

고욤(*Diospyros lotus* L.)잎 Ethyl Acetate 분획물의 멜라닌형성 억제 효과

최병민¹ · 전인화² · 김상준³ · 유강열³ · 장선일^{2,4*}

¹원광대학교 의과대학 생화학교실, ²(주)아토큐앤에이, ³전주생물소재연구소,
⁴전주대학교 의과대학 보건관리학과

Melanogenesis-Inhibitory Effects of Ethyl Acetate Fraction from *Diospyros lotus* L. Leaf Extract

Byung-MinChoi¹, In Hwa Jeon², Sang Jun Kim³, Kang-Yeol Yu³, and Seon Il Jang^{2,4*}

¹Department of Biochemistry, School of Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-479, Korea

²Ato Q&A Corporation, Jeonju 560-759, Korea

³Jeonju Biomaterials Institute, Jeonju 561-360, Korea

⁴Department of Healthcare & Science, School of Medicinal Science, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea

Abstract – *Diospyros lotus* has been cultivated for its edible fruits and leaves which are considered for its medicinal importance. The aim of this study was to evaluate the anti-melanogenesis of ethyl acetate (EA) fractions from *D. lotus* leaves in B16 cells. The order of the total polyphenol content with regard to the different solvent fractions from *D. lotus* leaves was EA>butanol>methanol>chloroform> n-hexane. The major compounds of EA fraction from *D. lotus* leaves by HPLC analysis were myricitrin and myricetin. Cellular TYR activity and melanin content in response to treatment with 100 mg/mL of EA fraction was inhibited more strongly than group treated with arbutin. Further, EA fraction exhibited significant anti-melanogenesis effects by reducing the levels of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), inhibiting the synthesis of TYR, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) and TRP-2. Therefore, EA fractions from *D. lotus* leaves may be a good source of skin-whitening agents in the future development of medicine-based trouble skin therapy.

Key words – *Diospyros lotus* leaves, Ethyl acetate fraction, B16 melanoma cells, Anti-melanogenesis

피부에서 멜라닌형성(melanogenesis)은 태양으로부터 유래한 자외선뿐만 아니라 약물들로부터 인체를 보호하기 위한 자연스런 생리작용으로 먼저 멜라닌이 합성되고 이동되면서 멜라노솜을 방출하는 등 여러 가지 단계를 거치게 된다.¹⁾ 즉, 피부에 있는 멜라닌세포가 자외선, 약물 또는 α -melanocyte stimulating hormone(α -MSH) 등 외인성 및 내인성 인자에 노출되면, 아미노산의 일종인 tyrosine이 tyrosinase(TYR)의 촉매작용으로 dopa를 생성하고 다시 TYR의 촉매로 인해서 dopaquinone이 생성되면서 두 가지 방향으로 멜라닌 색소를 생성한다.^{2,3)} 첫째, dopaquinone으로부터 dopachrome이 되고 indol-5,6-quinone이 되면서 검은색과 갈색을 나타내는 eumelanin 색소가 생성된다. 둘째,

dopaquinone이 cysteine과 glutathion의 작용을 받아 cystenyl-dopa가 만들어지고 enothiazine alanine으로 변하면서 노란색이나 붉은색을 나타내는 pheomelanin 색소가 생성된다.¹⁻³⁾ 생체에서 α -MSH는 microphthalmia-associated transcription factor(MITF)을 활성화시켜 멜라닌 색소 생성에 중요한 역할을 한다.^{4,5)} 이와 같이 멜라닌은 멜라닌세포로부터 형성되어 인체를 보호하는 생리작용이 있지만, 과도하게 피부에 침착되면 피부미용에 문제점으로 지적되고 있다. 그 현상으로 피부에 기미(melasma), 주근깨(freckle) 및 검버섯(age spot) 등이 형성되어 피부미용에 큰 문제점을 야기한다.¹⁾ 그러므로 적당한 피부색과 피부노화 방지를 위해서는 TYR의 활성을 차단시키는 동시에 MITF의 활성을 억제시키는 물질을 도포하거나 복용해야할 필요성이 있다.

고욤나무(*Diospyros lotus* L.)는 감나무과(Ebenaceae)에 속하는 다년생 낙엽성 목본으로 산성, 중성 또는 알칼리성 토

*교신저자(E-mail): sonjjang@jj.ac.kr
(Tel): +82-63-220-3124

양에서 양지와 음지에도 잘 자라는 강한 생육적 특징이 있어 감나무 껍을 붙이는데 사용되어 왔다. 고욤나무 열매는 10-11월에 익은 것을 따서 말려 한약재로 쓰며, 소시(小柿), 우내시(牛奶柿), 연조(軟棗), 정향시(丁香柿)라고도 불린다.⁶⁾ 한의학계를 비롯한 전통의약분야에서는 성숙한 과일인 고욤을 진정, 진통, 수렴 및 변비치료에 사용되어 왔을 뿐만 아니라 출혈, 이뇨증, 불편증 및 딸국질 개선 그리고 항균제로 활용해 왔다.^{7,8)} 고욤의 생화학적 성분은 지방산, 당, 플라보노이드 및 비휘발성 물질이 보고되었고, 최근에는 혈액의 항응고, 뇌세포 보호 작용, 항산화 및 항암효과에 대한 보고가 있다.⁶⁻¹²⁾ 이러한 보고는 주로 고욤씨와 고욤껍질을 대상으로 이루어지고 있는 실정이다. 최근에 저자들은 고욤 잎 추출물을 대상으로 항산화 활성 및 적혈구 산화적 손상에 따른 복원 효과¹³⁾와 항알레르기 및 항염효과에 대한 연구보고를 한바 있다.^{13,14)} 그러나 지금까지 고욤잎 추출물을 대상으로 미백에 관련된 멜라닌형성 억제 작용에 대한 보고는 없다.

