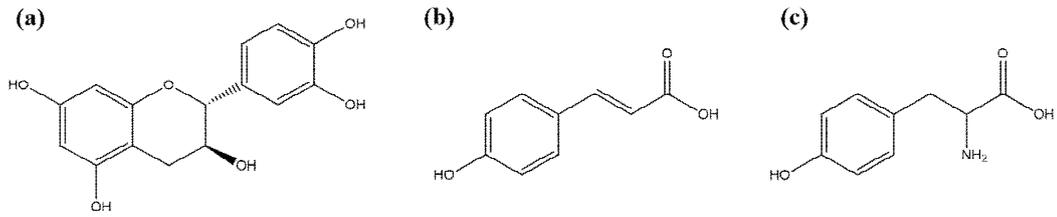


Figure 16. Structures of (a) catechin, (b) *p*-coumaric acid, (c) L-tyrosine.

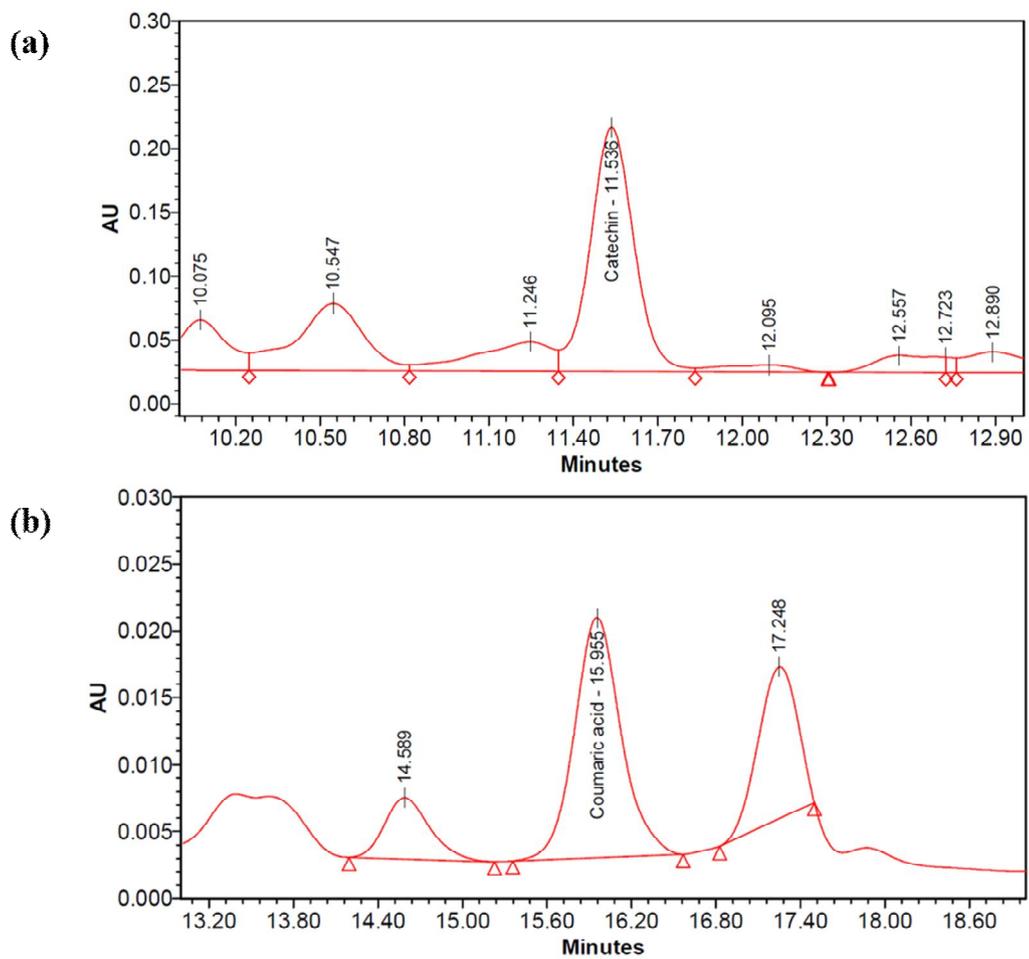


Figure 17. HPLC chromatogram of TWLE. (a) catechin, (b) *p*-coumaric acid.

## 4. 안전성 평가시험

### 4.1. 중금속 검사 결과

도양에서 검출될 수 있는 유독성 중금속인 납, 비소, 수은에 대한 검사를 진행하였다. 2019년 4월 개정된 <화장품 안전기준 등에 관한 규정(식품의약품안전처 고시 제2019-27호)>에 따르면, 해당 물질의 검출 허용 한도는 다음과 같다.

