

# 배양 흑색종세포에 있어서 NiSO<sub>4</sub>의 세포독성 및 멜라닌화에 대한 감잎 추출물의 영향

박승택<sup>1</sup> · 이경완<sup>2</sup> · 서영미<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 의과대학·원광대학교 건강증진연구소, <sup>2</sup>원광보건대학교 간호학과

## Effect of Persimmon Leaves Extract on the Cytotoxicity and Melanogenesis of NiSO<sub>4</sub> in Cultured Melanoma Cells

Seung-Taeck Park<sup>1</sup>, Gyoung-Wan Lee<sup>2</sup> and Young-Mi Seo<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Medicine·Institute for Health Improvement, Wonkwang University, Iksan 507-749, Korea

<sup>2</sup>Department of Nursing, Wonkwang Health Science University, Iksan 507-749, Korea

### Abstract

To evaluate the effect of persimmon(*Diospyros kaki* Thunb.) leaves(PL) extract on the cytotoxicity and melanogenesis of nickel sulfate(NiSO<sub>4</sub>), an environmental pollutant or an allergic contact dermatitis inducer, the colorimetric assay was performed to measure the cell viability and lactate dehydrogenase(LDH) activity as well as the tyrosinase activity and total amount of melanin in cultured B16/F10 melanoma cells. In this study, NiSO<sub>4</sub> significantly decreased cell viability in dose-dependent manner, and XTT<sub>50</sub> value was calculated at 106.7μM of NiSO<sub>4</sub>. The cytotoxicity of NiSO<sub>4</sub> was revealed to be mid-toxic in these cultures by Borenfreund and Puerner's toxic criteria. And also, vitamin E effectively prevented NiSO<sub>4</sub>-induced cytotoxicity by the significant increase of cell viability. PL extract showed the antioxidative activity by the significant increase of cell viability and the decrease of LDH activity compared to positive control(NiSO<sub>4</sub>). In the melanogenesis, PL extract significantly decreased both tyrosinase activity and total amount of melanin which were increased by NiSO<sub>4</sub>-induced cytotoxicity. From these findings, it is suggested that the cytotoxicity of NiSO<sub>4</sub> is involved in oxidative stress, and PL extract effectively prevented the cytotoxicity and the melanogenesis induced by NiSO<sub>4</sub>. Conclusively, natural component such as PL extract may be a putative resources for beauty or detoxification by the prevention of the toxicity and the melanogenesis of heavy metals related with oxidative stress such as NiSO<sub>4</sub>.

**Key words :** Heavy metals, Oxidative stress, Tyrosinase activity

## I. 서론

니켈(Ni)은 환경오염원이면서 알레르기성 접촉피부염의 유발제로도 작용한다고 알려져 있으며, 제련을 비롯한 염료, 차과용 아말감, 전기도금 및 도료제조 등과 같이 산업체에서 다양한 용도로 사용되고 있다(Lee et al., 2012). 특히, 니켈은 크롬이나 카드뮴과 같이 산업체에서 발암물질로 분류되어 있으며 흡이나 분진 또는 니켈 수용액이 폐나 피부에 노출될 경우 폐암이나 피부염을 유발한다고 한다(Counts et al., 2002). 니켈은 수은이나 납과 같은 중금속류

처럼 독성이 강하기 때문에 피부에 노출될 경우 피부조직에 손상을 초래하여 염증이나 궤양은 물론, 심지어는 피부암을 유발하기도 한다(Son et al., 2013). 대부분 중금속으로 중독된 경우 인체의 간에서는 이를 방어하기 위한 metallothioneine이라는 해독물질을 생성하게 된다. 그러나 너무 과량의 중금속이 인체에 들어온 경우 해독물질로 모두 처리할 수 없기 때문에 중독현상을 유발하게 된다(Jin and Nordberg, 1983).

최근, 니켈을 비롯한 수은이나 카드뮴, 구리와 같은 몇몇 중금속들은 이의 중독에 산화적 손상(oxidative stress)이 관여하고 있다고 제시된 바 있다(Son et al., 2013). 산화적 손상은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 속하는 hydroxyl radical을 비롯한 hydrogen peroxide 및 superoxide와 같은 자유기(free radicals)들로서, 이와 같은 증거로는 이들의 독성이 항산화제나 또

Received on February 4, 2014. Revised on April 11, 2014.

Accepted on April 18, 2014.

\*Corresponding author: dudn0408@naver.com

이 논문은 2013년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 연구되었음.

는 항산화 효소에 의하여 경감되었다는 연구 결과들이 보고되고 있다(Chen and Lin, 2001). 산화적 손상은 ROS에 속하는 자유기들이 막의 지질과산화반응의 사슬을 활성화시키며(Lee et al., 2003), 세포 내 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체를 자극하여 과량의 칼슘 유입을 유도할 뿐만 아니라 흥분성 아미노산(excitatory amino acids, EAAs)의 분비 촉진과 같은 세포 퇴화의 현상을 유도한다(Park et al., 1996). 더욱이 ROS는 피부의 멜라닌세포를 활성화시켜 멜라닌합성의 증대와 이로 인한 색소침착증을 유발하는 요인으로도 작용한다고 한다(Kuwata et al., 1993).

