

구기자 및 구기엽 추출물의 피부과색소 조절효과

김동희¹ · 이수연² · 김남경³ · 윤보경³ · 정다솜³ · 최은영³ · 홍소리³ · 윤지영² · 강명화⁴ · 이진영^{2*}

¹(재)대구경북한방산업진흥원, ²호서대학교 한방화장품과학과, ³북자여자고등학교, ⁴호서대학교 식품영양학과

Moderating Effects of Skin Hyperpigmentation from *Lycii fructus* and *Lycii folium* Extracts

Dong-Hee Kim¹, Soo-Yeon Lee², Nam-Kyung Kim³, Bo-Kyung Youn³, Da-Som Jung³, Eun-Young Choi³, So-Ri Hong³, Ji-Young Yoon², Myung-Hwa Kang⁴, and Jin-Young Lee^{2*}

¹Daegu Gyeongbuk Institute for Oriental Medicine Industry, Gyeongbuk 712-260, Republic of Korea

²Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Chungnam 336-795, Republic of Korea

³Bokja Girl's High School, Chungnam 330-130, Republic of Korea

⁴Department of Food Science & Nutrition, Hoseo University, Chungnam 336-795, Republic of Korea

Received June 30, 2011; Accepted November 4, 2011

The objective of the present study was to evaluate the skin whitening effect of the extracts, *Lycii fructus* (LF), *Dry-L. folium* (DLF) and *Fresh-L. folium* (FLF). Tyrosinase inhibition activities was 44% in DLF ethanol extracts at a 500 µg/mL. When the tyrosinase activities in B16F10 murine melanoma cell were tested, the activities in DLF ethanol extracts was 14% at a 50 µg/mL concentration. The protein expression of microphthalmia-associated transcription factor, tyrosinase related protein 1 (TRP-1), TRP-2, and tyrosinase, which are all melanin related factors, showed that LF, DLF and FLF extracts inhibited the protein bio-synthesis in B16F10 melanoma cell. Especially the DLF extract showed greater decrease of protein expressions. Results indicate that the DLF extract tested in the present study had skin whitening activity and can be used as a function a ingredients for food and cosmetic compositions.

Key words: *Dry-Lycii folium*, *Fresh-L. folium*, *Lycii fructus*, microphthalmia-associated transcription factor, tyrosinase related protein 1 (TRP-1), TRP-2, tyrosinase

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 효소는 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-dihydroxyphenyl-alanine (DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPA quinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다. TRP-1

은 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[Alvaro 등, 1995; Veronique과 Friedrich, 1999]. DCT는 초기에 tyrosinase-related protein-2 (TRP-2)로 불렸던 효소로서 DOPA chrom을 DHICA로 이성화하는 효소이다. 그 중 tyrosinase 효소는 eumelanin과 pheomelanin의 합성에 절대적으로 필요하며, TRP-1과 DCT는 eumelanin의 합성에 더 깊이 관여 하는 것으로 알려져 있다[Hearing, 1999; Choe, 2006]. 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[Curto 1992; Chakraborty, 1998].

구기자나무(*Lycium chinense* Miller)는 가지과(Solanaceae)에

*Corresponding author

Phone: +82-41-540-9552, Fax: +82-41-540-9538

E-mail: jylee@hoseo.edu

<http://dx.doi.org/10.3839/jabc.2011.044>

속하는 낙엽덩굴성 관목으로 온대, 아열대 지역에 분포하고 있으며 우리나라를 비롯하여 중국 동북부, 대만, 일본 등지에서 재배 및 자생되고 있다. 그 뿌리를 지골피, 잎은 구기엽, 어린순은 천정초, 열매를 구기자(*Lycii fructus*)라 한다. 동의보감에서 구기자는 자양, 강장, 보혈, 지갈, 보정기 등에 효능이 있는 것으로 기술되어 있으며, 본초강목에는 구기자를 복용하면 근골을 단단하게 하며 몸이 가벼워져 늙지 않고 더위와 추위를 타지 않으며 독성이 없고 염증, 갈증을 수반하는 당뇨병이나 신경이 마비되는 질병에 좋다고 기록되어 있다[Park 등, 2005; 2006]. 구기자에는 *vetaine*과 *rutin*과 같은 기능성 성분이 다량 함유되어 있고, 항암효과, 면역증진, 간 기능 개선효과, 혈중 콜레스테롤 저하 등의 효능이 있다고 알려져 있으며, 구기자의 성분으로 열매에는 *carotenoid*, *cholin*, *meliscic acid*, *zeaxanthin*, *physalien* (*dipalmityl-zeaxanthin*), *betaine*, β -*sitosterol*, *vitamin B1*과 불포화 지방산이 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다[Park 등, 2002; Lee 등, 2008].

구기엽에는 *glutamic acid*, *proline*, *rutin*, *betaine*, *vitamin C* 등이 들어있다. *Betaine*은 구기엽에 10~20 mg/g 정도 함유되어 있으며, 숙취를 해소해주는데 탁월한 효능이 있다고 알려져 있다. 구기엽에 함유되어 있는 *rutin*은 최초로 메밀에서 분리되었으며 *rutin*의 주요 효능은 혈압억제, 혈당과 혈청 콜레스테롤 저하로 성인병 예방에 좋다고 알려져 있고 그 외 성분으로 *rutin*과 유사한 *flavonoid*계 화합물들이 지질대사 조절 능력과 항산화 활성이 강하다[Kim 등, 2008; Ahn과 Cho, 2011]. 따라서 본 연구에서는 피부흑화를 억제하여 미백효과를 얻을 수 있는 물질을 탐색하던 중 민간에서 한약재로 사용되어 지고 있는 구기자, 구기엽에서 미백효과를 가지는 물질이 있음을 확인하였고, 또한 제철 생구기엽의 활성이 건조된 구기엽에 비해 효능이 있는지 확인하고 화장품 마케팅 자료 및 기능성 화장품으로서의 산업화 가능성을 검토하기 위하여 두 가지를 추출하여 비교하였다.

