

수질 추출물의 항산화활성 및 미백활성 효과

박 해 룡[†]

경남대학교 제약공학과 교수

Antioxidant and Skin Whitening Activities of Hirudinidae Extracts

Hae-Ryong Park[†]

Professor, Dept. of Pharmaceutical Engineering, Kyungnam University, Changwon 51767, Republic of Korea

ABSTRACT

This study evaluated the antioxidant and skin-whitening activities of Hirudinidae extracts and their cytotoxicity profiles. Methanolic (HNM) and ethanolic (HNE) extracts were prepared and assessed for total phenolic content and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity. The total phenolic contents of HNM and HNE were 165 and 147 mg GAE/100 mg extract, respectively. However, both extracts exhibited relatively low DPPH radical-scavenging activity at 5 mg/mL, with 3% (HNM) and 15% (HNE) inhibition. Skin-whitening potential was evaluated using a mushroom tyrosinase inhibition assay. HNM demonstrated higher tyrosinase inhibitory activity (28.6% at 500 mg/mL) compared to HNE (18.7% at 500 mg/mL). Based on these results, HNM was further investigated for its anti-melanogenic effects in α -melanocyte-stimulating hormone (MSH)-stimulated B16-F10 melanoma cells. HNM significantly suppressed melanin production, indicating potent inhibition of melanogenesis. To exclude the possibility that the observed depigmenting effects were due to cytotoxicity, cell viability was assessed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and lactate dehydrogenase (LDH) assays. The results confirmed that HNM did not induce cytotoxic effects in B16-F10 cells at the tested concentrations. Therefore, these findings suggest that the methanolic extract of Hirudinidae exhibits notable anti-melanogenic activity without cytotoxicity, highlighting its potential as a functional ingredient for skin-whitening applications managing of hyperpigmentation disorders.

Key words: antioxidant, B16-F10 cells, Hirudinidae, melanogenesis, skin whitening

서 론

피부색을 이루는 구성요소 중 피부 흑화와 관련된 melanin은 피부 표피의 기저층에 존재하는 색소형성세포주(melanocyte) 내 소기관인 melanosome에서 효소적 촉매반응에 의해 형성되는 것으로 melanogenesis라 정의한다(Chang TS 2009). Melanogenesis는 선택적인 cytokine과 growth factor에 의해 조절되는데(Choi H 등 2012) 중요 조절인자로, 뇌하수체 중엽에서 분비되는 α -Melanocyte stimulating hormone(α -MSH)가 melanocyte의 막에 존재하는 melanocortin receptor 1(MC1R)에 결합함으로써 GPCR(G-protein-coupled receptor)-cAMP(cyclic Adenosine monophosphate)-MITF(microphthalmia associated transcription factor) pathway를 통해 melanogenesis를 자극시켜, melanin 생합성에 관여하는 효소인 tyrosinase, TRP-1 (tyrosinase related protein-1), TRP-2(tyrosinase related protein-2)를 발현시키게 된다(Libert A 등 1989). 그 중 melanogenesis에 증추적인 역할을 하는 tyrosinase는 melanosome 내 존재하는

tyrosine을 출발 물질로 하여 이를 순차적으로 DOPA와 DOPA quinone으로 산화시킨다. 이후 cysteine 또는 glutathione의 관여 여부에 따라 DOPA quinone이 DOPA chrome, 5,6-dihydroxyindole, indole-5,6-quinone 단계를 거쳐 흑색 또는 갈색을 나타내는 알칼리 난용성의 eumelanin 또는 cysteinyl DOPA, alanyl-hydroxybenzothiazine을 거쳐 황색 또는 적색을 나타내는 알칼리 가용성의 pheomelanin 등의 melanin으로 합성되며, 일반적으로 eumelanin을 melanin이라 지칭한다(Hearing VJ & Jiménez M 1987).

이렇게 생성된 melanin은 피부가 햇빛에 노출되었을 때 자외선의 빛 에너지를 흡수하여 자외선이 진피 내로 투과하여 발생시키는 피부기관의 손상을 방어하며, 피부 내에 생성된 유해산소 및 free radical을 소거시키는 등 외부 유해인자로부터 피부를 보호해주는 유용한 역할을 수행한다(Slominski A 등 2004). 또한, 피부세포 내의 melanin 생성량과 분포도에 따라 사람의 피부색이 결정되며, melanin 색소가 많은 사람은 갈색 또는 검은색의 피부를 갖지만, melanin 색소가 적은 사람은 흰색의 피부를 갖게 된다. 하지만 외부의 자극으로 인해 다량의 melanin이 국소적 과색소침착을 일으키면 기미,

[†] Corresponding author : Hae-Ryong Park, Tel: +82-55-249-2689, Fax: +82-505-999-2104, E-mail: parkhy@kyungnam.ac.kr

주근깨, 염증 후 색소침착, 검버섯뿐만 아니라 피부염, 피부암과 같은 피부 질환이 야기된다(Kim KS 등 2006).