최근 한약재나 허브와 같은 식물로부터 정제된 추출물 성분 중에는 페놀화합물(phenolic compound)이나 카로티노이드(carotenoid) 또는 이소프레노이드(isoprenoid)와 같은 다양한 물질들이 함유되어 있다고 보고되었다(Li et al., 2007). 특히, 탄닌(tannin)이나 플라보노이드(flavonoid)와 같은 페놀화합물과 비타민 C나 비타민 E와 같은 성분들은 항산화에 뛰어난 효능을 가지고 있다고 한다(Jarvis and Neville, 2000). 특히, 페놀화합물은 분자구조상에 수산기(-OH)를 한 개 또는 그 이상을 가지고 있어 다른 물질과의 결합력이 뛰어나 그 결과 항산화를 비롯한 항암, 항염 등과 같은 다양한 생리활성을 나타낸다(Ma et al., 2003).

식물 중 감나무(*Diospyros kaki* Thunb.)는 우리나라 전국에 걸쳐 분포하고 있으며, 감나무의 잎, 즉 감잎(시엽, persimmon leave, PL)은 독이 없어 오래전부터 한방에서 구건을 비롯한 숙취, 토혈, 갈증 등을 해소하는 데 사용되어 왔다(Ha et al., 2008). 감잎은 탄닌, 비타민 C, 비타민 E, 카로티노이드, 플라보노이드, 콜린(choline) 등을 함유하고 있어 항산화 및 항염, 항돌연변이 등에 탁월한 효능이 있다고 알려져 있다(Kim et al., 1997). 이들 성분에 대한 함량을 살펴보면, 비타민 C가 39.3mg·g<sup>-1</sup>, 플라보노이드가 28.4mg·g<sup>-1</sup>, 비타민 E가 310.1mg·g<sup>-1</sup>, β-카로틴이 28.4mg·g<sup>-1</sup> 정도로 각각 포함되어 있다고 알려져 있으며, 이 중에서도 강력한 항산화제인 비타민 E가 가장 많이 함유되어 있다고 한다(Kim et al., 2001). 본 연구는 니켈 화합물의 일종인 NiSO<sub>4</sub>의 세포독성과 멜라닌화에 대한 감잎 추출물의 영향을 조사하였다.

## II. 연구방법

### 1. 약제 제조

본 실험에 사용된 황산니켈(NiSO<sub>4</sub>), dimethyl sulfoxide(DMSO), 비타민 E, phosphate buffered saline(PBS), trypsin, 그리고 sodium phosphate는 Sigma사(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. NiSO<sub>4</sub>의 제조는 working 용액을 이용하여 50, 100, 300 및 500μM의 저장액을 만든 후 최종 농도로 희석 사용하였으며, 세포

배양은 10%의 fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)이 포함된 minimum essential medium (MEM, Gibco, USA)으로 배양하였다. 2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide, disodium salt(XTT, Sigma, USA)는 실험 전날 50 μg·mL<sup>-1</sup> 농도로 만들어 보관한 후 실험 당일 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

### 2. 세포 배양

B16/F10 흑색종세포(melanoma cells)의 배양은 Choi et al.(2011)의 방법에 따라 행하였다. 즉, 계대 배양하여 냉동 저장한 세포주를 꺼내어 직경 9cm인 배양 petri-dish(Palcon Co.)에 넣고 일정 시간 동안 배양하였다. 배양 용기에 가득 자란 세포를 0.025% trypsin을 이용하여 petri-dish로부터 분리하여 10% FBS가 함유된 MEM에 부유시켰다. 배양액에 넣어 균질화된 세포들을 1×10<sup>5</sup>cell/well이 되도록 96-well 용기에 넣고, 36°C, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 정온기에서 72시간 동안 배양하였다.

### 3. 감잎 추출

감잎은 전북 익산시에 위치하고 있는 대학 내 수목원에서 시험 재배중인 10년생 ‘감주백목’(일본원산지)으로부터 2012년 7월경에 채취하여 대학부설 생명자원과학연구소에서 동정확인 후 사용하였다. 재배지는 연평균 11°C 이상으로 배수가 잘 되고 사방이 트이어 일조량과 통풍이 좋은 곳으로서 잎은 성숙되어 짙은 녹색을 띠었다. 채취한 감잎은 깨끗이 세척한 다음 통풍이 잘 되고 서늘한 곳에서 건조시켰으며, 건조 완료 후 냉암소에 보관하여 시료로 사용하였다. 시료 추출은 Oh(2001)의 방법에 따라, 보관 중인 시료 73.9g을 파쇄한 다음 1,000mL의 환저플라스크에 시료와 함께 시료의 3배 정도의 증류수를 넣고 2시간 동안 가열하였다. 동일 과정을 반복하여 얻은 추출액을 모아 3,000rpm에서 30분 동안 원심분리한 후 상정액을 모아 여과시키고 이를 진공농축기로 감압농축 후 동결건조하여 3.8g의 시료를 얻었다. 이 때 수율은 5.1%로 나타났다.