재료 및 방법

재료 및 추출. 본 실험에서 사용한 구기자(*L. fructus*, LF), 건조구기엽(*Dry-L. foilum*, DLF), 생구기엽(*Fresh-L. folium*, FLF)은 충남 구기자 농업시험장에서 구입하여 분쇄 후 사용하였다. 열수 추출물의 경우, 구기자, 건조구기엽, 생구기엽 100 g에 10배 양의 증류수를 가하여 3시간 환류냉각 추출하여 상등액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하였고, 시료의 에탄올 추출은 시료 중량의 70% 에탄올 10배의 양을 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출 하였다. 각 추출물들은 원심분리 및 여과, 농축 후 동결 건조하여 냉동실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

시약. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)는 Sigma chemical Co. (St Louis, MO)에서 구입하였다. 세포배양을 위해 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, trypsin 250, 0.4% trypan blue stain은 hyclone 및 haema-

cytometer (Marienfeld, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase related protein 1 (TRP-1), TRP-2, tyrosinase primary antibody 와 mouse-anti-goat, rabbit-anti-mouse 등 secondary antibody는 Santacruz (Santacruz, CA)에서 구입하였다. 그 외 각종 시약은 특급 시약을 사용하였다.

세포배양. 본 실험에 이용한 각 세포의 배양은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가한 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 계대 배양하였다. Melanoma (B16F10) 세포에 시료용액의 여러 농도(1, 10, 100, 1000 µg/mL) 또는 양성 대조군을 1 시간 전 처리한 후 LPS (1 µg/mL)를 처리하고 24시간 배양하였다.

Tyrosinase 저해활성 측정. Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등[1986]의 방법에 따라 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.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정. 세포 생존율 측정은 Carmichael 등[1987]의 방법에 따라 측정하였다. 세포주 melanoma (B16F10)를 96 well plate에 5×10⁴ cells/well이 되게 0.18mL 분주하고, 시료를 농도 별로 조절하여 0.02 mL 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 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 well당 DMSO 0.15 mL를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 측정은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Cellular tyrosinase 저해활성 측정. Melanoma (B16F10) 세포를 각 culture dish에 가득 배양 한 후, 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 세척하였다. 각 dish에 lysis buffer (67 mM sodium phosphate buffer, 1% triton X-100, 0.1 mM phenylmethyl sulfonylfluoride)를 100 µL 첨가한 후 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고, 세포를 수집하여 ultrasonication 하였다. 이를 1시간 동안 방치한 후 13,200 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻어진 상층액을 효소용액으로 사용하였다. 이를 67 mM phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 8.0 mM의 L-DOPA 120 µL와 시료용액 40 µL을 96-well plate에 넣은 후, 67 mM phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 효소용액 40 µL을 첨가하여 37°C에서 30분간 배양한 후, 생성된 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정하였다.

Melanoma cell (B16F10)에서의 melanin 생합성 저해율 측정. 피부 멜라노마 세포로부터의 melanin 생합성 저해 측정은 Hosoi 등[1985]의 방법에 따라 측정하였다. DMEM 배지로 배양된 B16F10 세포를 100 mm culture dish에 1×10⁶ cell/dish

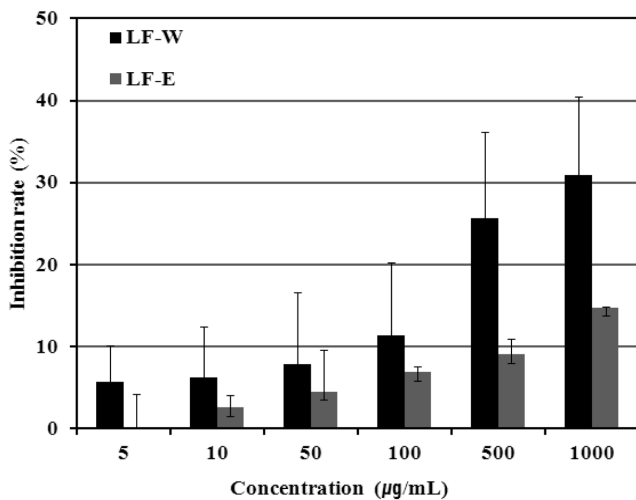


Fig. 1. Inhibition rate of *L. fructus* extract on tyrosinase. ■ LF-W: *L. fructus* extracted with water, ▒ LF-E: *L. fructus* extracted with ethanol. Result are means \pm SD of triplicate data.

가 되게 분주하고 24시간 배양 후 시료를 농도별로 조제하여 2 mL 첨가하고, 48시간 후에 인산완충액(pH 7.4)으로 세척하였다. 그 다음 0.25M trypsin-EDTA 용액으로 세포를 탈착한 후 수확한 세포를 1×10^6 세포 당 1 mL의 5% trichloroacetic acid (TCA)로 처리하고, 2,500 rpm으로 2회 원심분리한 후 분리된 melanin을 인산완충액으로 세척한 뒤 ether:ethanol (1:3) 1 mL를 가하여 2회 원심분리 한 후 ether 1 mL로 세척 건조시켰다. 건조된 melanin에 1 N NaOH를 1 mL 가하여 80°C에서 1시간 반응시킨 후 분광 광도계 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Melanin 생합성 저해는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