그러므로 본 연구는 고욤잎 ethyl acetate(EA) 분획물을 대상으로 α -MSH로 자극된 멜라노마 세포주인 B16 세포에서 TYR 활성, 세포내 멜라닌 함량 및 멜라닌형성 관련 분자인 TYR, TRP-1, TRP-2과 MITE 분자 발현을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약 - Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS)은 Gibco BRL 사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, TYR, MITF, TRP-1 및 TRP-2 항체는 Santa Cruz Biotechnology 사(Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. Glutamine, antibiotics (streptomycin & penicillin), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), rutin, astragal, myricitrin, myricetin, kaempferol, gallic acid, quercetin 및 기타 분석급 시약은 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

고욤잎 - 실험에 사용한 고욤(*D. lotus* L.)은 전라북도 진안군 부귀면 수향리 신기마을에서 2013년 6월 30일에 채취하였다. 고욤잎의 동정은 마을 주민으로부터 고욤나무를 확인한 후 최종적으로 우석대학교 한의과대학 본초방제학교 실 김홍준 교수로부터 동정을 받았다. 고욤잎 표본(#2013-07-10)은 전주대학교 대체의대학 보건관리 연구실에 보관하고 있다. 채취된 고욤잎은 즉시 증류수로 세척한 후 5분간 증기찜을 한 후 실온에서 선풍기를 활용하여 건조하였으며, 최종적으로 건조기에서 40°C로 12시간 동안 건조하였다.

추출 및 분획 - 건조된 고욤잎은 400 g을 메탄올 4,000 mL

을 주입하여 24시간 방치한 다음 추출물은 0.45 μ m 필터를 사용하여 여과하고 감압에 의해 유기용매를 제거하고 최종적으로 동결건조기하여 50.3 g을 얻었다. 그 후 50 g을 취하여 가온한 3차 증류수를 이용하여 재용해한 후 *n*-hexane>chloroform>ethyl acetate>butanol>water 순서로 하여 분획 과정을 진행하고 수율(%)을 측정하였다.

HPLC 분석조건 및 Fingerprinting - 실험에서 사용된 분석용 HPLC는 Agilent 1200(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)장치를 활용하였다. 표준 화합물을 80% 메탄올 수용액을 이용하여 적당한 농도로 희석한 후 검액으로 사용하였다. 시료는 주입 전에 0.45 μ m syringe filter로 여과하였다. 이동상으로 A 용매로서 0.5% 개미산 수용액과 B 용매로서 아세트니트릴의 혼합용액을 programmed gradient elution 방법으로 용리하였다. Gradient elution system은 (A)/(B)=0.5% Formic acid aq. (v/v)/acetonitrile (A/B, v/v) as a gradient elution: Initiation-5% B, 3 min-5% B, 8 min-10% B, 12 min-10% B, 15 min-15% B, 20 min-15% B, 27 min-40% B, 32 min-40% B, 39 min-65% B, 43 min-65% B, 48 min-30% B, 50 min-10% B 조건으로 수행하였다. Gemin NX-C18 컬럼(Phenomenex, Golden, Colorado, USA) 온도는 30°C를 유지하였다. 유속은 0.6 mL/min로 검출파장은 254 nm로 고정하여 분석하였다. 또한, 표준시약(rutin, astragal, myricitrin, myricetin과 kaempferol)은 1 mg/mL로 조제하여 고욤잎 EA분획물에 함유되어 있는 rutin, astragal, myricitrin, myricetin 및 kaempferol를 확인하는데 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정 - 총 폴리페놀 함량의 측정은 Folin-Denis법¹⁵⁾에 따라 메탄올 1 mg/mL의 농도로 용해한 각 용매별 추출액과 Folin-Ciocalteu시약 및 10% NaCO₃용액을 각각 1 mL씩 차례로 가한 다음 실온에서 1시간 동안 방치한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 농도별로 제조한 후 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.