### 4. NiSO<sub>4</sub>의 처리

20~160μMs까지의 NiSO<sub>4</sub>의 농도가 20μM 간격으로 각각 포함된 배양액에서 세포를 48시간 동안 처리하였으며, 처리 농도 중 XTT<sub>50</sub>값의 산정을 위한 범위 농도인 120~160μM의 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 동시에, XTT<sub>50</sub>값을 회귀직선식(regression equation)에 의하여 산출하였다.

## 5. 비타민 E의 처리

감잎의 성분 중 다량으로 함유되어 있는 비타민 E를 배양 중인 B16/F10 흑색종세포에 10 $\mu$ M 간격으로 0~50 $\mu$ M까지의 농도를 각각 처리한 다음 2시간 후에 XTT<sub>50</sub> 농도의 NiSO<sub>4</sub>를 세포에 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 30과 40 $\mu$ M 비타민 E의 농도에서 세포생존율을 양성대조군인 NiSO<sub>4</sub> 단독 처리와 비교하였다.

## 6. 감잎 추출물의 처리

감잎 추출물이 NiSO<sub>4</sub>의 독성 감소에 미치는 영향을 조사하기 위하여 XTT<sub>50</sub> 농도의 NiSO<sub>4</sub>를 배양 세포에 처리하기 2시간 전에 5 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 간격으로 10~30 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>까지의 감잎 추출물을 각각 처리한 다음 15 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>과 25 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>의 농도에서 양성대조군인 NiSO<sub>4</sub> 단독 처리와 비교하였다.

## 7. 세포생존율(cell viability) 측정

Mosmann(1983)의 방법에 따라, 96-well 배양 용기에 72시간 동안 배양 중인 B16/F10 흑색종세포에 NiSO<sub>4</sub>는 48시간 동안, 비타민 E와 감잎 추출물은 2시간 동안 처리한 다음 이를 다시 48시간 동안 NiSO<sub>4</sub>로 각각 배양하였다. 배양이 완료된 다음, 실험 전날 제조한 XTT를 각 well당 10 $\mu$ L씩 넣고 4시간 동안 처리하였다. 처리 완료 후 DMSO를 넣은 다음 ELISA reader를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 8. Lactate dehydrogenase(LDH) 활성 측정

LDH 활성 측정은 산화적 손상에 의한 세포막의 변성 정도에 따라 세포 내에서 유출된 LDH 효소를 양적으로 측정하는 대표적 분석지표의 하나로서, LDH 활성 분석을 통해 NiSO<sub>4</sub>에 의한 산화적 손상과 이에 대한 감잎 추출물의 영향을 항산화 측면에서 분석하기 위함이다. LDH 활성 분석은 Ann et al.(2002)의 방법에 따라, NiSO<sub>4</sub>나 또는 5 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 간격으로 10~30 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>까지의 감잎 추출물 농도를 배양 세포에 각각 일정 시간 동안 처리한 다음 세포 배양액을 원심분리 튜브에 넣어 1,500rpm에서 15분 동안 원심시켰다. 원심 완료 후 상정액 50 $\mu$ L를 취하여 LDH CytoTox detection kit(Asan Co., Seoul, Korea)의 반응액(0.05U·mL<sup>-1</sup>) 50 $\mu$ L를 넣은 다음 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 후 ELISA reader로 490nm에서 흡광도를 측정하였으며, 15 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>과 25 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>의 농도에서 양성대조군인 NiSO<sub>4</sub> 단독 처리와 비교하였다. LDH 활성은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

## 9. 티로시나제(tyrosinase) 활성 측정

티로시나제는 멜라닌 합성에 관여하는 효소로서 산화적 손상은 티로시나제의 활성을 증가시켜 멜라닌화를 촉진시킨다고 알려져 있다. 따라서, 티로시나제의 활성 조사를 통하여 NiSO<sub>4</sub>의 산화적 손상과 이에 대한 감잎 추출물의 영향을 항산화 측면에서 조사하기 위함이다. 티로시나제의 활성 측정은 Choi et al.(1998)의 방법에 따라, NiSO<sub>4</sub>나 또는 5 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 간격으로 10~30 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>까지의 감잎 추출물의 농도를 각각 배양 세포에 일정 시간 동안 처리한 다음 세포배양액을 원심분리 튜브에 넣어 1,500rpm에서 15분 동안 원심시켰다. 원심분리 후 침전물을 얻어 이를 100 $\mu$ L의 세포용해액으로 처리한 후 상정액을 취하여 시료로 사용하였다. 0.1M PBS(pH 6.8)에 L-Dopa를 녹인 tyrosinase 기질용액 0.2mL, 0.3mL의 시료액 및 tyrosinase 효소액(1,250U·mL<sup>-1</sup>)을 넣은 다음 37 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였으며, 15 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>과 25 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>의 농도에서 양성대조군인 NiSO<sub>4</sub> 단독 처리와 비교하였다. 티로시나제의 활성은 반응 후 생성된 DOPA chrome을 측정함으로써 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

