

백합뿌리 추출물의 멜라닌 생성 억제효과

윤훈석¹ · 양경월² · 김정은¹ · 김정미² · 이남호¹ · 현창구^{1,3*}

¹제주대학교 화장품과학연구센터

²(주)제주사랑

³제주대학교 LINC 사업단

Hypopigmenting Effects of Extracts from Bulbs of *Lilium Oriental Hybrid 'Siberia'* in Murine B16/F10 Melanoma Cells

Hoon Seok Yoon¹, Kyung-Wol Yang², Jung Eun Kim¹, Jeong Mi Kim²,
Nam Ho Lee¹, and Chang-Gu Hyun^{1,3*}

¹Cosmetic Science Center, Dept. of Chemistry and ³LINC Agency, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea
²Jeju Love Co., Ltd., Jeju 690-756, Korea

ABSTRACT In order to develop a skin-whitening agent, melanin contents and intracellular tyrosinase activity were determined by western blotting. Ethyl acetate fractions of 80% ethanol extracts from lily (*Lilium Oriental Hybrid 'Siberia'*) bulbs (R-EA) inhibited melanin synthesis in a dose-dependent manner in α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-treated B16/F10 murine melanoma cells. Intracellular tyrosinase activity and melanin contents were suppressed by 45% and 74%, respectively, in response to treatment with 100 μ g/mL of R-EA. Examination of protein expression associated with α -MSH-induced melanogenesis showed that tyrosinase related protein (TRP)-1 was inhibited more strongly than tyrosinase, and these results were correlated with stronger inhibition of melanin synthesis than intracellular tyrosinase activity. Taken together, R-EA containing *p*-coumaric acid and resveratrol could be used as a hypopigmentation agent through suppression of sustained extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation *via* melanogenic induction.

Key words: lily bulbs, hypopigmentation, melanin, extracellular signal-regulated kinase

서 론

백합(*Lilium longiflorum* Thunb.)은 아시아의 대부분 지역에서 식재료와 약초로 사용되어져 왔고 전 세계적으로 매력적인 화훼용 식물로 재배되고 있다. 백합뿌리는 중국과 일본 등지에서 염증과 폐질환 치료에 가장 널리 사용되는 일반적인 약재였다. 많은 연구를 통해서 다양한 종류의 백합들로부터 얻은 뿌리를 함유한 처방이 피부의 찰과상 및 화상의 회복과 외과수술 시 발생하는 상처의 회복에 도움을 주는 것으로 알려졌다(1).

백합은 천연화합물을 많이 포함하고 있으며 이 중 phenolic glycosides, flavonoids, carotenoids, sterols, steroidal saponins, steroidal glycoalkaloids 등의 많은 이차 대사산물들이 백합에서 분리되었다. 백합꽃에서 분리된 화합물들이 항염증 활성을 가지는 것으로 확인되었고 백합뿌리에서 분리된 여러 가지 steroidal saponin류의 화합물들이 항암 활성을 가지는 것으로 알려졌다(2-6).

피부색은 표피와 진피의 경계부위에 위치한 멜라닌 생성 세포가 합성해내는 멜라닌의 양과 종류에 따라 결정된다. 노화나 멜라닌의 과생산에 따라 피부의 생리적 기능이 떨어지게 되면 피부표면에 멜라닌 색소가 침착되면서 일광흑색점(노인성흑자) 등과 같은 다양한 형태의 과색소침착이 발생하게 된다(7). 과색소침착이 일어나는 원인에는 자외선 및 열 등의 원인이 있다. 이 중 자외선에 피부가 오래 노출되면 α -melanocyte stimulating hormone(α -MSH), endothelin-1(ET-1) 그리고 nitric oxide(NO) 등의 멜라닌 생성 촉진인자가 각질형성세포에서 분비된다(8). 멜라닌 생성세포와 피부색소침착을 조절하는 인자 중의 하나인 α -MSH는 국지적으로 생산되어지는 melanocortin peptide들 중 하나이다. α -MSH가 melanocortin-1 receptor(MC1R)에 붙게 되면 세포내에서는 adenylate cyclase가 활성화되면서 세포내 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)의 농도가 증가하게 되고, protein kinase A(PKA) 세포신호전달 경로를 거쳐 멜라닌 생성경로의 속도조절 효소인 tyrosinase를 활성화시킨다(9). 이외에도 자외선의 영향으로 멜라닌 생성을 촉진하는 basic fibroblast growth factor(bFGF)와 stem cell factor(SCF) 등도 역시 각질형성세포에서 분비된다(10).

Received 22 January 2014; Accepted 1 April 2014

*Corresponding author.

E-mail: cghyun@jejunu.ac.kr, Phone: +82-64-754-4419

멜라닌 생성은 멜라노솨에서 일어나며 멜라노솨은 소포체가 기원된 특이적인 세포내막으로 감싸여진 기관이다. 멜라노솨의 발달과정 중에 tyrosinase, tyrosinase-related protein-1(TRP-1) 그리고 tyrosinase-related protein-2(TRP-2)가 생성되어지며, 이 중 tyrosinase는 L-tyrosine에서 dopaquinone까지의 변환과정을 촉진하는 멜라닌 생성에 연관된 핵심 효소이며, eumelanin과 pheomelanin의 합성에 모두 관여한다. Tyrosinase는 tyrosine hydroxylase, dihydroxyphenylalanine(DOPA) oxidase 그리고 5,6-dihydroxyindole(DHI) oxidase의 여러 가지 효소활성을 가진다. TRP-1은 5,6-dihydroxyindole carboxylic acid(DHICA) oxidase의 효소활성을 가지는 것으로 보고되어 있으나 기능은 아직 확실하지 않다. TRP-1이 tyrosinase를 안정화시키는 데 기여할 것이라는 보고도 있었다(11). TRP-2의 기능은 dopachrome tautomerase이며, 멜라닌 생합합체에 있어서 carboxylated subunit들의 비율을 조절하는 역할을 한다(12).

Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, peroxidase 등의 효소활성을 모두 또는 일부분을 억제함으로써 피부미백효과가 나타나게 되며, 이 중 tyrosinase와 TRP-1은 흑갈색을 띠는 eumelanin의 생합성에 연관된 핵심 효소 단백질이다. 대부분의 피부미백 소재들은 여러 가지 기전을 통해 tyrosinase에 특이적으로 작용하여 제 기능을 못하게 한다. 예를 들어 C₂-ceramide와 tretinoin은 tyrosinase 유전자가 전사되는 것을 막고, hydroquinone과 arbutin은 tyrosinase의 경쟁적 저해제로 작용하기도 하며, linoleic acid와 α -linolenic acid는 tyrosinase의 단백질 분해를 유도하기도 한다(13). 최근에는 제주조릿대와 해조류인 새발의 추출물들을 이용한 연구에서 α -MSH에 의해 24시간 이상에서 지속적으로 나타나는 extracellular signal-regulated kinase(ERK)의 활성화 현상을 관찰하였고, 이 지속적인 ERK의 활성화가 저해되면서 멜라닌 생성 연관 단백질의 발현 및 멜라닌 생성이 저해되는 것이 밝혀졌고, nobiletin이라는 멜라닌 생성 촉진인자에 대해서도 ERK의 활성화 저해제인 U0126 처리시 phosphorylated ERK(p-ERK)와 tyrosinase의 발현이 줄어들고 이에 따라 nobiletin에 의해 유도된 멜라닌 생성이 줄어든다는 보고가 있었다(14-17).

그러므로 본 연구에서는 α -MSH에 의해 활성화된 p-ERK, tyrosinase, TRP-1과 TRP-2의 발현이 백합뿌리 분획물에 의해서 저해되는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 분획

본 연구에 사용된 시료는 제주시 신촌리 백합농가에서 2012년 12월에 구입한 백합뿌리를 사용하였다. 백합뿌리 시료 200 g에 80% 에탄올(ethanol) 1 L를 첨가하여 실온에서 3일간 2회 추출하였고 이를 여과, 감압농축, 동결건조

하여 사용하였다. 백합뿌리 80% 에탄올 추출물(20 g)을 물(H₂O)에 현탁시킨 후 헥산(hexane), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(butanol), 물 순으로 극성이 낮은 용매부터 극성이 높은 용매 순으로 순차적으로 용매분획을 각각 3회씩 반복 수행하여 분획층(fraction)을 수득하였고 각 분획층을 감압농축, 동결건조 하여 헥산 분획물 0.1 g(0.1%), 에틸아세테이트 분획물 1.1 g(5.5%), 부탄올 분획물 3.9 g(19.5%), 물 분획물 13.5 g(67.5%)을 얻어 실험시료로 사용하였다. 시료는 실험에 사용하기 전 밀봉하여 냉동보관(-20°C) 하였다.

세포생존율 측정

시료가 세포의 성장에 미치는 영향을 측정하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 분석을 수행하였다. 대사가 왕성한 살아있는 세포는 세포내 mitochondria의 탈수소 효소작용에 의하여 수용성의 노란색인 MTT를 환원시켜 자주색을 띠는 비수용성 formazan을 형성한다.

생쥐의 B16/F10 흑색종 세포를 10% fetal bovine serum(FBS; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; GIBCO BRL)을 이용하여 2×10^4 cells/well로 24 well plate에 넣고 24시간 배양 후 시료와 α -MSH 50 nM을 동시에 처리하고 48시간 배양하였다. 이후 MTT 용액 50 μ L를 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. 배양배지를 완전히 제거하고 dimethylsulfoxide(DMSO; Sigma-Aldrich)를 200 μ L 가하여 침전물을 완전히 용해시킨 후 microplate reader (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 540 nm 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며 대조군의 흡광도 값과 비교하여 세포생장률을 평가하였다.

