

홍화자, 향부자, 형개 추출물의 미백효과에 관한 연구

황은영^{1,2} · 김동희¹ · 황주영¹ · 김희정¹ · 박태순¹ · 이인선² · 손준호^{1*}

¹한국한방산업진흥원, ²계명대학교 식품가공학과

A Study on the Depigmenting Effect of *Carthamus tinctorius* Seed, *Cyperus rotundus* and *Schizonepeta tenuifolia* Extracts

Eun-Young Hwang^{1,2}, Dong-Hee Kim¹, Jo-Young Hwang¹, Hui-Jeong Kim¹,
Tae-Soon Park¹, In-Sun Lee², and Jun-Ho Son^{1*}

¹Korea Promotion Institute for Oriental Medicine Industry
²Department of Food and Technology, Keimyung University

Abstract The objective of the present study was to evaluate the skin depigmentation effect of the extracts of three herbs, *Carthamus tinctorius* seed, *Cyperus rotundus* and *Schizonepeta tenuifolia*. Their effects on tyrosinase and melanin synthesis inhibitory action were assessed. We found that the *C. tinctorius* seed ethanol extracts reduced the tyrosinase activity and melanin formation of B16F10 melanoma cells. The *C. tinctorius* seed suppressed the expression in microphthalmia associated transcription factor (MITF), tyrosinase, tyrosinase related protein 1 (TRP-1), and tyrosinase related protein 2 (TRP-2) in B16F10 melanoma cells. These results show that *C. tinctorius* seed inhibited melanogenesis on the B16F10 melanoma cell. The underlying mechanism of *C. tinctorius* seed whitening activity may be the inhibition of tyrosinase, MITF, tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 expression. The results suggested that *C. tinctorius* seed has considerable potential as a natural functional ingredient with a depigmentation effect.

Keywords: *Carthamus tinctorius* seed, tyrosinase, B16F10 melanoma cell, melanin synthesis, depigmenting effect

서 론

급속한 산업화에 따른 환경오염으로 인해 오존층이 파괴되어 자외선 조사량이 증가하고 있다(1). 인간의 피부색은 내적, 외적 요인에 의해 달라지는데 그 중 피부색을 결정하는 근본적인 내적인자는 천연 피부 색소인 melanin이다(2). 과도한 melanin 합성은 인체에 기미, 주근깨, 피부반점을 형성하고 피부노화를 촉진하며 피부암 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다(3,4). Tyrosine 으로부터 melanin의 생합성에서 가장 중요한 단계는 tyrosinase의 촉매작용을 통하여 일어나는 초기 반응(5)으로 tyrosine의 hydroxyl 기를 부착시켜 3,4-dihydroxy phenylalanine(DOPA)을 생성하는 기작이다(6).

최근에는 tyrosinase 뿐만 아니라 microphthalmia-associatedtranscription factor(MITF), tyrosinase related protein-1(TRP-1), tyrosinase related protein-2(TRP-2) 등과 같은 단백질을 이용하여 melanin합성 억제에 대한 연구가 이루어지고 있다(7). Melanin은 몇 가지 세포내 신호전달 기전을 통하여 합성되는데, 첫째 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)/PKA(protein kinase A)경로, 둘째 nitric oxide에 의한 cyclic guanosine monophosphate(cGMP)

경로, 셋째 protein kinase C(PKC)의 경로, 넷째 p38 MAP kinase경로 등이 알려져 있다. 그 중 cAMP/PKA경로가 melanin 합성의 주요 경로로서 UV에 피부가 노출되었을 때 melanin 세포의 cAMP가 증가되고 하류 신호전달 물질인 PKA를 활성화 시키며, cAMP response element binding protein(CREB)을 거쳐 MITF의 발현을 증가시킨다(8,9). MITF는 melanin 합성 과정에서 중요한 전사 조절 인자로 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진한다(8,10).

현재 미백제로 가장 많이 사용되는 arbutin은 L-tyrosine과 경쟁적으로 작용하는 저해제이며(11), arbutin, ascorbic acid는 tyrosinase 활성 부위의 copper를 chelating하여 tyrosine에서 DOPA로 그리고 DOPA에서 DOPA quinone으로 진행되는 과정을 저해한다(12). 그러나 현재 의학계나 화장품업계에서는 피부 안전성, 제형 안정성 등의 문제로 제한된 양만 사용되고 있다(13,14). 따라서 천연 한방약용식물을 소재로 한 연구가 관심 받고 있다.

홍화자(*Carthamus tinctorius* L.)는 홍화의 씨로 종자가 성숙한 여름철에 채취하고別に 건조하여 약제로 쓰는데, 성질이 따뜻하고 맛이 달다(15,16). 그리고 최근 관상 동맥 확장 및 혈압을 낮추는 작용이 있으며 고 콜레스테롤혈증을 향상시키고 혈전을 치료하는 효과 있다고 보고된 바 있고(17), 골절 및 골다공증의 예방제로 사용되고 있다(18).

