

## Whitening Effect of *Salvia miltorrhiza* Bunge Water Extract in Human Epidermal Melanocyte

Tae-Soon Park · Dong-Hee Kim · Jun-Ho Son\* 

### 인간 표피 멜라닌 세포에서의 단삼 추출물의 미백효과에 관한 연구

박태순 · 김동희 · 손준호\*

Received: 13 July 2015 / Accepted: 2 September 2015 / Published Online: 31 December 2015  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2015

**Abstract** The objective of this study was to investigate the whitening effect of *Salvia miltorrhiza* Bunge water extract (SM-W) in human epidermal melanocyte (HEM). Mushroom tyrosinase inhibitory effect of SM-W was approximately 42% at 1,000 µg/mL. The HEM cellular tyrosinase and melanin synthesis inhibition activity were 26 and 25% at 5 µg/mL, respectively. Whitening related proteins and mRNAs including tyrosinase, tyrosinase related protein 1 (TRP-1) and TRP-2, and microphthalmia associated transcription factor were reduced by SM-W treatment. In addition, the cAMP expression inhibitory effect of SM-W was decreased by 41% at 5 µg/mL concentration. These results indicated that *Salvia miltorrhiza* Bunge could be used to the possible utilization of functional cosmetic ingredients by confirming whitening activity related with melanin content.

**Keywords** cosmetic · human epidermal melanocyte · *Salvia miltorrhiza* Bunge · tyrosinase · whitening

### 서론

의학기술이 발전되고 현대사회의 생활수준이 향상됨에 따라 인간의 평균수명도 증가되면서 사람들의 관심은 건강하게 오래 살며 아름답게 늙어가는 것으로 집중되고 있어, 기미(melasma), 주근깨(freckle)와 같은 색소 침착형 피부질환과 피부트러블을 유발하는 각종 염증 등에 대한 예방 및 치료에 사회적인 관심이 높아지고 있다. 이러한 시대 관심에 부응하여 천연에서 유래한 소재로부터 유용성분을 추출하여 생리활성을 밝혀내고 기능성 소재로서의 활용성을 타진하기 위한 많은 연구가 수행되고 있다(Jin 등, 2012).

표피의 기저층에 존재하는 멜라닌(melanin)은 피부색을 결정하는 주요한 색소로서 자외선에 의한 손상을 막고 활성산소를 제거하여 피부를 보호역할을 한다(Choi 등, 2011). 그러나 이의 과도한 생성은 기미, 주근깨, 피부 반점 등 유발하며 멜라닌 전구물질의 독성으로 인해 세포의 사멸 및 피부암 생성이 촉진되기도 한다(Urabe 등, 1994). 기존의 미백에 관한 연구로는 멜라닌 합성의 과정에 주요한 역할을 하는 tyrosinase의 활성 억제하는 정도를 스크리닝하여 미백소재를 개발하는 경우가 많이 있었지만, 최근에는 멜라닌 생성, 이동, 축적 등 여러 단계에서의 기작을 조절함으로써 다양한 메커니즘을 연구를 통해 보다 효능이 우수한 미백소재를 개발하려는 경우가 증가하고 있다(Lee 등, 2011). 멜라닌합성의 세포내 신호전달 기전 중 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA) 경로가 멜라닌 합성의 주요 경로로서 자외선에 피부가 노출되었을 때 멜라닌 세포의 cAMP가 증가되고 하루 신호전달 물질인 PKA를 활성화시키며, cAMP reponse element binding protein (CREB)을 거쳐 microphthalmia associated transcription factor (MITF)의 발현을 증가시킨다(Sassone-Corsi, 1998; Busca와 Ballotti, 2000). MITF는 멜라닌합성 과정에서 중요한 전사 조절 인자로 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진한다(Busca와 Ballotti, 2000; Saha 등, 2006).

T.-S. Park · D.-H. Kim · J.-H. Son  
Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry, Gyeongbuk  
712-260, Republic of Korea