멜라닌 함량 측정

멜라닌 함량 측정은 생쥐(Mus musculus)의 B16/F10 흑색종 세포주를 6 well plate에 1×10^5 cells/well이 되게 준비한 후 24시간 동안 37°C CO₂ 세포배양기(Heraeus BB15, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 배양하고, 멜라닌 생합성 유도물질인 α -MSH 50 nM을 처리하고 동시에 시료를 각각 처리하였다. 48시간 동안 37°C CO₂ 세포배양기에서 배양하였으며 24시간이 지난 후 배지 교체와 동시에 α -MSH 50 nM과 시료를 다시 처리하였다. 세포를 trypsin-EDTA(GIBCO BRL)를 이용하여 수확했다. 이렇게 수확된 세포에 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF; Sigma-Aldrich)와 1% Triton X-100(Sigma-Aldrich)을 함유한 67 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)를 500 μ L 처리하고 초음파로 분쇄하였으며, 이 상태로 1시간 동안 얼음에서 보관하였다. 1시간 후 4°C 원심분리기

(Combi-514R, Hanil, Incheon, Korea)에서 12,000×g로 20분간 원심분리 하였으며, 이때 상층액을 버리고 분리된 침전물에 1 N NaOH 용액을 첨가하여 70°C 항온수조에서 20분 동안 보관하면서 침전물이 용해되기를 기다린 후 이 용해된 용액을 멜라닌 함량 분석에 사용하였다. α-MSH만 처리한 대조구와 비교하여 상대적인 멜라닌 함량을 405 nm에서 측정하였고 각각의 데이터는 단백질의 양으로 보정하여 나타내었다.

세포내 tyrosinase 저해활성 측정

세포내 tyrosinase 저해활성 측정은 생쥐의 B16/F10 흑색종 세포를 6 well plate에 1×10^5 cells/well이 되게 준비한 후 24시간 동안 37°C CO₂ 세포배양기에서 배양하고 α-MSH 50 nM을 처리하고 25, 50, 100 µg/mL 농도로 백합뿌리 에틸아세테이트 분획물 시료를 처리하여 멜라닌 생성 유도 조건에서의 저해효과를 관찰하였다. 48시간 동안 37°C CO₂ 세포배양기에서 배양하였으며 배양 도중 24시간이 지난 후 배지교체와 동시에 위와 같은 조건으로 다시 처리하였다. 세포를 trypsin-EDTA를 이용하여 수확한 후 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride와 1% Triton X-100을 함유한 67 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)를 500 µL 처리하고 초음파 분쇄를 실시하였으며 이후 1시간 동안 얼음에서 보관하였다. 1시간 후 4°C 원심분리기에서 12,000×g로 20분간 원심분리 하였으며 상층액을 취하여 세포내 tyrosinase 활성분석에 사용했다. 세포내 tyrosinase 활성분석은 세포내에 존재하는 tyrosinase의 작용 결과 생성되는 DOPACHrome을 비색법에 의해 측정했다. 33 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8), 9 µM L-tyrosine (Sigma-Aldrich)과 4 mM L-DOPA(Sigma-Aldrich)를 혼합한 후 위에서 얻은 상층액 100 µL를 처리하여 37°C 항온기에서 2시간 반응시켰다. 반응액 중에 생성된 DOPACHrome을 475 nm에서 측정하여 멜라닌 생성을 유도한 대조구(α-MSH 처리구)를 기준으로 하여 상대적인 활성을 나타내었다. 각각의 데이터는 단백질의 양으로 보정하여 나타내었다.

멜라닌 생성 연관 단백질 분석

생쥐의 B16/F10 흑색종 세포를 6 well plate에 1×10^5 cells/well이 되게 준비한 후 24시간 동안 37°C CO₂ 세포배양기에서 배양하고 멜라닌 생합성 유도물질인 α-MSH 50 nM을 처리하고 동시에 25, 50, 100 µg/mL 농도로 백합뿌리 에틸아세테이트 분획물 시료를 처리하였다. 48시간 동안 37°C CO₂ 세포배양기에서 배양하였으며 배양 도중 24시간이 지난 후 배지교체와 동시에 위와 같은 조건으로 다시 처리하였다. 이렇게 배양된 세포는 먼저 배지를 제거하고 1×PBS 1 mL를 첨가하여 scraper로 수거하고 4°C, 250×g에서 5분 동안 원심분리 하여 상층액을 제거한 후 100 µL RIPA buffer(10×RIPA, 0.1 M PMSF, 0.1 M Na₃VO₄, 0.5

M NaF, 5 mg/mL aprotinin, 5 mg/mL leupeptin)로 용해시키고 원심분리 하였다. 여기서 얻은 상층액을 이용하여 12% SDS-PAGE로 전기영동하고 이를 polyvinylidene fluoride membrane(Millipore, Billerica, MA, USA)에 이 전시켰다. 그리고 이를 5% 탈지분유가 함유된 Tris buffered saline tween 20(TBST; 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에 1시간 동안 방치하였다. Phosphorylated ERK의 활성을 검토하기 위한 항체로는 mouse monoclonal anti-p-ERK 1/2(Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), tyrosinase의 항체로는 goat polyclonal anti-tyrosinase(Santa Cruz Biotech), Trp-1의 항체로는 goat polyclonal anti-Trp-1(Santa Cruz Biotech), Trp-2의 항체로는 rabbit polyclonal anti-Trp-2(Santa Cruz Biotech), β-actin의 항체로는 mouse monoclonal anti-β-actin(Sigma-Aldrich)을 5% 탈지분유가 함유된 TBST 용액에 희석하여 4°C, 24시간 동안 반응시켰다. TBST 용액으로 세척한 후 2차 항체로는 horse radish peroxidase가 결합된 anti-goat, anti-mouse IgG를 5% 탈지분유가 함유된 TBST 용액에 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 membrane을 TBST로 세번 세척 후 ECL kit(Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 1~3분간 반응시킨 후 X-ray 필름으로 현상하였다.

