

Antimelanogenic Effect of *Ligularia fischeri*, *Solidago virga-aurea*, *Aruncus dioicus* Extracts from *Ullung* Island in Murine Melanoma CellsDong-Hee Kim<sup>1,2</sup>, Bong-Jeun An<sup>2</sup>, Se-Gie Kim<sup>3</sup>, Tae-Soon Park<sup>1</sup>, Gun-Hye Park<sup>2</sup> and Jun-Ho Son<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Daegu Gyeongbuk Institute for Oriental Medicine Industry, 712-260, Korea<sup>2</sup>Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University, Gyeongbuk, 712-715, Korea<sup>3</sup>Lejiham Cosmetics Co, Ltd, Gyeongbuk, 712-715, Korea

Received November 5, 2010 / Accepted November 25, 2010

The objective of the present study was to evaluate the skin whitening effect of the extracts of 3 herbs, *Ligularia fischeri*, *Solidago virga-aurea* and *Aruncus dioicus*, which were collected from *Ullung* island. Tyrosinase inhibition activities were 33% in pre-fermented extracts and 45% in post-fermented ones. When tyrosinase activities in B16F10 murine melanoma cells were tested, activities in pre- and post-fermented extracts were 41 and 56.5%, respectively. Thus, the post-fermented extracts might have greater skin whitening effects. The protein expression of MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase, which are all skin-whitening related transcription factors, showed that both pre- and post-fermented herbs inhibited protein biosynthesis in B16F10 melanoma cells. Post-fermented herb extracts especially showed a greater decrease of protein expressions. The expression of MITF, a regulatory transcription factor, was also decreased by both extracts but was greater in the post-fermented ones. From the results, it can be concluded that the 3 herb extracts from *Ullung* island may inhibit melanin biosynthesis by the suppression of MITF activity in a signaling pathway. Results indicate that the post-fermented herbs tested in the present study had skin whitening activities and can be used as functional ingredients for food and cosmetic compositions.

**Key words** : Tyrosinase, MITF, *Ligularia fischeri*, *Solidago virga-aurea*, *Aruncus dioicus*

## 서 론

자외선이나 환경오염 그 밖의 요인의 자극에 대해 피부세포는 방어 기전으로 포유동물의 표피 기저층에 존재하는 melanocyte의 melanosome에서 멜라닌을 생성한다. 멜라닌은 피부표피의 기저층에 위치한 멜라노사이트 내 소기관인 멜라노솜에서 tyrosine이 tyrosinase 효소에 의해 합성된다. 잘 알려진 효소로는 tyrosinase 외에도 tyrosinase related protein-1 (TRP-1)과 dopachrome tautomerase (DCT) 등이 있다. 이 중에서 tyrosinase는 melanogenesis의 속도 결정 단계인 초기 반응에 작용하는 효소로서, tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPA quinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다. TRP-1은 mouse에서 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)를 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화하는 효소이다. 그러나 human TRP-1은 이러한 활성이 없는 것으로 보고되었다[1]. DCT는 초기에 tyrosinase-related protein-2 (TRP-2)로 불렸던 효소로서 dopachrome을 DHICA로 이성화하는 효소이다. 그 중 tyrosinase 효소는 eumelanin과 pheomelanin의 합성에 절대적

으로 필요하며, TRP-1과 DCT는 eumelanin의 합성에 더 깊이 관여 하는 것으로 알려져 있다[5,9,23].

UV (Ultraviolet; 자외선)에 의한 피부 손상이나 노화 또는 발암으로부터 신체를 보호하기 위한 멜라닌의 생성은 색소의 합성이나 분포의 기능에 장애가 있을 경우 다양한 피부 질환을 유발하게 되며, 과도한 색소의 침착은 흑색종, 주근깨, 노인성 검버섯 등을 생성시킨다. 최근에 사람들의 미적 욕구와 건강에 대한 관심이 증가하면서 화장품업계에서는 멜라닌의 생성을 억제하는 기능성화장품의 개발에 대한 관심이 점점 높아지고 있다[4,7].

현재 의학계나 화장품업계에서는 멜라닌 과잉 생성을 억제하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있으며, 지금까지 알려진 tyrosinase의 저해제로 hydroquinone, 4-hydroxyanisole, ascorbic acid, kojic acid, azelaic acid 등이 있으나, 피부 안전성, 제형 안정성 등의 문제로 제한된 양만 사용되고 있다[6-8]. 이에 따라 세포독성이 적으면서 멜라닌 합성을 감소시키고 동시에 non-mutagenic한 미백제를 찾기 위한 연구가 진행되고 있으며, 특히 천연물질이 날로 각광받고 있다.