## 10. 총멜라닌양 측정

Hosoi et al.(1985)의 방법에 따라, NiSO<sub>4</sub>나 또는 5 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 간격으로 10~30 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>까지의 감잎 추출물 농도를 각각 배양 세포에 일정 시간 동안 처리한 다음 세포배양액을 1,500rpm에서 15분 동안 원심시켰다. 원심분리 후 침전물에 10% DMSO가 첨가된 1N NaOH를 200 $\mu$ L를 넣은 다음 80 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 ELISA reader로 405nm에서 흡광도를 측정하였으며, 15 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>과 25 $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>의 농도에서 양성대조군인 NiSO<sub>4</sub> 단독 처리와 비교하였다. 실험군의 총멜라닌양은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

## 11. 통계처리

실험 자료는 SPSS(version 18)를 이용하여 동일 실험을 3회 반복한 자료를 통계처리하였고 평균±표준편차(SD)로 표시하였다. 자료에 대한 유의성 검정을 위해 일변량분산분석(ANOVA)을 행하였으며 P-value가 0.05 미만을 유의한 것으로 하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. NiSO<sub>4</sub>의 세포독성

NiSO<sub>4</sub>에 대한 세포독성을 측정하기 위하여 처리 농도 중 120~

160μM에 대하여 세포생존율을 조사한 결과 NiSO<sub>4</sub>는 처리한 농도에 비례하여 세포생존율을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰으며( $P<0.001$ ), 이 때 XTT<sub>50</sub>값은 106.7μM에서 나타났다(Table 1). 본 실험 결과는 Lee et al.(2012)이 NiSO<sub>4</sub>가 배양 NIH3T3 섬유모세포의 세포생존율을 감소시킴으로서 세포독성을 나타냈다는 연구 보고와 일치하였다. 또한, NiSO<sub>4</sub>는 Borenfreund and Puerner(1984)의 독성판정기준에 의하여 XTT<sub>50</sub>값이 100~1,000μM 사이에 나타남으로서 중간독성(mid-cytotoxic)인 것으로 판정되었다. 본 실험에서 NiSO<sub>4</sub>에 의한 세포생존율의 감소는 카드뮴처럼 NiSO<sub>4</sub>가 세포의 DNA나 RNA의 합성을 억제하거나(Counts et al., 2002), 또는 세포 내 단백질합성을 저해한(Lowry et al., 1951) 원인도 배제할 수는 없지만, 그보다는 NiSO<sub>4</sub>에 의한 산화적 손상에 의한 가능성이 더욱 클 것으로 생각된다.

## 2. 비타민 E가 NiSO<sub>4</sub> 세포독성 경감에 미치는 영향

감잎 성분 중 가장 많이 함유되어 있는 항산화제의 일종인 비타민 E가 NiSO<sub>4</sub>에 미치는 영향을 조사하기 위하여 비타민 E를 전처리한 농도 중 30과 40μM에 대한 세포생존율을 조사한 결과 NiSO<sub>4</sub>, XTT<sub>50</sub>값의 세포생존율은 대조군인 100%(0.390)에 비하여 50.3%(0.196)로 유의한 감소를 나타냈다( $P<0.01$ ). 반면, 30μM 비타민 E 처리에서는 87.9%(0.343)로, 이는 NiSO<sub>4</sub>만의 처리에 비해서 매우 유의한 증가를 나타냈다( $P<0.001$ ). 한편, 40μM의 처리에서는 세포생존율이 95.9%(0.374)로 대조군과는 거의 비슷하게 나타남에 비하여, NiSO<sub>4</sub>만의 처리에 비하여 매우 유의한 증가를 나타냈다( $P<0.001$ ) (Table 2). 본 실험에서 산소자유기 제거제인 비타민 E가 세포생존율을 증가시킨 것은 NiSO<sub>4</sub>에 의한 산화적 손상을 비타민 E가 방어한 것으로서, 이는 Lee et al.(2012)이 항산화 효소인 catalase가 NiSO<sub>4</sub>의 독성을 방어했다는 연구 결과와도 일치하였다. 위의 실험 결과들은 NiSO<sub>4</sub>의 독성에 산화적 손상이 관여하고 있음을 제시하고 있다. 비타민 E는 산소자유기 제거제 중에서도 매우 강력한 항산화제의 일종으로서 8개의 동속체가 있는데 그 중에서도 α-tocopherol이 함량과 생리활성이 가장 높은 것으로 알려져 있다(Ozdil et al., 2004).