총 플라보노이드 함량 측정 - 총 플라보노이드는 Moreno 등¹⁶⁾의 방법에 따라 1 mg/mL 농도의 시료액에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1M potassium acetate 0.1 mL 및 ethanol 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분간 방치한 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 가한 다음 실온에서 1시간 방치한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin를 농도별로 제조한 후 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료의 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

세포 생존율 측정 - 설치류 유래 B16 melanoma 세포주는 (재)전주생물소재연구소(전주시, 전북, 대한민국)로부터 분양받았다. B16 세포는 10% FBS와 1% antibiotics

(penicillin & streptomycin)가 함유된 DMEM배지를 사용하여 습도가 충분하고 37°C가 유지되는 CO₂ 배양기(5% CO₂와 95% 대기)에서 배양하였다. 배양된 세포는 well 당 2×10⁴로 계수하여 24 well 배양 plate에 접종하고 24시간 후에 추출물 또는 EA 분획물을 농도별로 처리하고 α-MSH(1 μM)로 자극하여 48시간 배양하였다. B16세포의 생존율은 MTT assay 방법에 의해 측정하였다. 요약하면 MTT 용액(5 mg/mL)을 주입하고 4시간동안 37°C에서 방치한 후 상층액을 제거하고 formazan 산물을 DMSO로 용해하여 96 well plate로 옮겨 540 nm ELISA reader (Molecular Devices, USA)로 흡광도를 측정하였다.

멜라닌 함량 측정 - B16세포의 TYR 활성은 Tomita 등¹⁷⁾ 방법에 따라 L-DOPA 산화율을 측정하여 계산하였다. B16 세포는 well 당 1×10⁵로 계수하여 24 well 배양 plate에 접종하고 24시간 후에 추출물 또는 EA 분획물을 농도별로 처리하고 α-MSH(1 μM)로 자극하여 48시간 배양한 후 냉각(4°C) 인산완충용액으로 2회 세척하고 0.25% trypsin을 처리하여 세포를 수확하였다. 세척된 세포는 인산완충용액을 사용하여 1,200 rpm으로 2회 원심세척하고 0.1 M 인산완충용액 50 μL(pH 6.8), 1% Triton X-100과 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride가 함유된 lysis 완충액을 150 μL 주입하고 4°C에서 30분간 방치한 후 12,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. 단백질 정량은 Bradford method로 정량하였고, 각각의 세포용해액은 well 당 100 μL씩 96 well plate에 주입한 후 여기에 인산완충액(pH 6.8)에 0.1% L-DOPA 용액을 100 μL을 다시 주입하여 혼합하고 37°C에서 60 분간 방치한 후 405 nm ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 또한 세포내 멜라닌 함량은 상기와 같이 배양된 세포를 인산완충액으로 2회 원심 세척한 후 60°C에서 30분간 건조하였다. 건조된 세포는 1 N NaOH를 500 μL 주입한 후 405 nm ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

Western Blot - B16 세포는 1×10⁵로 계수하여 60 mm 배양접시에 접종하고 24시간 후에 EA 분획물을 농도별로 처리하고 α-MSH(1 μM)로 자극하여 48시간 배양하였다. 배양된 세포는 1 mL의 인산완충액을 주입하고 scraper로 수거하

고 인산완충액을 사용하여 2회 원심 세척한 후 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, aprotinin(5 μg/mL), pepstatin A(5 μg/mL)와 chymostatin(1 μg/mL)이 포함되어있는 20 mM Tris-HCL 완충액(pH 7.4)에 부유시켰다. 단백질 함량은 Bradford method로 정량하였고, 세포용해액의 단백질은 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel을 활용하여 전기영동하여 전개하였으며, nitrocellulose membrane을 활용하여 전개 단백질을 옮기고 2% BSA와 0.1% Tween 20이 함유된 0.01 M Tris-HCL 완충액(TBS)으로 실온에서 60 분간 blocking하였다. 그 후 nitrocellulose membrane은 0.1% Tween 20이 함유된 TBS로 3회 세척한 후 5% BSA가 함유된 TBS에 TYR, MITF, TRP-1, TRP-2(1:200) 또는 β-actin(1:1000) 항체 용액을 주입하고 12시간 방치한 다음 0.1% Tween 20이 함유된 TBS(TBST)로 3회 세척하고 다시 TBS를 활용하여 3회 세척하여 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체(1:10000)를 주입하고 60분간 방치한 후 TBST와 TBS로 3회씩 세척한 후 UVItec Chemiluminescence Imaging System(Cambridge, UK)을 활용하여 단백질의 발현을 조사하였다.

통계처리 - 모든 실험값은 평균±표준편차로 표시했으며, 통계분석은 ANOVA와 Student's t-test로 처리하였으며, 유의성 한계는 p<0.05로 정하였다.

결 과

EA분획물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 - 본 연구는 고음압 MeOH 추출물(ME)을 활용하여 n-hexane(Hx)>chloroform(C)>ethyl acetate(EA)>butanol(Bu)등의 순서로 용매 분획을 실시한 결과 Table I과 같이 ME수율은 18.3%, Hx수율은 0.61%, C수율은 0.06%, EA수율은 1.38% 그리고 Bu수율은 2.57%였다. 더불어 EA 분획물의 총 폴리페놀의 함량은 324.30±7.16(mg GAE/g)으로 다른 분획물보다 1.9배에서 12배 높았으며, 총 플라보노이드 함량은 EA 분획물이 298.50±5.46(mg QE/g)으로 Bu 분획물(324.34±2.89 mg QE/g)보다 약간 낮았지만, ME(298.59±4.52 mg

Table I. Extraction yield, total polyphenol and flavonoid content (TPC and TFC) in the extract and fractions of *Diospyros lotus* leaves (DLL)

Extract	Extraction yield (%)	TPC mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)
MeOH (ME)	18.3	98.59±5.08	298.59±4.52
n-Hexane (Hx)	0.61	26.50±0.40	267.93±3.99
Chloroform (C)	0.06	37.01±1.07	214.04±0.23
Ethyl acetate (EA)	1.38	324.30±7.16	298.50±5.46
Butanol (Bu)	2.57	168.58±2.11	324.34±2.89

GAE: gallic acid equivalent, QE: quercetin equivalent. Values represent the means±SD (n=3).