울릉도 특산 약용 작물인 곰취(*Ligularia fischeri*) 항염증작용에 의하여 폐장의 화농성 염증, 관절염 등 여러 가지 염증에 효과를 나타낸다. 곰취의 생장점이 되는 어린잎에는 다른 식물에 비해 비타민 C가 아주 풍부하다. 충분한 비타민 C의 섭취는 감기 예방에 효과적이며, 곰취의 풍부한 비타민 C의 함유와

**\*Corresponding author**

Tel : +82-53-810-0320, Fax : +82-53-801-9896

E-mail : bio115@dogm.re.kr

높은 레티놀 함량으로 인해 미백에도 효과가 탁월한 것이 밝혀져있다[11]. 미역취(*Solidago virga-aurae*)는 caffeic acid, rutin, astragaloside, chlorogenic, quercetin, tannin, saponin, flavonoid 등 특수 성분이 함유되어 있어 항균, 항암, 항산화 효과가 있으며, 세포재생의 기능이 있어 건선피부에 미역취 달인물로 환부를 자주 씻으면 효험이 있다[10,14,22]. 삼나무(*Aruncus dioicus*) 또한 사포닌, 살리실알데히드, 스펀린, 인회분, 지질, 비타민 A, 칼슘 등이 함유되어 있으며, 기능성 물질인 flavonoid 및 polyphenol 등이 있어 유해 산소를 막아주는 항산화, 항암, 면역증진, 간 기능 강화 등에 효과가 있다[17,21]. 이와 같이 다양한 약리작용을 지니고 있는 울릉도 특산 약용작물을 이용한 미백연구에 대한보고 예는 아직 없다.

또한 유산균을 이용한 유산 발효를 하여 제품의 부패를 방지하고 bacteriocin과 같은 항균물질을 분비하여 균을 억제하며 부패세균의 증식을 억제하는 등의 효과를 가지는 미생물로 알려져 있기에 독성 성분들을 분해 및 변화시켜 그 독성을 최소화하여 적은 양으로도 큰 효능을 발휘할 수 있다. 이에 본 연구에서는 다양한 생리활성을 지니는 울릉도 특산약용작물의 용매 추출물(LSA-A)과 유산균을 접종하여 발효 추출물(FA)에 의한 tyrosinase 활성 및 멜라닌 형성 저해 효과, melanogenesis 관련 효소 발현양의 변화 등을 측정하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료 및 시약

본 실험에 사용한 울릉도 특산 약용 작물(*Ligularia fischeri*, *Solidago virga-aurae*, *Aruncus dioicus*)은 울릉웰빙식품에서 구입하여 사용하였고, 발효에 사용된 균인 bifidobacterium bifidum은 Korean cell line Bank (KCLB)에서 구입하였다. 추출 및 발효에 사용된 acetone은 국산 일급 시약을 구입하였다. Tyrosinase 효소 활성 저해 실험을 위하여 사용된 mushroom tyrosinase, tyrosine과 dimethyl sulfoxide (DMSO), L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT), lipopolysaccharide (LPS) 는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포배양을 위해 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, trypsin 250, 0.4% trypan blue stain은 Gibco BRL Co. (Grand Island, USA) 에서 구입하여 사용하였으며 MIF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase primary antibody와 mouse-anti-goat, rabbit-anti-mouse 등 secondary antibody는 Santacruz (CA, USA)에서 구입하였다. 그 외 각종 시약은 특급 시약을 사용하였다.

#### 시료 추출 및 발효

시료의 추출과 발효는 Fig. 1과 같이 추출하였다. 시료 100

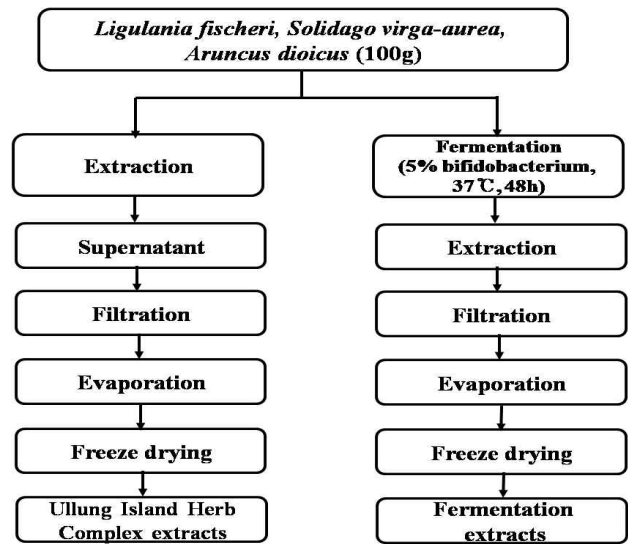


Fig. 1. The procedure for extraction from *Ligularia fischeri*, *Solidago virga-aurae* and *Aruncus dioicus*.