\*Corresponding author (J.-H. Son: bio115@kotmin.kr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본 약용식물로 뿌리의 색이 붉은 특징을 가지고 있으며, 뿌리는 특유의 냄새가 있고 맛은 약간 쓴맛이 난다(Kim, 1989). 단삼의 주요 성분으로는 tanshinone I, II A, II B 등을 포함한 diterpene 화합물과 danshensu, protocatechuic aldehyde, salvialolic acid B 등을 포함하는 phenolic 화합물, baicaline,  $\beta$ -sitosterol, ursolic acid, vitamin E 및 tannine 등이 보고되어있다(Fugh-Berman, 2000). 단삼의 효능으로는 항염증(Yun 등, 2007), 항혈전(Yang 등, 2007), 항산화(Yang 등, 2007; Kim과 Kim, 2008), 항알러지(Fan 등, 2009), 항균(Mok 등, 1994), 항암(Kim 등, 1999), 신경세포 자연사(Lee와 Kim, 2012) 및 뇌세포 보호 효과(Shim 등, 2008) 등이 보고되었으며, 현재까지의 미백효과에 대한 연구는 버섯유래 tyrosinase 저해능(Kim과 Kim, 2008)과 마우스 유래의 흑색종 세포와 같은 동물 암세포를 이용한 멜라닌 생합성 저해능(Chou 등, 2009)에 대한 보고만 되어 있고, 정상 인간 표피 멜라닌 세포를 이용한 미백기전에 관한 보고는 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 단삼의 열수 추출물을 이용하여 인간 정상 세포에서도 미백효능을 밝히고자 인간의 표피 멜라닌 세포인 human epidermal melanocyte (HEM)에서의 cAMP/PKA 경로를 통한 멜라닌 생합성 억제에 의한 미백효과를 검증하고 미백화장품의 소재로서의 가능성을 확인하였다.

## 재료 및 방법

**시료제조.** 본 실험에 사용한 단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 2014년 6월에 경상북도 경산시 소재의 H사의 규격 포장한 중국산을 구입하여 사용하였다. 단삼 100 g에 10배의 물을 가하여 70°C에서 3시간 환류 냉각 추출한 뒤 상등액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하였다. 획득한 추출액을 whatman No. 1 여과지로 여과하고 농축하여 동결건조 후 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

**시약 및 기기.** 세포독성 측정에 사용된 세포주는 인간 표피 멜라닌 세포를 ATCC (USA)에서 구입하여 사용하였으며, mushroom tyrosinase, tyrosine, L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetra zolium-bromide (MTT)와 ripa buffer는 Sigma-Aldrich Co. (USA)에서 구입하였다. 세포배양을 위해 Dulbecco's modified eagle medium, fetal bovine serum, penicillin/streptomycin, trypsin 250, 0.4% trypan blue stain은 Gibco BRL (USA)에서 구입하여 사용하였다. cAMP kit는 Cayman (USA)에서 구매하였으며, 1차 항체 mouse anti-MITF, TRP1, TRP2, goat anti-tyrosinase 와 mouse-anti-goat IgG, rabbit-anti-mouse IgG 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (USA)에서 구입하였다. 또한 사용된 측정기기는 ELISA reader (Tecan, Austria)를 이용하여 분석하였다.

**MTT assay에 의한 세포 생존율 측정.** 세포를 96-well plate에  $5 \times 10^3$  cells/well 이 되게 180  $\mu$ L씩 분주하고, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양 하였다. 배양 후 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 20  $\mu$ L를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 150  $\mu$ L를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 microplate reader (Gen5, Bio-Tak Instruments, Inc., USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Tyrosinase 저해활성 및 멜라닌 함량 측정.** Tyrosinase 저해활성 측정은 버섯유래의 tyrosinase와 HEM 세포 유래의 tyrosinase 저해활성을 측정하였다. 먼저 버섯 유래의 tyrosinase 저해능은 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 500  $\mu$ L에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 200  $\mu$ L 및 시료용액 100  $\mu$ L의 혼합액에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 200  $\mu$ L를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였으며(Yagi 등, 1986), HEM에서 유래된 tyrosinase 저해활성은  $1 \times 10^5$ 개 세포에 lysis buffer (67 mM sodium phosphate buffer, 1% triton X-100, 0.1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride) 100  $\mu$ L를 첨가한 후 얼음에 방치한 후 초음파 분쇄 하였다. 1시간 후 13,200 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻어진 상등액을 효소용액으로 사용하여 67 mM phosphate buffer, pH 6.8에 녹인 8.0 mM의 L-DOPA 180  $\mu$ L를 기질로, 세포 상등액 20  $\mu$ L를 첨가하여 37°C에서 60분간 반응한 후, 생성된 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정하였다.