향부자(*Cyperus rotundus*)는 사초과에 속한 향부자의 뿌리줄기이다. 성미는 맵고 약간 쓰며, 달고 따뜻한 성질을 가지고 있으며, 주로 작용하는 장기는 간장이다. 약리를 보면 자궁 억제작용을 나타내며, 항염증, 진통작용 및 일정한 해열작용과 중추신경 억제작용이 있다. 강심작용과 혈압강하작용이 있으며, 이질균과

*Corresponding author: Jun Ho Son, Korea Promotion Institute for Oriental Medicine Industry, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-260, Korea
Tel: 82-53-810-0320
Fax: 82-53-801-9896
E-mail: bio115@dgom.re.kr
Received July 19, 2011; revised November 17, 2011;
accepted November 29, 2011

Table 1. List of medicinal plants

Scientific name	Part used
<i>C. tinctorius</i>	seed
<i>C. rotundus</i>	root
<i>S. tenuifolia</i>	leaf

피부진균에도 억제효과를 나타낸다(19-21).

형개(*Schizonepeta tenuifolia*)는 중국 북부지방이 원산지로서 가소(假蘇)라고도 부르는 한해살이풀로 중국에는 야생종도 있으나 국내에서는 약용식물로 재배한다. 익모초와 비슷하고 전체에 부드러운 털이 나 있으며 강한 방향을 풍긴다. 꽃이 달린 진초를 걷어서 말린 것을 “형개”라고 한다. 형개는 L-Menthone, DL-Menthone, D-Limonene 등의 성분을 함유하고 있다. 한방에서는 감기와 발진, 알리지, 천식 등에 사용된다(22).

그러나 경북지역에서 재배된 홍화자, 향부자, 형개의 미백효과에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 천연의 미백제를 찾기 위해 홍화자, 향부자, 형개 추출물 비교를 통해 tyrosinase 활성 및 melanin 형성 저해효과, melanogenesis 관련 메커니즘을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

시료제조

본 실험에서 사용한 경북 지역에서 재배된 약용식물로 3종 홍화자(*C. tinctorius*, seed), 향부자(*C. rotundus*, root), 형개(*S. tenuifolia*, leaf)로 홍화자는 경북영천, 향부자는 경북고령, 형개는 경북청송에서 재배된 것으로 휴먼허브(Dae-Gu, Korea)에서 구입하여 사용하였다(Table 1). 이들 경북약용식물은 실온에서 70% 에탄올로 3회 반복 추출하였다. 추출액은 여과지를 사용하여 여과하고 rotary vacuum evaporator(Rotavapor R-205, BUCHI, Postfach, Switzerland)로 감압농축한 후 동결 건조하여 미백활성 검정에 사용하였다.

시약 및 기기

미백 및 주름억제 효과 측정에 사용된 시약인 mushroom tyrosinase, L-DOPA 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 생존율 측정에 사용된 melanoma 세포인 B16F10는 Korean Cell Line Bank(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 세포 생존율 측정 시약은 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), 및 haemocytometer는 LaborOptik(Marienfeld, Germany)에서 구입하여 사용하였으며, 3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 Band density는 LAS4000 image analyzer (Fujifilm Life science, Tokyo, Japan)기기를 사용하여 측정하였다.

Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등(23)의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175M 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(110U/mL) 0.2mL을 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을

475 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

세포 배양

마우스 흑색 (B16F10) 세포는 Michikawa 등(24)의 방법에 따라 배양 세포에 0.25% trypsin 용액을 희석 처리한 후 세포를 분리한 다음 DMEM 배지에 10% FBS과 1% penicillin/streptomycin (100 U/mL)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존능력 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael 등(25)의 방법에 따라 측정하였다. Melanoma(B16F10)을 96-well plate에 5×10⁴ cells/well이 되도록 0.18 mL 분주하고, 시료를 농도 별로 조절하여 0.02 mL 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 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 well당 dimethyl sulfoxide(DMSO) : EtOH(1 : 1) 0.15 mL를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader(Spectra MAX 340 pc, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

마우스 흑색 세포(B16F10)에서의 melanin 생합성 저해활성 측정

Melanoma(B16F10) 세포로부터의 melanin 생합성 저해 측정은 Hosoi 등(26)의 방법을 변형하여 측정하였다. DMEM 배지로 배양된 melanoma 세포를 100 mm culture dish에 2×10⁶ cell/dish가 되도록 분주하고, 24시간 배양 후 시료를 농도별로 조절하여 2 mL 첨가하고, 48시간 후에 인산완충액(pH 7.4)으로 세척한 후 원심 분리하여 세포 침전물을 만들었다. 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액을 150 μL 첨가하고 60°C에서 1시간 용해하였으며 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 합성 멜라닌을 사용하여 작성된 표준 직선에서 구하고 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하여 나타내었다.