g을 실온에서 24시간 침지하여 상층액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였으며, 발효는 시료 100 g에 37°C의 증류수를 시료가 잠길 정도로만 넣은 뒤, 전체 양의 5%의 균을 접종하여 교반 시켰다. 37°C에서 48시간 동안 발효를 시킨 뒤 상층액과 발효된 시료를 따로 분리 하여 발효된 시료는 다시 추출을 하였다. 울릉도 곰취, 미역취, 삼나무의 발효 전 복합 추출물 24.3 g을 얻었으며 곰취, 미역취, 삼나무의 발효 후 각 추출물 27.9 g을 얻었다. 추출물은 원심 분리 및 여과, 농축 후 동결건조하여 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

#### Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등[24]의 방법으로 측정하였다. 반응구는 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5 ml에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.2 ml 및 시료용액 0.1 ml의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/ml) 0.2 ml을 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

#### 세포배양

본 실험에 이용한 각 세포의 배양은 10% FBS과 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 적응시켜 계대 배양하였다. 마우스 흑색 세포(B16F10)에 시료용액의 여러 농도(1, 10, 100, 1,000 ug/ml)를 처리하고 48시간 배양

하였다.

#### MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael 등[3]의 방법에 따라 측정하였다. B16F10을 96 well plate에  $5 \times 10^4$  cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 시료를 농도 별로 조제하여 0.02 ml 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well 당 DMSO 0.15 ml를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

#### 마우스 흑색 세포(B16F10)에서의 melanin 생합성 저해율 측정

피부 멜라노마 세포로부터의 tyrosinase 활성 측정은 Matinez-Esparza 등[19]의 방법에 따라 측정하였다. DMEM 배지로 배양된 멜라노마 세포를 100 mm culture dish에  $2 \times 10^6$  cell/dish가 되게 분주하고 24시간 배양 후 시료를 농도별로 조제하여 2 ml 첨가하고, 48시간 후에 인산완충액(pH 7.4)으로 세척하였다. Lysis buffer를 200 ul씩 분주한 후 세포를 수거하여 얼음에서 30분간 lysis 시켰다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

#### Western blot을 이용한 MITF, TRP1, TRP2, tyrosinase 활성 측정

미백 관련 mechanism인 MITF, TRP1, TRP2, tyrosinase 활성을 보기 위하여 B16F10 cell suspension을 100 mm culture dish에 각 well당  $2 \times 10^4$  cells/ml cell로 가한 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화 시켰다. 배지를 제거한 후 울릉도 추출물, 발효 상등액, 발효 후 추출물을 농도별(10, 100 ug/ml)로 처리한 배지로 48시간 배양한 후 또 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척해주었다. lysis buffer 100 ul로 용해해서 4°C 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리 하여 상층액을 모은다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 Bradford assay로 정량 하여 20 ul의 단백질을 10%의 SDS-polyacrylamide에 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer cell (Bio Rad)를 이용하여 PVDF membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 incubation 시켰다. 10분 간격으로 TBST로 3회 washing하고 MITF (1:1,000), TRP-1 (1:1,000), TRP-2 (1:1,000), tyrosinase (1:1,000),  $\beta$ -actin

(1:1,000) 1차 항체를 희석하여 4°C에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 washing 하고 mouse anti-rabbit IgG HRP, bovine anti-goat IgG HRP의 각각의 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 3회 washing한 뒤 암실에서 chemiluminescence ECL kit (Amersham Pharmacia, Biotech)용액으로 반응시키고 LAS4000 image analyzer (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)을 이용하여 밴드를 확인하여 density를 측정하였다.

#### 통계방법

실험결과는 평균 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 이용하였다.

## 결과 및 고찰

#### Tyrosinase 저해 활성 확인

피부 내에서 멜라닌 중합체 생합성을 효과적으로 저해할 수 있는 tyrosinase 저해활성을 측정하기 위하여 mushroom 아래의 tyrosinase 저해 활성 측정 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 울릉도 곰취, 미역취, 삼나무 발효 전 복합 추출물 및 *Bifidobacterium bifidum*을 이용한 곰취, 미역취, 삼나무 발효 후 추출물의 경우 1,000 ug/ml에서 각각 복합 추출물은 33% 저해율, 발효 후 추출물은 45%의 저해율을 나타내었다. Tyrosinase의 저해 활성 또한 발효 후 추출물이 발효 전보다 높은 효능을 나타냄을 확인 할 수 있었다. 이는 Jung 등[13]의 토사자, 숙지황, 오가피 추출물 1,000 ug/ml에서 30.0% 미만의 tyrosinase 저해능, An 등[2]의 진달래꽃 추출물의