Western blot을 이용한 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 활성 측정. 미백 관련 mechanism인 MITF, TRP1, TRP2, tyrosinase활성을 보기 위하여 melanoma cell인 B16F10 cell suspension을 100 mm culture dish에 각 well당 2×10^4 cells/mL cell로 가한 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화시켰다. 배지를 제거한 후 구기자, 건조구기엽, 생구기엽 추출물을 각각 50 µg/mL로 처리한 배지로 24시간 배양한 후 또 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척해주었다. Lysis buffer 100 µL로 용해해서 4°C 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리 하여 상층액만을 모은다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 Bradford assay로 정량하여 20 µL의 단백질을 10%의 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide에 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer cell (Bio Rad, Hercules, CA)을 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer [5% skim milk in tris-buffered saline and tween 20 (TBST)]에서 배양시켰다. 10분 간격으로 TBST로 3회 washing하고 MITF (Santacruz, 1:1000), TRP-1 (Santacruz, 1:1000), TRP-2 (Santacruz, 1:1000), tyrosinase (Santacruz, 1:1000), β -actin (Santacruz 1:1000) 1차 항체를 희석하여 4°C에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고 mouse anti-rabbit IgG horse radish peroxidase

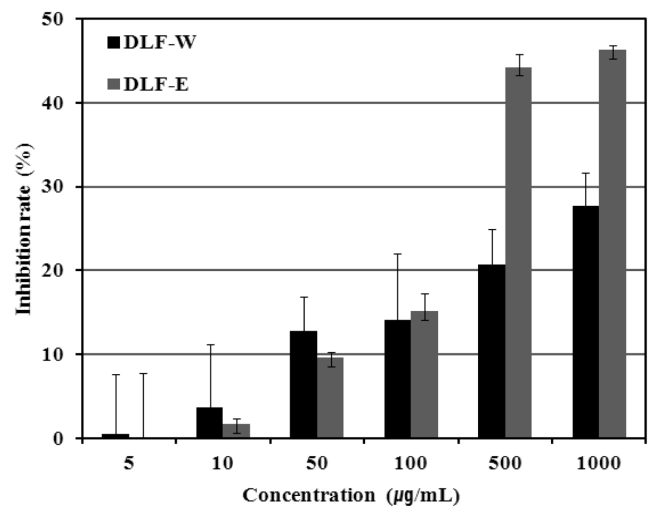


Fig. 2. Inhibition rate of Dry-*L. folium* extract on tyrosinase. ■ DLF-W: Dry-*L. folium* extracted with water, ▒ DLF-E: Dry-*L. folium* extracted with ethanol. Result are means \pm SD of triplicate data.

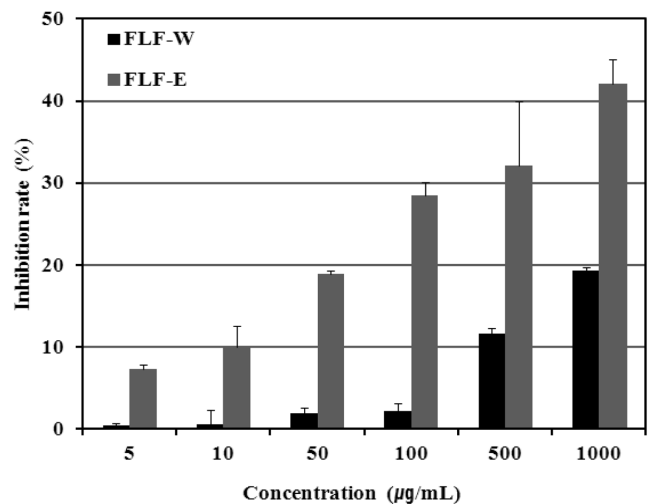


Fig. 3. Inhibition rate of Fresh-*L. folium* extract on tyrosinase. ■ FLF-W: Fresh-*L. folium* extracted with water, ▒ FLF-E: Fresh-*L. folium* extracted with ethanol. Result are means \pm SD of triplicate data.

(HRP), bovine anti-goat IgG HRP의 각각의 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 3회 washing한 뒤 암실에서 enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England)용액으로 반응시키고, LAS 4000 chemiluminescence detection system (Fuji, Tokyo, Japan)을 이용하여 밴드를 확인하여 density를 측정하였다.

결과 및 고찰

Tyrosinase 저해활성 확인. 구기자, 건조구기엽, 생구기엽의 tyrosinase저해활성을 측정한 결과 Fig. 1~3과 같이 나타내었다. 먼저 구기자의 tyrosinase 저해활성은 열수추출물 1,000 µg/mL에서 30.8%의 저해활성을 나타내었으며, 건조구기엽과 생구기엽의 에탄올추출물은 각각 46.2와 42.0%의 저해활성을 나타내