멜라닌 함량 측정은 상기의 HEM세포의 원심분리 후 남은 pellet을 이용하여 멜라닌 함량 측정에 사용하였다. 상등액이 제거된 pellet을 건조 시킨 뒤 1 N NaOH 1 mL를 넣어 80°C에서 1시간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. tyrosinase 저해 및 멜라닌 생합성 저해는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

**세포 내 cAMP 농도 측정.** 세포 내 cAMP 농도는 Cayman사의 cAMP immunoassay kit (USA)를 사용하여 측정하였다.  $3 \times 10^5$ 개의 HEM 세포를 0.1 M HCl에 용해하여 phosphodiesterase 활성을 억제하였다. 상층액을 모아서 중화 시키고 희석하여 고정된 cAMP conjugate를 넣어 96-well에서 cell lysate와 면역반응을 시켰다. Substrate solution을 넣어 결합한 효소의 활성 정도를 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

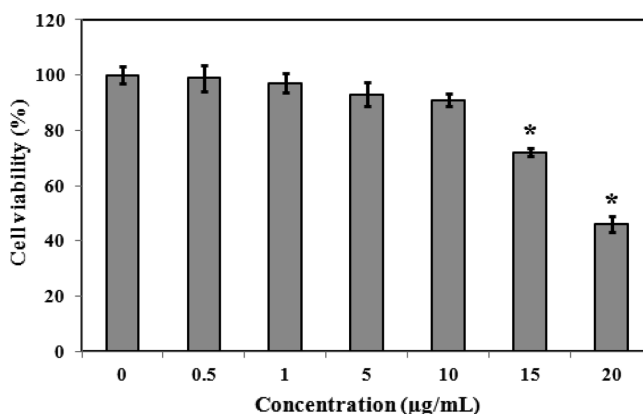
**Western blot을 이용한 미백관련 단백질의 발현 측정.** 미백관련 인자 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 cell line (HEM)을 6-well에  $1 \times 10^5$  cells/well에 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 각 well에 시료를 48시간 동안 처리한 뒤 PBS로 2번 세척해주었다. Lysis buffer를 이용하여 HEM 세포를 용해시키고, 4°C 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리 하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 Bradford assay로 정량하여 20  $\mu$ g의 단백질을 10%의 SDS-PAGE gel에서 전기영동 하여 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 incubation 시켰다. MMP-1 각각의 1차 항체를 1:1000으로 희석하여 4°C에서 over night 한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 washing 하고 mouse anti-rabbit IgG HRP의 각각의 2차 항체를 1:1,000로 희석하여 실온에서 1시간 동안 붙이고, 3회 세척 후 LAS 4000 image analyzer (Fugifilm life science, Japan)기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량 하였다.

**RT-PCR을 이용한 미백관련 mRNA 발현 측정.** 단삼 열수 추출물의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF 유전자 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 cell line (HEM)을 6-well에  $1 \times 10^5$  cells/well에 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 시료를 농도별로 처리한 배지로 교환하고 48시간 동안 처리한 뒤 PBS로 2번 세척해주었다. Total RNA는 PBS로 3번 세척하고 세포를 포집한 다음 trizol reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 분리하였다. Total RNA 2  $\mu$ g과 PCR primer

**Table 1** The sequences of the primers of the MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase and GAPDH for HEM 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	TOC ACC ACC CTG TTG CTG TA

oligonucleotide를 RT-PCR mixer와 혼합하고 RT-PCR을 시행하였다. Lysis buffer를 이용하여 HEM 세포를 용해시키고, 4°C 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리 하였다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF의 염기서열은 Table 1과 같다. RT의 조건은 42°C에서 1시간 방치하여 cDNA를 제조하고 94°C에서 5분간 방치하여 reverse transcriptase를 불활성화 시켰다. 이후의 PCR 조건은 94에서 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 LAS 4000 image analyzer 으로 확인하였다.