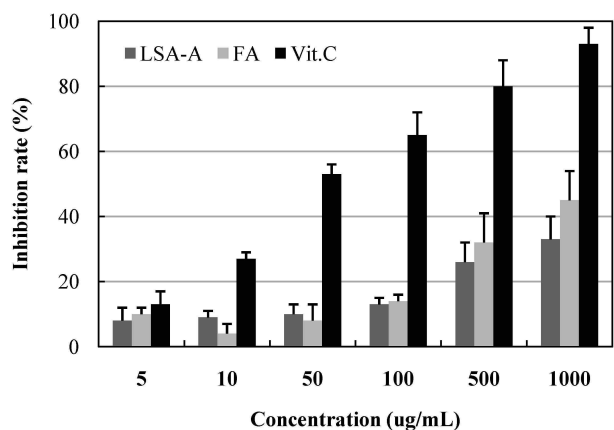


Fig. 2. Tyrosinase inhibition rate of extracts isolated from LSA-A and FA. LSA: Endemic plant (*Ligularia fischeri*, *Solidago virga-aurea* L. var. *asiatica* Nak, *Aruncus dioicus* var.) in ul-lung island extracted with acetone, FA: Extracted after Fermentation Results were expressed as % control and data were mean  $\pm$  S.E. of at least five determinations.

tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 열수 및 에탄올 추출물 1,000 ug/ml에서 각각 24.0, 48.0%의 저해를 나타낸 결과와 비교하였을때 발효 후 추출물의 활성이 우수함을 확인할 수 있었다. 또한 Kwak 등[17]의 싹 추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 10 mg/ml에서 hexane, chloroform 및 ethyl acetate로 분획한 추출물이 각각 55.8, 57.5, 60.2%의 효과를 나타내었다고 보고한 것과 비교하여, 발효 추출물의 tyrosinase 저해활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

울릉도 곰취, 미역취, 삼나물 발효 전 복합 추출물 및 *Bifidobacterium bifidum*을 이용한 곰취, 미역취, 삼나물 발효 후 추출물에 의한 melanoma 세포의 생존율을 확인한 결과를 Fig. 3과 같이 나타내었다. 발효 전 복합 추출물 및 발효 후 추출물 모두 1,000 ug/ml 이하에서 82%의 세포독성은 나타났지만, 그 수치가 미비해 영향을 적게 받는 것으로 나타났다. Han 등[8]이 보고한 전통 메주에서 분리한 단독균으로 제조한 메주 추출물의 혈액암세포에 대한 억제능을 보았을 때 21종의 추출물 중에서 가장 높은 저해능이 0.5 mg/ml의 농도에서 58.0%를 나타내었으며, Lee 등[18]이 보고한 국내산 백화사설초 전초와 뿌리의 항암효과에서 0.4 mg/ml의 농도에서 32.6, 37.0%를, Kim 등[15]이 보고한 구름버섯과 영지버섯의 항암효과를 측정된 결과 1 mg/ml의 농도에서 44.0, 62.0%의 암세포 증식억제효과를 나타내는 것으로 보아, 발효 전 복합 추출물 및 발효 후 추출물은 B16F10 세포에서 높은 생존율을 가지는 것을 확인 하였으며, 이하 모든 세포실험에서의 농도 설정은 1, 10, 100 ug/ml로 진행 하였다.

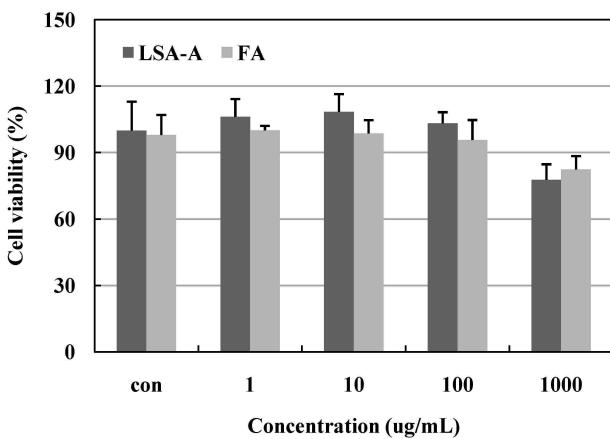


Fig. 3. Cell viability of ullung island extracts and fermentation extracts on melanoma cell (B16F10). LSA: Endemic plant (*Ligularia fischeri*, *solidago virga-aurea* L. var. *asiatica* Nakai, *Aruncus dioicus* var.) in ullung island extracted with acetone, FA: Extracted after Fermentation Results were expressed as % control and data were mean±S.E. of at least five determinations.