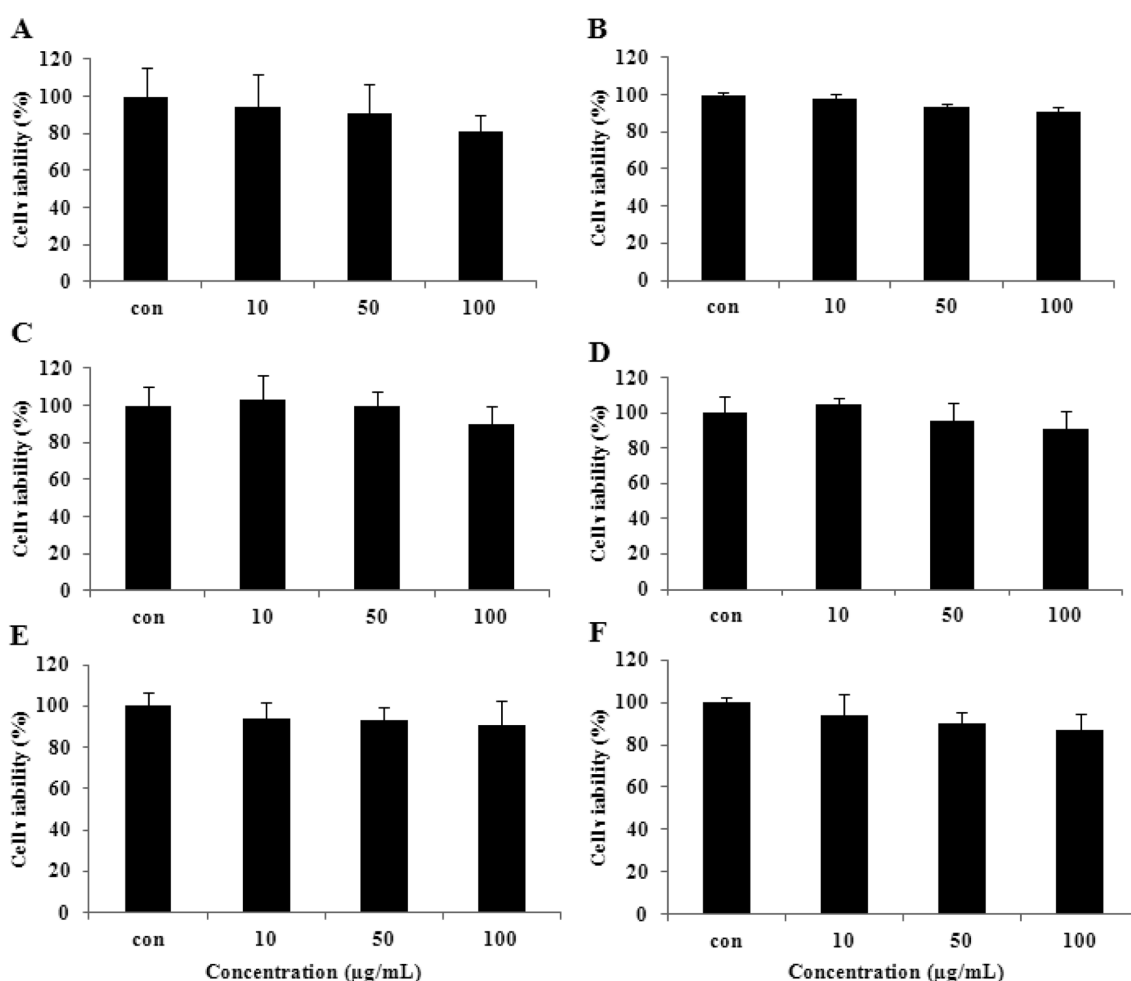


Fig. 4. Cell viability of *L. fructus*, Dry-*L. foitum* and Fresh-*L. foitum* extracts on melanoma cell (B16F10). Result are means \pm SD of triplicate data. (A) *L. fructus* extracted with water (B) *L. fructus* extracted with ethanol (C) Dry-*L. foitum* extracted with water (D) Dry-*L. foitum* extracted with ethanol (E) Fresh-*L. foitum* with water (F) Fresh-*L. foitum* with ethanol

어 건조구기엽 에탄올추출물의 활성이 가장 우수함을 확인할 수 있었다. 이는 Kim 등[2009]의 연구에서 생더덕과 발효더덕의 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 1,000 µg/mL에서 각각 26.9, 24.4%의 저해율을 나타낸 결과와, Kang 등[2008]의 연구에서 포공영과 대계근의 에틸아세테이트 분획물의 tyrosinase 저해활성을 측정된 결과 각각 20, 35%의 저해활성을 나타낸 결과와 비교해 볼 때 구기자, 건조구기엽, 생구기엽의 tyrosinase 저해활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정. 구기자, 건조구기엽, 생구기엽 추출물에 의한 melanoma 세포의 생존율을 확인한 결과를 Fig. 4와 같이 나타내었다. 구기자, 건조구기엽, 생구기엽의 경우 100 µg/mL 이하에서 약간의 세포독성은 나타났지만, 그 수치가 미비해 구기자, 건조구기엽, 생구기엽 추출물의 영향을 적게 받는 것으로 나타났다. Han 등[1999]이 보고한 전통 매주에서 분리한 단독균으로 제조한 매주 추출물의 혈액암세포에 대한 억제능을 보았을 때 21종의 추출물 중에서 가장 높은 저해능이 0.5 mg/mL의 농도에서 58.0%를 나타내는 것으로 보아, 구기자, 건조구기엽, 생구기엽 추출물은 B16F10 cell에서 높은 생존율을 가지는 것을 확인 하였으며, 이하 모든 세포실험

에서 구기자, 건조구기엽, 생구기엽 추출물의 농도 설정은 50 µg/mL로 진행 하였다.

Melanoma cell (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[Kwak 등, 2001]. 구기자, 건조구기엽, 생구기엽 추출물을 천연 미백제로 사용하기 위하여 세포에서의 tyrosinase 활성을 측정된 결과 Fig. 5와 같이 나타내었다. 구기자 물 추출물의 경우 50 µg/mL에서 2.0%의 tyrosinase 활성 저해 효과를 나타내었으며, 건조구기엽 에탄올 추출물의 경우 50 µg/mL에서 14%의 tyrosinase 활성 저해 효과를 나타내었다. 생구기엽 에탄올 추출물의 경우 5%의 저해율을 나타내었으며, 대조군인 알부틴의 경우 50 µg/mL의 농도에서 10% 저해효과를 나타내었다. 결과적으로 건조구기엽 에탄올 추출물이 tyrosinase의 활성을 직접적으로 저해함으로 멜라닌 합성을 억제한 것으로 생각되어 진다.