## 3. 감잎 추출물이 NiSO<sub>4</sub> 세포독성 감소에 미치는 영향

NiSO<sub>4</sub>의 세포독성에 대한 감잎 추출물의 영향을 알아보기 위하여 전처리한 농도 중 15μg·mL<sup>-1</sup>와 25μg·mL<sup>-1</sup>의 감잎 추출물에 대한 세포생존율을 조사한 결과 XTT<sub>50</sub> 농도의 NiSO<sub>4</sub>만의 처리에서는 세포생존율이 대조군인 100%(0.371)에 비하여 32.1%(0.119)로 매우 유의한 감소를 나타냈다( $P<0.001$ ). 이에 비하여 15μg·mL<sup>-1</sup> 감잎 추출물의 전처리에서는 35.0%(0.130)로 나타나 NiSO<sub>4</sub>만에 의

**Table 1.** The effect of nickel sulfate(NiSO<sub>4</sub>) on the cell viability of cultured B16/F10 melanoma cells.

NiSO <sub>4</sub> (μM)	XTT assay(450nm)	
	Optical density (Mean±SD)	(% of control)
Control	0.113±0.009	100
120	0.050±0.003	44.2 <sup>***</sup>
140	0.048±0.007	42.5 <sup>***</sup>
160	0.036±0.005	31.9 <sup>***</sup>
106.7(XTT <sub>50</sub> )	0.057±0.006	50.4 <sup>**</sup>

<sup>\*\*\*</sup>Significant at  $P<0.01$  or  $P<0.001$ , respectively.

**Table 2.** The effect of vitamin E on the recovery of cell viability in cultured B16/F10 melanoma cells decreased by nickel sulfate(NiSO<sub>4</sub>).

Vitamin E(μM)	XTT assay(450nm)	
	Absorbance (Mean±SD)	(% of control)
Control	0.390±0.025	100
NiSO <sub>4</sub> (XTT <sub>50</sub> )	0.196±0.013	50.3 <sup>**</sup>
30	0.343±0.047	87.9 <sup>*</sup>
40	0.374±0.032	95.9

<sup>\*\*</sup>Significant at  $P<0.05$  or  $P<0.01$ , respectively.

**Table 3.** The effect of persimmon leaves extract on the recovery of cell viability in cultured B16/F10 melanoma cells decreased by nickel sulfate(NiSO<sub>4</sub>).

Persimmon leaves extract (μg·mL <sup>-1</sup> )	XTT assay(450nm)	
	Absorbance (Mean±SD)	(% of control)
Control	0.371±0.041	100
XTT <sub>50</sub> (NiSO <sub>4</sub> )	0.119±0.010	32.1 <sup>***</sup>
15	0.130±0.017	35.0 <sup>***</sup>
25	0.201±0.039	54.2 <sup>**</sup>

<sup>\*\*\*</sup>Significant at  $P<0.01$  or  $P<0.001$ , respectively.

한 세포독성이 감소되지 않았으나, 25μg·mL<sup>-1</sup> 추출물 처리에서는 세포생존율이 54.2%(0.201)로 나타나 NiSO<sub>4</sub>만의 처리에 비하여 유의하게 증가한 것으로 나타났다( $P<0.01$ )(Table 3). 본 실험 결과는 25μg·mL<sup>-1</sup>의 감잎 추출물이 NiSO<sub>4</sub>의 세포독성을 방어하였음을 말해주고 있으며, Son et al.(2012)이 감잎 추출물이 NiSO<sub>4</sub>와 같은 중금속류인 카드뮴의 독성을 방어했다는 연구 결과와도 서로 상통함을 알 수 있었다. 위의 실험 결과는 감잎 추출물이 NiSO<sub>4</sub>에 의한 세포의 단백질 합성이나 핵산물질의 손상을 방어했을 가능성을 배제할 수는 없지만, 그보다는 NiSO<sub>4</sub>에 의한 산화적 손상을 방어함으로써 세포생존율을 높였을 것으로 생각된다. 이같은 증거

의 하나로 Ha et al.(2008)이 감잎 추출물의 항산화능을 보고한 연구 결과가 이를 말해주고 있다. 감잎 추출물의 항산화능은 아마도 추출물 성분 중에 비타민 C를 비롯한 비타민 E, 플라보노이드, 탄닌, β-카로틴 등 항산화 성분들에 의한 것으로 생각된다(Song et al., 1996). 따라서, 본 연구에서는 감잎 추출물의 항산화능을 알아보기 위하여 LDH 활성을 조사하였다.