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

Western blot을 통한 미백 관련 단백질의 발현 측정

미백관련 인자 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 B16F10 melanoma 세포를 100 mm tissue culture dish에 2×10⁴ cells/well에 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 시료를 농도별로 처리한 배지로 교환하고 48시간 배양한 후 PBS로 세척하였다. Lysis buffer 100 μL를 첨가하여 세포를 용해시키고 원심분리 하여(12,000 rpm, 4°C, 20 min) 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 bradford assay로 정량하였으며, 60 μL의 단백질을 10%의

Table 2. The sequences of the primers of the MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase and GAPDH for B16 melanoma cells

Gene	Primer	Sequence (5' 3')
MITF	Forward	AGC GTG TAT TTT CCC CAC AG
	Reverse	TAG CTC CTT AAT GCG GTC GT
TRP-1	Forward	ACT TCA CTC AAG CCA ACT GC
	Reverse	AGC TTC CCA TCA GAT GTC GT
TRP-2	Forward	GCT CCA AGT GGC TGT AGA CC
	Reverse	AAT GCA GTG GCT TGG AAA TC
Tyrosinase	Forward	GAC GGT CAC TGC ACA CTT TG
	Reverse	GCC ATG ACC AGG ATG AC
GAPDH	Forward	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
	Reverse	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

SDS-PAGE를 이용하여 전기 영동한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 PVDF membrane에 옮긴 다음 30-40 mV에서 2 시간 이상 transfer하였다. Transfer가 끝나면 ponceau에 담근 후 band를 확인하고 TBST로 2회 이상 씻은 후 꺼내서 5% skim milk로 overnight시켜 background는 제거시켰다. 3회 washing 후 1차 antibody(1:1000)를 1시간 동안 붙인 후 다시 2차 antibody(1:1000)를 붙이고 ECL kit(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 film에 옮겨 측정하였다. Band density는 LAS4000 image analyzer(Fujifilm Life science, Tokyo, Japan)으로 확인하였다.

PCR을 통한 미백 관련 mRNA의 발현 측정

미백관련 인자 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 B16F10 melanoma 세포를 100 mm tissue culture dish에 2×10^4 cells/well에 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 시료를 농도별로 처리한 배지로 교환하고 48시간 배양한 후 PBS로 세척하였다. Total RNA는 DEPC 처리된 saline으로 3번 세척하고 세포를 포집한 다음 TRIzol Reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 분리하였다. Total RNA 2 μ g과 PCR primer oligonucleotide를 RT-PCR mixer와 혼합하고 RT-PCR을 실시하였다. MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 염기서열은 다음과 같다(Table 2). RT의 조건은 42°C에서 1시간 방치하여 cDNA를 제조하고 94°C에서 5분간 방치하여 reverse transcriptase를 불활성화 시켰다. 이어 PCR 조건은 94°C에서 30초(denaturation), 50°C에서 30초(annealing), 72°C에서 90초(extension)의 반응을 25-35회 반복하는 것을 기본으로 target cDNA 종류에 따라 최적의 조건으로 조절하였다. 증폭된 cDNA는 1.2% agarose gel을 사용한 전기영동으로 분리하고 LAS4000 image analyzer(Fujifilm Life science, Tokyo, Japan)으로 확인하였다.

통계처리

실험결과를 통계분석은 SAS program을 이용하여 일원분산분석법을 실시하여 Duncan's multiple range test에 의해 시료간의 유의적 차이($p < 0.05$)를 검정하였다.

결과 및 고찰

Tyrosinase 저해 활성 확인

피부 내에서 tyrosinase는 melanin 생성 과정에 있어서 핵심적인 요소이다. 이 효소는 아미노산인 tyrosine을 DOPA로 전환시키

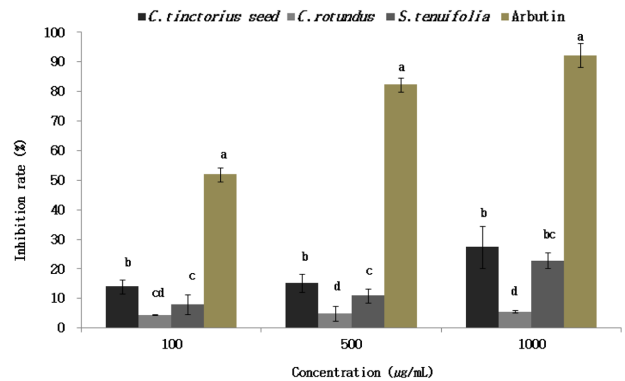


Fig. 1 Inhibition rate of ethanol extracts from medicinal plant on tyrosinase. Mean values with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$).

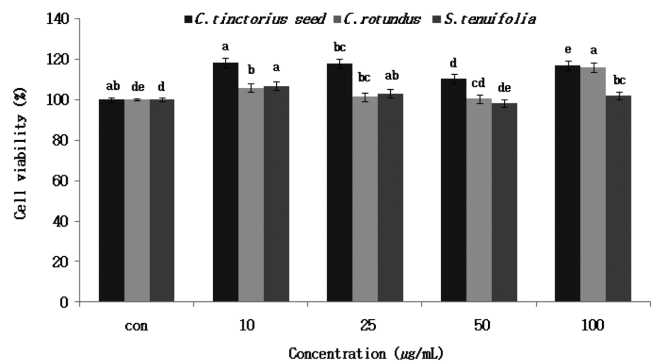


Fig. 2 Cell viability of ethanol extracts from medicinal plant on B16F10 melanoma cell. Mean values with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$). NS, not significant.

