

홍조류 새발(*Acanthopeltis japonica*) 추출물의 생리 활성에 관한 연구

윤훈석^{1,2}, 최수연³, 황준호³, 장미경³, 고희철², 고수연², 박지권², 정완석², 김세재^{2,3*}

¹고려대학교 생명공학원

²제주대학교 생명과학기술혁신센터

³제주대학교 생명과학과

요 약

본 연구에서는 제주도 연안에 서식하는 해조류 중 홍조류의 일종인 새발 추출물의 생리활성을 분석하였다. 새발의 100% 에탄올 조추출물, 70% 에탄올 조추출물 그리고 100℃ 열수 추출물 등의 3종류의 시료를 준비하여 DPPH에 의한 전자공여능 측정, 폴리페놀 함량 측정과 세포독성 등의 생리활성을 측정하였다. 그 결과, 3종류의 새발 조추출물의 폴리페놀 함량은 1.3~2.0% 사이였고, DPPH 라디칼 소거능은 IC₅₀값이 2,000 µg/ml 이상이었으며, 세포독성은 관찰되지 않았다. 그리고 murine macrophage 세포주인 RAW 264.7 세포에서 lipopolysaccharide 자극에 의해 유도된 nitric oxide(NO)의 생성억제 효과를 측정한 결과, 3종류의 새발 조추출물에 의해 농도 의존적으로 NO의 생성량이 현저히 저해되었고, inducible NO synthase (iNOS) 단백질 발현도 저해되었다. 그리고 alpha-MSH에 의해 유도된 B16/F10 murine melanoma cells에서 멜라닌 생합성 관련 효소의 발현에 미치는 영향을 알아본 결과, tyrosinase와 tyrosinase related protein 1을 저해하는 쪽으로 인산화된 ERK 1/2의 발현이 조절되는 것으로 확인되었다. 본 연구결과로 미루어 볼때 새발 조추출물이 폴리히드록시 페놀화합물이 갖는 세포독성과 항산화 활성을 갖는 화합물이 화장품 제형에 들어갔을 때의 불안정성, 변색, 변취 등의 문제를 줄일 수 있을 것이라 사료되며, 멜라닌 생성을 유발할 수 있는 NO의 생성억제와 멜라닌 생합성에 필수적인 효소인 tyrosinase의 저해활성이 뛰어난 것으로 분석되었다. 따라서 홍조류인 새발(*Acanthopeltis japonica*)의 조추출물은 항염증 효과와 관련된 미백 기능성 화장품 원료로서의 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

서 론

피부 색소 형성은 자외선이나 신호전달물

질 등의 외부적 또는 내부적 요인들에 의해 멜라닌 생성이 증가되면서 일어난다. 기미와 주근깨 같은 과색소 질환은 이들 멜라닌 생

성 및 분포가 증가되면서 나타나는 질환이다. 피부 색소를 증가시키는 대표적 인자인 자외선은 피부색소형성에 관여하는 확실한 인자이지만 그 경로는 명확하게 밝혀져 있지 않다. 자외선에 의한 피부색소 증가는 주로 각질형성세포(keratinocyte)에서 분비되는 인자들에 기인한다. 이러한 자극을 받은 각질형성세포가 분비하는 인자들로는 endothelin-1 (ET-1), α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), nitric oxide(NO)등이 있다. ET-1의 경우 멜라노사이트의 protein kinase C(PKC) 경로와 cAMP 경로를 통해 피부 색소형성을 촉진시킨다(Imokawa 등 1997; Thody와 Graham 1998). α -MSH의 전구체인 proopiomelanocortin(POMC)도 α -MSH와 같이 멜라노사이트에 있는 melanocortin-1 (MC-1) 수용체에 결합하여 cAMP 활성을 증가시켜 멜라닌 생성을 촉진시키고, NO는 cGMP경로를 통해 멜라닌 생성을 증가시킨다(Im 등 1998; Romero-Graillet 등 1997). 이밖에도 각질형성세포에서 분비되는 멜라닌 생성 촉진인자는 basic fibroblast growth factor(bFGF), stem cell factor(SCF)등이 있다(Gilchrest 등 1996; Grabbe 등 1994). 그러나 이들 인자들이 *in vitro*에서 자외선효과를 완벽히 재현해낼 수는 없다. 그러므로 피부색소조절을 위해서는 세포배양 환경에서 자외선의 효과를 그대로 재현하여 이 작용을 차단할 수 있는 시스템 확립이 필요하다.

피부색소를 형성하는 멜라닌은 세포내 물질인 티로신이 티로시나제 효소에 의해 도파, 도파퀴논으로 전환되고 이후 티로시나제 관련 단백질인 tyrosine related protein 2 (TRP-2; dopachrome tautomerase)와

TRP-1(5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase)의 작용과 자동화 과정을 통해 멜라닌이 형성된다(Hearing 1998).