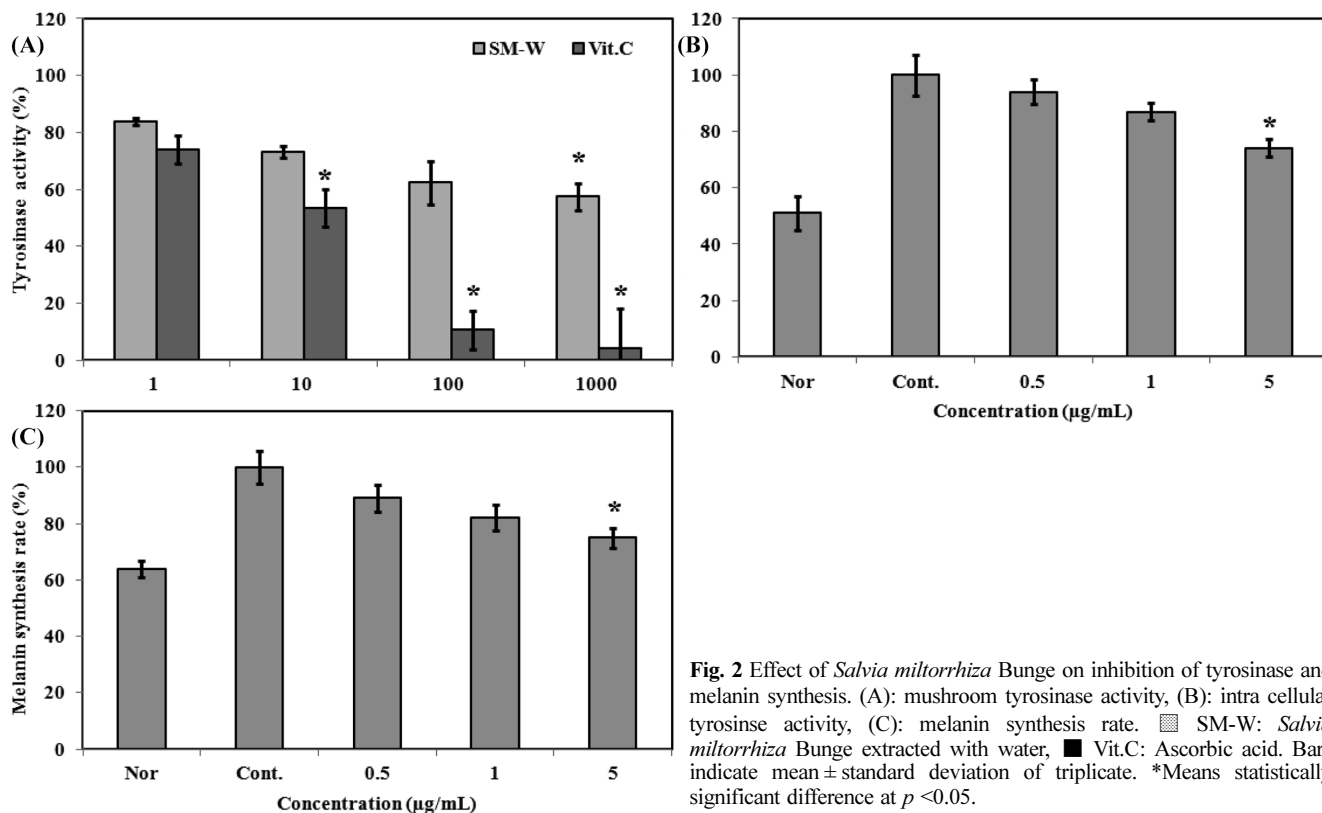


**Fig. 1** Cell viability of water extract from *Salvia miltorrhiza* Bunge on HEM. Bars indicate mean ± standard deviation of triplicate. \*Means statistically significant difference at  $p < 0.05$ .

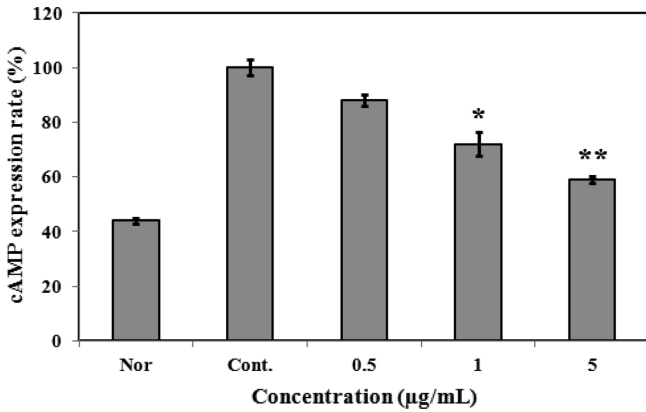
**통계처리.** 결과의 통계처리는 SPSS 10.0을 사용하였으며, 유의 차 검증은 분산분석(ANOVA: analysis of variance) 프로그램에서 t-test를 이용하여 통계적 유의수준  $p < 0.05, 0.01$ 에서 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**Human epidermal melanocyte의 세포 생존율 평가.** 단삼 열수 추출물의 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 평가한



**Fig. 2** Effect of *Salvia miltorrhiza* Bunge on inhibition of tyrosinase and melanin synthesis. (A): mushroom tyrosinase activity, (B): intracellular tyrosinase activity, (C): melanin synthesis rate. ■ SM-W: *Salvia miltorrhiza* Bunge extracted with water, ■ Vit.C: Ascorbic acid. Bars indicate mean ± standard deviation of triplicate. \*Means statistically significant difference at  $p < 0.05$ .