HPLC fingerprint 분석

백합뿌리 80% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물을 DMSO에 녹여 1 mg/mL의 농도가 되게 만들어 준 후 syringe filter로 여과하고 *p*-coumaric acid 및 resveratrol의 함량을 high performance liquid chromatography (HPLC; Alliance™ Waters 2695, Waters 2998 photodiode array detector, Waters Corporation, Milford, MA, USA)로 측정하였다. 분석에 사용한 칼럼은 Sunfire™ 4.6 mm×250 mm C18 column(Particle size 5 µm, Waters Corporation)이며, 이동상으로는 0.1% acetic acid, acetonitrile을 사용하였고, 유속 0.5 mL/min으로 하여 25~35% acetonitrile의 조건으로 30분 동안 340 nm의 자외선 파장으로 분석하였다. 표준품은 DMSO에 녹여 각각 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 제조하여 peak 면적을 구하고 회귀 방정식을 이용한 검량선을 작성하여 정량하였다.

통계처리

실험결과는 mean±SD로 나타냈으며 Student's *t*-test (Microsoft Office Excel 2007)의 단측검정을 사용하여 통계학적 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

백합뿌리 분획물의 멜라닌 생성 억제효과

생쥐의 B16/F10 흑색종 세포에 백합뿌리 분획물(100 µg/

mL)과 α -MSH(50 nM)를 동시 처리하여 48시간 배양한 후 MTT 분석을 이용하여 세포 생존율을 확인하였다. 백합뿌리 분획물은 100 μ g/mL의 농도에서 90~100%의 생존율을 보여 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다(Fig. 1A). 또한 분획물 중 에틸아세테이트 분획물이 hexan 분획물에 비해 수율이 좋고 부탄올 분획물에 비해 멜라닌 생성 억제능력과 세포내 tyrosinase 효소활성 억제능력이 우수함을 확인하였다(Fig. 1B, 1C). 그러므로 에틸아세테이트 분획물을 선택하여 실험을 진행하였다.

에틸아세테이트 분획물의 세포내 멜라닌 생성 억제효과

멜라닌 생성세포 및 흑색종 세포는 UV 자극에 의해 멜라닌 생성이 촉진되어진다. 이때 멜라닌 생성을 촉진시키기 위해 α -melanocyte stimulating hormone(α -MSH), stem cell factor(SCF), endothelin-1(ET-1) 등이 분비된다. 이 중 α -MSH는 멜라닌 생성세포 및 흑색종 세포의 분화 및 멜라닌 생성을 유도한다. 그 결과 멜라닌 생성세포 및 흑색종 세포의 수상돌기가 많아지거나 수상돌기 부분에 멜라닌 색소가 침착되어 대조군에 비해 α -MSH 처리군의 멜라닌 함량이 늘어나게 된다.

멜라닌 생성 저해활성이 우수한 에틸아세테이트 분획물을 먼저 MTT 분석을 통해 분획물이 100 μ g/mL 농도 범위

에서 세포 독성을 갖지 않음을 재차 확인하였고(Fig. 2A) 이를 바탕으로 에틸아세테이트 분획물을 25, 50 및 100 μ g/mL 농도로 처리하여 멜라닌 생성 억제활성을 측정하였다. 그 결과 α -MSH 단독 처리군에 비해 에틸아세테이트 분획물은 각각의 처리농도에서 21%, 44% 및 74%의 멜라닌 생성 억제활성을 확인하였다. 또한 에틸아세테이트 분획물은 세포내 tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 억제함도 규명하였다(Fig. 2B, 2C). 그러므로 α -MSH로 유도된 멜라닌 생성 억제에 세포내 tyrosinase 활성억제와 연관됨을 알 수 있었다.

멜라닌 생성 연관 단백질 발현 억제활성

멜라닌은 흑색과 갈색을 띠는 eumelanin과 적색과 황색을 띠는 pheomelanin으로 나누어지는데, 피부미백 화장품 소재의 목표가 되는 연구는 eumelanin의 생성을 억제하는 방향으로 초점이 맞추어져 있다. Eumelanin의 생성에 연관된 단백질은 tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2이고, 이 중 tyrosinase의 활성화에 ERK의 지속적인 활성화가 연관되어 있음을 나타내는 연구 결과가 있으므로, 에틸아세테이트 분획물에 의해 감소된 멜라닌 생성 억제활성이 p-ERK, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질 발현 억제가 그 원인임을 확인하기 위해 Western blot analysis로 세포질 내에서