Melanoma cell (B16F10)에서의 melanin 함량 측정. 사람의 피부색을 결정하는 가장 중요한 요인인 멜라닌은 피부의 광노

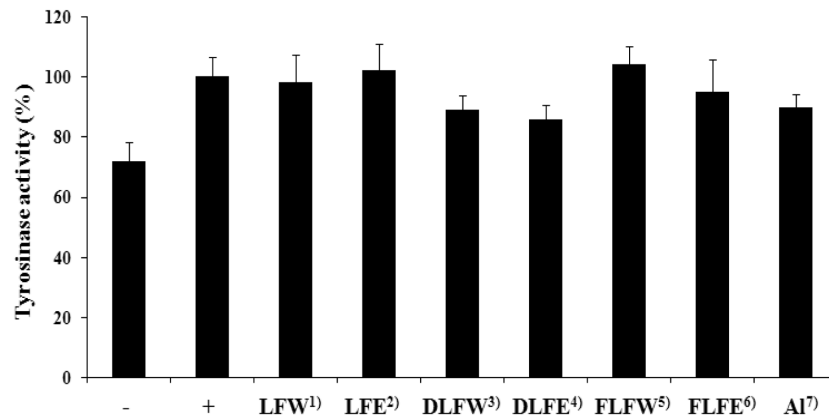


Fig. 5. Tyrosinase activity of *L. fructus*, Dry-*L. folium*, and Fresh-*L. folium* extracts on melanoma cell (B16F10). Result are means \pm SD of triplicate data.

¹⁾*L. fructus* extracted with water

²⁾*L. fructus* extracted with ethanol

³⁾Dry-*L. folium* extracted with water

⁴⁾Dry-*L. folium* extracted with ethanol

⁵⁾Fresh-*L. folium* with water

⁶⁾Fresh-*L. folium* with ethanol

⁷⁾Arbutin

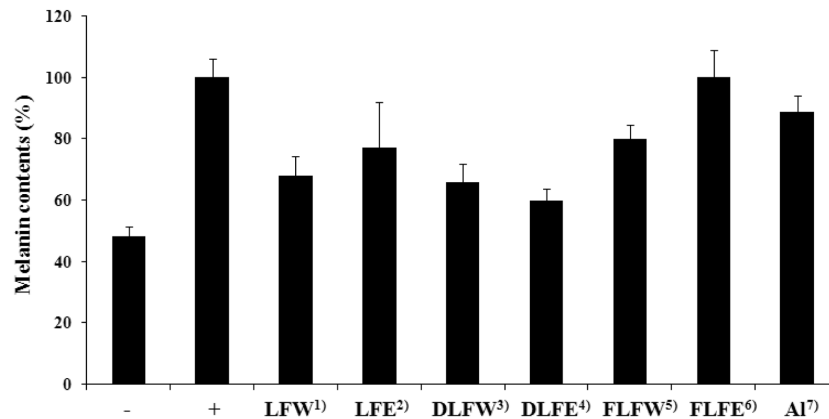


Fig. 6. Melanin contents of *L. fructus*, Dry-*L. folium*, and Fresh-*L. folium* extracts on melanoma cell (B16F10). Result are means \pm SD of triplicate data.

¹⁾*L. fructus* extracted with water

²⁾*L. fructus* extracted with ethanol

³⁾Dry-*L. folium* extracted with water

⁴⁾Dry-*L. folium* extracted with ethanol

⁵⁾Fresh-*L. folium* with water

⁶⁾Fresh-*L. folium* with ethanol

⁷⁾Arbutin

화나 일광각화증을 억제할 뿐만 아니라[Mishima 등, 1988; Akiu 등, 1991], 기미, 주근깨, 검버섯 등의 부분적인 과색소침착증(hyperpigmentation)을 일으키는 역할을 하고있다[Choi 등, 1998]. 멜라닌은 표피 기저층 melanocyte의 수지상 돌기를 통하여 주위의 keratinocyte로 전달되고, 피부의 각질층으로 이행한다[Yamamura 등, 2002]. 구기자, 건조구기엽, 생구기엽 추출물의 melanoma 세포에서의 melanin 생합성 저해효과를 측정 한 결과, 구기자 물 추출물의 경우 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 32.0%의 tyrosinase 활성 저해 효과를 나타내었으며, 건조구기엽 에탄올 추출물의 경우 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 40%의 tyrosinase 활성 저해 효과를 나타내었다. 같은 농도에서 생구기엽 물 추출물의 경우 20%의 저해율을 나타내었으며, 대조군인 알부틴의 경우 11%

저해효과를 나타내었다 (Fig. 6). 결과적으로 건조구기엽 에탄올 추출물이 tyrosinase의 활성을 직접적으로 저해함으로 멜라닌 합성을 억제한 것으로 생각되어 진다. Hong[2008]의 황금 추출물의 B16F10에서의 멜라닌 생성 억제 효과를 살펴 본 결과 0.8, 0.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 80, 75%의 멜라닌 생성억제 효과를 나타낸 결과와 비교하여, 건조구기엽 에탄올 추출물이 황금 보다는 적은 효능을 나타내었지만 대조 물질인 알부틴의 생합성 저해율 보다 높은 효능을 가짐으로서 우수한 미백 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 활성 측정. 구기자, 건조구기엽, 생구기엽 추출물이 melanin 합성에 관계된 효소인 tyrosinase에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16F10 mouse