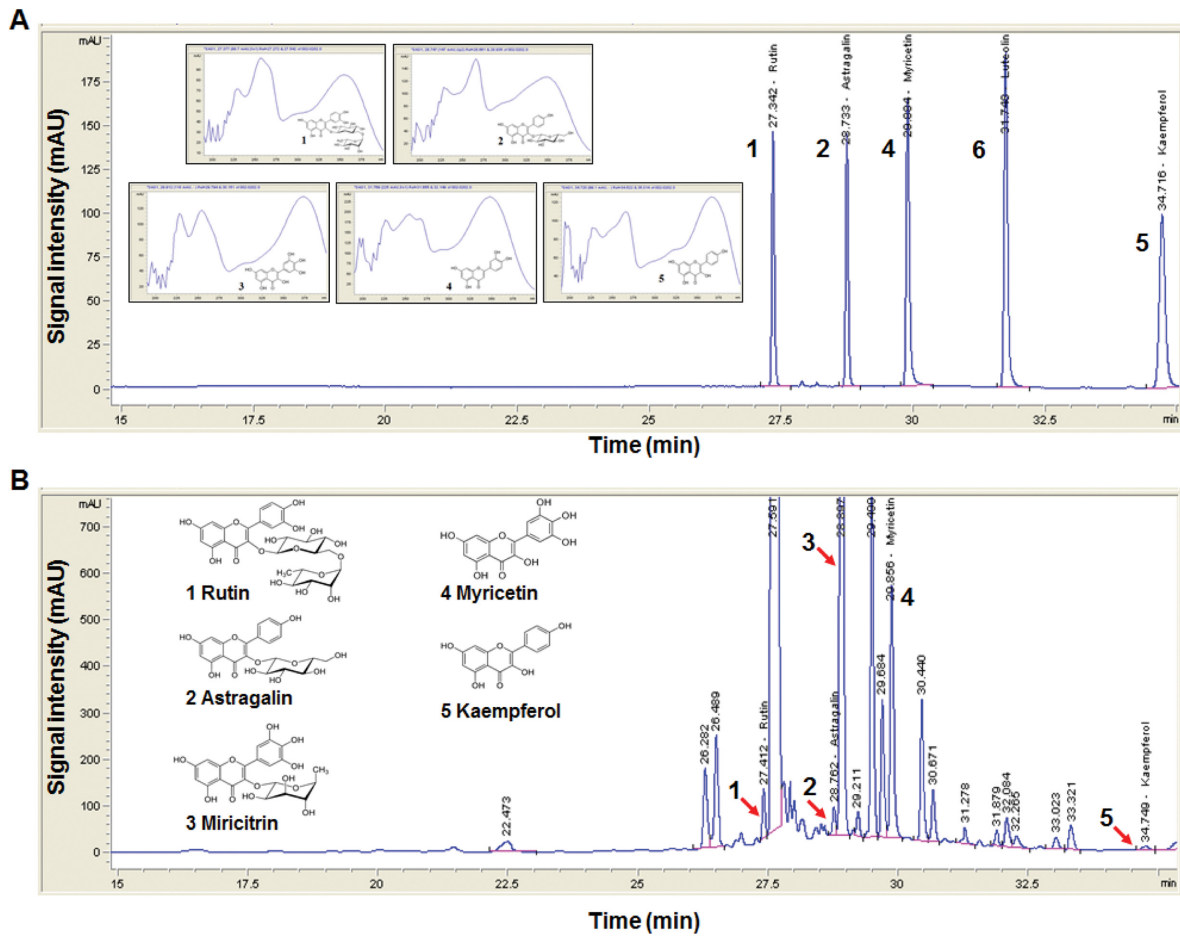


Fig. 1. HPLC chromatogram in EA fraction of *D. lotus* leaves. A: standard mixtures detected at 254 nm; B: EA fraction detected at 254 nm.

QE/g)와 같았고 Hx분획물(267.93±3.99 mg QE/g)과 C분획물(214.04±0.23 mg QE/g) 보다 높았다.

EA분획물의 HPLC Fingerprinting - 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 높은 고염 EA분획물을 대상으로 rutin, astragalín, myricitrín, myricetin과 kaempferol 등 표준 물질을 활용하여 HPLC fingerprinting을 수행한 결과 rutin, astragalín과 kaempferol 등의 함량은 매우 낮은 것으로 조사되었으나, myricitrín과 myricetin의 함량은 매우 높아 주요 화합물로 동정되었다(Fig. 1).