마우스 흑색 세포(B16F10)에서의 tyrosinase 활성 확인

멜라닌 세포에서 멜라닌을 합성하는 주요기전은 tyrosinase가 tyrosine을 기질로 하여 DOPA를 DOPA quinone으로 전환시키는 DOPA oxidase로서 멜라닌 합성의 처음 두 단계 반응을 촉매하면서 시작 된다 울릉도 곰취, 미역취, 삼나물 발효 전 복합 추출물 및 *Bifidobacterium bifidum*을 이용한 곰취, 미역취, 삼나물 발효 추출물을 천연 미백제로 사용하기 위하여 세포에서의 tyrosinase 활성을 측정된 결과 Fig. 4와 같이 나타내었다. 발효 전 복합 추출물의 경우 100 ug/ml에서 41.0%의 tyrosinase 활성 저해효과를 나타내었으며, 발효 후 추출물의 경우 100 ug/ml에서 56.5%의 tyrosinase 활성 저해효과를 나타내어 발효 후 추출물이 tyrosinase 활성 저해효과가 높은 것으로 나타났다. 이는 Park 등[20]의 삼백초 에탄올 추출물과 Chun 등[6]의 quercetin의 tyrosinase 활성 저해 효과와 비슷함을 확인 하였다. 결과적으로 발효 후 추출물이 tyrosinase의 활성을 직접적으로 저해함으로써 멜라닌 합성을 억제할 것으로 생각되어진다.

MITF, TRP1, TRP2, tyrosinase 활성 측정

울릉도 발효 전, 후 추출물이 melanin 합성에 관계된 효소인 tyrosinase에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16F10 세포에 울릉도 곰취, 미역취, 삼나물 발효 전 복합 추출물 및 *Bifidobacterium bifidum*을 이용한 곰취, 미역취, 삼나물 발효 추출물을 농도별로 10 ug/ml, 100 ug/ml 처리 한 후 48시간 뒤에 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase protein 발현을 western blotting으로 확인하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 housekeeping gene인 β-actin를

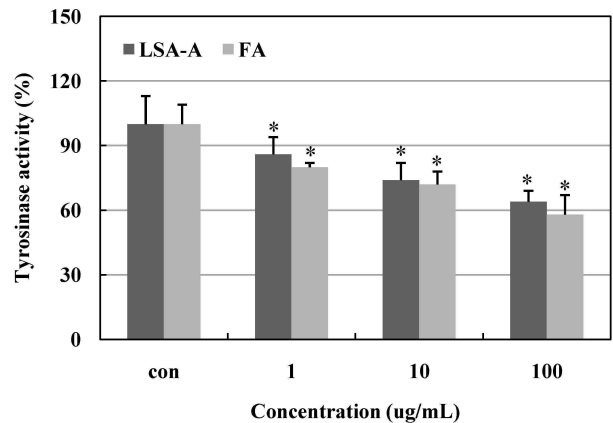


Fig. 4. Tyrosinase activity of ullung island extracts and fermentation extracts on melanoma cell (B16F10). LSA: Endemic plant (*Ligularia fischeri*, *solidago virga-aurea* L. var. *asiatica* Nakai, *Aruncus dioicus* var.) in ullung island extracted with acetone, FA: Extracted after Fermentation Results were expressed as % control and data were mean±S.E. of at least five determinations. Significantly different from control group (\*p<0.05).