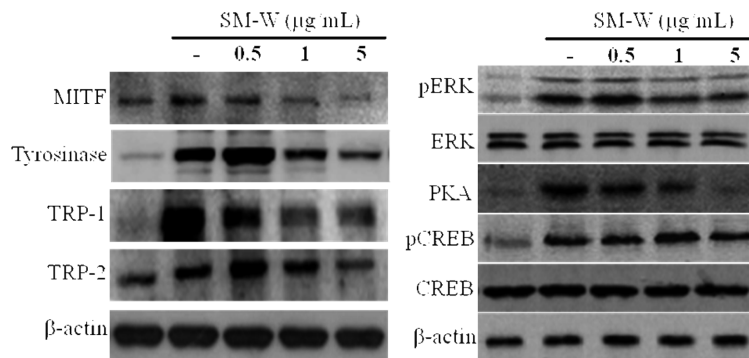
**Fig. 3** Decreased cAMP levels in HEM cells by water extract from *Salvia mitorrhiza* Bunge treatment. Bars indicate mean  $\pm$  standard deviation of triplicate. \* \*\*Means statistically significant difference at (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

결과 Fig. 1과 같이 나타내었다. 추출물의 농도를 0.5–20 µg/mL 처리 후 세포 독성을 측정된 결과 0.5–10 µg/mL의 농도까지 90% 이상의 세포 생존율을 나타내어, HEM 세포를 이용한 tyrosinase, 멜라닌 생합성, 미백관련 신호전달 단백질 및 유전자 발현 실험은 5 µg/mL 이하의 농도에서 실험을 진행하였다. **Tyrosinase 및 멜라닌 생합성 저해활성.** Tyrosinase 저해제는 미백화장품의 주요 기능성 성분으로 임상적으로 피부암과 과색소 침착에 관련되는 피부병 치료에 유효한 것으로 알려져 있다(Yang 등, 2008). 따라서 본 연구에서는 먼저 버섯 유래의 tyrosinase를

사용하여 1, 10, 100, 1,000 µg/mL의 단삼 추출물을 처리하여 효소활성을 측정된 결과 1,000 µg/mL의 농도에서 42%의 저해능을 나타내었다. 또한, 세포수준에서의 tyrosinase 활성을 억제하는 알아보기 위하여 HEM 세포에 단삼 추출물 0.5, 1, 5 µg/mL의 농도로 처리한 결과 각각 6, 13, 26%로 농도 의존적 저해능을 나타내었다(Fig. 2). 이 결과에서 단삼 열수 추출물이 멜라닌 합성 억제 효과는 세포에 작용하여 tyrosinase의 활성을 억제하는 것에 기인하는 것을 알 수 있다. 이는 멜라닌 생합성 저해능 5 µg/mL에서 26%의 저해능을 나타낸 것과 비교시 유사한 결과를 나타내어 높은 상관 관계를 나타내었다(Fig. 2). 이 3가지의 결과에서 단삼 추출물은 세포내에서 tyrosinase가 작용하는 상위단계 과정에 영향을 미쳐 활성을 억제한 것이라 추정되어 cAMP/PKA경로의 인자들의 단백질 및 유전자 발현 저해능을 측정하였다.