멜라노사이트에 의해 만들어진 멜라닌은 멜라닌소체 형태로 멜라노사이트의 수상돌기를 따라 각질형성세포로 분비된다. 멜라닌소체는 4단계에 걸쳐 만들어지는데, 첫 번째 단계는 smooth endoplasmic reticulum에서 만들어진 premelanosome과 멜라닌 형성과정에 참여하는 티로시나제와 TRP-2 그리고 TRP-1을 포함하는 coated vesicle들이 fusion된다. Fusion된 vesicle이 trans-Golgi network를 지나면서 멜라닌이 만들어진다. 색소가 형성된 멜라닌소체는 수상돌기를 따라 바깥쪽으로 이동하여 최종적으로 주위에 있는 각질형성세포에 분비된다(Orlow 등 1998). 피부염증이 일어난 후 피부에 주로 과색소형성이 되나 반대로 희게 되는 경우도 있다. 자외선이나 세균감염 때 생긴 염증에 의해 얼굴이 검어지거나 감수성이 있는 사람은 기미와 잡티가 발생하기도 한다. 이 때 피부에 존재하는 세포인 림프구, 대식세포, 내피세포, 섬유아세포 등 염증반응에 관련하는 세포들이 관련하는데 이 세포들은 염증매개물질을 분비시켜 멜라노사이트에서의 멜라닌 생성을 유도한다.

염증반응 매개물질은 피부 색소 형성을 촉진시킨다고 알려져 있다. 아라키돈산 대사물과 히스타민을 첨가하여 멜라노사이트를 배양하면 티로시나제의 활성이 증가하고 멜라노사이트의 성장과 증식이 촉진된다(Tomita 등 1989; 1992; Morelli 등 1989). 항염증제인 corticosteroid나 indomethacin을 피부에 도포하면 자외선에 의해 유발된 홍반이 호전됨과 동시에 피부의 과색소 침착이 억제된다

(Takiwaki 등 1994).

염증매개물질인 활성산소 역시 피부색소형성을 촉진시키며, 토코페롤이나 아스코르브산과 같은 항산화제에 의해 이들 색소침착이 억제된다(Joshi 등 1987; Tobin과 Thody 1994; Funasaka와 Chakraborty 1998).

본 연구에서는 제주도의 연안 조간대 부근에서 채집한 새발(*Acanthopeltis japonica*)의 조추출물의 항산화효과 및 항염증효과 그리고 피부색소형성과정에 미치는 효과를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 준비

새발 (*Acanthopeltis japonica*)은 2005년 5월 제주도 연안의 조간대 부근에서 채집하여 실험실로 운반한 뒤 흐르는 수돗물로 수세하여 염분을 제거하고, 건조한 후 미세하게 분쇄하여 -18 °C의 냉동고에 보관하였다. 보관된 새발 100 g을 각각 100% 에탄올과 70% 에탄올 1 L에 48시간 상온에서 교반하여 추출한 후 여과하였고, 여과액은 회전농축기로 농축하였다. 열수추출물은 파쇄된 새발 100 g에 증류수 1 L를 가한 후 100 °C에서 2시간 동안 가온하고 여과한 후 여과액을 회전농축기로 농축하였다.

2. 폴리페놀 화합물의 함량분석

폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법 (Gutfinger 등 1976)을 약간 변형시켜 측정하였다. 즉, 새발 조추출물을 1 mg/mL에 녹

인 다음 0.2 mL를 시험관에 취하고 증류수를 가하여 2 mL로 만든 후, 여기에 0.2 mL Folin-ciocalteu's phenol reagent (Sigma)를 첨가하여 잘 혼합한 후 3분간 실온에 방치하였다. 3분후 2 M Na₂CO₃용액 (Sigma) 0.4 mL를 가하여 혼합하고 증류수를 첨가하여 4 mL로 만들었다. 그 후 실온에서 1시간 방치하여 상정액을 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tannic acid (Aldrich)를 이용한 표준곡선은 tannic acid 1 mg을 50% 메탄올 용액 1 mL에 녹이고 최종농도가 0, 32.5, 75, 125, 250 및 500 µg/mL용액이 되도록 취하여 위와 같은 방법으로 725 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

3. 전자공여능 측정

DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) radical 소거활성 효과는 Blois의 방법 (Blois 1955)을 변형하여 수행하였다. 2 mg/mL의 추출물과 항산화제인 butyl hydroxyanisole (BHA)와 Trolox를 대조군으로 사용하여 96 well에 100 µL를 넣고 0.4 mM DPPH 100 µL를 첨가하여 혼합한 다음 실온의 암실에서 30분간 방치한 후, microplate reader로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거율 측정은 다음과 같이 electron donation activity(EDA, %)로 구하여 계산하였다.

$$\text{전자공여능 (\%)} = (\text{Sample-Blank/Blank}) \times 100$$

4. 세포독성 측정

세포독성 측정은 lactate dehydrogenase (LDH) 분석법과 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,

5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 분석법 (Loo와 Rillema 1998)을 병행하여 사용하였다. LDH는 대부분의 세포에 존재하는 효소로서 원형질막이 손상을 입으면 세포배양액으로 방출된다. 따라서 손상을 입은 세포가 방출하는 LDH activity를 측정하는 간편하고 간단한 colorimetric assay 방법이다. 본 실험에서는 RAW 264.7 세포를 1.0×10^5 cells/mL의 농도로 48 well plate의 각 well에 넣고 24시간 동안 배양한 후, 시료를 농도별로 첨가하여 세포배양이 끝난 후 LDH의 유출정도를 측정하여 세포의 손상정도를 평가하였다. LDH cytotoxicity detection kit (Takara)를 사용하여 492 nm에서 activity를 측정하였다.