EA분획물이 세포 생존율에 미치는 영향 - 본 연구는 고염 EA분획물이 B16 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해서 α-MSH(1 μM)을 처리한 대조군과 α-MSH를 처리하지 않은 대조군과 비교한 결과 세포 생존율에 미치는 영향은 없었다. 또한 EA 분획물 50 μg/mL과 100 μg/mL 실험군 그리고 참고물질로 arbutin 100 μg/mL을 처리한 실험군에서도 세포 생존율의 변화는 없었다. 따라서 본 연구에 사용된 EA 분획물이 세포 생존율에는 영향을 주지 않아 독성이 없었다.

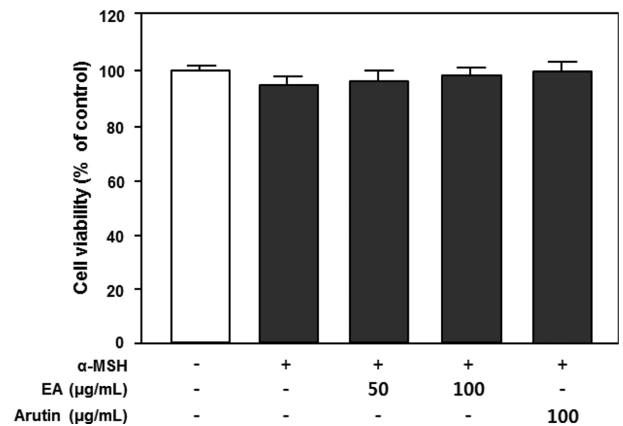


Fig. 2. Effect of EA fraction from *D. lotus* leaves on B16 cell viability. B16 cells (2×10^4) cultured in 24 well culture plate for 24 hours, and then were treated with or without 1 μM of α-MSH in the presence and absence of EA fraction (50 μg/mL or 100 μg/mL) for 48 hours. Cell viability were measured by MTT assay as described in the section of Materials and Methods. Values represent the means ± SD of three independent experiments.

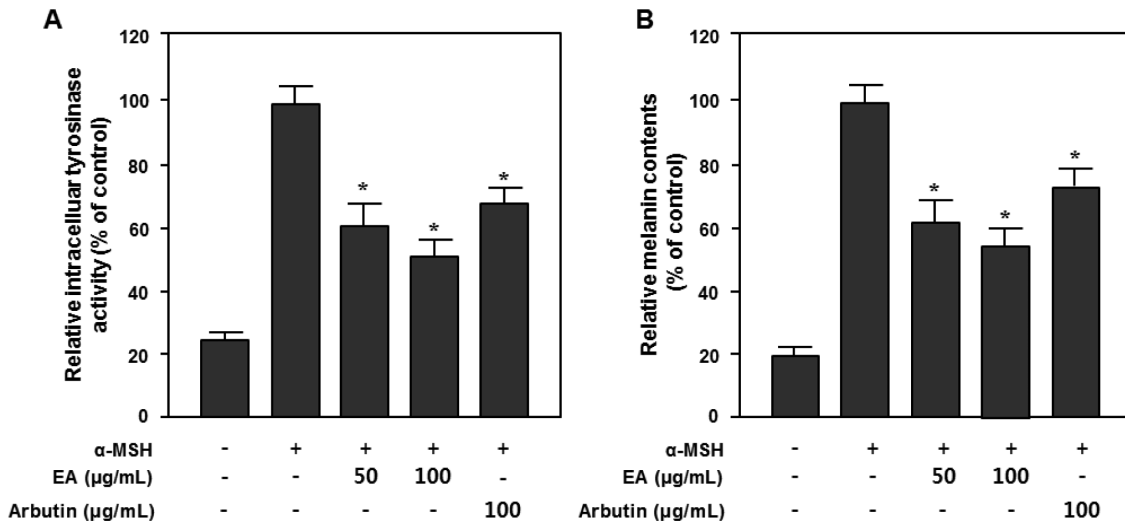


Fig. 3. Inhibitory effect of EA fraction from *D. lotus* leaves on intracellular tyrosinase activity (A) and melanin content (B) in B16 cells. B16 cells (1×10^5) cultured in 24 well culture plate for 24 hours, and then were treated with or without 1 μM of α-MSH in the presence and absence of EA fraction (50 μg/mL or 100 μg/mL) for 48 hours. Intracellular tyrosinase activity and melanin content were measured as described in the section of Materials and Methods. Values represent the means ± SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ versus α-MSH alone group.