며 향후 DOPA quinone 그리고 dihydroxyindole(DHI)로부터 DOPochrome거쳐 흑갈색의 melanin을 형성한다(27). 홍화자, 향부자, 형개 3가지 천연 추출물을 대상으로 tyrosinase 저해활성을 측정하였다(Fig. 1). 홍화자, 향부자, 형개 에탄올 추출물 1000 μ g/mL에서 각각 27, 6, 23%로 홍화자 추출물이 가장 높은 저해율을 나타냈으며, 100, 500 μ g/mL의 낮은 농도에서도 3가지 추출물 중 홍화자 추출물이 가장 높은 저해율을 나타냈다. 그러나 미백제로 알려진 arbutin과 비교하였을 때, tyrosinase 저해활성 결과가 낮았지만 3가지 추출물 중 홍화자는 천연소재로서의 미백기능에 효과적인 가치가 있음을 기대할 수 있다. 또한, 제주산 식물을 이용한 tyrosinase 저해연구에서 1000 μ g/mL의 농도에서 10% 미만의 효과를 나타낸 결과와 비교하여 홍화자 추출물의 활성이 우수함을 확인할 수 있었다(28).

MTT assay에 의한 세포 생존능력 측정

세포 수준의 연구에 많이 이용되고 있는 MTT assay는 cell proliferation과 viability의 *in vitro* 분석에 매우 유용하게 사용되고 있다(29). 홍화자, 향부자, 형개 추출물에 의한 melanoma 세포의 생존율을 확인한 결과(Fig. 2), 3가지 추출물 모두 10, 25, 50, 100 μ g/mL 농도에서 100% 이상의 세포 생존율을 확인하였다. 따라서 B16F10 세포에서 세포독성이 없으므로 50 μ g/mL 농도 이하에서 melanin 생합성 저해 및 단백질 발현정도 실험을 진행하였다.

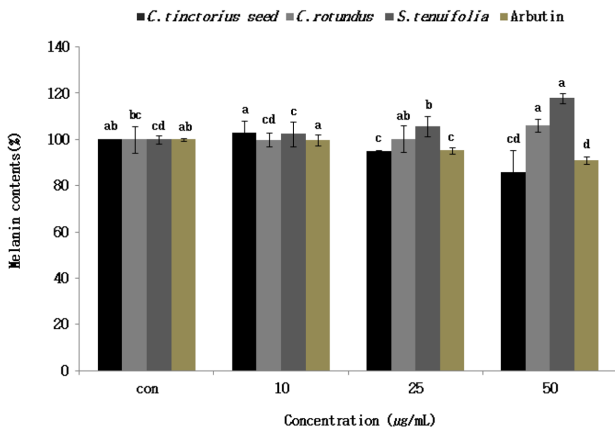


Fig. 3 Inhibition melanin synthesis of ethanol extracts from medicinal plant on B16F10 melanoma cell. Mean values with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$). NS, not significant.

마우스 흑색 세포(B16F10)에서의 melanin 생합성 저해활성 측정

Melanin은 세포 내의 소기관인 ribosome에서 tyrosinase라는 효소의 생합성에서 합성되기 시작한다. 이 효소의 작용으로 아미노산의 일종인 tyrosine에서 몇 단계의 합성을 거쳐, 기저층의 melanin 세포 melanoma site라는 흑색세포 표면에 침착하여 검고 갈색의 작은 melanin 입자가 만들어 진다(27). 홍화자, 향부자, 형개 추출물의 melanoma 세포에서의 melanin생합성 저해활성을 측정하였다(Fig. 3). 각 추출물 25, 50 µg/mL 농도에서 향부자, 형개 추출물은 대조군에 비해 100% 이상으로 오히려 증가하여 melanin 생합성을 촉진시켜 미백효과가 전혀 나타나지 않았다. 그러나 홍화자 추출물은 농도 의존적으로 감소함을 확인하였으며, 50 µg/mL농도에서 melanin 생합성 14%의 저해 효과를 나타내었다. 또한, 9% 저해율을 나타낸 arbutin보다 더 우수한 홍화자 추출물의 melanin 저해 효과를 확인하였다. 이는 유럽밤나무 꽃 MeOH, EtOH, water 추출물을 통한 melanin저해 연구에서 보고된 50 µg/mL 농도에서 melanin 생합성 저해는 9, 11, 8%로 홍화자 추출물이 높은 저해 효과를 보였고(30), 초음파 병행을 통한 병풀 EtOH, water 추출물의 melanin 생합성 저해는 200 µg/mL의 농도에서 10% 이하의 효과를 나타낸 결과와 비교하여 홍화자 추출물의 melanin 저해 활성이 우수함을 확인하였다(31).

MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질 발현

Melanin 생합성 신호전달 체계에는 매우 다양한 신호전달물질이 관여하고 있다. melanin은 몇 가지 세포내 신호전달 기전을 통하여 합성되는데, 그 중 cAMP/PKA 경로가 melanin 합성의 주요 경로로서 UV에 피부가 노출되었을 때 melanin세포의 cAMP가 증가되고 하류 신호전달 물질인 PKA를 활성화 시키며, CREB을 거쳐 MITF의 발현을 증가시킨다. MITF는 melanin 합성 과정에서 중요한 전사 조절 인자로 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진한다(8-10). 홍화자, 향부자, 형개 추출물의 미백효과검증을 위한 melanin 합성관련 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질 발현정도를 측정하였다(Fig. 4-7). 각 추출물을 50 µg/mL농도로 처리한 결과, 3가지 추출물 중 홍화자 추출물이 전사조절 인자인 MITF 발현을 가장 많이 감소시켰다. Tyrosinase발현 역시

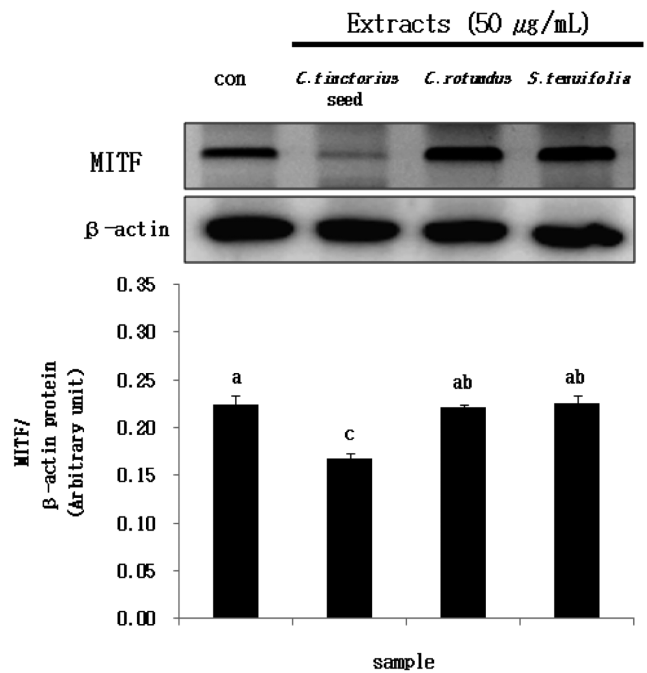


Fig. 4 Inhibition effects of ethanol extracts from medicinal plant on the expression of MITF in B16F10 melanoma cell. Cells were incubated with medium containing 50 µg/mL medicine plants (*C. tinctorius seed*, *C. rotundus*, *S. tenuifolia*) for 24 h. The MITF protein levels in each sample was normalized to the quantity of β-actin. Mean values with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$).

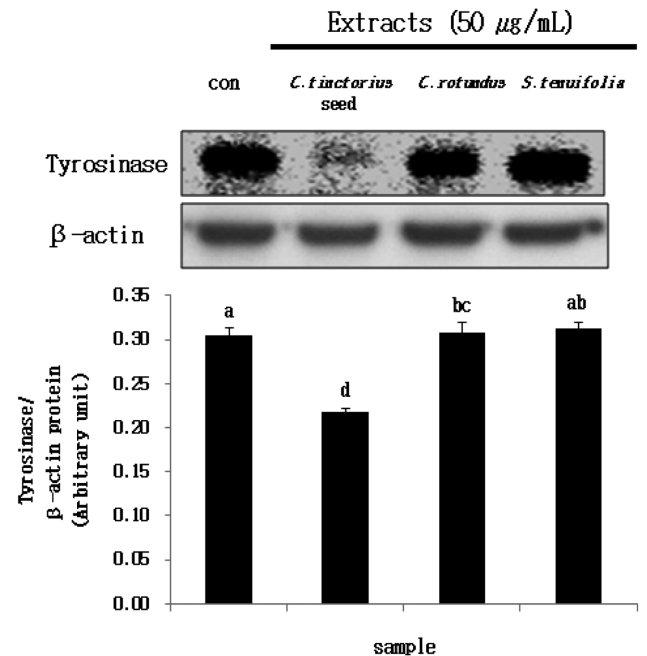


Fig. 5 Inhibition effects of ethanol extracts from medicinal plant on the expression of Tyrosinase in B16F10 melanoma cell. Cells were incubated with medium containing 50 µg/mL medicine plants (*C. tinctorius seed*, *C. rotundus*, *S. tenuifolia*) for 24 h. The tyrosinase protein levels in each sample was normalized to the quantity of β-actin. Mean values with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$).