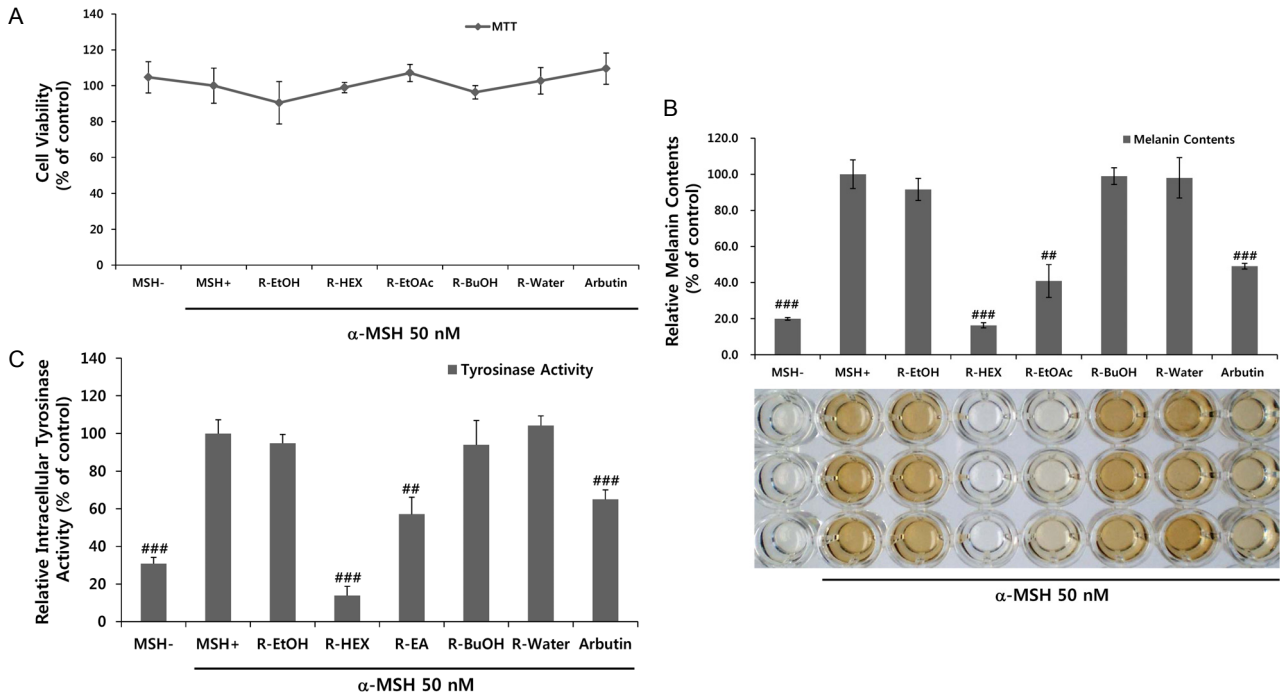


Fig. 1. Anti-melanogenic effects of 80% ethanol extracts and 4 fractions from lily bulbs. A: cell viability using MTT assay. B: relative melanin contents, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.005$ compared to positive control by Student's t-test. C: relative intracellular tyrosinase activity, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.001$, ^{###} $P < 0.0001$ compared to positive control by Student's t-test. Insert represents the raw data of melanin contents. MSH-, negative control without α -MSH; MSH+, positive control with 50 nM of α -MSH; R-EtOH, 100 μ g/mL of 80% ethanol extracts from lily bulbs with 50 nM of α -MSH; R-HEX, 100 μ g/mL of hexane fractions from lily bulbs with 50 nM of α -MSH; R-EtOAc, 100 μ g/mL of ethyl acetate fractions from lily bulbs with 50 nM of α -MSH; R-BuOH, 100 μ g/mL of butanol fractions from lily bulbs with 50 nM of α -MSH; R-water, 100 μ g/mL of water fractions from lily bulbs with 50 nM of α -MSH; Arbutin, 100 μ g/mL of arbutin with 50 nM of α -MSH.