역시, 세포배양 후 배양액을 제거하고 MTT 100 μ g을 첨가하고 4시간 동안 더 배양하였다. 배지를 제거한 다음, dimethylsulfoxide (Sigma) 150 μ L를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조군의 흡광도 값과 비교하여 성장억제정도를 조사하였다.

5. NO 생성 억제를 측정

RAW 264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1.0×10^5 cells/mL로 조절한 후 48 well plate에 접종하고, 시험물질과 LPS (100 ng/mL)를 단독 및 동시처리, IFN- γ (100 U/mL)를 단독 및 동시처리, LPS (100 ng/mL) + IFN- γ (100 U/mL) 동시처리 등의 방법으로 하여 24시간 내지

48시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess [2.5% phosphoric acid (부피/부피) 용액에 1% sulfanilamide(무게/부피)와 0.1% naphylethylenediamine (무게/부피)가 되게 넣은 시약] 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO $_2^-$ 의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 μ L와 Griess시약 100 μ L를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite (NaNO $_2$)를 표준용액으로 비교하였다.

6. 티로시나제 저해활성 측정

티로시나제 저해활성 측정은 버섯 티로시나제 저해활성 측정과 B16/F10 melanoma 세포내 티로시나제 활성 측정을 통하여 분석하였다. 우선, 버섯 티로시나제 저해활성 측정은 티로시나제의 작용결과 생성되는 DOPA chrome을 비색법(Pomerantz 1966)에 의해 측정하였다. 기질로서 1.5 mM L-tyrosine 5 μ L, 25 mM L-DOPA 40 μ L, 67 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8) 80 μ L 및 시료용액 40 μ L의 혼합액에 버섯티로시나제(Sigma) 80 μ L (60 unit)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 30분간 반응하였다. 반응후 생성된 DOPA chrome을 475 nm의 흡광도로 측정하여 다음 식에 의해 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = (1 - (S_{\text{ABS}} - B_{\text{ABS}} / C_{\text{ABS}})) \times 100$$

* S_{ABS} : 시료 및 기질 그리고 효소가 모두 들어간 상태에서 측정한 흡광도

B_{ABS} : 효소 대신 완충용액이 들어간 상태에서 측정한 흡광도

C_{ABS} : 시료 대신 완충용액이 들어간 상태에서 측정한 흡광도

그 다음으로 세포내 티로시나제 활성 측정 은 생쥐의 melanoma 세포주 중 B16/F10 세포를 6 well plate에 mL당 5×10^4 이 되게 준비한 후, 24 시간동안 37 °C CO₂ 항온기에서 배양하고, 멜라닌 생합성 유도물질인 α -MSH 50 nM을 처리하고 동시에 시료를 13, 25, 50, 100 μ g/mL로 각각 처리하였다. 72시간 동안 37 °C CO₂ 항온기에서 배양하였으며 36시간이 지난 후, 배지교체와 동시에 α -MSH 50 nM과 시료를 다시 처리하였다. 세포를 trypsin EDTA를 이용하여 수확한 후 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride와 1% Triton X-100을 함유한 67 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)를 500 μ L 처리하고 sonication하였으며, 이 상태로 1 시간 동안 얼음에서 보관하였다. 1시간 후, 4 °C 원심분리기에서 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하였으며 상층액을 취하여 세포내 tyrosinase 활성분석에 사용했다. 세포내 tyrosinase 활성분석은 세포내에 존재하는 tyrosinase의 작용결과 생성되는 DOPA chrome을 비색법에 의해 측정했다. 120 μ L의 67 mM Sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 기질로서 5 μ L의 1.5 mM L-tyrosine과 40 μ L의 25 mM L-DOPA를 혼합한 후 위에서 얻은 상층액 100 μ L를 처리하여 37 °C 항온기에서 30분간 반응시켰다. 반응액 중에 생성된 L-DOPA와 DOPA chrome을 475 nm와 490 nm에서 측정하여 멜라닌 합성을 유도한 대조구를 기준으로 하여 상대적인 활성을 나타내었다. 그리고 다음 식에 의해 저해율을 구하였다.

* 저해율 (Inhibition Ratio; %) = 100 - 세포내 티로시나제 활성 (%)

7. 단백질 발현양상 분석

B16/F10 세포(5×10^4 cells/mL)에 새발 추출물을 13~100 μ g/ml의 농도로 처리한 다음 72시간 동안 배양하였다. 배양된 세포는 먼저 배지를 제거하고, 1×PBS 1 mL를 첨가하여 scraper로 수거하여, 4 °C, 2,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 세척하였다. 원심분리하고 상층액을 제거한 후, 100 μ L RIPA buffer (10×RIPA, 0.1 M PMSF, 0.1 M Na₃VO₄, 0.5 M NaF, 5 mg/mL aprotinin, 5 mg/mL leupeptin)를 첨가하여 30분 동안 lysis 시켰으며, 4 °C, 13,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 Bradford 방법을 이용하여 정량하였다. (Bradford 1976). 배양 세포로부터 얻어진 단백질 시료 30 μ g를 10% SDS-PAGE (poly acrylamide gel electrophoresis)로 전기영동으로 분리하고, 전이용액 (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, pH 8.3)을 사용하여 단백질을 polyvinylidene fluoride membrane (Millipore)에 200 mA로 2시간 동안 전이시켰다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TBST (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)용액에서 상온에서 1시간 동안 실시하였다. ERK의 활성화 정도를 검토하기 위한 항체로는 mouse monoclonal anti-p-ERK (Santa-Cruz), tyrosinase의 항체로는 goat polyclonal anti-Tyrosinase (Santa-Cruz), Trp-1의 항체로는 goat polyclonal anti-Trp-1 (Santa-Cruz), Trp-2의 항체로는 rabbit polyclonal anti-Trp-2 (Santa-Cruz), β -actin의 항체로 mouse monoclonal anti- β