#### 4. 감잎 추출물이 LDH 활성에 미치는 영향

감잎 추출물이 LDH 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 추출물을 전처리한 농도 중 15μg·mL<sup>-1</sup>와 25μg·mL<sup>-1</sup>에 대한 세포생존율을 조사한 결과, NiSO<sub>4</sub> XTT<sub>50</sub>만의 LDH 활성은 107.4%(0.029)로 대조군(0.027)보다 다소 증가하였다. 반면, 15μg·mL<sup>-1</sup> 처리에서는 96.3%(0.026)로 나타났으며, 25μg·mL<sup>-1</sup> 처리에서는 92.6%(0.025)로 나타나 이는 모두 NiSO<sub>4</sub> XTT<sub>50</sub>만을 처리한 LDH 활성에 비하여 유의한 감소를 나타냈다(*P*<0.05)(Table 4). 본 연구 결과는 감잎 추출물이 NiSO<sub>4</sub>에 의하여 증가된 LDH 활성을 감소시킨 것으로서, 이는 감잎 추출물이 NiSO<sub>4</sub>의 산화적 손상에 의한 막의 지질과산화물을 억제함으로써 세포막 손상을 방어한 것임을 증명하고 있다(Choi et al., 1996).

지질과산화에 의한 막손상은 막의 산화적 정도를 측정하는 대표적인 지표의 하나로서 본 연구에서 앞서 행한 항산화제인 비타민 E가 NiSO<sub>4</sub>의 독성을 방어하였다는 결과와 함께 이는 NiSO<sub>4</sub>의 독성이 산화적 손상과 관련되어 있다는 것을 재증명하고 있음을 알 수 있다(Ha et al., 2008).

#### 5. 감잎 추출물이 티로시나제(tyrosinase) 활성에 미치는 영향

감잎 추출물 시료에 대한 티로시나제의 활성을 조사하기 위하여 시료를 전처리한 농도 중 15μg·mL<sup>-1</sup>와 25μg·mL<sup>-1</sup>의 세포생존율을 조사한 결과, NiSO<sub>4</sub> XTT<sub>50</sub>만을 처리한 경우의 티로시나제 활성은 200.0%(0.050)로 대조군인 100%(0.025)보다 매우 유의하게 증가하였다(*P*<0.001). 반면, 15μg·mL<sup>-1</sup> 전처리에서는 140.0%(0.035)로, 25μg·mL<sup>-1</sup> 전처리에서는 80.0%(0.020)로 이는 모두 NiSO<sub>4</sub> XTT<sub>50</sub>만을 처리한 LDH 활성에 비하여 매우 유의한 감소를 나타냈다(*P*<0.01)(Table 5). 본 연구 결과는 감잎 추출물이 티로시나제의 활성 억제능, 즉 멜라닌 합성 억제 기능을 가지고 있다는 것을 제시하고 있다(Kim et al., 1997). 이같은 현상은 감잎 추출물이 NiSO<sub>4</sub>의 산화적 손상을 방어한 결과 티로시나제의 활성을 억제하였을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 이를 알아보기 위하여 감잎 추출물이 총멜라닌양에 미치는 영향을 조사하였다.

**Table 4.** The effect of persimmon leaves extract on the decrease of lactate dehydrogenase(LDH) activity in cultured B16/F10 melanoma cells increased by nickel sulfate(NiSO<sub>4</sub>).

Persimmon leaves extract(μg·mL <sup>-1</sup> )	LDH activity(unit/min/g)	
	Mean±SD	(% of control)
Control	0.027±0.005	100
XTT <sub>50</sub> (NiSO <sub>4</sub> )	0.029±0.008	107.4
15	0.026±0.007	96.3
25	0.025±0.003	92.6

**Table 5.** The effect of persimmon leaves extract on the decrease of tyrosinase activity in cultured B16/F10 melanoma cells increased by nickel sulfate(NiSO<sub>4</sub>).

Persimmon leaves extract(μg·mL <sup>-1</sup> )	Tyrosinase activity(490nm)	
	Mean±SD	(% of control)
Control	0.025±0.004	100
XTT <sub>50</sub> (NiSO <sub>4</sub> )	0.050±0.007	200.0 <sup>***</sup>
15	0.035±0.003	140.0 <sup>**</sup>
25	0.020±0.005	80.0 <sup>*</sup>

<sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup>, <sup>\*\*\*</sup> Significant at *P*<0.05 or *P*<0.01 or *P*<0.001, respectively.

#### 6. 감잎 추출물이 총멜라닌양에 미치는 영향

감잎 추출물 시료가 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 시료를 전처리한 농도 중 15μg·mL<sup>-1</sup>와 25μg·mL<sup>-1</sup>에 대한 총멜라닌양을 측정하였다. NiSO<sub>4</sub>만의 처리에서는 총멜라닌양이 106.6%(0.0386)로 대조군인 100%(0.0362)보다 약간 증가한 것으로 나타났다. 한편, 15μg·mL<sup>-1</sup> 전처리에서는 총멜라닌양이 92.8%(0.0336)로, NiSO<sub>4</sub>만의 처리에 비하여 약간 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다. 반면, 25μg·mL<sup>-1</sup>의 추출물 처리에서는 74.6%(0.0270)로 이는 NiSO<sub>4</sub>만의 처리에 비하여 매우 유의한 감소를 나타냈다(*P*<0.001)(Table 6). 본 연구 결과는 감잎 추출물이 티로시나제의 활성을 억제함으로써 멜라닌 합성을 저해한 것으로서 이는 앞서 행한 본 연구의 티로시나제의 활성과도 일치함을 알 수 있었다. 다시 말해 이같은 결과는 감잎 추출물이 NiSO<sub>4</sub>에 의한 멜라닌화를 효과적으로 방어하였음을 말해주고 있다.