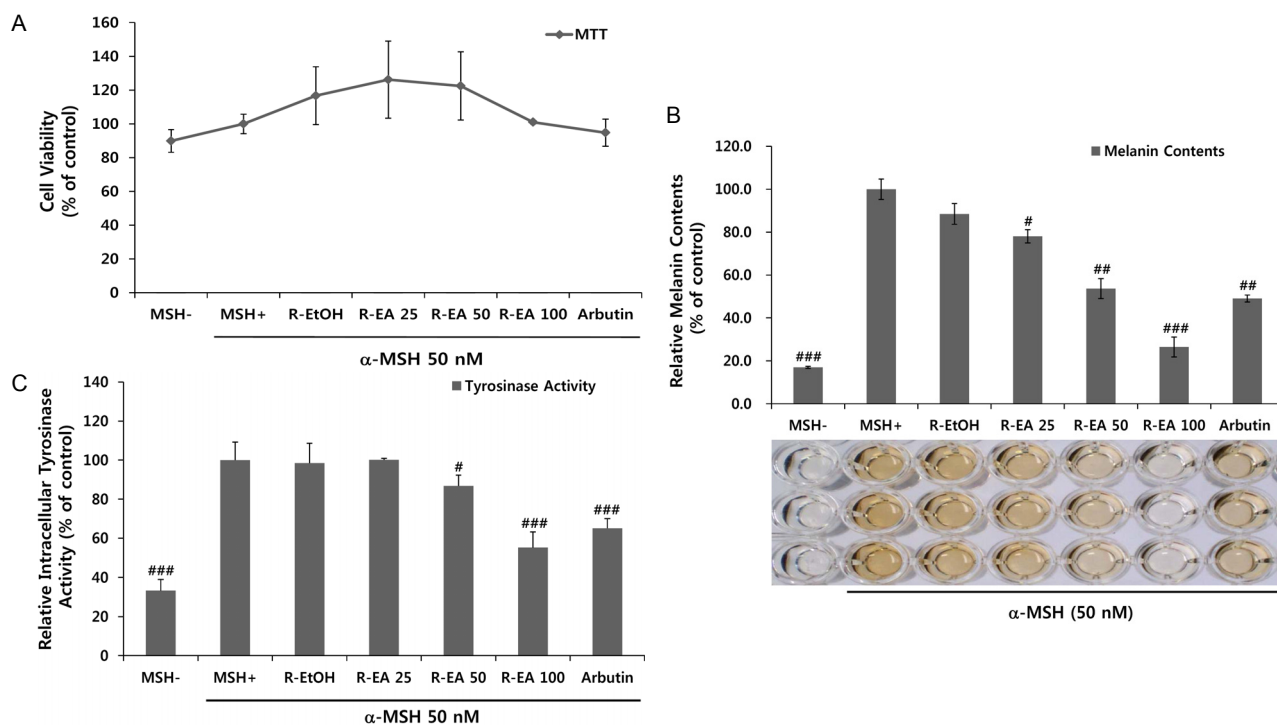


Fig. 2. Hypopigmenting effects of ethyl acetate fractions from 80% ethanol extracts of lily bulbs. A: cell viability using MTT assay. B: relative melanin contents, [#]*P*<0.01, ^{##}*P*<0.001, ^{###}*P*<0.0001 compared to positive control by Student's t-test. C. relative intracellular tyrosinase activity, [#]*P*<0.005, ^{###}*P*<0.001 compared to positive control by Student's t-test. Insert represents the raw data of melanin contents. MSH-, negative control without α-MSH; MSH+, positive control with 50 nM of α-MSH; R-EtOH, 100 μg/mL of 80% ethanol extracts from lily bulbs with 50 nM of α-MSH; R-EA 25, 25 μg/mL of ethyl acetate fractions form lily bulbs with 50 nM of α-MSH; R-EA 50, 50 μg/mL of ethyl acetate fractions from lily bulbs with 50 nM of α-MSH; R-EA 100, 100 μg/mL of ethyl acetate fractions from lily bulbs with 50 nM of α-MSH; Arbutin, 100 μg/mL of arbutin with with 50 nM of α-MSH.

의 p-ERK, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질의 발현량을 조사하였다.

생쥐의 B16/F10 흑색종 세포에 α-MSH 50 nM과 에틸아세테이트 분획물을 25, 50, 및 100 μg/mL 농도로 처리하고 48시간 배양한 후 에틸아세테이트 분획물의 p-ERK, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 발현 억제활성을 확인하였다. 그 결과 α-MSH 단독 처리군은 p-ERK, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현이 현저히 증가하였고 에틸아세테이트 분획물은 농도 의존적으로 p-ERK, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현을 억제함을 확인하였다(Fig. 3). 제주조릿대와 해조류인 새발의 추출물들을 이용한 연구에서 α-MSH에 의해 24시간 이상에서 지속적으로 나타나는 ERK의 활성화 현상을 관찰하였으며, 이 지속적인 ERK의 활성화가 저해되면서 멜라닌 생성 연관 단백질의 발현 및 멜라닌 생성이 저해되는 것이 밝혀졌으며, nobiletin이라는 멜라닌 생성 촉진인자에 대해서도 ERK의 저해제인 U0126 처리 시 24시간 이상에서 지속적으로 발현되는 p-ERK와 tyrosinase의 발현이 줄어들고 이에 따라 nobiletin에 의해 유도된 멜라닌 생성이 줄어든다는 보고가 있었다(14-16).

백합뿌리 분획물의 지표물질 분석

백합뿌리 미백소재의 지표물질 함량분석을 위한 방법으

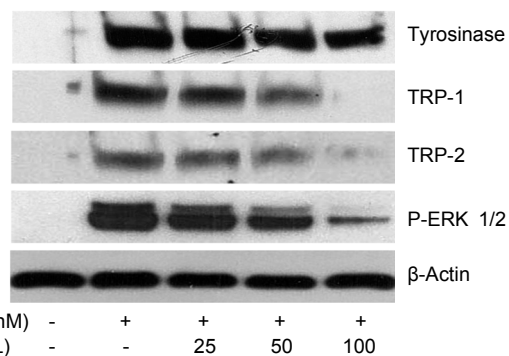


Fig. 3. Examination of protein expression associated with α-MSH-induced melanogenesis. Western blot analysis using primary antibody of tyrosinase, TRP-1, TRP-2, phosphorylated ERK 1/2, and β-Actin. β-Actin was used as a loading control.

로 α-MSH에 의해 멜라닌 생성이 촉진된 B16/F10 흑색종 세포에서 미백효과가 있다고 보고된 p-coumaric acid와 자외선 B 조사에 의해 멜라닌 생성이 유도된 guinea pig에서 피부 미백효과를 보이는 것으로 알려진 resveratrol의 함유 여부를 HPLC로 분석하였다(18,19).