이와 같은 질환 및 미관상의 문제점을 극복하기 위하여 사용되는 것이 피부 미백제이며, 미백제의 개발은 활발히 이루어지고 있다(Briganti S 등 2003). 현재 피부 미백제들의 기능은 melanin의 합성을 억제하거나, 이미 생성된 melanin이 존재하는 melanosome을 파괴시키거나 탈각화현상을 촉진해 이미 각질층에 축적된 melanin이 떨어져 나가게 하는 방법 등이 적용되고 있다. 이 중 가장 근본적인 방법은 melanin의 생성을 억제하는 방법으로, melanin 생성경로에서 중요한 역할을 하는 tyrosinase의 발현을 저해하거나, 발현된 tyrosinase의 활성을 저해하는 것 등이 있다. 활성을 저해하는 방법으로는 tyrosinase의 Cu^{2+} 을 chelating 시켜 tyrosine과의 결합을 저해하거나, melanin 단량체인 dihydroxyindole과 tyrosinase 간의 간섭으로 중간 대사물을 형성시켜 melanin 중합체 형성의 장애를 일으키는 등의 효과적인 방법을 통해 미백효과를 나타낼 수 있는 물질의 탐색이 이루어지고 있다(Maeda K & Fukuda M 1996).

그 대표적인 물질로는 kojic acid가 존재하며, 이는 tyrosinase 활성부위에 존재하는 Cu^{2+} 을 흡착시켜 효소활성을 저해하지만, 화장품에 배합 시 불안정성과 피부 부작용의 문제 및 최근 동물실험 결과 간암 유발이 밝혀져 화장품 원료로서의 사용이 중지된 바 있다(Crispo JA 등 2010). 또한, Vitamin-C 또는 그 유도체는 산화가 잘 되는 불안정성 때문에 화장품의 원료로 사용이 어려우며, hydroquinone은 피부에 대한 미백효과는 탁월하지만 알레르기 유발, melanin 생성 세포에 대한 독성, 영구 탈색화 등 피부에 대한 자극성이 높으며, 최근 발암성 물질로 규정되어 사용이 금지되거나 각 나라별로 제한적인 농도만 허가하고 있다(Karamagi C 등 2001). 이와 같이 과색소침착을 억제하고자 많은 미백물질들이 개발되어 왔지만 불안정성으로 인해 분해되어 착색되거나, 피부 침투력 저하, 생체에서의 효능, 효과의 불분명 및 안전성 문제 등으로 그 사용이 제한되고 있는 실정이다(Tomida K 등 1990).

따라서 기존 피부 미백제들의 문제점을 해결하고, 피부 세포주에 대한 효과적인 새로운 미백소재를 획득하기 위해 안정성과 안전성이 보장되는 천연물을 대상으로 tyrosinase 저해활성을 나타내는 물질을 탐색한 결과, 수질(Hirudinidae) 추출물로부터 미백활성을 확인하였다. 수질은 거머리과로 거머리를 석회에 무쳐 햇빛에 말리거나 구운 것으로써 뇌혈관 질환, 고지혈증, 호흡기 질환 등의 치료에 광범위하게 응용되고 있으며, 특히 강한 항응고 작용이 다른 한약재보다 우수하고, 일반적인 어혈 치료약물에 비해 월등한 효능이 이미 밝혀졌다(Sohn JH 등 2001). 하지만 피부 세포주에 대한 미백활성에 대한 연구는 보고되지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 한약재로 사용되는 수질을 methanol

과 ethanol로 각각 추출하여 항산화 활성과 tyrosinase 저해 활성을 측정하고, B16F10 세포주에서 멜라닌 축적 억제 효과를 분석함으로써, 새로운 미백 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

본 실험에서 사용된 수질(Hirudinidae)은 ㈜금강계약으로부터 제공받아 추출하여 실험에 사용하였다. 세포주 배양을 위해 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS) 및 penicillin, streptomycin은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구매하였으며, 미백활성 평가를 위해 사용된 tyrosinase, tyrosine, arbutin, α -MSH, 세포독성평가를 위해 사용된 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma Chemical CO.(St. Louis, MO, USA)로부터, LDH (lactate dehydrogenase) release assay kit는 Wako Pure chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)로부터 구매하여 사용하였다. 그 외의 연구에 사용된 여러 가지 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

2. 수질 추출물 제조

수질 5 g에 각각 50 mL의 100% methanol과 100% ethanol 용매를 가하여 상온에서 3일 동안 정치시켜 추출한 후, 여과지(Advantec, 5C 125 mm, Tokyo, Japan)로 여과하였다. 여과된 추출액은 회전감압농축기(EYELA N-1000, Tokyo, Japan)를 이용하여 40°C에서 감압 농축하고, 획득된 수질 methanol, ethanol 추출물을 각각 HNM, HNE라 명명하였다. 각 추출물은 항산화활성, tyrosinase 활성 저해, melanin 생성 저해 및 세포독성 등을 평가하기 위해 각각 methanol과 ethanol에 녹여 적당한 농도로 희석하여 처리하였다.