멜라닌화의 원인에는 여러 요인이 있겠지만 그 중 중요한 요인의 하나로서 산화적 손상이 관여하고 있다고 알려져 있다. 즉, 산화적 손상은 멜라닌세포로 하여금 멜라닌합성 및 티로시나제의 과활성을 유도함으로써 멜라닌화를 촉진시킨다는 것이다(Kang et al., 2007). 그러나, 감잎 추출물과 같은 천연성분들에 대한 생리활성에 대한 더욱 자세한 기전 규명을 위해서는 각 구성성분에 대한 자세한 생리활성 분석은 물론, 세포수용체나 신호전달체와의 상호작용 현상에 대한 체계적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

**Table 6.** The effect of persimmon leaves extract on the decrease of total amount of melanin in cultured B16/F10 melanoma cells increased by nickel sulfate(NiSO<sub>4</sub>).

Persimmon leaves extract (μg·mL <sup>-1</sup> )	Total amount of melanin(405nm)	
	Mean±SD	(% of control)
Control	0.0362±0.005	100
XTT <sub>50</sub> (NiSO <sub>4</sub> )	0.0386±0.007	106.6
15	0.0336±0.003	92.8
25	0.0270±0.004	74.6*

\*Significant at  $P<0.05$ .

#### IV. 적요

환경오염원이면서 알레르기성 접촉피부염 유발제인 NiSO<sub>4</sub>의 세포독성과 멜라닌합성에 대한 감잎 추출물의 영향을 배양 B16/F10 흑색종세포를 재료로 하여 조사하였다. 또한, 감잎 추출물의 항산화능을 lactate dehydrogenase(LDH) 활성에 의하여 조사하였다. 본 연구에서 NiSO<sub>4</sub>는 배양 B16/F10 흑색종세포에 처리한 농도에 비례하여 세포생존율을 유의하게 감소시켰으며 ( $P<0.001$ ), 이 때 XTT<sub>50</sub>값은 106.7μM로 중간독성인 것으로 나타났다. 또한, 항산화제인 비타민 E는 NiSO<sub>4</sub>에 의하여 감소된 세포생존율을 유의하게 증가시킴으로서 NiSO<sub>4</sub>의 세포독성을 방어하였다( $P<0.001$ ). 한편, NiSO<sub>4</sub>의 세포독성에 대한 감잎 추출물의 영향에 있어서, 감잎 추출물은 NiSO<sub>4</sub>만의 처리에 비하여 유의한 세포생존율의 증가 및 LDH 활성 감소를 보임으로서 항산화능을 나타냈다. 멜라닌화에 있어서, 감잎 추출물은 NiSO<sub>4</sub>에 의하여 증가된 티로시나제(tyrosinase) 활성과 총멜라닌양을 모두 유의하게 감소시켰다( $P<0.001$ ). 이상의 결과로부터 NiSO<sub>4</sub>의 세포독성에 산화적 손상이 관여하고 있으며, 감잎 추출물은 항산화능에 의하여 NiSO<sub>4</sub>의 세포독성을 효과적으로 방어하였다. 또한 감잎 추출물은 티로시나제 활성과 총멜라닌양을 유의하게 감소시킴으로서 NiSO<sub>4</sub>에 의한 멜라닌화를 효과적으로 방어하였다. 따라서, 감잎과 같은 천연추출성분은 NiSO<sub>4</sub>처럼 산화적 손상과 관련이 있는 중금속의 독성으로부터의 미백 및 항독을 위한 천연소재로서의 개발적 가치가 크다고 생각된다.

#### V. References

Ann, H.C., K.B. Kwon, E.Y. Park, S.H. Jang, and D.G. Ryu. 2002. Effects of Guarhaebaekbanhatang extract on beating rate and LDH activity in cultured rat myocardial cells. *Kor. Ori. Physiol. & Pathol.* 16:289-295.

Borenfreund, E. and J.A. Puerner. 1984. A simple quantitative

procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J. Tiss. Cult. Meth.* 9:7-9.

Chen, C.Y. and T.H. Lin. 2001. Effects of nickel chloride on human platelets: enhancement of lipid peroxidation, inhibition of aggregation and interaction with ascorbic acids. *J. Toxicol. Environ. Health* 62:431-438.

Choi, Y.S., S.J. Kim, M.O. Jeon, Y.W. Ryu, Y.S. Rim, and I.J. Jung. 2011. Antioxidative and detoxic effects of *Salicornia herbacea* L. extract in cultured human skin fibroblast damaged by hydrogen peroxide. *J. Invest. Cosmetol.* 7(4):389-396.

Choi, S.W., W.W. Kang, S.K. Chung, and S.H. Choon. 1996. Antioxidative activity of flavonoids in persimmon leaves. *Food Biotechnol.* 5:119-123.