-actin (Sigma)을 5% skim milk가 함유된 TBST용액에 희석하여 4℃, 24시간 동안 반응시켰다. TBST 용액으로 세척한 후, 2차 항체로는 Horse Radish peroxidase가 결합된 anti-goat, anti-mouse, anti-rabbit IgG를 5% Skim milk가 함유된 TBST용액에 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, membrane을 TBST로 세 번 세척 후 ECL kit(Amersham Cat. No. RPN2106V2)을 사용하여 1~3분간 반응시킨 후 X-ray 필름으로 현상하였다.

결과 및 고찰

1. 총 폴리페놀 함량 및 DPPH radical 소거활성

새발 조추출물의 폴리페놀 함량 분석결과 70% 에탄올 조추출물 (Aj-E2)이 2.0%로 가장 높았으며, 100% 에탄올 조추출물 (Aj-1)은 1.3% 그리고 100℃ 열수추출물 (Aj-H)

은 1.5%였다. Arbutin의 DPPH radical 소거능은 IC₅₀값이 128 µg/mL인데 비해, 새발 조추출물들의 DPPH 라디칼 소거능은 IC₅₀값이 2,000 µg/mL 이상으로 항산화 활성이 매우 저조하였다 (Fig. 1). 그리고 2,000 µg/mL에서의 DPPH radical 소거능은 Aj-H (23.8%) > Aj-E2 (14.2%) > Aj-E1 (4.2%) 순으로 DPPH radical 소거활성에 의한 항산화 활성은 매우 낮은 것으로 나타났다.

2. RAW 264.7 세포에서의 항염 활성

3종류의 새발 조추출물 모두 500 µg/ml 농도까지는 세포독성을 보이지 않았으며 농도의 의존적으로 NO의 생성을 억제 하였다(Fig. 2). 시료중에서 70% 에탄올 조추출물 (Aj-E2)이 가장 높은 NO 생성 억제활성을 보여주었으며 IC₅₀값은 213.8 µg/ml 이었다 (Fig. 2). 70% 에탄올 추출물(Aj-E2)의 세포독성을 LPS로 자극한 세포와 자극하지 않은 세포 모두에서 LDH법에 의해 측정하였다.

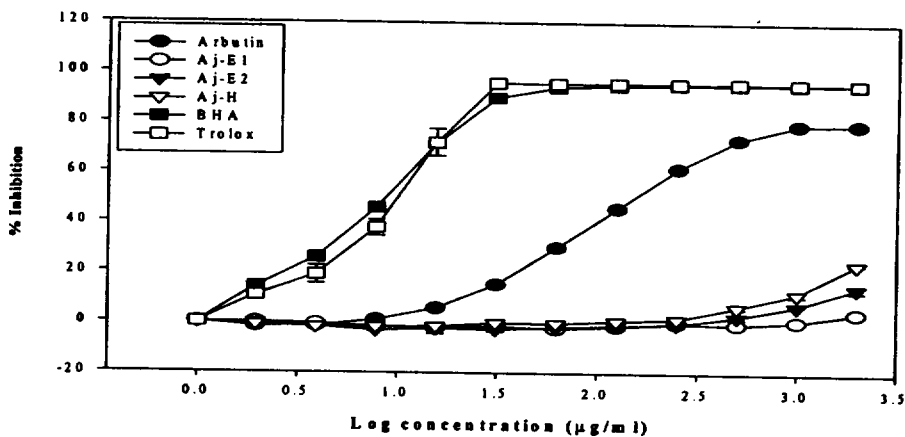


Figure 1. DPPH radical scavenging activity of Arbutin, Aj-E1 (100% ethanol extract of *Acanthopeltis japonica*), Aj-E2 (70% ethanol extract of *Acanthopeltis japonica*), Aj-H(100℃ hot water extracts of *Acanthopeltis japonica*), BHA, Trolox

70% 에탄올 조추출물(Aj-E2)은 500 µg/ml 농도까지는 세포 독성을 보이지 않았으며 이 결과는 MTT 환원법의 결과와 일치하였다. 또한, 70% 에탄올 추출물은 LPS로 자극한 대식세포에서 NO 생성으로 인한 세포사멸을 농도 의존적으로 억제하였다 (Fig. 3). 그리고 70% 에탄올 추출물(Aj-E2)은 IFN- γ 와 LPS를 병행투여한 대식세포의 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하였으며 단백질 발현 분석 결과 iNOS의 발현을 억제하는 효과를 나타냄으로서 iNOS의 발현을 억제함과