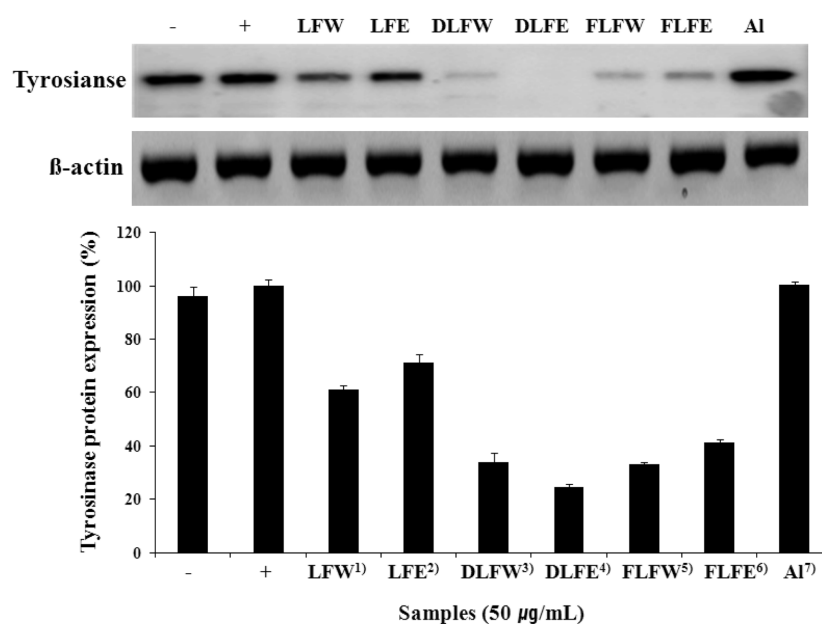


Fig. 7. Extracted of *L. fructus*, *Dry-L. foilum*, and *Fresh-L. folium* caused a dose-dependent inhibition of tyrosinase protein B16F10 cells. After B16F10 cells (1×10^6 cells) were starred in serum free medium for 1 h the cells were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *L. fructus*, *Dry-L. foilum* and *Fresh-L. folium* extracts for 48 h. Protein was detected by Western blotting analysis with their antibodies, respectively.

- ¹⁾*L. fructus* extracted with water
- ²⁾*L. fructus* extracted with ethanol
- ³⁾*Dry-L. foilum* extracted with water
- ⁴⁾*Dry-L. foilum* extracted with ethanol
- ⁵⁾*Fresh-L. folium* with water
- ⁶⁾*Fresh-L. folium* with ethanol
- ⁷⁾Arbutin

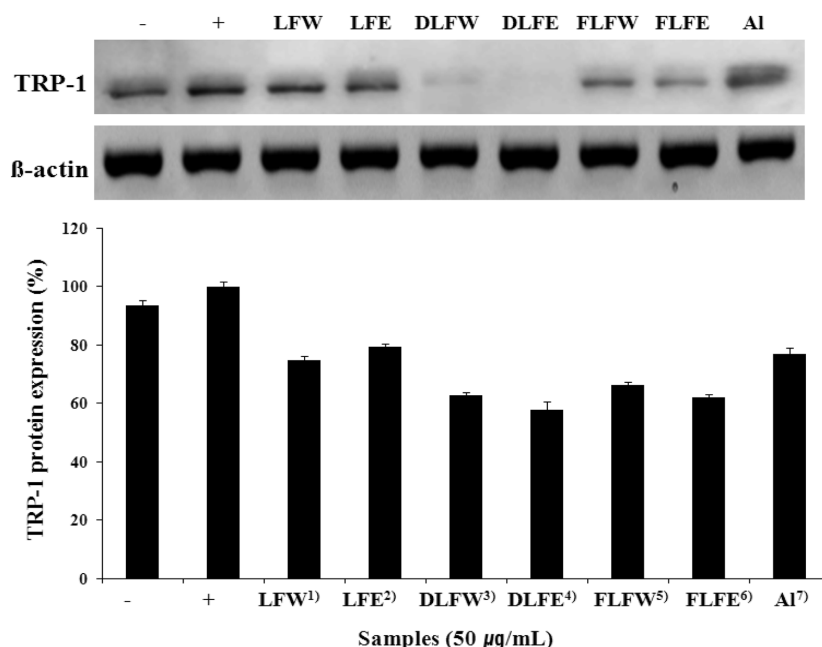


Fig. 8. Extracted of *L. fructus*, *Dry-L. foilum*, and *Fresh-L. folium* caused a dose-dependent inhibition of TRP-1 protein B16F10 cells. After B16F10 cells (1×10^6 cells) were starred in serum free medium for 1 h the cells were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *L. fructus*, *Dry-L. foilum* and *Fresh-L. folium* extracts for 48 h. Protein was detected by Western blotting analysis with their antibodies, respectively.

- ¹⁾*L. fructus* extracted with water
- ²⁾*L. fructus* extracted with ethanol
- ³⁾*Dry-L. foilum* extracted with water
- ⁴⁾*Dry-L. foilum* extracted with ethanol
- ⁵⁾*Fresh-L. folium* with water
- ⁶⁾*Fresh-L. folium* with ethanol
- ⁷⁾Arbutin