Choi, B.W., B.H. Lee, K.J. Kang, E.S. Lee, and N.H. Lee. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* 29:237-243.

Counts, A.L., M.A. Miller, M.L. Khakhria, and S. Strange. 2002. Nickel allergy associated with a transpalatal arch appliance. *J. Orofac. Orthop.* 63:509-515.

Ha, D.H., J.K. Lee, and Y.S. Choi. 2008. Effect of persimmon leaves extract on the melanogenesis and cell viability in cultured melanoma cells injured by reactive oxygen species. *Kor. J. Orien. Physiol. Pathol.* 22(5):1304-1308.

Hosoi J., T. Abe, T. Suda, and T. Kuroki. 1985. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 45:1474-1478, 1985.

Jarvis, J.K. and K. Neville. 2000. Antioxidant vitamins: current and future directions. *Nutr. Today* 35:214-221.

Jin, T. and G.F. Nordberg. 1983. Cadmium toxicity in kidney cells. Resistance induced by short term pretreatment in vitro and in vivo. *Acta. Pharmacol. Toxicol.* 58:137-143.

Kang, J.R., J.Y. Lee, and W.K. Whang. 2007. Antioxidant activity and tyrosinase inhibitory activity of *Elscholtzia splendense*. *J. Kor. Soc. Cosm.* 13:163-170.

Kim, J.N., K.Y. Kim, Y.K. Roh, and S.W. Choi. 1997. Antioxidative substances and their changes in the leaves of persimmon(*Diospyros kaki*) during growth. *Kor. J. PostHarvest Sci. Technol. Agri. Prod.* 4:323-330.

Kim, K.S., H.J. Lee, and M.K. Kim. 2001. Effect of water and ethanol extracts of persimmon leaf and green tea different conditions on lipid metabolism and antioxidative capacity in 12-month-old rats. *Kor. Nutr. Soci.* 34:499-512.

Kuwata, T., M. Kitagawa, and T. Kasuga. 1993. Proliferative activity of primary cutaneous melanocytic tumor. *Virchows Archiv. Pathol. Anat.* 423:359-367.

Lee, H.J., B.J. Lee, D.S. Lee, and Y.W. Seo. 2003. DPPH radical scavenging effect and in vitro lipid peroxidation inhibition by *Portulaca oleracea*. *Kor. J. Biotechnol. Bioengineering* 18:165-169.

Lee, J.K., W.W. Yu, and H.O. Yang. 2012. Protective effect of *Perilla silkokiana* Nakai extract on nickel, allergen of contact dermatitis in cultured human skin fibroblasts. *Kor. J. Aesthe. Cosmetolo.* 10(4):857-862.

- Li, Y.L., G.P. Gan, H.Z. Zhang, H.Z. Wu, C.L. Li, Y.P. Huang, Y.W. Liu, and J.W. Liu. 2007. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome in vitro anticancer cell lines. *J. Ethnopharmacol.* 113(1):115-124.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin-protein reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-271.
- Ma, J., X.D. Luo, P. Protiva, H. Tang, C. Ma, M.J. Basile, I.B. Weinstein, and E.J. Kennelly. 2003. Bioactive novel polyphenols from the fruit of *Manikara zapota*(sapodolla). *J. Nat. Prod.* 66(7):983-986.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
- Oh, H.M. 2001. Effect of dried leaf powders, water and ethanol extracts of persimmon and green tea on lipid metabolism and antioxidative capacity in 12-month-old rats. MS thesis, Ewha Womans University, Seoul.
- Ozdil, S., R. Yanardag, M. Koyuturk, S. Bolkem, and S. Arbak. 2004. Protective effects of ascorbic acid, di- $\alpha$  tocopherol acetate, and sodium selenate on ethanol-induced gastric mucosal injury of rats. *Bio. Trace Elem. Res.* 99(1):173-190.
- Park, S.T., K.T. Lim, Y.T. Chung, and S.U. Kim. 1996. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by anti-oxidants and NMDA receptor antagonist. *Neurotoxicol.* 17:37-46.
- Song, H.S., H.K. Lee, H.D. Jang, M. Lee, and M.H. Kang. 1996. Antimutagenic effect of persimmon leaf tea extracts in sister chromatid exchange(SCE) assay system. *J. Kor. Sco. Food Nutr.* 25:232-239.
- Son, Y.W., S.K. Oh, Y.R. Choi, S.H. Park, Y.M. Seo, H.J. Lee, and I.J. Jung. 2013. Effects of Chelidonium majus extract on mercury-induced cytotoxicity and melanogenesis. *J. Invest. Cosmetol.* 9(3):229-235.
- Son, Y.W., Y.S. Rim, Y.W. Yu, and I.J. Jung. 2012. Effect of persimmon leaves extract on the cytotoxicity induced by cadmium of hair dye component. *J. Invest. Cosmetol.* 8(1):9-15.