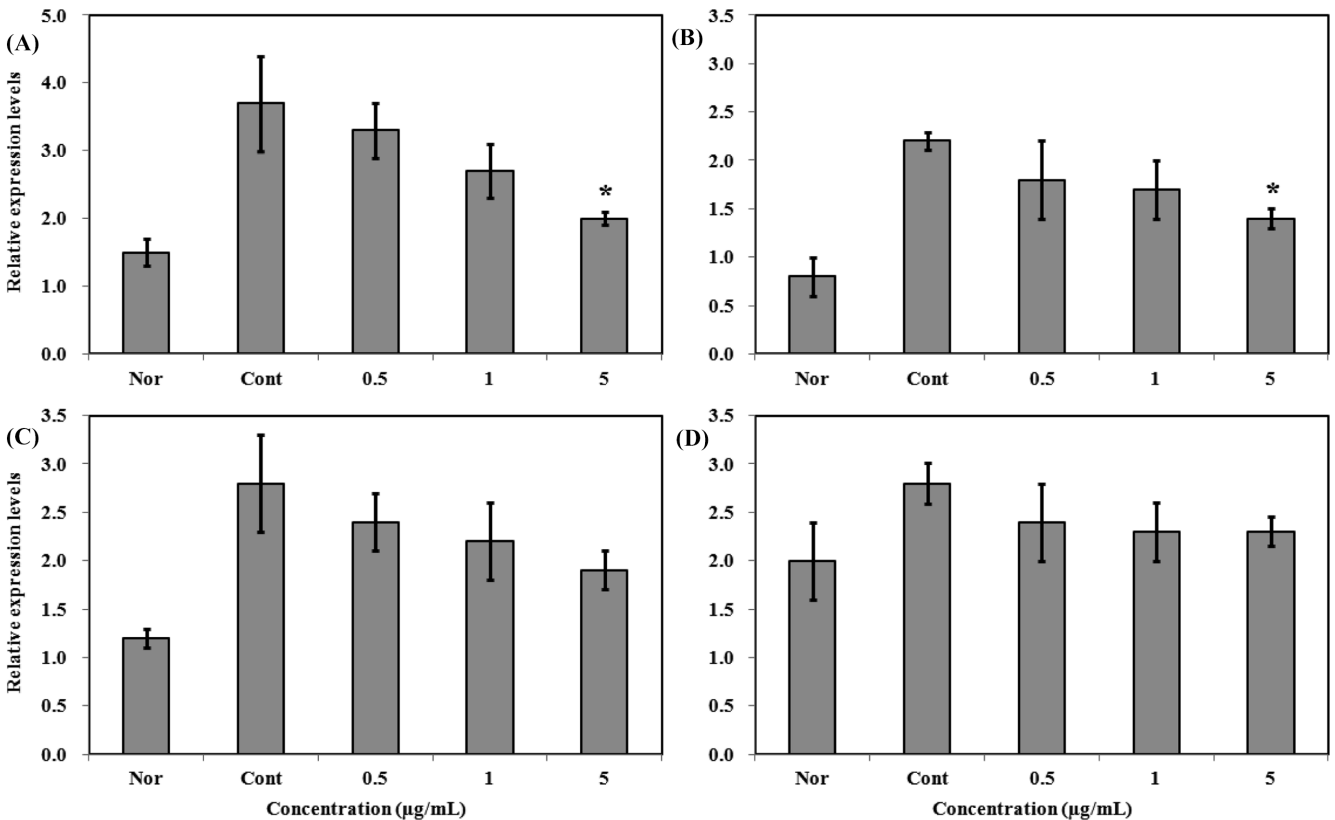
**세포내 cAMP 활성 측정.** 멜라닌 색소형성의 중심 기작은 cAMP의 과도한 발현에 의해 tyrosinase 유전자발현이 유도되고 멜라닌 생성이 증가 한다(Jung 등 2009). 따라서 단삼 추출물의 농도에 따른 cAMP의 활성을 측정된 결과를 Fig. 3과 같이 나타내었다. 단삼 추출물 0.5, 1 µg/mL에서 각각 12, 28%의 발현 저해능을 나타내었으며, 5 µg/mL의 농도에서는 41%의 cAMP발현 저해능을 나타내었다.

**미백관련 단백질 및 유전자 발현 저해효과.** 앞서 기술한 바와 같이 멜라닌 생합성 신호전달 체계에는 다양한 신호전달물질이 관여하고 있다. 그 중 cAMP/PKA 경로가 멜라닌 합성의 주요 경로로서 자외선에 피부가 노출되었을 때 세포 내 cAMP가 증가되고 하위 신호전달 물질인 PKA를 활성화 시키며, CREB를 거쳐 MITF의 발현이 증가된다. MITF는 멜라닌합성 과정에



Protein expression rate	SM-W (µg/mL)					
	Nor.	Cont.	0.5	1	5	
(A)	MITF	78 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 11.9	85 $\pm$ 10.7	64 $\pm$ 4.6*	55 $\pm$ 1.7*
	Tyrosinase	19 $\pm$ 0.5	100 $\pm$ 1.9	98 $\pm$ 2.3	65 $\pm$ 4.2*	43 $\pm$ 1.7*
	TRP-1	11 $\pm$ 2.7	100 $\pm$ 4.2	88 $\pm$ 3.5	58 $\pm$ 3.4*	52 $\pm$ 5.7*
	TRP-2	63 $\pm$ 10.2	100 $\pm$ 11.9	99 $\pm$ 4.7	95 $\pm$ 5.4	78 $\pm$ 0.9*
(B)	pERK	23 $\pm$ 0.5	100 $\pm$ 1.9	95 $\pm$ 2.3	75 $\pm$ 4.2	65 $\pm$ 1.7
	PKA	38 $\pm$ 2.8	100 $\pm$ 3.7	88 $\pm$ 4.0	62 $\pm$ 2.5	42 $\pm$ 1.1*
	CREB	32 $\pm$ 2.1	100 $\pm$ 2.1	92 $\pm$ 4.5	91 $\pm$ 5.4	88 $\pm$ 2.1

**Fig. 4** Inhibition effects *Salvia mitorrhiza* Bunge water extract on whitening related proteins of melanogenesis in HEM cells. Protein were detected by western blotting analysis with their own antibodies. Table showed normalization of proteins. All signal of proteins except pERK, pCREB were divided by  $\beta$ -actin's signal. pERK and pCREB were normalized by ERK and CREB. (A), proteins expression involved to melanin biosynthesis; (B), cAMP downstream proteins expression was evaluated by western blot. <sup>a</sup>Each values represents mean  $\pm$  SD of three experiments. \*Means statistically significant difference at  $p < 0.05$ .