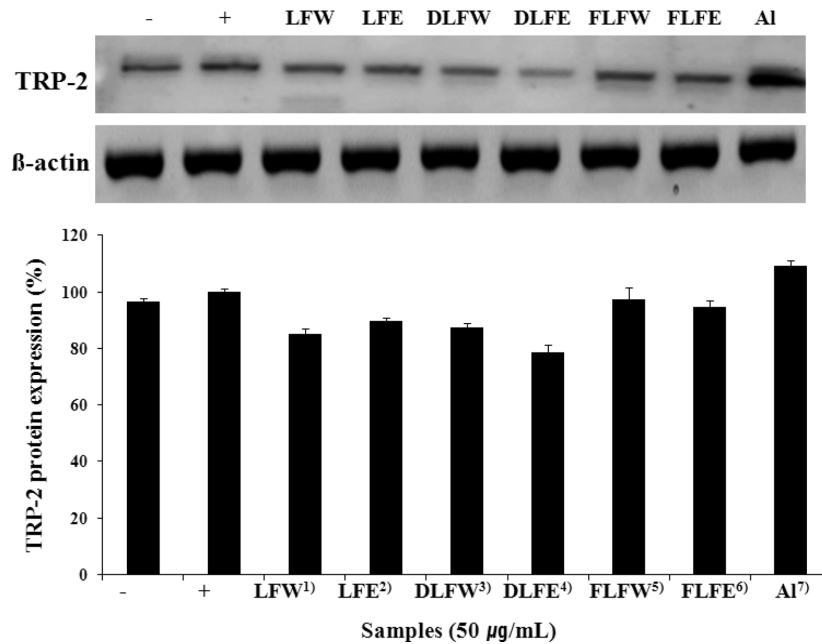


Fig. 9. Extracted of *L. fructus*, *Dry-L. foilum*, and *Fresh-L. foilum* caused a dose-dependent inhibition of TRP-2 protein B16F10 cells. After B16F10 cells (1×10^6 cells) were starved in serum free medium for 1h the cells were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *L. fructus*, *Dry-L. foilum*, and *Fresh-L. foilum* extracts for 48 h. Protein was detected by Western blotting analysis with their antibodies, respectively.

¹⁾*L. fructus* extracted with water

²⁾*L. fructus* extracted with ethanol

³⁾*Dry-L. foilum* extracted with water

⁴⁾*Dry-L. foilum* extracted with ethanol

⁵⁾*Fresh-L. foilum* with water

⁶⁾*Fresh-L. foilum* with ethanol

⁷⁾Arbutin

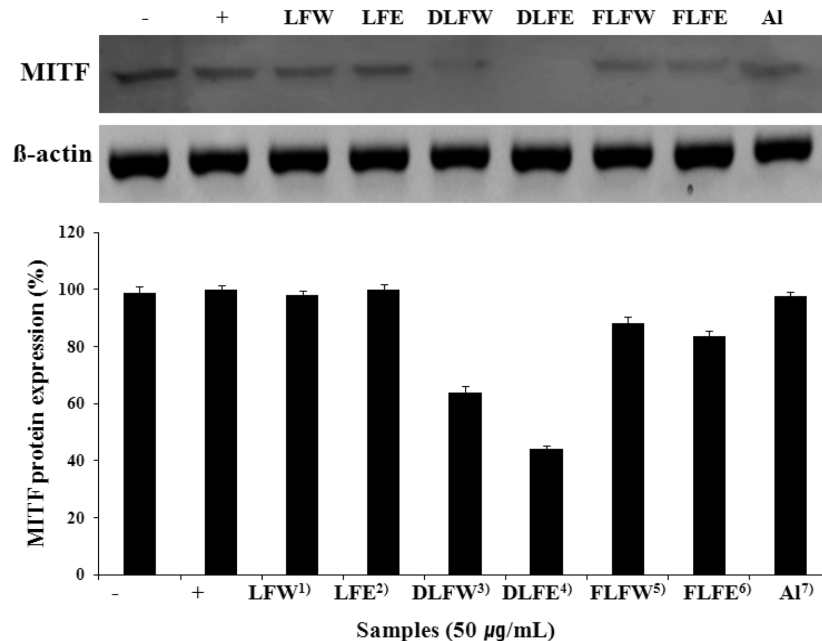


Fig. 10. Extracted of *L. fructus*, *Dry-L. foilum*, and *Fresh-L. foilum* caused a dose-dependent inhibition of MITF protein B16F10 cells. After B16F10 cells (1×10^6 cells) were starved in serum free medium for 1 h the cells were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *L. fructus*, *Dry-L. foilum*, and *Fresh-L. foilum* extracts for 48 h. Protein was detected by Western blotting analysis with their antibodies, respectively.

¹⁾*L. fructus* extracted with water

²⁾*L. fructus* extracted with ethanol

³⁾*Dry-L. foilum* extracted with water

⁴⁾*Dry-L. foilum* extracted with ethanol

⁵⁾*Fresh-L. foilum* with water

⁶⁾*Fresh-L. foilum* with ethanol

⁷⁾Arbutin

melanoma 세포에 구기자, 건조구기엽, 생구기엽 추출물을 농도 별로 50 µg/mL 처리 한 후 24시간 뒤에 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase protein 발현을 western blotting으로 확인하였다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 β-actin을 positive control로 사용하였다. Fig. 7~10에서 보는 바와 같이 추출물을 처리 하지 않은 B16F10군에서는 각 전사인자의 단백질 발현이 증가하였지만, 구기자 추출물 을 50 µg/mL을 처리한 B16F10군에서는 tyrosinase protein의 발현이 처리하지 않은 군보다 감소하였다. 특히, 건조구기엽 추출물의 경우 tyrosinase의 단백질 발현량이 80% 가까이 저해되었으며, TRP-1은 42%의 저해율을 나타내었고, TRP-2는 22% 저해율을 나타내었다. 또한 MITF의 경우 건조구기엽 물 추출물의 경우 27% 저해율을, 건조구기엽 에탄올 추출물의 경우 57%의 저해율을 나타내었다. Ha[2009]의 절편 모 에탄올 추출물이 B16F10 세포에서 멜라닌 관련 단백질인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현을 농도별 처리 시에도 감소시키지 않았으며, Na[2009]의 목단피 추출물의 경우 tyrosinase, MITF의 발현을 억제 시키지 못한 결과와 비교하여 건조구기엽 추출물은 농도 의존적으로 TRP-2를 감소시키는 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한 MITF의 억제는 tyrosinase의 발현 억제를 통하여 melanin 생성을 억제 할 수 있으며, MITF의 발현이 억제되면 색소 생성이 억제 될 수 있다. 본 실험에서도 건조구기엽 추출물이 대조군에 비하여 농도 별로 MITF 발현을 감소시킴을 확인할 수 있었다. 이상의 결과, 건조구기엽 추출물은 멜라닌 합성에 직접적으로 관여하는 효소인 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 발현을 억제하고 melanocyte 세포 수준에서의 활성을 억제하여 melanin 합성을 억제하는 것으로 나타났다.