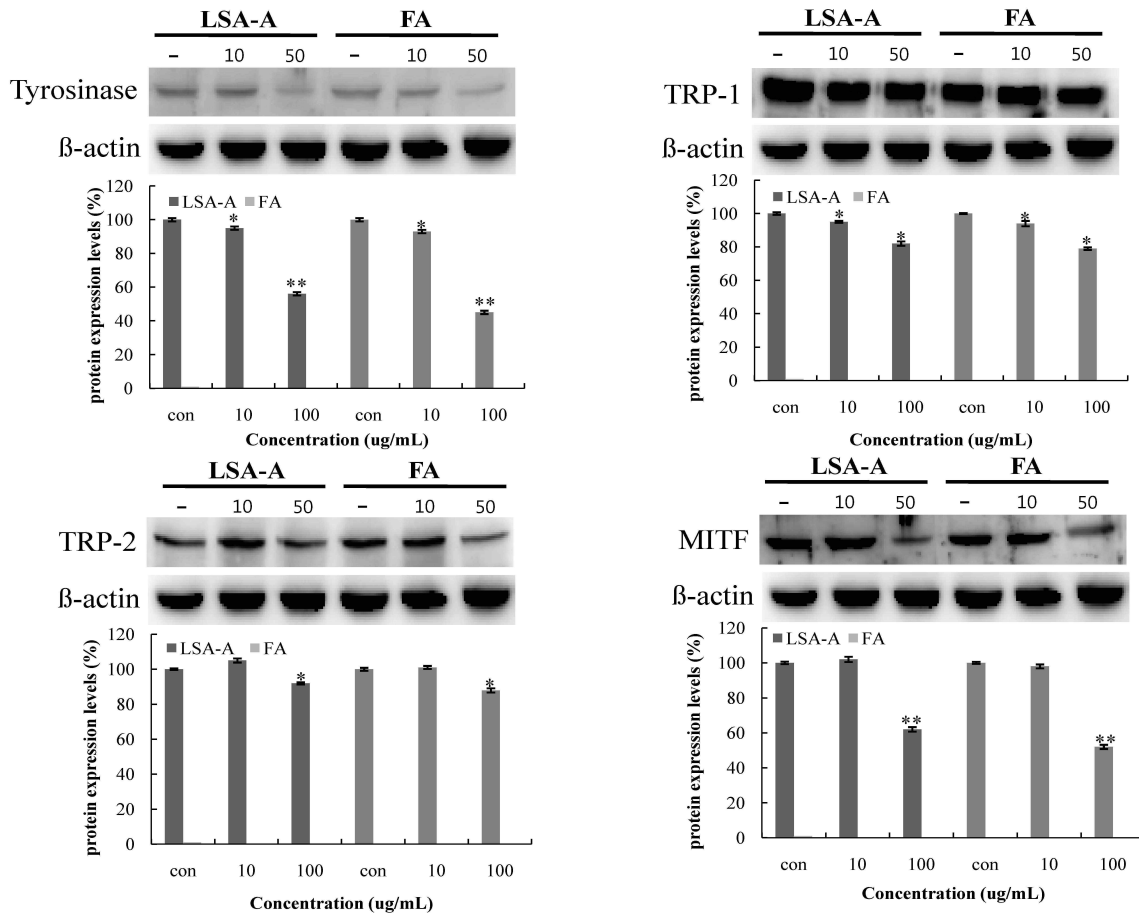


Fig. 5. Extracted of ullung island extracts and fermentation extracts caused a dose-dependent inhibition of whitening related protein B16F10 cells. After B16F10 cells ( $1 \times 10^6$  cells) were starved in serum free medium for 1h the cells were treated with 10, 100 ug/ml of LSA and FA extracts for 48h. Protein was detected by western blotting analysis with their antibodies, respectively. LSA: Endemic plant (*Ligularia fischeri*, *solidago virga-aurea* L. var. *asiatica* Nakl, *Aruncus dioicus* var.) in ullung island extracted with acetone, FA : Extracted after Fermentation Results were expressed as % control and data were mean  $\pm$  S.E. of at least five determinations. Significant as compared to control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

positive control로 사용하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 추출물을 처리 하지 않은 B16F10군에서는 각 전사인자의 단백질 발현이 증가 하였지만, 발효 전 복합 추출물 및 발효 추출물을 농도별로 10, 100 ug/ml를 처리한 B16F10군에서는 tyrosinase protein의 발현이 처리하지 않은 군보다 감소하였다. 특히, 발효 추출물의 경우 tyrosinase의 단백질 발현량이 50% 가까이 저해하였으며, TRP-1, TRP-2 또한 40% 가까이 저해 되었다. 또한 MITF의 경우 발효 전 복합 추출물의 경우 38% 저해율을 발효 추출물의 경우 42%의 저해율을 나타냄으로써 발효 추출물이 미백에 관련된 전사인자의 발현에도 효과가 있음을 알 수 있었다. Yang 등[25], Jo 등[12]은 tyrosinase, TRP-1 단백질 발현양은 감소 하였지만 TRP-2 단백질 발현양은 변화가 없었다고 보고 하였지만 본 실험에서는 울릉도 발효 전 후 추출물이 농도 의존적으로 TRP-2를 감소 시키는 효과를 나타냄을 관찰 할 수 있었다. 또한 MITF의 억제는 tyrosinase의 발현