3. 세포주 배양 및 처리

수질 추출물의 미백활성 및 세포독성을 시험하기 위해 한국세포주은행(KCLB, Seoul)으로부터 mouse 유래 흑색종 세포주 B16-F10을 분양받아 본 실험에 사용하였다. 세포배양을 위해 DMEM medium(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS) 및 100 units/mL의 penicillin, 100 mg/mL의 streptomycin, 3.5 mg/mL의 $NaHCO_3$ 을 첨가하여 사용하였다. 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO_2 incubator(MCO-18-AIC, SANYO, Osaka, Japan)에서 배양하였으며, melanin의 생성을 유도하기 위한 α -MSH(α -melanocyte stimulating hormone)는 Sigma Chemical CO.(St.

Louis, MO, USA)에서 구매하였으며, 최고 100 mM의 농도로 멸균수에 용해하여 사용하였다.

4. 총 페놀 화합물의 함량 측정

수질 추출물의 페놀 화합물의 함량 측정은 Singleton VL & Rossi JA(1965)의 방법을 실험에 맞게 변형하였다. 시료 200 mL에 1 N Folin-Ciocalteu reagent 200 mL를 첨가하여 3분 동안 실온에 방치한 후 10% Na₂CO₃ 200 mL를 첨가하고 암실에 1시간 방치한 후 13,400×g에서 5분 동안 원심분리(MICRO 17R, Hanil Sci., Seoul, Korea) 후 반응액을 690 nm에서 흡광도(Model 680, Bio-Rad Lab., California, USA)를 측정하였다. 표준검정곡선은 gallic acid를 사용하여 나타냈으며, 총 페놀 화합물의 함량을 계산하였다.

5. DPPH Radical 소거능 측정

수질 추출물들의 DPPH radical 소거능(radical scavenging activity; RSA)을 알아보기 위해 Thitilerdecha N 등(2010)의 방법을 실험에 맞게 변형하여 측정하였다. 추출한 시료 20 µL에 0.2 mM DPPH 용액 80 µL를 첨가하여 10초 동안 섞은 후 실온에서 10분간 방치 후 492 nm에서 흡광도(Model 680, Bio-Rad Lab., California, USA)를 측정하였다.

6. Tyrosinase 저해 활성 측정

수질 추출물의 mushroom tyrosinase 활성 저해 능력을 알아보기 위해 96-well plate의 각 well에 100 µL의 시료와 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 140 µL, enzyme(1,500 units/mL mushroom tyrosinase) 20 µL, substrate(1.5 mM tyrosine) 40 µL을 순서대로 첨가한 후 37°C에서 15분 동안 incubation한 다음 ELISA reader(Model 680, Bio-Rad Lab., California, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 각각 methanol과 ethanol 100 µL, 양성대조군으로는 1 mM의 arbutin을 사용하였다.

7. Melanin 생성량 측정

B16-F10 melanoma 세포주에 대한 HNM의 melanin 생성 억제 효과를 평가하기 위하여 6-well plate에 5×10^4 cells/mL 이 되도록 2 mL씩 첨가한 후 24시간 동안 배양하였다. HNM을 각각 10, 50 µg/mL의 농도로 처리하고, 무처리 대조군은 1% methanol이 되도록 처리한 후, melanin 생성 유도제인 1 mM의 α-MSM을 처리하여 96시간 동안 배양한 뒤 melanin의 양을 측정하였다. 먼저 배양액으로 방출된 melanin의 함량을 측정하기 위해 96-well plate에 상등액을 100 µL 분주하고 ELISA(Model 680, Bio-Rad Lab., California, USA)를 이용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음, 배양한 세포를

0.25% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확한 후 원심분리(5,000 rpm, 4°C, 5분)를 실시하고 cell pellet에 1 N NaOH (10% DMSO) 100 µL를 넣고, 80°C에서 10분간 세포막과 세포 내 melanin 색소를 녹여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. MTT Reduction Assay