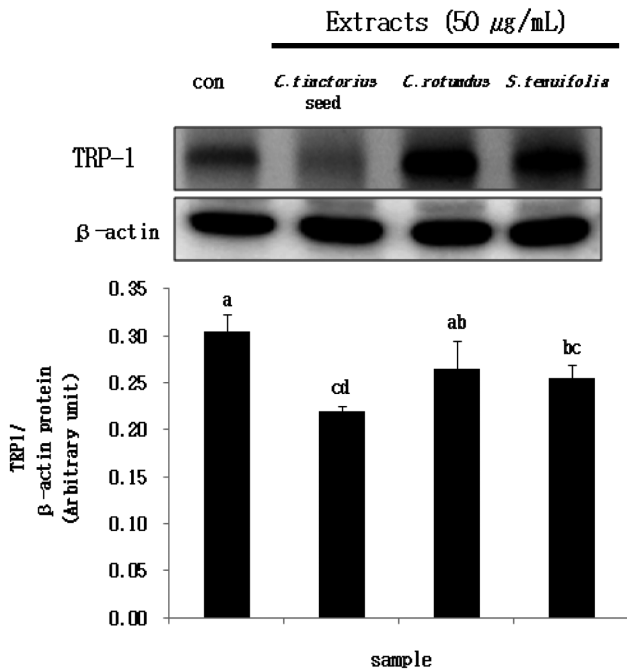


Fig. 6 Inhibition effects of ethanol extracts from medicinal plant on the expression of TRP-1 in B16F10 melanoma cell. Cells were incubated with medium containing 50 µg/mL medicine plants (*C. tinctorius* seed, *C. rotundus*, *S. tenuifolia*) for 24 h. The TRP-1 protein levels in each sample was normalized to the quantity of β-actin. Mean values with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$).

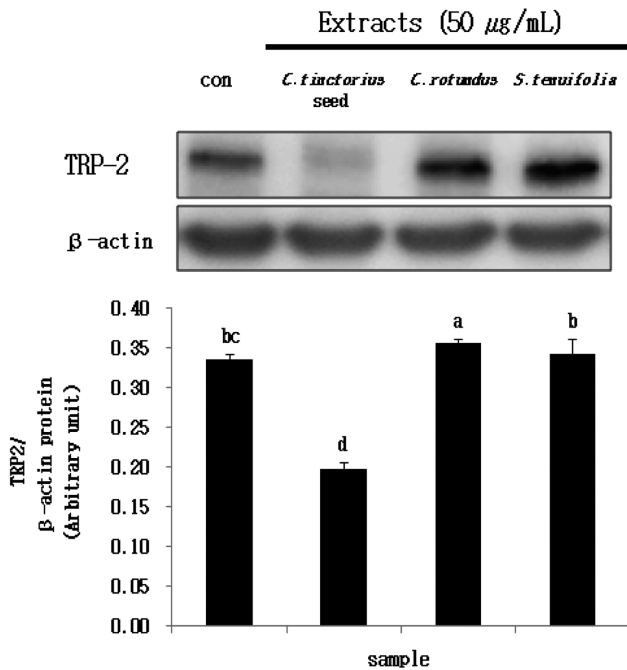


Fig. 7 Inhibition effects of ethanol extracts from medicinal plant on the expression of TRP-2 in B16F10 melanoma cell. Cells were incubated with medium containing 50 µg/mL medicine plants (*C. tinctorius* seed, *C. rotundus*, *S. tenuifolia*) for 24 h. The TRP-2 protein levels in each sample was normalized to the quantity of β-actin. Mean values with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$).

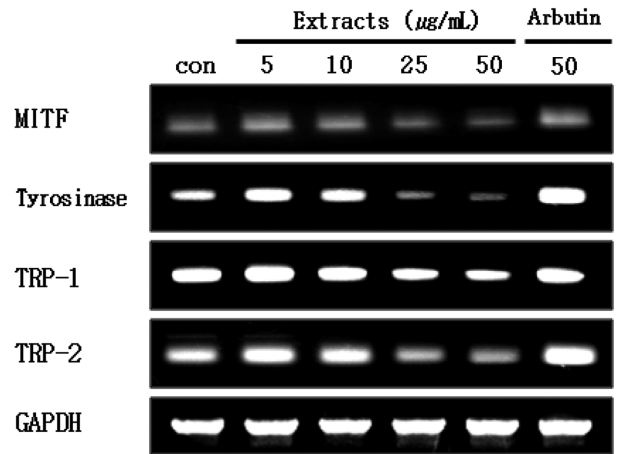


Fig. 8 Inhibition effects of ethanol extracts from *C. tinctorius* seed on the expression of MITF, Tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 mRNA in B16F10 melanoma cell. Cells were incubated with medium containing 0, 5, 10, 25, and 50 µg/mL *C. tinctorius* seed ethanol extracts for 24 h. Cells were incubated with medium containing 50 µg/mL albutin for 24 h. The MITF, Tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 mRNA levels in each sample was normalized to the quantity of GAPDH. Each value is mean±SD ($n \geq 3$).