억제를 통하여 melanin 생소 생성을 억제 할 수 있으며 MITF의 발현이 억제되면 색소 생성이 억제 될 수 있다. 본 실험에서도 울릉도 발효 전, 후 추출물이 대조군에 비하여 농도별로 MITF 발현을 감소 시키는 효과를 확인할 수 있었다. 이상의 결과, 울릉도 곰취, 미역취, 삼나물 복합 추출물 및 *Bifidobacterium bifidum*을 이용한 곰취, 미역취, 삼나물 발효 추출물은 멜라닌 합성에 직접적으로 관여하는 효소인 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 발현을 억제하고 melanocyte 세포 수준에서의 활성을 억제하여 melanin 합성을 억제하는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 울릉도 곰취, 미역취, 삼나물 혼합 추출 및 발효 하여 이들의 기능성 화장품 소재로서의 가치를 탐색 하고자 하여 미백 활성을 조사하였다. 미백 효과를 검증하기 위하여 효소실험을 하여 양성대조군과 비교한 실험에서도 울릉도 곰취, 미역취, 삼나물의 추출 전 후 추출물이 모두 효과가 있음을 밝힐 수가 있었으며 발효 후 추출물의 경우 발효 전보

다 효과가 상승함을 알 수 있었다. 또한 마우스 흑색 세포 종 cell line 인 B16F10 cell을 이용하여 추출물의 세포 독성 확인 및 melanin 생합성 검증, 멜라닌 생합성에 관련 되어 있는 전사 인자인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 단백질 발현을 측정 한 결과 효소 실험 결과와 일치함을 확인 할 수 있었다. 앞으로의 추가적인 연구로 울릉도 곰취, 미역취, 삼나무 추출물의 발효 전, 후 추출물의 정확한 미백 기전을 밝히기 위하여 멜라닌 생합성을 증가시키는 유전자 조절하는 인자들의 활성 검증 및 주름 개선 효과를 확인하여 미백과 주름 개선에 효과가 있는 기능성 소재로서의 연구가 뒷받침 되어야 할 것이다.

### References

- Sánchez-Ferrer, A., J. N. Rodríguez-Lopez, F. García-Cúnovas, and F. García-Carmona. 1995. Tyrosinase a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta* **1247**, 1-11.
- An, B. J., C. E. Lee, J. H. Son, J. Y. Lee, G. H. Choi, and T. S. Park. 2005. Antioxidant, anticancer and tyrosinase inhibition activities of extracts from *Rhododendron mucronulatum* T. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem* **48**, 280-284.
- Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* **47**, 936-942.
- Chakraborty, A. K., Y. Funasaka, M. Komoto, and M. Ichihashi. 1998. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res* **11**, 206-212.
- Choe, Y. S. 2006. The effect of Basic cosmetic ingredients on the melanogenesis in the B16F10 mouse melanocyte. Konkuk University, Seoul, Korea.
- Chun, H. J., W. H. Chli, S. H. Baek, and W. H. Woo. 2002. Effect of quercetin on melanogenesis in melan-a melanocyte Cells. *Korean J. Pharmacogn* **33**, 245-251.
- Curto, E. V., C. Kwong, H. Hermersdörfer, H. Glatt, C. Santis, V. Virador, V. J. Jr. Hearing, and T. P. Dooley. 1999. Inhibitors of mammalian melanocytes tyrosinase: *In vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochem Pharmacol* **57**, 663-672.
- Han, J., H. J. Kim, S. S. Lee, and I. S. Lee. 1999. Inhibitive effects of meju extracts made with a single inoculum of the fungi isolated from the traditional meju on the human leukemia cell line. *Korean J. Mycol* **27**, 312-317.
- Hearing, V. J. 1999. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Dermatol* **4**, 24-28.
- <http://blog.naver.com/linkmoon.do?Redirect=Log&logNo=1>.
- Hwang, B. Y., J. H. Lee, T. H. Koo, H. S. Kim, Y. S. Hong, J. S. Ro, K. S. Lee, and J. J. Lee. 2002. Furanoligularenone, an eremophilane form *Ligularia fischeri*, inhibits the LPS-induced production of nitric oxide and prostaglandin E2 in macrophage Raw264.7. *Planta Med* **68**, 101-105.
- Jo, M. G. 2005. Inhibitory Effect of the methanol extract of *Fructus Forsythiae* on the melanogenesis in human melanoma cells. Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University. Iksan Chonbuk, Korea.
- Jung, S. W., N. K. Lee, S. J. Kim, and D. S. Han. 1995. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Technol* **27**, 891-896.
- Kim, T. J. 1997. Flower growing in the wild flower of Korean. pp. 38, Kunkil media. Seoul, Korea.
- Kim, S. H., E. J. Cha, and Y. J. Hwang. 2004. Studies on antitumor activity and antimicrobial activity of *Coriolus Versicolor* (Fr.) *Qual* and *Ganoderma Lucidum* (Fr.) *Karst. Korean J. Human Ecology* **7**, 49-58.
- Kwak, J. H., U. K. Seo, and Y. H. Han. 2001. Inhibitory effect of Mugwort extracts on tyrosinase activity. *Korean J. Biotechnol. Bioeng* **16**, 220-223.
- Lee, C. B. 2003. Coloured flora of Korea. pp. 515-516, Hyangmoonsa, Seoul.
- Lee, H. J., E. O. Lee, Y. H. Lee, K. H. Kim, J. H. Lee, N. I. Baek, J. C. Ra, and S. H. Kim. 2004. Anti-tumor activity of Korean oldenlandiae Herba and Radix. *Korean J. Pharmacogn* **35**, 110-115.
- Martinez-Esparza, M., D. Jimenez-cervantes, F. Solano, and J. A. Lonzano. 1998. Garcia-Borrón J.C. mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem* **255**, 139-146.
- Park, D. J. and J. C. Lee. 2008. A study on the antioxidative and depigmentation activities of the ethanol extract of Saururus herba. *Lor. J. Herbology* **23**, 193-202.
- Shin, J. W., S. I. Lee, M. H. Woo, and S. D. Kim. 2008. Effect of ethanol extracts of goat's beard on streptozotocin Induced diabetic symptoms and oxidative stress in rats. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **18**, 939-948.
- Toshio, M., I. Yoshinori, and U. Akira. 1991. Studies on the constituents of *Solidago virga-aurea* L. I. structural elucidation of saponins in the herb. *Chem. Pharm. Bull* **39**, 2037-2042.
- Veronique, D. M. and B. Friedrich. 1996. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Letters* **381**, 165-168.
- Yagi, A., T. Kanbara, and N. Morinobu 1986. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Med* **3981**, 517-519.
- Yang, H. O., W. Y. Choi, B. H. Jeon, S. H. Baek, and H. J. Chun. 2002. Water extract from Cornis Fructus regulates melanogenesis in B16/F10 melanoma. *Korean J. Oriental Physiol. & Patol* **16**, 818-822.