B16-F10 melanoma 세포주에 대한 HNM의 세포생존율을 측정하기 위해 MTT reduction assay를 실시하였다. B16-F10 세포주를 96-well plate에 5×10^4 cells/mL의 농도로 100 µL씩 plating하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, HNM을 각각 1, 5, 10, 50 µg/mL의 농도로 세포주에 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT solution(5 mg/mL)을 10 µL씩 첨가하여 30분 동안 반응시켰다. 배지를 완전히 제거하고, 각 well에 100 µL씩 DMSO를 첨가하여 형성된 비수용성의 formazan을 완전히 용해한 후 ELISA reader(Model 680, Bio-Rad Lab., California, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, HNM을 처리하지 않고 배양시킨 대조군 세포의 생존율을 100%로 하였을 때 상대적인 세포생존율을 나타냈다.

9. LDH Release Assay

B16-F10 melanoma 세포주에 대한 HNM의 세포독성을 측정하기 위해 LDH release assay를 실시하였다. B16-F10 melanoma 세포주를 96-well plate에 5×10^4 cells/mL의 농도로 100 µL씩 plating하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, HNM을 각각 1, 5, 10, 50 µg/mL의 농도로 세포주에 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 먼저 세포 외로 방출된 LDH를 측정하기 위해 상등액을 새로운 96-well plate에 50 µL를 옮기고, LDH reagent를 각 well 당 50 µL씩 첨가하여 상온에서 정치시킨 후 20분간 반응시켰다. 색의 변화로 반응이 완료되는 것을 확인한 후 stop solution을 각 well에 100 µL씩 첨가하여 반응을 중지시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 LDH의 방출량을 측정하였다. 다음으로 세포 내의 LDH를 측정하기 위해 기존의 96-well plate에 있는 배양액을 제거한 후, 0.5% Triton X-100 용액을 50 µL씩 첨가하여 40 rpm으로 10분간 shaking을 하여 세포벽을 손상시킨 뒤, 위와 같은 방법으로 LDH reagent를 50 µL와 stop solution을 100 µL를 첨가하고, ELISA reader(Model 680, Bio-Rad Lab., California, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDH에 대한 세포독성의 백분율은 배양액과 세포 내에서 유리된 총 LDH에 대한 배양액으로부터 유리된 LDH의 흡광도 값으로 계산하여 백분율로 나타내었다.

10. 통계처리

모든 자료처리는 SPSS-PC+ 통계 패키지를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치±표준편차(S.D.)를 구하고, 실험군 간의 평균값의 통계적 유의성은 Student *t*-test에 의해 $p<0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다. 세 집단 이상의 비교는 one way ANOVA법으로 분산분석을 하였으며, 유의성 검증은 $p<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 수질 추출물의 항산화활성 평가

피부는 다양한 환경적 요인뿐만 아니라 자외선에 노출됨으로써 반응성이 매우 큰 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)에 의해 유도된 광산화적 손상을 지속적으로 받게 된다. ROS는 4개의 전자에 의해서 환원된 강력한 산화제로 산소 분자가 한 개, 두 개 혹은 세 개의 전자에 의해 환원된 것으로 O_2^- (superoxide radical), H_2O_2 (hydrogen peroxide) 혹은 OH^- (hydroxyl radical), 1O_2 (singlet oxygen)이라 한다(Halliwell B & Aruoma OI 1991). 이들 ROS 중에서 singlet oxygen이나 hydroxyl radical은 피부의 광손상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 피부 항산화제 파괴, 지질과산화 반응의 개시, 단백질 및 DNA 산화, 결합조직 성분의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름생성과 melanocyte를 자극시켜 melanin 생성까지 유발시키게 된다(Fantone JC & Ward PA 1982). 이를 토대로 ROS를 소거시켜 1차적인 melanin 생성 유도를 저해할 수 있는 항산화물질을 수질 추출물로부터 측정하고자 한다.

Phenol 화합물은 식물의 2차 대사산물의 주요 물질로서 hydroxyl기를 가지는 방향족 화합물을 총칭하며, phenolic hydroxyl기는 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하여 항산화 및 항암 등의 다양한 생리활성을 나타낸다(Milke L 등 2018).

Table 1. Total phenol contents of Hirudinidae extracts

	Extraction solvent	
	HNM	HNE
$\mu\text{g}/100 \text{ mg GAE}^a$	165.5±23.17	147.4±1.55

All measurements were done triplicate, and values are average of three replication.

GAE^a: gallic acid equivalents.

HNM: methanolic extracts of Hirudinidae.

HNE: ethanolic extracts of Hirudinidae.