동시에 세포사멸도 억제되는 효과를 보여 주었다 (Fig. 4). 이 결과로 알 수 있는 것은, cGMP 경로를 통해 펄라린 생성을 증가시키고 (Im 등 1998; Romero-Graillet 등 1997) 자극을 받은 각질 형성세포가 분비하는 인자들 중 하나인 (Imokawa 등 1997; Thody와 Graham 1998) NO의 생성을 유도한 대식세포에서 70% 에탄올 추출물 (Aj-E2)이 iNOS의 발현을 억제함으로써 NO 생성을 저해하고 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

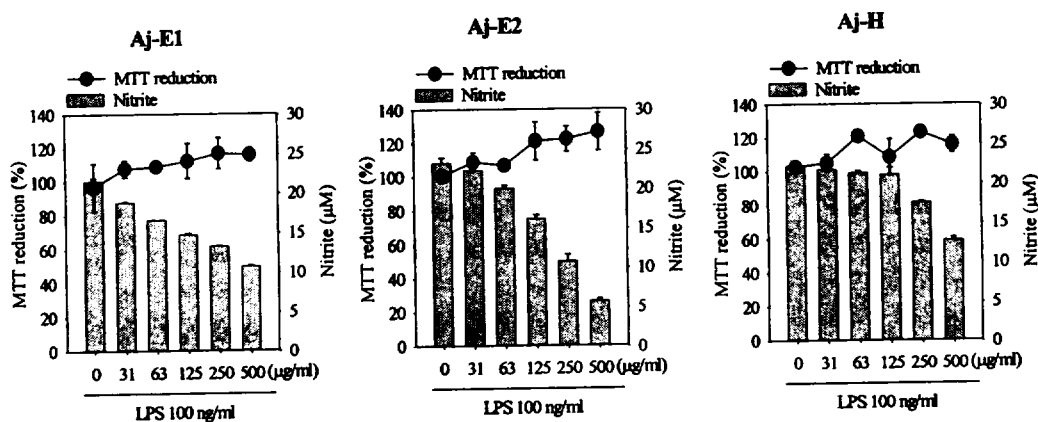


Figure 2. The inhibitory activity of Aj-E1(100% ethanol extract of *Acanthopeltis japonica*), Aj-E2(70% ethanol extract of *Acanthopeltis japonica*), Aj-H(100 °C hot water extract of *Acanthopeltis japonica*) on LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells

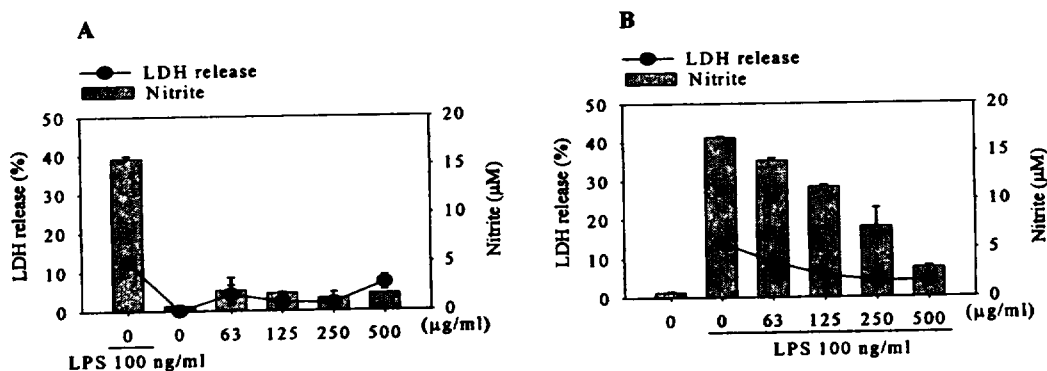


Figure 3. Cell viability and NO production inhibitory activity of Aj-E2 (70% ethanol extract of *Acanthopeltis japonica*) on non-LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells(A) and on LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells(B)