홍화자 추출물이 가장 많이 감소됨을 확인하였다. 더 나아가 tyrosinase related protein으로 알려져 있는 단백질로서 5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid(DHICA)를 oxidation시켜 indole-2-carboxylic acid(IQCA)를 생성하여 흑갈색을 나타내게 하는 TRP-1과 DOPA chrome을 DHICA로 이성화하는 TRP-2의 단백질 발현정도를 측정 한 결과, 앞선 실험의 결과와 동일하게 홍화자 추출물이 가장 낮게 감소하여 발현되는 것을 확인하였다. 이는 여정자 추출물(32), 백강잠 추출물(33)의 미백효과 검증기전 연구에서 보고된 바와 같이 MITF 발현 억제를 통하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현이 감소하는 것으로 사료된다.

MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA 발현

미백효과검증을 위한 melanin 합성관련 단백질 발현정도에서 홍화자 추출물이 가장 뛰어난 활성을 가지는 것을 확인하였다. 이에 홍화자 추출물이 melanin 합성관련 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA 발현에 미치는 영향을 5, 10, 25, 50 µg/mL 농도에서 측정하였다(Fig. 8). 홍화자 추출물은 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA 발현을 농도 의존적으로 억제하였다. 또한 미백제로 사용되고 있는 arbutin의 양성대조군과 홍화자 추출물을 50 µg/mL 농도에서 비교한 결과, 홍화자 추출물이 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 mRNA 발현을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다. 본 결과와 유사한 연구에서 신선초 추출물은 endothelin-1 mRNA와 단백질 생성량을 감소시킴으로써 melanin 생성량을 감소시킨다고 보고하였고(34), 정공피 추출물 역시 melanin 형성에 관여하는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 유전자 발현을 억제함으로써 미백 작용을 하는 것으로 보고 하였다(35). 이상의 결과, 홍화자 추출물은 tyrosinase 활성과 melanin 합성 억제효과를 갖고 있으며, 이러한 효과는 MITF 발현 억제를 통한 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현 감소를 규명하였다. 따라서 홍화자 추출물의 미백효과를 확인하였고, 더 나아가 천연의 미백 기능적 소재로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

본 연구에서는 3가지 홍화자, 향부자, 형개 추출물의 미백효과를 연구하였다. 멜라닌 생성 첫 단계인 tyrosinase 억제활성과 멜라닌 생성 억제효과를 측정된 결과, 홍화자 에탄올 추출물이 tyrosinase 활성과 B16F10 melanoma 세포의 멜라닌 생성 억제하였다. 그 결과, 홍화자 추출물은 B16F10 melanoma 세포에서 melanogenesis 따른 tyrosinase 형성 억제에 따른 멜라닌 합성 관련 인자 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 의 발현을 억제함에 따라 홍화자 추출물의 미백효과를 확인하였다. 따라서 홍화자는 미백효과를 가진 천연 기능성 재료로서 가능성이 매우 높은 것으로 판단된다.

문 헌

1. Yu YG, Jeong MS, Choe JY, Kim JY. A study on whitening effect of *Ephedra sinica* extracts. Korean J. Design Cult. Soc. 31: 153-159 (2005)
2. Jeong MH, Kim SS, Kim JS, Lee HJ, Chio GP, Lee HY. Jour. Skin whitening and skin immune activities of different parts of *Acer mono* and *Acer okamotoanum*. Korean For. Soc. 99: 470-478 (2005)
3. Chen JS, Wei C, Marxhall MR. Inhibition mechanism of *koji* acid on polyphenol oxidase. J. Agr. Food Chem. 58: 79-110 (1991)
4. Urabe K, Aroca P, Tsukamoto K, Mascagna D, Paulumbo A, Prota G, Hering VJ. The inherent cytotoxicity of melanin precursors. Biochim. Biophys. Acta 1221: 272-278 (1994)
5. Hearing VJ, Tsukamoto K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. FASEB J. 5: 2902-2909 (1991)
6. Jimenez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, Urabe K, hearing V, Lezano J, Garcia-Gorreni JC. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. J. Biol. Chem. 269: 17993-18000 (1994)
7. Parvez S, Malik K, Ah KS, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J. Appl. Microbiol. 100: 1171-1185 (2006)
8. Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. Pigm. Cell Res. 13: 60-69 (2000)
9. Sassone CP. Coupling gene expression to cAMP signalling: Role of CREB and CREM. Int. J. Biochem. Cell B. 30: 27-38 (1998)
10. Saha B, Singh SK, Sarkar C, Bera R, Ratha J, Tobin DJ, Bhadra R. Activation of the Mitf promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB. Pigm. Cell Res. 29: 595-605 (2006)
11. Maeda K, Fukuda M. Arbutin: Mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. J. Phamacol. Exp. Ther. 276: 765-769 (1996)
12. Battaini GE, Monzani L, Casella L, Santagostini R, Pagliarin. Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. J. Biol. Inorg. Chem. 5: 262-268 (2000)
13. Chun HJ, Chli WH, Baek SH, Woo WH. Effect of quercetin on melanogenesis in melan-a melanocyte cells. Korean J. Pharmacogn. 33: 245-251 (2002)
14. Curto EV, Kwong C, Hermersdorfer H, Glatt C, Santis V, Virador VJ and Dooley TP. Inhibitions of mammalian melanocytes tyrosinase: *In vitro* comparisons of alkyl esters of gentiic acid with other putative inhibitors. Biochem. Pharmacol. 57: 663-672 (1999)
15. Seo BI, Lee ES, Park JH, Kim SC, Byun BH, Choi HY. A efficacy of Korean and *Chinese Carthami Semen* on analgesic effect, anti-inflammation and arthritis. Korean J. Herbol. 16: 1-10 (2001)
16. Hur TY, Yun MY, Cho EH, Lee OJ, Kim KS, Cho NG. Clinical