따라서 추출물 상태에서 phenol의 양을 측정함으로써 항산화 활성 등의 생리활성 기능을 유추할 수 있으므로 표준물질인 gallic acid를 이용하여 수질 추출물에 들어있는 phenol 성 물질의 함량을 측정하였다. 그 결과, 총 phenol의 함량은 100 mg을 기준으로 HNM은 165.5 $\mu\text{g}/100 \text{ mg GAE}$ 였으며, HNE은 147.4 $\text{mg}/100 \text{ mg GAE}$ 로, 기능성 phenol 화합물이 HNM에 다량 함유되어 있다는 것을 확인하였다(Table 1).

수질의 직접적인 항산화활성을 평가하기 위해 DPPH radical 소거능을 측정하였다. DPPH radical은 안정한 radical이지만 전자를 공여할 수 있는 물질과 만나면 radical이 소거되고 이를 흡광도로 측정할 수 있어 물질의 항산화활성을 분석하는 대표적인 방법으로 이용되고 있다. HNM과 HNE의 다양한 농도(0.1, 0.5, 1, 5 mg/mL)에서 DPPH radical 소거능을 측정한 결과, HNM은 농도별로 0.92, 1.03, 2.76, 3.28%의 낮은 활성을 나타냈지만, HNE는 5.58, 7.52, 8.43, 15.15%로 농도 의존적이며 통계적으로 유의한 결과를 확인하였다. HNE이 상대적으로 HNM보다 DPPH radical 소거능이 높은 것을 확인할 수 있었지만 양성대조군인 vitamin-C 1 mg/mL (75.17%)의 활성에는 미치지 못하는 낮은 활성임을 확인하였다(Table 2). 또한, 총 phenol 함량의 결과와는 반대되는 결과로써 수용성 radical인 DPPH가 수용성의 항산화제와의 반응성이 더 뛰어나므로 HNE에 HNM보다 수용성 항산화물질이 더 함유되어

Table 2. DPPH radical scavenging effects of HNM and HNE

	Extraction solvent		
	HNM	HNE	
	mg/mL		
DPPH RSA (%)	0.1	0.92±0.005	5.58±0.117
	0.5	1.03±0.013	7.52±0.267
	1	2.76±0.055	8.43±0.394
	5	3.28±0.058	15.15±1.485

A solution of 80 μL of 0.2 mM DPPH in ethanol was gently mixed with 20 μL of HNM for 1 h and absorbance was measured at 490 nm. The data was expressed as mean values (\pm S.D.) of the three independent experiments.

HNM: methanolic extracts of Hirudinidae; HNE: ethanolic extracts of Hirudinidae.

있을 것으로 확인하였다.

2. 수질 추출물의 미백활성 평가

피부가 자외선에 노출되면 뇌하수체 중엽에서 분비되는 α -MSH에 의해 melanocyte 내 cAMP 기작이 가동되어 MITF가 발현되고, 이는 melanin 생합성에 관여하는 단백질들인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현을 증가시키게 된다(Imokawa G 2004). 그중 발현된 tyrosinase는 melanocyte 내에 존재하는 아미노산인 tyrosine을 기질로 DOPA와 DOPA quinone으로 대사시키고, 최종적으로 melanin을 생성하게 된다. 이처럼 melanin 합성 단계 중 최초의 반응을 담당하는 tyrosinase는 melanin의 생합성 속도 결정단계를 중추적으로 관여하게 된다(Kim KS 등 2006). 이와 같이 tyrosinase 활성에 대한 직접적인 억제제를 확인하는 tyrosinase의 활성 평가 실험을 통해 기존 피부 미백제인 arbutin과 수질 추출물들의 농도에 따른 tyrosinase 저해 활성을 비교하였다.

HNM과 HNE를 각각 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 활성을 측정된 결과, HNM 처리군은 20.9, 23.6, 24.4, 28.6%의 농도 의존적인 억제 효과를 나타내었으며, HNE 처리군은 10.4, 11.0, 13.0, 18.7%로, HNM보다 낮은 저해 활성을 나타내었다(Figs. 1A and B). 이를 통해 HNM이 HNE보다 tyrosinase 저해 활성이 높다는 것을 확인할 수 있었고, tyrosinase 활성을 효과적으로 저해할 수 있는 생리활성물질이 존재함을 유추할 수 있었다. 또한, 추출물의 저해 활성이 1 mM의 arbutin에 비해 낮은 활성을 보였지만, 추출물인 상태를 감안한다면 높은 저

해 활성을 가지는 것을 확인하였다.