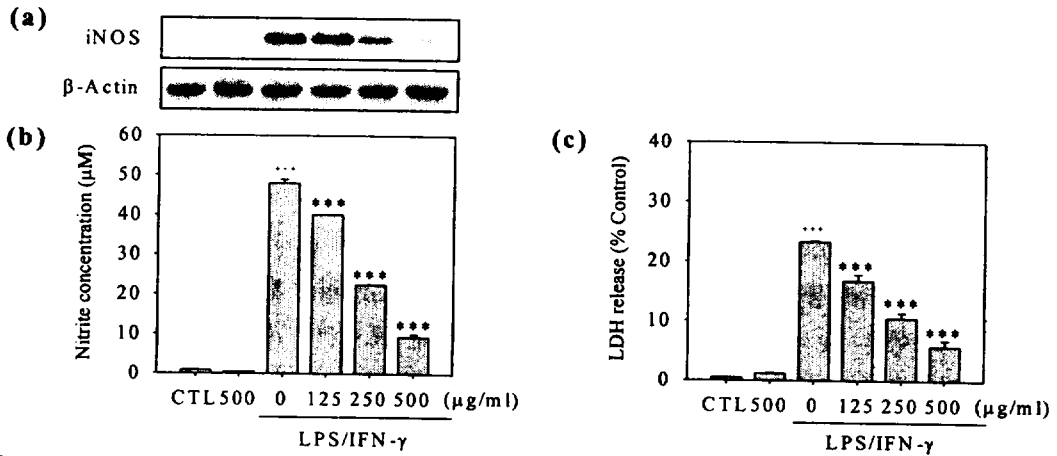


Figure 4. The effect of 70 % ethanol extract of *Acanthopeltis japonica* on NO-mediated cytotoxicity after LPS treatment in RAW 264.7 cells. Cells were incubated with LPS (100 µg/ml) / IFN- γ (100 U/ml) in the presence of 70 % ethanol extracts of *Acanthopeltis japonica*. At 24 h, NO release was determined by Griess reagent (b). iNOS expression was detected by Western blotting (a). Cytotoxicity was determined by LDH release (c). Note that 70 % ethanol extract of *Acanthopeltis japonica* significantly inhibited NO production and iNOS expression and reduced LDH release after LPS/IFN- γ treatment. Values are expressed as mean \pm SD.

+++ $p < 0.0005$ vs. control; *** $p < 0.0005$ vs. LPS/IFN- γ -treated.

3. 미백활성

새발 조추출물의 버섯 티로시나제 저해활성을 분석한 결과, 시료농도 100 µg/mL에서 100 % 에탄올 조추출물 (Aj-E1)은 9.0 %, 70 % 에탄올 조추출물 (Aj-E2)은 22.9 %, 100 °C 열수추출물 (Aj-H)은 저해활성을 나타내지 않았다. 버섯 티로시나제 저해활성은 Aj-E2 > Aj-E1 > Aj-H 순이었으며 전반적으로 이들의 저해활성은 매우 미약하였다. 이는 3종류의 새발 조추출물이 티로시나제 특이적인 저해활성을 나타내지 않고 있음을 의미하는 분석결과이다. 이에 따라 새발 조추출물 시료를 13-100 µg/mL 시료농도로 α -MSH 50 nM로 멜라닌 생합성과정을 촉진시켜준 B16/F10 멜라노마 세포주에 처리하여 세포내 티로시나제 저해활성을 분석하였다

(Fig. 5). 각 시료를 100 µg/mL 농도처리했을 때 arbutin의 세포내 티로시나제 저해활성이 47.4 %인데 반해, Aj-E1은 79.4 %, Aj-E2는 86.8 %, Aj-H는 67.1 %로 3종류의 조추출물 모두 arbutin보다 세포내 티로시나제 저해활성이 양호한 결과를 얻을 수 있었다. 그리고 이를 α -MSH로 유도하지 않은 상태에서 세포내 티로시나제 저해활성을 분석해본 결과 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교했을 때 농도 의존적으로 세포내 티로시나제 저해활성이 나타나는 경향을 보여주었다. 이를 100 µg/mL 농도에서 세포내 티로시나제 저해활성을 비교해 보면 Aj-E1은 61.1 %, Aj-E2는 65.4 % 그리고 Aj-H는 34.0 %로 나타났다 (Fig. 6). 이는 melanotropic agent에 의해 유도되어진 세포내 티로시나제 활성 뿐만이 아

니라 유도되어지지 않은 세포내 티로시나제 활성도 저해하고 있음을 반영하는 것으로 사료된다.

새발의 70% 에탄올 추출물이 피부색소 형성에 관여하는 단백질 발현양상에 미치는 영향을 Western blot으로 분석하였다(Fig. 7). 새발 추출물은 유멜라닌(eumelanin) 생

성에 직접적인 영향을 미치는 것으로 보고된 티로시나제와 Trp-1 (DHICA oxidase)이라는 두가지 효소발현을 모두 저해하였다(Fig. 7). 이러한 결과는 새발추출물이 ERK 1/2의 활성화를 일정수준 이하로 저해하면서 멜라닌 생합성에 직접적으로 관여하는 효소인 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 저해

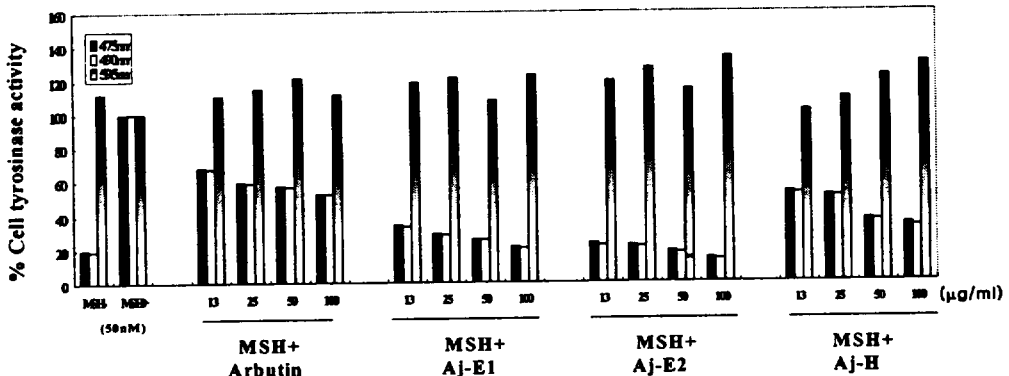


Figure 5. Assay of cell tyrosinase activity of murine B16/F10 melanoma cell line after a treatment of the Aj-E1(100% ethanol extract of *A. japonica*), Aj-E2(70% ethanol extract of *A. japonica*), Aj-H(100 °C hot water extract of *A. japonica*) in induction state of α -MSH. B16/F10 melanoma cells were cultured for 72hrs. When it passed for 36hrs, α -MSH induction media were exchanged and samples were retreated for the same manner.