납 : 점토를 원료로 사용한 분말제품은 50  $\mu\text{g/g}$ 이하, 그 밖의 제품은 20  $\mu\text{g/g}$ 이하

비소 : 10  $\mu\text{g/g}$ 이하

수은 : 1  $\mu\text{g/g}$ 이하

식품공전 제8.9.1.2와 제8.9.1.4에 의거한 시험결과 납과 비소는 불검출 되었으며, 식품공전 제8.9.1.6에 의거한 시험결과 수은은 0.00 mg/mL가 검출되어 검출 허용 한도를 넘지 않는 것으로 나타났다.

## 4.2. 피부 첩포 안전성 평가시험 결과

(주)대한피부과학연구소에 의뢰하여 TLWE의 24시간 피부 첩포를 통한 안전성 평가시험을 진행하였다. (시험번호 KDRI-2018-552-Q1, IRB 승인번호 KDRI-IRB-18552) 시험은 2018년 11월 20일부터 3일간 진행되었다. 선정 기준에 부합하는 피험자 30명을 선정하여 피험자의 등에 15  $\mu$ L의 TLWE를 24시간 첩포하였다. 첩포를 제거하고 30분, 24시간, 48시간 경과 후 관찰하여 국제접촉피부염학회(ICDRG) 및 미국화장품협회(PCPC) 기준을 응용한 자체기준에 의거하여 평가하였다. TLWE는 이전 실험에서 사용된 200  $\mu$ g/mL보다 높은 농도인 800  $\mu$ g/mL에서 피부자극 지수 0.011점을 얻어 무자극 물질로 판단되었다.

**Table 6. Subjects Information.**

NO.	ID	Gender	Age	NO.	ID	Gender	Age
1	J3147	female	20	16	J3298	male	23
2	J3295	female	20	17	J3153	male	24
3	J2387	female	20	18	J3098	female	24
4	J3150	female	20	19	J3207	female	25
5	J2332	female	21	20	J3009	female	25
6	J3176	female	21	21	J3297	female	26
7	J3178	female	21	22	J2473	female	28
8	J2448	female	21	23	J3156	female	34
9	J3087	male	21	24	J2350	female	37
10	J3138	female	21	25	J3157	female	37
11	J3082	female	22	26	J2362	female	38
12	J3060	female	22	27	J2659	female	39
13	J3296	female	22	28	J2904	female	40
14	J3203	male	23	29	J2660	female	40
15	J2280	male	23	30	J3103	female	44

Table 7. Test results.

No.	2018-552-00-Q1-L			BLANK		
	24h*	Reaction		24h*	Reaction	
		48h	72h		48h	72h
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0.5	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0.5	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
13	0.5	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0.5	0	0
21	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0
자극 지수	0.011			0.011		
판정	무자극			-		

## IV. 고찰

보다 안전한 천연 원료에 대한 소비자들의 선호가 증가하고 있으며, 최근 인체에 무해한 천연 화장품 원료를 찾기 위한 연구가 계속되고 있다. 본 논문에서는 항산화 효능이 우수하며 아직 멜라닌 생성과 관련된 효능이 보고되지 않은 비자외열추출물(TLWE)에 주목하여 연구를 진행하였다.

B16F10 세포주는 human melanocytes와 대부분의 melanogenic 메커니즘을 공유하면서, 체외에서 배양하는 것이 상대적으로 쉽기 때문에 실험에 사용되었다.[3] B16F10 세포에 TLWE (50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리하여 독성이 나타나는 범위를 확인하였고, 82 %의 세포생존율을 나타낸 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 농도를 사용하여 후속 실험을 진행하였다.

$\alpha$ -MSH로 자극된 세포에 TLWE를 처리하여 멜라닌 생성과 tyrosinase 발현과 활성화에 미치는 영향을 확인하였으며, 그 결과 TLWE에 의해 멜라닌 생성량과 tyrosinase 활성이 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. 동시에 실험한 70 % EtOH 추출물(70 % EtOH Ext.)과 EtOAc 분획물(EtOAc Fr.)이 유의한 변화를 나타내지 않은 것과 비교하여 더 우수한 미백 활성을 나타내었다. 따라서, TLWE로 추가 분석을 진행하여 멜라닌 생성 억제 기전을 확인하였다.