Tyrosinase의 활성이 더 뛰어난 HNM을 미백 소재로서의 정확한 활성을 알아보기 위해 세포주의 melanin 생성 억제 효과에 대해 연구하였다. B16-F10 melanoma 세포주에 HNM을 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 후 α -MSH 1 mM을 처리하여 melanin의 생성을 유도하여 세포 배양액과 세포 내 melanin의 생성량을 측정하였다. 배양액 속 melanin의 함량을 측정할 결과, 무처리 대조군을 100%로 보았을 때, α -MSH 단독 처리군은 151%로 melanin의 생성이 유도된 것을 확인할 수 있었고, HNM 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리 시 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 101.5%로 α -MSH 단독 처리군보다 melanin 생성량이 감소하였으며 양성대조군인 100 μM arbutin보다 약 34% 더 높은 억제율을 나타낸다는 것을 확인하였다(Fig. 2A). 세포 내 melanin의 생성량을 측정할 결과, 무처리군을 100%로 보았을 때 α -MSH 처리군은 147.4%로, HNM 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 69.0%로써, 양성대조군인 100 μM arbutin의 농도 처리군(129.8%)보다 약 60% 정도 melanin의 생성을 더 저해한다는 것을 확인하였다(Fig. 2B).

3. 수질 추출물의 세포독성 평가

또한, HNM의 뛰어난 미백활성이 B16-F10 세포주에 대한 HNM의 세포독성으로 인해 melanin 생성 억제 효과로 나타나는 것인지 확인하기 위하여 세포독성 평가를 실시하였다. B16-F10 세포주에 HNM을 처리하여 배양시킨 후 MTT reduction assay를 실시하여 formazan 형성량을 통해 세포생존율을 측정하였다. 무

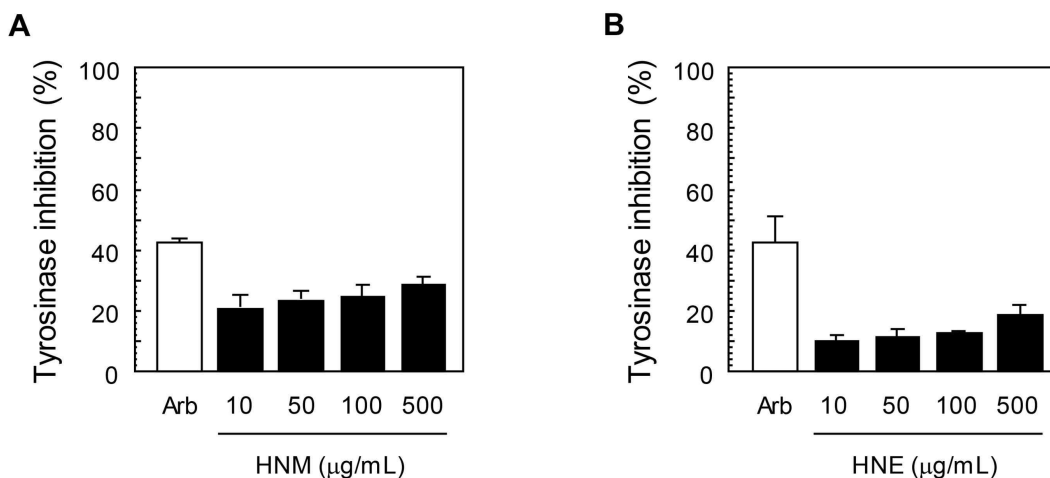


Fig. 1. Tyrosinase inhibition activity of HNM and HNE.

The assay solution contains different concentrations of HNM, HNE, 1,500 units/mL tyrosinase, and 1.5 mM tyrosine (A: tyrosinase inhibition of HNM; B: tyrosinase inhibition of HNE). The assay mixture was incubated at 37°C for 15 min. After incubation, the absorbance was measured at 490 nm. Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate experiments.

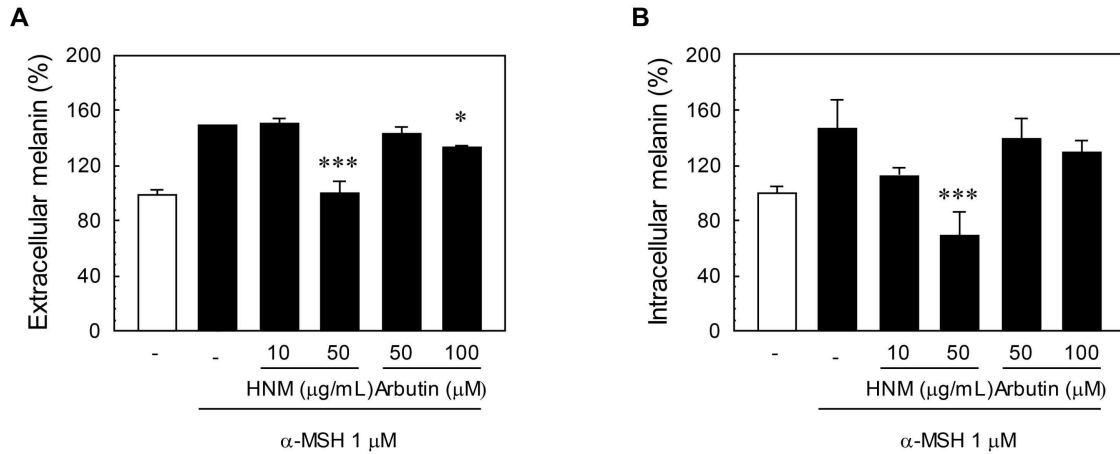


Fig. 2. Depigmenting effects of HNM on melanin contents in α -MSH-stimulated B16-F10 melanoma cells.