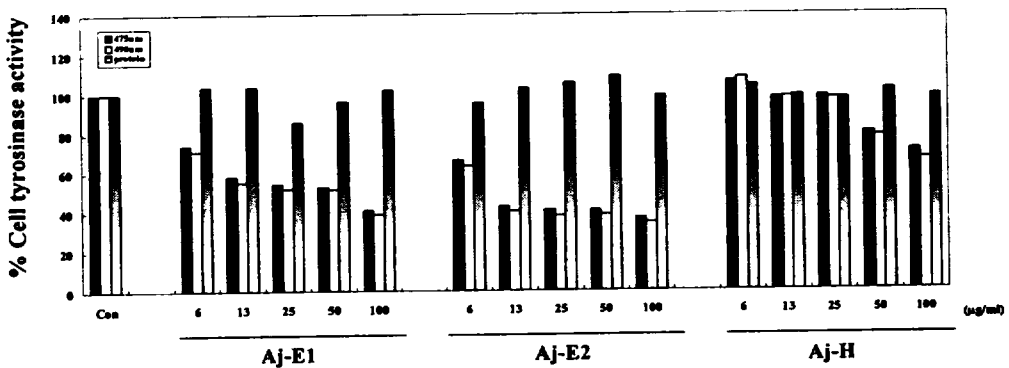


Figure 6. Assay of Cell tyrosinase activity of B16/F10 melanoma cell line after treatment of the Aj-E1(100% ethanol extract of *A. japonica*), Aj-E2(70% ethanol extract of *A. japonica*), Aj-H(100 °C hot water extract of *A. japonica*) in non-induction state of α -melanocyte stimulating hormone. B16/F10 melanoma cells were cultured for 72hrs. When it passed for 36hrs, media were exchanged and samples were retreated.

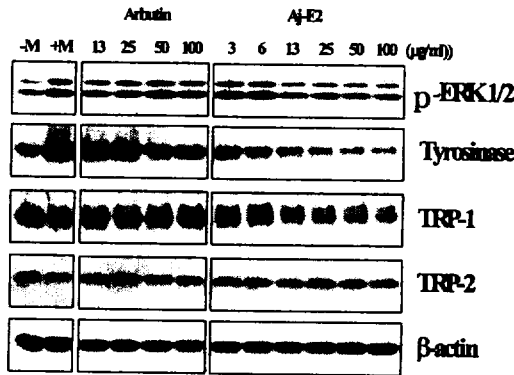


Figure 7. Western blot analysis of p-ERK 1/2, Tyrosinase, Trp-1(DHICA oxidase), Trp-2(DOPA chrome tautomerase) and β -actin in the B16/F10 melanoma cells after a treatment with arbutin and the 70% ethanol extract of *A. japonica*(Aj-E2) for a dose-dependent manner. B16/F10 melanoma cells were cultured for 72 hrs inducing melanogenesis with α -MSH 50nM. When it passed for 36 hrs, media were exchanged and samples were retreated.

-M : without MSH, +M : MSH 50 nM addition, Arbutin 13 : MSH 50nM + Arbutin 13 μ g/ml, Arbutin 25 : MSH 50nM + Arbutin 25 μ g/ml, Arbutin 50 : MSH 50nM + Arbutin 50 μ g/ml, Arbutin 100 : MSH 50nM + Arbutin 100 μ g/ml, Aj-E2 3 : MSH 50 nM + *A. japonica* 70% ethanol extracts 3 μ g/ml, Aj-E2 6 : MSH 50 nM + *A. japonica* 70% ethanol extracts 6 μ g/ml, Aj-E2 13 : MSH 50 nM + *A. japonica* 70% ethanol extracts 13 μ g/ml, Aj-E2 25 : MSH 50 nM + *A. japonica* 70% ethanol extracts 25 μ g/ml, Aj-E2 50 : MSH 50 nM + *A. japonica* 70% ethanol extracts 50 μ g/ml, Aj-E2 100 : MSH 50nM + *A. japonica* 70% ethanol extracts 100 μ g/ml

하는 보고(Kadearo 등 2003)와 일치하는 결과이다. 새발 추출물은 UV를 조사한 각질형성세포에서 멜라닌생성을 유도하기에 충분한 NO가 생성되는 것을 저해하여 멜라노사이트로 보내는 paracrine factor의 양을 줄일 수 있는 가능성을 제시하였다. 또한, tyrosinase의 활성을 mRNA 수준에서 관여하는 NO에 대해 저해활성도 가짐을 확인할 수 있었다 (Fig. 4) (Romero-Graillet 등 1996; Lassalle 등 2003; Sasaki 등 2000). 이는 미백의 지표물질인 arbutin이 tyrosinase의 활성부위에서 L-tyrosine과 경쟁적 저해제로 작용하는 것 (Maeda 등 1996)과는 달리 ERK 1/2의 활성화와 관련된 세포신호전달 경로를 통해 미백활성을 나타내는 것으로 사료되는 결과이다(Kadearo 등 2003). 따라서 홍조류인 새발(*Acanthopeltis japonica*)의 조추출물은 항염증 효과와 관련된 미백관련 기능성 화장품 원료로서의 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