**Fig. 5** Inhibition effects *Salvia mitorrhiza* Bunge water extract on whitening related mRNA of melanogenesis in HEM cells. Melanin related mRNA was detected by real-time PCR. (A): MITF, (B): tyrosinase, (C): TRP-1, (D): TRP-2. Bars indicate mean  $\pm$  standard deviation of triplicate. \*Means statistically significant difference at  $p < 0.05$ .

서 중요한 전사 조절 인자로 tyrosinase, TRP-1, 2의 전사를 촉진 시킨다(Busca와 Ballotti, 2000; Sassone-Corsi, 1998; Saha 등, 2006). 단삼 열수 추출물의 멜라닌 합성관련 인자 단백질 및 유전자 발현 정도를 측정하였다(Figs. 4, 5). 먼저 미백관련 단백질 발현의 경우 단삼 추출물의 농도 의존적으로 발현을 저해시켰다. 특히 tyrosinase의 경우 5  $\mu\text{g/mL}$ 에서 57%의 발현을 저해하여 가장 높은 저해능을 나타내었으며, MITF는 45%, TRP-1은 48%, TRP-2는 22%의 발현 저해능을 나타내었다. 또한 상위단계 인자인 PKA, ERK, CREB 단백질의 발현량을 측정된 결과 CREB 및 인산화된 CREB의 단백질 발현저해는 미비하였으나, 멜라닌 생성성에 직접 관여하는 PKA와 인산화된 ERK의 단백질 발현량이 급격하게 줄어드는 것을 확인하였다. 단삼 추출물의 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2의 유전자 발현에 미치는 영향을 확인한 결과 미백관련 단백질 발현 저해능과 유사한 결과를 나타내었다. 단삼 열수 추출물 농도 5  $\mu\text{g/mL}$ 에서 대조군과 비교하여 tyrosinase, TRP-1의 경우 40%의 저해능을 나타내었으며, MITF의 경우는 50% 이상의 발현 저해를 나타내었다.

단삼의 열수 추출물이 cAMP를 저해함으로써 tyrosinase 활성뿐만 아니라 TRP-1, TRP-2, MITF의 단백질 및 유전자 발현을 효과적으로 저해함을 확인하였으며, 단삼 추출물이 PKA의 단백질 발현을 감소 시켜 멜라닌 생성에 있어서 분자적 기작의 상위에 위치하는 신호전달을 억제함을 확인하였다. 이상의 결과를 통해 단삼 추출물이 cAMP/PKA 경로에서 cAMP, PKA의

발현 저해를 통해 하위 단백질 및 유전자들의 발현을 효과적으로 저해하여 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 사료된다. 이는 단삼의 미백 기능성 화장품 소재로서 가능성을 시사한다.

**초 록**

본 연구에서는 단삼 열수 추출물의 human epidermal melanocyte (HEM) 세포에서의 미백활성을 측정하였다. 버섯유래의 tyrosinase 저해능 측정결과 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 42%의 저해율을 나타내었으며, HEM 세포내의 tyrosinase, 멜라닌 생합성 저해능은 5  $\mu\text{g/mL}$ 에서 26, 25%의 저해능을 나타내었다. 단삼 추출물의 미백과 관련된 tyrosinase, tyrosinase related protein 1 (TRP-1), tyrosinase related protein 2 (TRP-2), microphthalmia associated transcription factor (MITF)의 단백질 및 유전자 양이 감소함을 나타내었다. 또한 그 상위 단계인 cAMP 발현이 5  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 41% 감소하는 것을 확인하였다. 본 실험을 통하여 단삼 추출물이 cAMP를 효과적으로 억제함으로써, 이를 통해 tyrosinase 활성뿐만 아니라 TRP-1, TRP-2 그리고 MITF 발현을 효과적으로 저해 한다는 사실을 확인하여 기능성 미백 화장품 소재로서의 활용 가능성을 제시하고자 한다.