The cells were cultured for 24 h, then treated with various concentrations of HNM and stimulated with 1 μ M of α -MSH for 96 h (A: extracellular melanin contents; B: intracellular melanin contents). Significant was determined compared with the α -MSH-treated group (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

처리 대조군의 세포생존율을 100%로 하였을 때, 각 농도별(1, 5, 10, 50 μ g/mL) HNM을 처리 시 101.4, 99.8, 102.0, 108.8%로 대조군과 대등한 세포생존율을 나타내었다(Fig. 3A).

다음으로 세포의 손상 정도를 확인하기 위해 배양액 중 들어 있는 세포막 손상으로 인해 발생하는 LDH(lactate dehydrogenase)의 방출량을 LDH release assay를 통해 측정하였다.

MTT reduction assay와 동일한 농도로 처리한 결과, 무처리 대조군의 LDH 방출량이 20.4%에 비해, 각 농도별(1, 5, 10, 50 μ g/mL) HNM을 처리 시 19.4, 18.8, 19.1, 23.3%로써 무처리 대조군과 차이가 없으며, 세포독성을 나타내지 않는다는 것을 확인하였다(Fig. 3B).

따라서, HNM은 피부의 노화와 색소형성 피부 세포주에

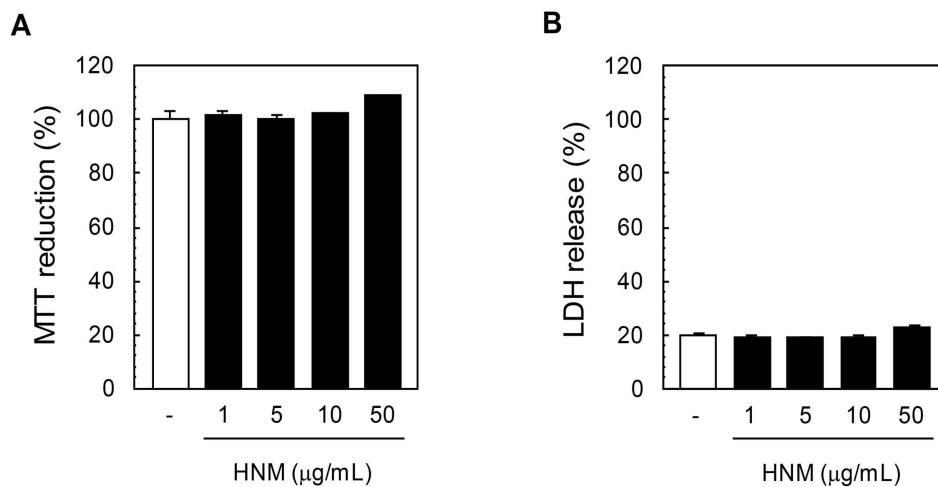


Fig. 3. Effects of HNM on cytotoxicity in B16-F10 melanoma cells (A: MTT reduction assay; B: LDH release assay).

The cells were cultured in the presence of various concentrations of HNM for 24 h. (A) After MTT reduction assay, the MTT reduction rate (means \pm S.D. of triplicate determination) was calculated by setting the control survival rate as 100%. (B) For the LDH release (mean \pm S.D. of triplicate determinations), data were normalized to the activity of LDH released from vehicle-treated cells (100%) and expressed as percentage of the control.

대한 melanin의 생성을 자극시키는 ROS를 환원시켜 melanin 생성의 1차적인 억제를 도모하였고, melanogenic enzyme인 tyrosinase 활성을 저해시켜 세포 내 melanogenesis를 억제시킨다는 것을 확인하였다. 그리고 HNM의 세포독성을 나타내지 않으므로 세포사에 의한 미백효과를 나타내는 것이 아니며, 피부 세포주에 대해 안전함을 확인하였다. 결과적으로, 수질은 피부 세포주에 대한 무독성과 자극적인 부작용 없는 안정성과 안전성이 보장되는 매우 효과적인 미백 물질이며, 이용 가치가 높은 천연물 소재로서의 잠재적인 가능성을 가지고 있다는 것을 본 연구를 통하여 규명하였다.