참고 문헌

- Blois, S. 1955. A note on free radical formation in biologically occurring quinones. *Biochim. Biophys. Acta.* 18(1): 165.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Briganti, S., E. Camera and M. Picardo. 2003. *Chemical and instrumental*

- approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* 16(2): 101-110.
- Funasaka, Y., A. K. Chakraborty, M. Komoto, A. Ohashi and M. Ichihashi. 1999. The depigmenting effect of alpha-tocopheryl ferulate on human melanoma cells. *Br. J. Dermatol.* 141(1): 20-29.
- Gilchrest, B. A., H. Y. Park, M. S. Eller and M. Yaar. 1996. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem. Photobiol.* 63(1): 1-10.
- Grabbe, J., P. Welker, E. Dippel and B. M. Czarnetzki. 1994. Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 287(1): 78-84.
- Gutfinger, T., R. Ashkenazy and A. Letan. 1976. Determination of benzoic and sorbic acids in orange juice. *Analyst.* 101(1198): 49-54.
- Hearing, V. J. 1998. Regulation of melanin formation. The pigmentary system of the skin, physiology and pathophysiology. Oxford Press, 423-438.
- Imokawa, G., T. Kobayashi, M. Miyagishi, K. Higashi and Y. Yada. 1997. The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment Cell Res.* 10(4): 218-228.
- Im, S., E. S. Lee, W. Kim, W. On, J. Kim, M. Lee and W. H. Kang. 2002. Donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocyte. *J. Korea Med. Sci.* 17: 58-64.
- Im, S., O. Moro, F. Peng, E. E. Medrano, J. Cornelius, G. Babcock, J. J. Nordlund and Z. A. Abdel-Malek. 1998. Activation of the cyclic AMP pathway by alpha-melanotropin mediated the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer Res.* 58(1): 47-54.
- Joshi, P. C., C. Carraro and M. A. Pathak. 1987. Involvement of reactive oxygen species in the oxidation of tyrosine and DOPA to Melanin and in skin tanning. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 142(1): 265-274.
- Kadekaro, A. L., R. J. Kavanagh, K. Wakamatsu, S. Ito, M. A. Pipitone and Z. A. Abdel-Malek. 2003. Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: Who will win the final round? *Pigment cell res.* 16(5): 434-447.
- Kang, H. H., H. S. Rho, J. S. Hwang and S. G. Oh. 2003. Depigmenting activity and low cytotoxicity of alkoxy benzoates or alkoxy cinnamate in cultured melanocytes. *Chem. Pharm. Bull.* 51(9): 1085-1088.
- Lassalle, M. W., S. Igarashi, M. Sasaki, K. Wakamatsu, S. Ito and T. Horikoshi. 2003. Effects of melanogenesis-inducing nitric oxide and histamine on the production of eumelanin and pheomelanin in cultured human

- melanocytes. *Pigment cell res.* 16(1): 81-84.
- Loo, D. T. and J. R. Rillema. 1998. Measurement of cell death. *Methods Cell Biol.* 57: 251-264.
- Maeda, K. and M. Fukuda. 1996. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276(2): 765-769.
- Morelli, J. G., J. J. Yohn, M. B. Lyons, R. C. Murphy and D. A. Norris. 1989. Leukotriens C4 and D4 as potent mitogens for cultured human neonatal melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 93(6): 719-722.
- Orlow, S., 1998. The biogenesis of melanosomes. in the pigmentary system, physiology and pathophysiology. eds. J. J. Nordlund, R. E. Bossey, V. J. Hearing, R. A. King and J. P. Ortonne. Oxford University Press, New York, pp 97-106.
- Pomerantz, S. H. 1966. The tyrosine hydroxylase activity of mammalian tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 241(1): 161-168.
- Romero-Graillet, C., E. Aberdam, N. Biagoli, W. Massabni, J. P. Ortonne and R. Ballotti. 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., E. Aberdam, M. Clement, J. P. Ortonne and R. Ballotti. 1997. Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated stimulates melanogenesis. *J. Clin. Invest.* 99(4): 635-642.
- Sasaki, M., T. Horikoshi, H. Uchiwa and Y. Miyachi. 2000. Up-regulation of tyrosinase gene by nitric oxide in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 13(4): 248-252.
- Takiwaki, H., S. Shirai, H. Kohno, H. Soh and S. Arase. 1994. The degrees of UVB-induced erythema and pigmentation correlate linearly and are reduced in a parallel manner by topical antiinflammatory agents. *J. Invest. Dermatol.* 103(5): 642-646.
- Thody, A. J. and A. Graham. 1998. Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Res.* 11(5): 265-274.
- Tobin, D. and A. J. Thody. 1994. The superoxide anion may mediate short-but not long-term effects of ultraviolet radiation on melanogenesis. *Exp. Dermatol.* 3(3): 99-105.
- Tomita, Y., K. Maeda and H. Tagami. 1989. Mechanisms for hyperpigmentation in postinflammatory pigmentation, urticaria pigmentosa and sunburn. *Dermatologica.* 179: 49-53.
- Tomita, Y., K. Maeda and H. Tagami. 1992. Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites : possible role in postinflammatory pigmentation. *Pigment Cell Res.* 5(5 Pt 2): 357-361.