EA분획물의 TYR 활성 및 멜라닌 생성에 억제 효과 - 본 연구는 고희염 EA분획물이 B16 세포내 TYR 활성과 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 Fig. 3A와 같이 α-MSH가 처리된 대조군의 TYR 활성을 100%로 정하였을 때 정상군의 TYR 활성은 25.32±3.12%였고, α-MSH와 EA 분획물이 동시에 처리된 50 μg/mL과 100 μg/mL 처리 실험군은 TYR 활성이 각각 61.53±8.51%와 52.35±3.25%로 나타나 대조군에 비해서 약 38%와 47%가 억제되는 효과가 있었다($p < 0.05$). 이러한 100 μg/mL의 EA 분획물의 TYR 활성은 참고물질로 활용한 100 μg/mL의 arbutin (69.15±4.61%)보다 약 17% 더 억제되었다. 더불어 Fig. 3B와 같이 α-MSH가 처리된 대조군의 멜라닌 함량을 100%로 정하였을 때 정상군의 멜라닌 함량은 19.52±2.54%였고, α-MSH와 EA 분획물이 동시에 처리된 50 μg/mL과 100 μg/mL 처리 실험군은 멜라닌 함량이 각각 62.12±6.71%와 55.4±4.56%로 나타나 대조군에 비해서 약 38%와 45%가 억제되는 효과가 있었고, 100 μg/mL의 arbutin(75.23±4.58%)보다 50 μg/mL과 100 μg/mL 처리 EA 실험군은 각각 13%와 20% 더 억제되는 효과가 있었다.

EA분획물의 멜라닌형성 관련 단백질 발현 억제 효과 - 마지막으로 본 연구는 고희염 EA분획물이 B16 세포의 멜라닌 형성과정과 관련된 단백질의 발현을 조사하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 α-MSH 처리 대조군은 TYR, TRP-1, TRP-2 및 MITE가 모두 정상세포 군에 비해서 높게 발현되었으나, 50 μg/mL과 100 μg/mL EA분획물 처리군은 이들 단백질 발현이 현저히 억제되는 효과가 있었다.

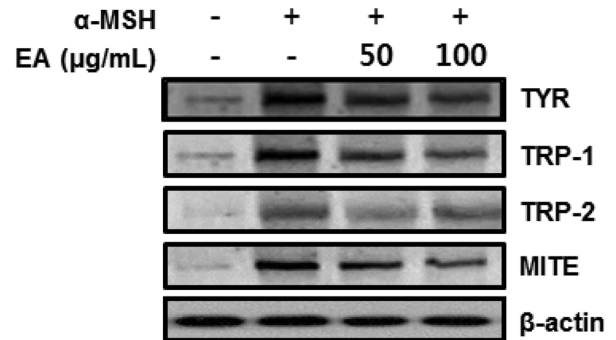


Fig. 4. Inhibitory effects of EA fraction from *D. lotus* leaves on protein expression associated with α-MSH-induced melanogenesis in B 16 cells. B16 cells (1×10^5) cultured in 24 well culture plate for 24 hours, and then were treated with or without 1 μM of α-MSH in the presence and absence of EA fraction (50 μg/mL or 100 μg/mL) for 48 hours. Western blot analysis using primary antibody of TYR, TRP-1, TRP-2 and MITE, and β-actin.

고 찰

최근에 우리는 고희염 추출물을 대상으로 추출물 자체의 항산화 활성과 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride(AAPH)가 유도하는 적혈구의 산화적 손상에 대한 항용혈 작용은 물론 AAPH에 의해 고갈된 적혈구의 GSH 함량을 복원하는 효과가 있음을 보고한바 있다.¹³⁾ 또한 고희염 추출물은 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)와 calcium ionophore A23187로 활성화된 랫트 비만세포에서

항염증 및 ICR 마우스에서 항 가려움증에 대한 효과를 규명한바 있다.¹⁴⁾ 그러므로 본 연구는 고욤잎을 대상으로 용매별 분획물을 얻고 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 조사한 결과 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높은 EA 분획물을 선택하여 멜라닌형성 억제에 대한 효과를 조사하였다.

고욤잎 EA분획물은 rutin, astragalín 및 kaempferol 함량은 매우 낮은 것으로 조사되었으나, myricitrin과 myricetin의 함량은 매우 높아 주요 화합물로 동정되었다(Fig. 1). 최근 고욤(건조과실 껍질)은 hydrolysable tannin 계열의 화합물인 gallic acid, methyl gallate와 ellagic acid, flavonol aglycone 계열인 kaempferol, quercetin과 myricetin 그리고 flavonol glycoside 계열인 myricetin-3-O- β -glucuronide과 myricetin-3-O- α -rhamnoside가 함유된 것으로 알려졌다.⁹⁾ 고욤잎 유래 rutin, astragalín, kaempferol, myricitrin과 myricetin 등의 화합물이 함유된 것을 본 연구에서 처음으로 밝혔다.

식품 및 약용식물 유래 rutin,¹⁸⁾ astragalín¹⁹⁾ 및 kaempferol²⁰⁾은 TYR 활성을 억제하여 미백 효과가 있는 것으로 알려졌으며, 소귀나무(*Myrica rubra*) 유래 myricetin과 myricitrin은 멜라닌형성 억제 효과가 있는 것으로 보고되었다.²¹⁾ 때문에 고욤잎 EA분획물에 대한 멜라닌형성 억제효과를 조사할 필요성이 제기되었다.