요 약

본 연구에서는 수질(Hirudinidae) 추출물을 이용하여 항산화 활성 및 피부 미백효과를 조사하였다. 수질의 methanol 추출물(HNM)과 ethanol 추출물(HNE)의 총 phenol 함량과 DPPH radical 소거능을 측정 한 결과, 총 phenol 함량에서는 HNM, HNE 각각 165, 147 µg/100 mg GAE의 활성을 보였으며, DPPH radical 소거능에서는 HNM, HNE 각각 3, 15%의 활성을 나타내었다. Tyrosinase 저해 활성을 확인한 결과, 500 µg/mL HNM, HNE는 각각 28.6, 18.7%의 활성을 나타내었다. 또한, tyrosinase 저해 활성이 더 뛰어난 HNM의 추가 연구를 위해 B16-F10 세포주에서 melanin 생성량을 측정 한 결과, α-MSH로 인한 melanin 생성을 양성대조군보다 효과적으로 저해하는 것을 확인하였다. MTT reduction assay, LDH release assay를 통하여 세포사에 의한 미백효과가 아닌 것을 확인함으로써 독성이 없고 안전성이 보장되는 천연물임을 확인하였다. 이상의 결과로부터 수질 추출물은 강력한 항산화활성을 가지면서 효과적인 피부 미백효과를 확인함으로써 이용 가치가 높은 천연물 소재로서의 가능성을 제시하였다.

감사의 글

이 연구결과물은 2024학년도 경남대학교 대학특성화연구비 지원에 의한 것임.

REFERENCES

- Briganti S, Camera E, Picardo M (2003) Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res* 16(2): 101-110.
- Chang TS (2009) An updated review on tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci* 10(6): 2440-2475.
- Choi H, Kim K, Han J, Choi H, Jin SH, Lee EK, Shin DW, Lee TR, Lee AY, Noh M (2012) Kojic acid-induced IL-production in human keratinocytes plays a role in its anti-melanogenic activity in skin. *J Dermatol Sci* 66(3): 207-215.
- Crispo JA, Piché M, Ansell DR, Eibl JK, Tai IT, Kumar A, Ross GM, Tai TC (2010) Protective effects of methyl gallate on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 393(4): 773-778.
- Fantone JC, Ward PA (1982) Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol* 107(3): 395-418.
- Halliwell B, Aruoma OI (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281(1-2): 9-19.
- Hearing VJ, Jiménez M (1987) Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigment. *Int J Biochem* 19(12): 1141-1147.
- Imokawa G (2004) Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders. *Pigment Cell Res* 17(2): 96-110.
- Karamagi C, Owino E, Katabira ET (2001) Hydroquinone neuropathy following use of skin bleaching creams: Case report. *East Afr Med J* 78(4): 223-224.
- Kim KS, Kim JA, Eom SY, Lee SH, Min KR, Kim Y (2006) Inhibitory effect of piperlonguminine on melanin production in melanoma B16 cell line by downregulation of tyrosinase expression. *Pigment Cell Res* 19(1): 90-98.
- Libert A, Ghanem G, Arnould R, Legeune FJ (1989) Use of alpha-melanocyte-stimulating-hormone analogue to improve alpha-melanocyte-stimulating-hormone receptor binding assay on human melanoma. *Pigment Cell Res* 2(6): 510-518.
- Maeda K, Fukuda M (1996) Arbutin: Mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J Pharmacol Exp Ther* 276(2): 765-769.
- Milke L, Aschenbrenner J, Marienhagen J, Kallscheuer N (2018) Production of plant-derived polyphenols in microorganisms: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 102(4): 1575-1585.
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic reagents. *Am J Enol Vitic* 16(3): 144-158.
- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J (2004) Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 84(4): 1155-1228.
- Sohn JH, Kang HA, Rao KJ, Kim CH, Choi ES, Chung BH,

- Rhee SK (2001) Current status of the anticoagulant hirudin: Its biotechnological production and clinical practice. *Appl Microbiol Biotechnol* 57(5-6): 606-613.
- Thitilertdecha N, Teerawutgulrag A, Kilburn JD, Rakariyatham N (2010) Identification of major phenolic compounds from *Nephelium lappaceum* L. and their antioxidant activities. *Molecules* 15(3): 1453-1465.
- Tomita K, Oda N, Ohbayashi M, Kamei H, Miyaki T, Oki T (1990) A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiensis*. *J Antibiot* 43(12): 1601-1605.
-
- | | |
|---------------|---------------|
| Date Received | Apr. 26, 2026 |
| Date Revised | Apr. 29, 2026 |
| Date Accepted | Apr. 29, 2026 |