초 록

구기자, 건조구기엽, 생구기엽 추출물의 미백효과를 검증하였다. Tyrosinase 저해활성 측정결과 건조구기엽 에탄올추출물 500 µg/mL에서 44%의 저해활성을 나타내었으며, melanoma cell (B16F10)에서의 melanin 생합성 저해율 측정결과 건조구기엽 에탄올 추출물 50 µg/mL에서 14%의 저해효과를 나타내었다. 구기자, 건조구기엽, 생구기엽 추출물을 처리한 B16F10군에서는 tyrosinase protein의 발현이 처리하지 않은 군보다 감소하였다. 특히, 건조구기엽 추출물의 경우 tyrosinase의 단백질 발현량을 많이 저해하였다. 결과적으로 건조구기엽 추출물의 미백활성이 가장 우수하였으며, 식품 및 화장품의 기능성 소재로 이용이 가능할 것으로 판단된다.

Key words: 건조구기엽, 구기자, 생구기엽, microphthalmia-associated transcription factor, tyrosinase related protein 1 (TRP-1), TRP-2, tyrosinase

감사의 글

이 논문은 2009년도 호서대학교의 재원으로 학술연구비 지원을 받아 수행된 연구임(2009-0156).

참고문헌

- Ahn TH and Cho JW (2011) Investigation of antioxidant activity on Chinese matrimony vine (*Lycium Chinense* M.) Germplasm. MS Thesis, Chungnam National University, Daejeon, Korea.
- Akiu S, Suzuki Y, Asahara T, Fujinuma Y, and Fukuda M (1991) Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis-biochemical study using cultured B16 melanoma cells. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi* **101**, 609-613.
- Alvaro SF, Jose Neptuno RL, and Francisco GC (1995) Tyrosinase a comprehensive review of its mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1247**, 1-11.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, and Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* **47**, 936-942.
- Chakraborty AK (1998) Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res* **11**, 206-212.
- Choe YS (2006) The effect of basic cosmetic ingredients on the melanogenesis in the B16F10 mouse melanocyte. Konkuk University, Seoul, Korea.
- Choi BW, Lee BH, Kang KJ, Lee ES, and Lee NH (1998) Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Korean J Pharmacogn* **29**, 237-242.
- Curto EV (1992) Inhibitors of mammalian melanocytes tyrosinase: In vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochem Pharmacol* **57**, 663-672.
- Ha TK (2009) Inhibitory effect of *Fritillaria verticillata* willd. var. thunbergii bak ethanol extract on melanin biosynthesis. MD Thesis, Sangji University, Wonju, Korea.
- Han J, Kim HJ, Lee SS, and Lee IS (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. *Mycobiology* **27**, 312-317.
- Hearing VJ (1999) Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J Invest Dermatol* **4**, 24-28.
- Hong SJ (2008) *Scutellaria baicalensis* georgi (SBG) inhibits melanin synthesis in mouse B16 melanoma cells. Ph D Thesis, Kyungwon University, GyeongGi, Korea.
- Hosoi J, Abe E, Suda T, and Kuroki T (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res* **45**, 1474-1478.
- Kang JR, Lee MK, and Kang SM (2008) Antioxidant property and tyrosinase inhibition activity of various extracts from plants in compositae plants. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **51**, 321-328.
- Kim SS, Ha JH, Jeong MH, Ahn JH, Yoon WB, Park SJ, Seong DH, and Lee HY (2009) Comparison of biological activities of fermented *Codonopsis lanceolata* and fresh *Codonopsis lanceolata*. *Korean J Medicinal Crop Sci* **17**, 280-285.
- Kim TS, Park WJ, Ko SB, and Kang MH (2008) Development of extracts of *Lycii folium* having high anti-oxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **37**, 1318-1322.
- Kwak JH, Seo UK, and Han YH (2001) Inhibitory effect of mugwort extracts on tyrosinase activity. *Korean J Biotechnol Bioeng* **16**, 220-223.
- Lee HC, Lee BC, Kim SD, Lee KS, Paik SW, Lee SS, and Kim SM

- (2008) Change in composition of Gugija (*Lycii fructus*) species according to harvest time. *Korean J Medicinal Crop Sci* **16**, 306–312.
- Mishima Y, Hatta S, Ohyama Y, and Inazu M (1988) Induction of melanogenesis suppression: Cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res* **1**, 367–374.
- Na SH (2009) *Paeonia suffruticosa* Andr (PSA) inhibits melanin synthesis in mouse B16 melanoma cells. PH. D. Thesis, Kyung Hee University, Yongin, Korea.
- Park BH, Cho HS, and Kim DH (2005) Anti-oxidative effects of solvent extracts of *Lycii fructus* powder (LFP) and *Maejakgwa* made with LFP. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **34**, 1314–1319.
- Park SJ, Park WJ, Lee BC, Kim SD, and Kang MH (2006) Anti-oxidative activity of different species *Lycium Chinensis* Miller extracts by harvest time. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **35**, 1146–1150.
- Park YJ, Kim MH, and Bae SJ (2002) Enhancement of anticarcinogenic effect by combination of *Lycii fructus* with vitamin C. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **31**, 143–148.
- Veronique DM and Friedrich B (1999) Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett* **381**, 165–168.
- Yagi A, Kanbara T, and Morinobu N (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica* **3981**, 517–519.
- Yamamura T, Onishi J, and Nishiyama T (2002) Antimelanogenic activity of hydrocoumarins in cultured normal human melanocytes by stimulating intracellular glutathione synthesis. *Arch Dermatol Res* **294**, 349–354.