Western blot 결과 TLWE는 멜라닌 생성 관련 효소들인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질의 발현을 저해하였으며, 이들의 상위 조절 인자인 MITF의 발현 또한 농도 의존적으로 저해하였다. MITF의 조절에 관여하는 MAPKs의 발현을 확인하였다. TLWE는 P-p38, P-JNK, P-ERK를 모두 감소시키는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 결과만으로는 작용 기전을 확신할 수 없으므로, 좀 더 정확한 신호 전달 경로를 확인하기 inhibitor를 처리하여 tyrosinase activity를 진행하였다.

그 결과 TLWE가 ERK 신호전달경로의 영향을 받으며, ERK의 인산화를 저해함으로써 멜라닌 생성을 증가시키는 것을 확인하였다. 그럼에도 불구하고 TLWE가 나타내는 미백 효과는 p38과 JNK 인산화의 영향과, 아직 밝혀지지 않은 또다른 경로로 인해 나타나는 것으로 예상된다.

TLWE가 또다른 멜라닌 신호전달경로인 cAMP 경로의 영향을 받는지 확인하기 위해서, AKT와 PKA 저해제를 처리하여 tyrosinase 활성을 측정하였다. TLWE가 AKT와 PKA의 인산화에 영향을 받는 것으로 나타났으며 따라서 TLWE는 AKT와 PKA에 관여하는 cAMP 신호전달 경로를 통하여 멜라닌 생성을 조절하는 것으로 예상된다.

추출물 내에서 활성 작용을 일으키는 성분을 알아보기 위하여 HPLC 분석을 진행하였다. 미백 활성이 보고된 지표물질 2개(catechin, *p*-coumaric acid)를 선정하여 함량을 측정하였다. 그 결과 TLWE (50 mg/mL)의 catechin과 *p*-coumaric acid의 함량은 각각 299.83  $\mu\text{g/mL}$ 와 4.85  $\mu\text{g/mL}$ 로, TLWE에 함유된 이러한 활성성분들이 멜라닌 생성 저해에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

제주대학교 생명과학기술혁신센터(RIC)에 의뢰하여 진행된 중금속 검사 결과, 납과 비소는 불검출되었으며 수은은 0.00 mg/mL가 검출되어 검출 허용한도를 넘지 않는 것으로 나타났다. (주)대한피부과학연구소에 의뢰하여 진행된 피부 철포 안전성 평가시험 결과 세포실험에 사용된 200  $\mu\text{g/mL}$ 보다 4배 높은 농도인 800  $\mu\text{g/mL}$ 에서도 부작용이 없는 무자극 물질로 판단되었다. 따라서 TLWE는 인체에 안전한 천연원료라고 할 수 있을 것이다.

결과적으로 TLWE는 뛰어난 항산화 효능을 가지고 있으며, B16F10 멜라노마 세포에서 MAPKs와 MITF를 조절하여 멜라닌 생성 효소들을 감소시킴으로써 멜라닌 생성을 억제하였다. 이러한 결과를 바탕으로, TLWE는 잠재적인 미백기능성원료로 활용될 수 있을 것임을 제안한다.

## V. 참고 문헌

1. Lee, E., et al., *Inhibitory Activities of Extracts from Hypericum ascyron L. on Biological Enzymes*. Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition, 2018.
2. Kim, D.-S., et al., *Effects of lysophosphatidic acid on melanogenesis*. Chemistry and physics of lipids, 2004. **127**(2): p. 199-206.
3. An, S.M., et al., *p-Coumaric acid, a constituent of Sasa quelpaertensis Nakai, inhibits cellular melanogenesis stimulated by alpha-melanocyte stimulating hormone*. Br J Dermatol, 2008. **159**(2): p. 292-9.
4. Vachtenheim, J. and J. Borovanský, *"Transcription physiology" of pigment formation in melanocytes: central role of MITF*. Experimental dermatology, 2010. **19**(7): p. 617-627.
5. Jian, D., et al., *Diethylstilbestrol enhances melanogenesis via cAMP-PKA-mediated up-regulation of tyrosinase and MITF in mouse B16 melanoma cells*. Steroids, 2011. **76**(12): p. 1297-1304.
6. Wu, L.-C., et al., *Antimelanogenic effect of c-phycoerythrin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways*. Journal of biomedical science, 2011. **18**(1): p. 74.
7. Jang, J.Y., et al., *Partially purified components of Nardostachys chinensis suppress melanin synthesis through ERK and Akt signaling pathway with cAMP down-regulation in B16F10 cells*. Journal of ethnopharmacology, 2011. **137**(3): p. 1207-1214.
8. Sun, M., et al., *G protein-coupled estrogen receptor enhances melanogenesis via cAMP-protein kinase (PKA) by upregulating microphthalmia-related transcription factor-tyrosinase in melanoma*.