그러므로 본 연구는 고욤잎 EA분획물을 대상으로 미백 효과가 있는지 확인하기 위해서 멜라닌형성 억제 물질로 알려진 arbutin(100 μ g/mL)과 EA 분획물을 선택하여 설치류 유래 멜라노마인 B16 세포주를 대상으로 TYR 활성 및 멜라닌 함량을 조사하였다. 그 결과 본 연구에서 사용한 50 μ g/mL과 100 μ g/mL의 EA 분획물은 참고물질로 사용한 arbutin보다 TYR 활성 및 멜라닌 생성 억제에 대한 효과가 우수하였다(Fig. 3).

멜라닌세포는 자외선, α -MSH, agouti signal protein(ASP), endothelin, growth factor 및 cytokine 등 내인성 및 외인성 인자에 의해서 활성화 된다.²²⁾ 이와 같이 내인성 또는 외인성 인자에 의해서 멜라닌세포내 TYR, TRP-1 및 TRP-2와 같은 분자가 활성화 되면서 멜라닌을 합성한다. TYR은 tyrosinase hydroxylase, dihydroxyindole oxidase 및 5,6-dihydroxyindole oxidase 등 효소를 활성화시켜 eumelanin과 pheomelanin을 합성하는데 핵심적인 역할을 한다. TRP-1은 TYR 활성을 안정화시키는데 관여하고,^{1,22,23)} TRP-2는 멜라닌 중합체의 carboxylate subunit 조절에 작용하는 것으로 알려졌다.²²⁾ 이와 같이 TYR, TRP-1과 TRP-2는 멜라닌 합성에 관여하는 중요한 분자다. 또한 MITE는 멜라닌 세포의 생존과 증식 및 멜라닌 생성에 있어 TYR 유전자를 조절하는 매우 중요한 전사인자(transcription factor)로 알려져 있어 멜라닌 생성에 결정적 역할을 한다.²³⁾

이와 같이 본 연구는 고욤잎 EA분획물이 멜라닌 생성 억제 효과와 관련된 분자적 기전을 알아보려고 western blot 방법으로 단백질 발현을 조사하였다. 그 결과 α -MSH가 유도하는 TYR, TRP-1, TRP-2 및 MITE 단백질 발현을 EA 분획물을 처리할 경우 현저히 억제되는 결과를 확인 하였다. 그러므로 고욤잎 EA분획물은 B16 세포에서 멜라닌 형성을 억제하는 우수한 효과가 있는 것을 본 연구를 통하여 처음으로 확인하였다. 그러므로 고욤잎 유래 EA 분획물은 멜라닌 색소 과다 침착에 의한 문제성 피부에 대해서 효과적으로 관리하는데 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 고욤잎 EA분획물이 어떠한 세포내 신호전달 경로로 TYR, TRP-1, TRP-2 및 MITE 등 단백질 발현을 억제하는지에 대해서는 앞으로 더 조사해야할 필요성이 있을 것으로 사료된다.

결 론

최근에 저자 등에 의해 항산화, 항염 및 항알레르기 효과가 우수함을 구명하면서 미백과 관련된 약리적 효과를 규명해야할 필요성이 제기 되었다. 그러므로 본 연구는 고욤잎을 대상으로 EA분획물을 얻고 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 조사한 결과 이들 물질이 풍부하게 함유되어 있음을 밝히고 관련 지표물질을 확인한 결과 미백효과가 있는 것으로 알려진 myricetin과 myricitrin이 주요 화합물인 것을 확인하였다. 또한 EA분획물을 대상으로 B16 세포의 생존율에 미치는 영향을 조사한 결과 본 연구에서 사용한 50 μ g/mL과 100 μ g/mL 실험군에서 세포독성이 없음을 확인한 후 이들 농도에서 B16 세포의 TYR 활성 및 멜라닌 생성에 대한 억제효과가 우수함을 확인하였다. 이러한 EA 분획물의 멜라닌 형성 억제는 TYR, TRP-1, TRP-2 및 MITE 등 단백질 발현을 억제함으로써 그 효과를 발휘하는 것을 본 연구에서 처음으로 규명하였다. 그러므로 고욤잎 EA분획물은 멜라닌 생성에 대한 미백 소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2013년도 산학연동기술개발사업(C0102117)으로 중소기업청과 일부 지역특화사업(R0002271)사업으로 산업통상부 지원을 받아 연구되었다.

인용논문

- Hill, H. Z., Li, W., Xin, P. and Mitchell, D. L. (1997) Melanin: a two edged sword? *Pigment Cell Res.* **10**: 158-161.
- Lin, Y. P., Hsu, F. L., Chen, C. S., Chern, J. W. and Lee, M. H. (2007) Constituents from the Formosan apple reduce tyrosinase activity in human epidermal melanocytes. *Phytochem-*