Fig. 4A와 4B는 각각 백합뿌리 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물의 p-coumaric acid에 대한 크로마토그램을 나타낸 것이다. 그 결과 retention time과 스펙트럼 비교

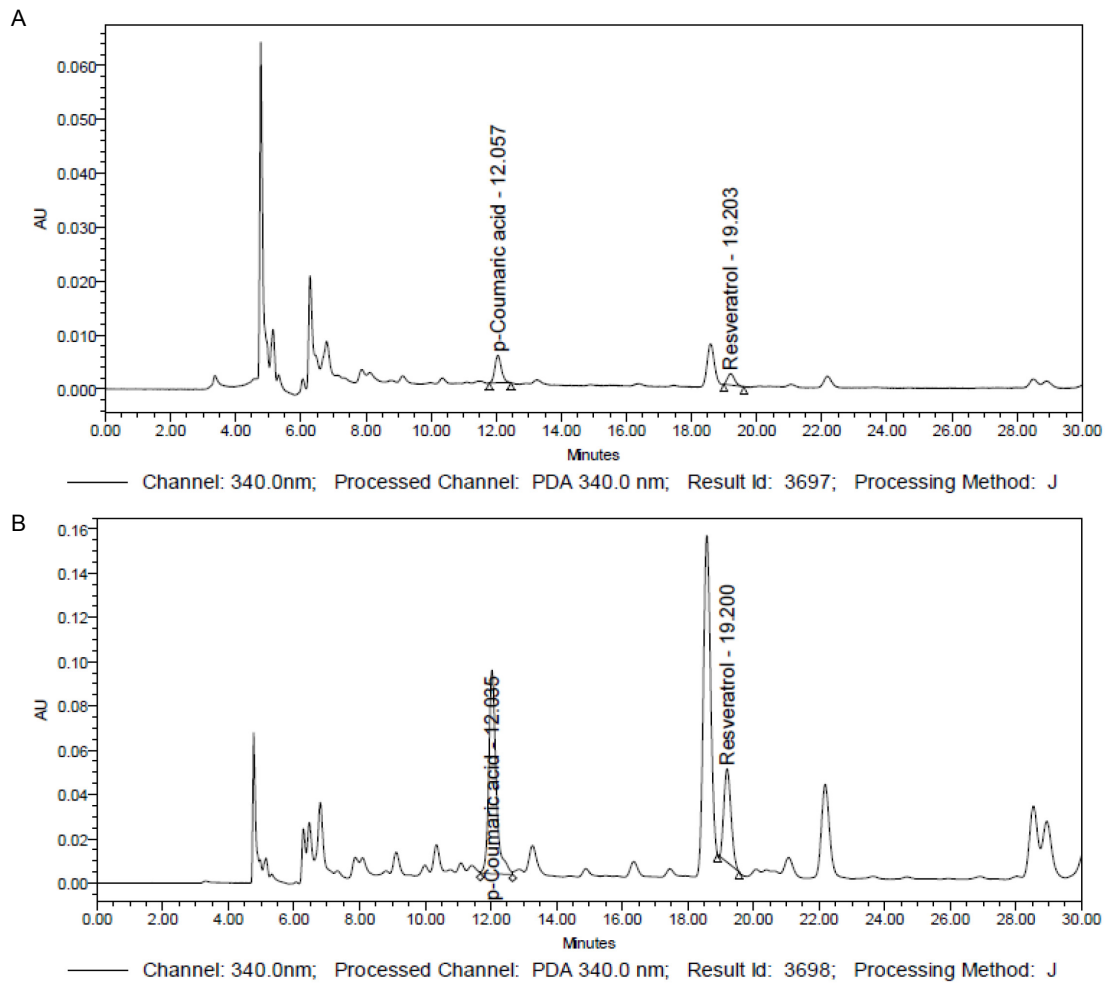


Fig. 4. Fingerprint analysis using high performance liquid chromatography (HPLC). A: HPLC peaks of 80% ethanol extracts from lily bulbs using as the two standard compounds, *p*-coumaric acid and resveratrol. B: HPLC peaks of ethyl acetate fractions from 80% ethanol extracts of lily bulbs using as the two standard compounds, *p*-coumaric acid and resveratrol.

로 백합뿌리 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물에 *p*-coumaric acid와 resveratrol이 함유되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 백합뿌리 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물의 *p*-coumaric acid와 resveratrol의 함량을 확인하기 위해 HPLC로 정량을 하였다. *p*-Coumaric acid와 resveratrol을 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되게 희석하고 HPLC의 크로마토그램에서 얻은 peak 면적을 이용해 회귀방정식을 구한 결과 *p*-coumaric acid는 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물에 각각 4.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 과 46.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$, resveratrol은 각각 7.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 과 16.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 이 함유되어 있음을 알 수 있었다. *p*-Coumaric acid와 resveratrol의 함량이 각각 약 10배와 2배 이상이 늘어나 있는 것을 확인할 수 있었고, 이에 따라 멜라닌 생성 저해활성이 늘어남을 알 수 있었다. 백합뿌리 추출물에 함유된 *p*-coumaric acid와 resveratrol은 피부미백 소재로서 알려져 있으며, resveratrol의 경우 항암, 항산화 소재로서의 활용가치가 높은 것으로 알려져 있다(18-21). 자외선 조사 전 식이섭취를 통해 멜라닌 생성 정도의 감소 및 피부암 유발인인 자외선

및 phorbol ester의 피부 노출 전 식이섭취를 하는 방식의 실험을 통해 피부암 발생이 저해되는지의 여부 등을 확인하여 먹는 화장품 및 피부암 예방 기능성 식품으로의 적용도 가능할 것이라 사료된다(22,23).