초록 : 마우스 악성흑색종세포에서 울릉도 곰취, 미역취, 삼나무 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과

김동희<sup>1,2</sup> · 안봉진<sup>2</sup> · 김세기<sup>3</sup> · 박태순<sup>1</sup> · 박근혜<sup>2</sup> · 손준호<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>대구경북지방산업진흥원, <sup>2</sup>대구한의대학교 화장품약리학과, <sup>3</sup>이·지·함 화장품)

현재까지 많은 연구들은 멜라닌 합성과정의 기전을 규명하는데 초점이 맞춰졌으며 이러한 이유로 tyrosinase 저해제 개발에 집중되어 왔다. 이에 본 연구는 울릉도 곰취, 미역취, 삼나무 추출물을 이용하여 미백효과를 검증하였다. tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과 울릉도 곰취, 미역취, 삼나무 발효 전 추출물의 경우 33%, 발효 후 추출물의 경우 45% 저해율을 세포 내 tyrosinase 활성 확인 결과 울릉도 곰취, 미역취, 삼나무 발효 전 추출물이 41%, 발효 후 추출물은 56.5%의 활성 저해율을 관찰 할 수 있었으며, 발효 후 추출물이 발효를 하지 않은 추출물보다 미백 효과가 더 뛰어남을 확인할 수 있었다. 미백 관련 전사 인자인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 단백질 발현을 측정한 결과 발효 전 후 추출물은 B16F10 melanoma 세포에서 tyrosinase, TRP-1과 TRP-2의 단백질 생합성을 두 추출물 모두 억제하였지만, 특히 발효 후 추출물의 경우 단백질 발현량이 더 감소하였다. Tyrosinase, TRP-1과 TRP-2의 발현을 조절하는 전사인자로는 MITF가 관여하는 것으로 알려져 있으며, 실제로 MITF는 melanin생성과 관련된 여러 유전자의 발현을 조절하는데 중요한 작용을 하고 있다. 따라서 울릉도 발효 후 추출물이 melanin 생성과 관련된 중요한 세 가지 단백질의 생합성을 전사단계에서 조절 전사인자인 MITF의 작용에 대한 효과를 확인한 결과 울릉도 발효 후 추출물이 MITF의 단백질 발현을 울릉도 발효 전 추출물보다 생성을 억제하는 효과가 더 높음을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 미백 생합성에 있어서 상위 신호단계에 있는 전사인자 MITF의 활성을 억제함으로써 하위 신호전달 과정을 억제하는 것임을 알 수 있었다. 이상의 결과로 미루어 보아 발효 후 추출물의 미백효과가 있음을 확인할 수 있었으며 앞으로의 연구를 뒷받침 하여 기능성 소재 개발가능성을 제시하고 있다.