study on dffect of carthmi-Flos Herbal acupuncture therapy on osteoarthritis in knee joint. Korean J. Acupunct. Moxibustion Soc. 19: 189-200 (2002)

17. Seung KR, Jung KH. Effect of *Carthamus tinctorius* L. semen on endotoxin-induced thrombosis in rats. J. Pharmacol. 9: 258-262 (2001)
18. Jung KW, Jeong CS, Jeong JS. Effect of subfractions of *Carthamus tinctorius* L. semen on the lipid peroxidation and oxygen free radical scavenging enzyme activities in CCl₄-induced hepatotoxic rats. J. Food Hyg. Safety 14: 179-185 (1999)
19. Park JY. Comparative studies on the physiological activities of processed and unprocessed cyperi rhizomata. PhD thesis, Sookmyung Women's University, Seoul, Korea (1996)
20. Hikino H, Apta K, Takemoto T. Structure and absolute configuration of *Cyperotundone*. Chem Pharm. Bull. 14: 890-896 (1966)
21. Gupta MB, Palit TK, Singh N, Bhargava KP. Pharmacological studies to isolate the active constituents from *Cyperus rotundus* possessing anti-inflammatory, anti-pyretic, and analgesic activities. Indian J. Med. Res 59: 76-82 (1970)
22. Moon JY. Distinction and phylogenetic analysies of *Citri unshiu semen*, *Schizonepetae spike* and *Prunella spike* on basis of DNA sequenes. PhD thesis, Kyunghee University, Seoul, Korea (2011)
23. Yagi AT, Kanbara T, Morinobu N. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. Planta Med. 3981: 517-519 (1986)
24. Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. J. Neurosci. Res. 37: 62-70 (1994)
25. Carmichael J, Defraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivuty tesing. Cancer Res. 47: 936-942 (1987)
26. Hosoi JE, Abe T, Suda T, Kuroki. Regulation of melanin synthesis of B16 melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. J. Cancer. Res. 45: 1474-1478 (1985)
27. Cho YJ. Study om the tyrosinase activity inhibition and free radical scavenging activity of natural materials. MS thesis, Sookmyung Womans University, Seoul, Korea. (2004)
28. Lee NH, Yang HC, Bu HJ, Jung DS, Lee SJ, Riu KZ. Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities and radical scavenging effects using plants in *Jeju*. Korean J. Pharmacogn. 32:175-180 (2001)
29. Carmichael J, Degraff WG, Gadzar AF. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 47: 936-942 (1987)
30. Sapkota K, Park SE, Kim JE, Kim S, Choi HS, Chun HS, Kim SJ. Antioxidant and antimelanogenic properties of chestnut flower extract. Biosci. Biotech. Bioch. 74: 1527-1533 (2010)
31. Ha JH, Kwon MC, Kim SS, Jeong MH, Hwang B, Lee HY. Enhancement of skin-whitening and UV-protective effects of *Centella asiatica* L. Urban by Ultrasonification Pross. Korean J. Medicinal Crop Sci. 18: 79-85 (2010)
32. Han GS, Kim DS, Woo WH, Mun YJ. Inhibitory effect of fructus *Ligustri Lucidi* on tyrosinase and MITF expressions. Korean J. Orient. Physiol. Pathol. 24: 296-301 (2010)
33. Oh HC, Lim KS, Hwang CY, Youn IH, Kim NK. A Study on the melanin synthesis inhibition and whitening effect of bombysis corpus. Korean J. Oriental Med. 20: 1-13 (2007)
34. Park SH, Lee BY, Han CS, Kim JG, Kim KT, Kim KH, Kim YH. Whitening effect of *Angelica keiskei koidzumi* extract by inhibition of endothelin-1 production and melanogenesis. Korean J. Soc. Cosmet. Sci. 34: 101-107 (2008)
35. Kim TH, You JK, Kim JM, Baek JM, Kim HS, Park JH, Choe M. Antioxidant and whitening effects of *Sorbus commixta* hecl cortex Extract. Korean J. Soc. Food Sci. Nutr. 39: 1418-1424 (2010)