요 약

피부미백 소재를 개발하기 위해 멜라닌 함량, 세포내 tyrosinase 활성의 측정 및 Western blotting 실험이 수행되었다. 백합(*Lilium Oriental Hybrid 'Siberia'*) 뿌리의 80% 에탄올 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물(R-EA)은 α -melanocyte stimulating hormone(α -MSH)에 의해 멜라닌 생성이 유도된 B16/F10 흑색종 세포에서 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 저해하였다. 정확하게 세포내 tyrosinase 활성과 멜라닌 함량은 에틸아세테이트 분획물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 α -MSH 단독 처리군에 비해 각각 45%와 74%의 저해율을 보였다. α -MSH에 의해 멜라닌 생성이 유도된 B16/F10 흑색종 세포에서 단백질 발현양상을 살펴본

결과 TRP-1이 가장 많이 억제된 양상을 확인할 수 있었고 이 결과는 세포내 tyrosinase 활성저해보다 멜라닌 생성저해가 더 많이 일어난 것과 일맥상통하는 것이다. 이를 종합해 볼 때 *p*-coumaric acid와 resveratrol 함량이 백합뿌리의 에탄올 추출물에 비해 많이 함유된 에틸아세테이트 분획물은 멜라닌 생성 유도물질에 의해 촉진된 ERK의 활성화를 억제하는 피부미백 소재로서 그 가치가 입증된다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 한국산업단지공단에서 지원하는 산업 집적지 경쟁력 강화사업으로 시행한 생산기술사업화 지원사업(현장맞춤형기술개발부문)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

REFERENCES

- Esposito D, Munafo JP Jr, Lucibello T, Baldeon M, Kormarntsky S, Gianfagna TJ. 2013. Steroidal glycosides from the bulbs of Easter lily (*Lilium longiflorum* Thunb.) promote dermal fibroblast migration in vitro. *J Ethnopharmacol* 148: 433-440.
- Shoyama Y, Hatano K, Nishioka I, Yamagishi T. 1987. Phenolic glycosides from *Lilium longiflorum*. *Phytochemistry* 26: 2965-2968.
- Francis JA, Rumbelha W, Nair MG. 2004. Constituents in Easter lily flowers with medicinal activity. *Life Sci* 76: 671-683.
- Tsukida K, Ikeuchi K. 1965. Epoxy-carotenoids. VIII. Pollen carotenoids of *Lilium longiflorum* and of its cultivated hybrid. *Bitamin* 32: 222-226.
- Mimaki Y, Nakamura O, Sashida Y, Satomi Y, Nishino A, Nishino H. 1994. Steroidal saponins from the bulbs of *Lilium longiflorum* and their antitumour-promoter activity. *Phytochemistry* 37: 227-232.
- Munafo JP Jr, Ramanathan A, Jimenez LS, Gianfagna TJ. 2010. Isolation and structural determination of steroidal glycosides from the bulbs of easter lily (*Lilium longiflorum* Thunb.). *J Agric Food Chem* 58: 8806-8813.
- Hill HZ, Li W, Xin P, Michell DL. 1997. Melanin: a two edged sword? *Pigment Cell Res* 10: 158-161.
- Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M, Higashi K, Yada Y. 1997. The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment Cell Res* 10: 218-228.
- Thody AJ, Graham A. 1998. Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Res* 11: 265-274.
- Gilchrest BA, Park HY, Eller MS, Yaar M. 1996. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem Photobiol* 63: 1-10.
- Hearing VJ, Tsukamoto K. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J* 5: 2902-2909.
- Tsukamoto K, Jackson IJ, Urabe K, Montague PM, Hearing VJ. 1992. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *EMBO J* 11: 519-526.
- Briganti S, Camera E, Picardo M. 2003. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res* 16: 101-110.
- Yoon HS, Kim JK. 2007. The inhibitory effect of *Acanthopeltis japonica* on melanogenesis. *J Soc Cosmet Sci Korea* 33: 87-92.
- Yoon HS, Kim JK, Kim SJ. 2007. The inhibitory effect on the melanin synthesis in B16/F10 mouse melanoma cells by *Sasa quelpaertensis* leaf extract. *Korean J Life Sci* 17: 873-875.
- Yoon HS, Lee SR, Ko HC, Choi SY, Park JG, Kim JK, Kim SJ. 2009. Involvement of extracellular signal-regulated kinase in nobiletin-induced melanogenesis in murine B16/F10 melanoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1781-1784.
- Kim HK, Han HS, Lee GD, Kim KH. 2005. Physiological activities of fresh *Pleurotus eryngii* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 439-445.
- An SM, Lee SI, Choi SW, Moon SW, Boo YC. 2008. *p*-Coumaric acid, a constituent of *Sasa quelpaertensis* Nakai, inhibits cellular melanogenesis stimulated by α -melanocyte stimulating hormone. *Br J Dermatol* 159: 292-299.
- Lee TH, Seo JO, Baek SH, Kim SY. 2014. Inhibitory effects of resveratrol on melanin synthesis in ultraviolet B-induced pigmentation in Guinea pig skin. *Biomol Ther (Seoul)* 22: 35-40.
- Ndiaye M, Philippe C, Mukhtar H, Ahmad N. 2011. The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges. *Arch Biochem Biophys* 508: 164-170.
- Hsieh TC, Wu JM. 2010. Resveratrol: biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule. *Biofactors* 36: 360-369.
- Abel EL, Angel JM, Kiguchi K, DiGiovanni J. 2009. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nat Protoc* 4: 1350-1362.
- Driedger PE, Blumberg PM. 1980. Specific binding of phorbol ester tumor promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 567-571.