- istry **268**: 1189-1199.
3. Hirobe, T. (2005) Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* **18**: 2-12.
 4. Kim, D. S., Jeong, Y. M., Park, I. K., Hahn, H. G., Lee, H. K., Kwon, S. B. Jeong, J. H., Yang, S. J., Sohn, U. D. and Park, K. C. (2003) A new 2-imino-1,3-thiazoline derivative, KHG22394, inhibits melanin synthesis in mouse B16 melanoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* **30**: 180-183.
 5. Briganti, S., Camera, E. and Picardo, M. (2003) Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res.* **16**: 101-110.
 6. Park, J. S. (2010) Date plum (*Diospyros lotus*) fruit. *Koshikye Cor. Seoul.* pp. 74-75.
 7. Ganapaty, S. I., Steve Thomas, P., Karagianis, G., Waterman, P. G. and Brun, R. (2006) Antiprotozoal and cytotoxic naphthalene derivatives from *Diospyros assimilis*. *Phytochemistry* **67**: 1950-1956.
 8. Ayaz, F. A. and Kadioglu, A. (1999) Fatty acid compositional changes in developing Persimmon (*Diospyros lotus* L.) fruit. *New Zealand J. Crop. Hort. Sci.* **27**: 257-261.
 9. Loizzo, M. R., Said, A., Tundis, R., Hawas, U. W., Rashed, K., Menichini, F., Frega, N. G. and Menichini F. (2009) Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds. *Plant Foods Hum. Nutr.* **64**: 264-270.
 10. Azadbakht, M., Hosseinimehr, S. J., Shokrzadeh, M., Habibi, E. and Ahmadi, A. (2001) *Diospyros lotus* L. fruit extract protects G6PD-deficient erythrocytes from hemolytic injury in vitro and in vivo: prevention of favism disorder. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **15**: 1270-1281.
 11. Moghaddam, A. H., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., Bigdellou, R., Mohammadzadeh, S. and Ebrahimzadeh, M. A. (2012) Antioxidant, antihemolytic and nephroprotective activity of aqueous extract of *Diospyros lotus* seeds. *Acta. Pol. Pharm.* **69**: 687-692.
 12. Nabavi, S. M., Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. F., Fazelian, M. and Eslami, B. (2009) *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of *Diospyros lotus* and *Pyrus boissieri*-ana growing in Iran. *Pharmaco. Maga.* **5**: 122-126.
 13. Kim, H. S., Kang, H. J., Jeon, I. H., Mok, J. Y., Park, Y. K., Shin, J. H., Kim, J. H. and Jang, S. I. (2013) Antioxidant activity and protective effect of leaf extract from *Diospyros lotus* on oxidative stress of red blood cells. *Korean J. Oriental Physiol. Pathol.* **27**: 631-636.
 14. Kim, H. S., Jeon, I. H., Mok, J. Y., Kang, H. J., Shin, J. H., Park, Y. K., Jeong, S. I. and Jang, S. I. (2013) Anti-allergy and anti-pruritic effects of *Diospyros lotus* L. leaf extract. *Korean J. Pharmacol.* **44**: 60-69.
 15. Peterson, D. M., Emmons, C. L. and Hibbs, A. H. (2001) Phenolic antioxidants and antioxidant activity in pearling fractions of oat groats. *J. Cereal. Sci.* **33**: 97-103.
 16. Moreno, D. A., Carvajal, M., Lopez-Berenguer C. and Garcia-Viguera, C. (2006) Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**: 1508-1522.
 17. Tomita, Y., Maeda, K. and Tagami, H. (1992) Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: possible role in post inflammatory pigmentation. *Pigment Cell Res.* **5**: 357-361.
 18. Drewa, G., Schachtschabel, D. O., Palgan, K., Grzanka, A. and Sujkowska, R. (1998) The influence of rutin on the weight, metastasis and melanin content of B16 melanotic melanoma in C57BL/6 mice. *Neoplasma* **45**: 266-271.
 19. Kim, G. E., Kang, H. K., Seo, E. S., Jung, S. H., Park, J. S., Kim, D. H., Kim, D. W., Ahn, S. A., Sunwoo, C. and Kim, D. (2011) Glucosylation of the flavonoid, astragalgin by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextranucrase acceptor reactions and characterization of the products. *Enzyme Microb. Technol.* **50**: 50-56.
 20. Rho, H. S., Ghimeray, A. K., Yoo, D. S., Ahn, S. M., Kwon, S. S., Lee, K. H., Cho, D. H. and Cho, J. Y. (2011) Kaempferol and kaempferol rhamnosides with depigmenting and anti-inflammatory properties. *Molecules* **16**: 3338-3344.
 21. Matsuda, H., Higashino, M., Chen, W., Tosa, H., Iinuma, M. and Kubo, M. (1995) Studies of cuticle drugs from natural sources. III. Inhibitory effect of *Myrica rubra* on melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 1148-1150.
 22. Nordlund, J. J., Boissy, R. E., Hearing, V. J., King, R. A. and Ortonne, J. P. (1998) *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology.* 1-1025. Oxford Univ. Press, New York.
 23. Fang, D., Kute, T. and Setaluri, V. (2001) Regulation of tyrosinase-related protein-2 (TYRP2) in human melanocytes: relationship to growth and morphology. *Pigment Cell Res.* **14**: 132-139.
 24. Tachibana, M. (2001) Cochlear melanocytes and MITF signaling. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **6**: 95-98.
- (2014. 6. 20 접수; 2014. 8. 20 심사; 2014. 9. 4 게재확정)