- The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2017. **165**: p. 236-246.
9. Bentley, N., T. Eisen, and C. Goding, *Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator*. Molecular and Cellular Biology, 1994. **14**(12): p. 7996-8006.
  10. Lee, A., et al., *The Inhibition of Melanogenesis Via the PKA and ERK Signaling Pathways by Chlamydomonas reinhardtii Extract in B16F10 Melanoma Cells and Artificial Human Skin Equivalents*. Journal of microbiology and biotechnology, 2018. **28**(12): p. 2121-2132.
  11. Kang, S., et al., *Inhibitory effect of dried pomegranate concentration powder on melanogenesis in B16F10 melanoma cells; involvement of p38 and PKA signaling pathways*. International journal of molecular sciences, 2015. **16**(10): p. 24219-24242.
  12. Han, J.S., J.H. Sung, and S.K. Lee, *Antimelanogenesis Activity of Hydrolyzed Ginseng Extract (GINST) via Inhibition of JNK Mitogen activated Protein Kinase in B16F10 Cells*. Journal of food science, 2016. **81**(8): p. H2085-H2092.
  13. Kim, K.-N., et al., *Octaphloretol A isolated from Ishige foliacea inhibits  $\alpha$ -MSH-stimulated induced melanogenesis via ERK pathway in B16F10 melanoma cells*. Food and chemical toxicology, 2013. **59**: p. 521-526.
  14. Lee, S.-I., et al., *The Antioxidant Activities and Neuroprotective Effects of Hot Water Extracts from Torreya Semen*. The Korea Journal of Herbology, 2017. **32**(6): p. 41-48.
  15. Jeon, H.-S., Y.-S. Lee, and N.-W. Kim, *The antioxidative activities of Torreya nucifera seed extracts*. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 2009. **38**(1): p. 1-8.
  16. Kim, S.B., B.W. Kim, and S.K. Hyun, *Comparison of antioxidant*

- activities and effective compounds in Korean and Chinese Torreya seeds.* Korean Journal of Food Science and Technology, 2018. **50**(3): p. 274-279.
17. Rhim, T.-J. and M.-Y. Choi, *Antimicrobial Effects on Food-Borne Pathogens and the Antioxidant Activity of Torreya Nucifera Extract.* The Korean Journal of Community Living Science, 2015. **26**(4): p. 697-705.
  18. Blois, M.S., *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.* Nature, 1958. **181**(4617): p. 1199.
  19. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.* Free radical biology and medicine, 1999. **26**(9-10): p. 1231-1237.
  20. Gottumukkala, R.V., et al., *Determination of Catechin and Epicatechin content in chocolates by high-performance liquid chromatography.* International scholarly research notices, 2014. **2014**.
  21. Karthikeyan, R., C. Devadasu, and P. Srinivasa Babu, *Isolation, characterization, and RP-HPLC estimation of P-coumaric acid from methanolic extract of durva grass (Cynodon dactylon Linn.)(Pers.).* International journal of analytical chemistry, 2015. **2015**.
  22. Kim, H.-H., et al., *Anti-oxidant and Anti-inflammation Activity of Fractions from Aster glehni Fr. Schm.* Microbiology and Biotechnology Letters, 2010. **38**(4): p. 434-441.
  23. 강종석, *제주 자생 뱀딸기 추출물의 기능성 화장품 소재화 연구.* 2017, 제주대학교 일반대학원: 제주.
  24. Yu, L., et al., *Free radical scavenging properties of wheat extracts.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(6): p. 1619-1624.
  25. Floegel, A., et al., *Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods.* Journal of food composition and analysis, 2011. **24**(7): p. 1043-1048.

26. Kim, J.-B., et al., *Antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibitory activity of ark shell (scapharca broughtonii)*. Korean journal of food and cookery science, 2014. **30**(2): p. 212-218.
27. Kim, J., et al., *Chemical constituents from needles of Torreya nucifera*. Planta Medica, 2010. **76**(12): p. P383.
28. Kim, T., et al., *Potential alpha-glucosidase inhibitors from thermal transformation of (+)-catechin*. Bioorg Med Chem Lett, 2014. **24**(6): p. 1621-4.
29. Sato, K. and M. Toriyama, *Depigmenting effect of catechins*. Molecules, 2009. **14**(11): p. 4425-32.
30. An, S.M., J.S. Koh, and Y.C. Boo, *p coumaric acid not only inhibits human tyrosinase activity in vitro but also melanogenesis in cells exposed to UVB*. Phytotherapy Research, 2010. **24**(8): p. 1175-1180.