**Keywords** 단삼 · 미백 · 인간표피멜라닌세포 · 티로신분해효소 · 화장품

**감사의 글** 본 논문은 보건복지부 한의약선도기술개발 사업의 사업비지원 (HI3C0556)에 의해 수행되었습니다.

## References

- Busca R and Ballotti R (2000) Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* **13**, 60–9.
- Choi SY, Kim YC, and Chang BS (2011) Inhibitory efficacy of black tea water extract on melanogenesis in melan-a cells and its action mechanisms. *Korean J Microscopy* **41**, 169–77.
- Chou G, Zhu E, LEE SY, Kim YH, Park SK, Oh ST et al. (2009) The study on the whitening of traditional Chinese medicines. *J Soc Cosmet Scientists Korea* **35**, 257–63.
- Fan GW, Gao XM, Wang H, Zhu Y, Zhang J, Hu LM et al. (2009) The anti-inflammatory activities of Tanshinone IIA, an active component of TCM, are mediated by estrogen receptor activation and inhibition of iNOS. *J Steroid Biochem Mol Biol* **113**, 275–80.
- Fugh-Berman A (2000) Herbs and dietary supplements in the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Prev Cardiol* **3**, 24–32.
- Jin KS, Yon NO, Park JA, Lee JY, Jin SJ, Hyun SK et al. (2012) Anti-oxidant, anti-melanogenic, and anti-inflammatory activity of *Zanthoxylum schinifolium* extract and its solvent fraction. *Korea J Microbiol Biotechnol* **40**, 317–79.
- Jung EJ, Lee JS, Huh SG, Lee JN, Kim YS, and Kim GD (2009) Phloridzin-included melanogenesis cAMP signaling pathway. *Food Chem Toxicol* **47**, 2436–40.
- Kim JK (1989) In *Illustrated natural drugs encyclopedia*, Namsandang Pubilshers, Korea.
- Kim OK, Chung SY, Park MK, Rheu HM, and Yang JS (1999) Anticancer activity of natural products including *Salviae miltiorrhizae*. *J Appl Pharmacol* **7**, 29–34
- Kim SH and Kim IC (2008) Antioxidative properties and whitening effect of the Eucommoae cortex, *Salviae miltiorrhizae* Radix, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Cnidii rhizome*. *J East Asian Soc Dietary Life* **18**, 618–23.
- Lee HG and Kim YG (2012) Effect of *Salviae miltiorrhizae* Radix on neuronal apoptosis following intracerebral hemorrhage of rats. *Kor J Herbology* **27**, 89–94.
- Lee HS, Shin KH, Ryu GS, Jee KY, Cho IS, and Kim HY (2011) Whitening Efficacy study of natural compounds-peptide derivatives via cAMP signaling pathway. *J Soc Cosmet Scientists Korea* **37**, 275–82.
- Mok JS, Park UY, Kim YM, and Chang DS (1994) Effect of solvents and extracting condition on the antimicrobial activity of *Salviae miltiorrhizae* Radix (*Salviae miltiorrhizae*) extract. *J korean Soc Food Nutr* **23**, 1001–7.
- Saha B, Singh SK, Sarkar C, Bera R, Ratha J, Tobin DJ et al. (2006) Activation of the Mitf promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB. *Pigment Cell Res* **19**, 595–605.
- Sassone-Corsi P (1998) Coupling gene expression to cAMP signaling: Role of CREB and CREM. *Int J Biochem Cell Biol* **30**, 27–38.
- Shim HN, Seong KM, Moon SJ, Lee SH, Yang JH, and Song BK (2008) The effect of the *Salvia miltiorrhiza* on axon regeneration following central nervous system injury. *J Korea Oriental Med* **29**, 47–59.
- Urabe K, Aroca P, Tsukamoto K, Mascagna D, Palumbo A, Prota G et al. (1994) The inherent cytotoxicity of melanin precursors: a revision. *Biochim Biophys Acta* **1221**, 272–8.
- Yagi A, Kanbara T, and Morinobu N (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica*. **3981**, 517–9.
- Yang ES, Hwang JS, Choi HJ, Hong RH, and Kang SM (2008) The effect of genistein on melanin synthesis and in vivo whitening. *Kor J Microbiol Biotechnol* **36**, 72–81.
- Yang SA, Im NK, and Lee IS (2007) Effect of methanolic extract from *Salviae miltiorrhiza* Bunge on in vitro Antithrombotic and antioxidative activities. *Korean J Food Sci Technol* **39**, 83–7.
- Yun HJ, Heo SK, Yun HJ, Park WH, and Park SD (2007) Anti-inframmary effect *Salviae miltiorrhizae* Radix. *Kor J Herbology* **22**, 65–73.