

Original Article / 원저

## 玫瑰花 에탄올추출물이 $\alpha$ -MSH로 유도된 과색소 형성 억제와 작용기전 연구

이진호<sup>1</sup> · 인명희<sup>1</sup> · 강석훈<sup>2</sup> · 문연자<sup>1,3</sup> · 우원홍<sup>3,4</sup> · 임규상<sup>4,5\*</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 한의학전문대학원 BK21-plus팀

<sup>2</sup>원광대학교 한약연구소 약학대학 한약학과

<sup>3</sup>원광대학교 한의과대학 해부학교실

<sup>4</sup>원광대학교 한국전통의학연구소

<sup>5</sup>원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

### Inhibitory Effect of the Ethanol Extract of *Rosae rugosae* Flos on the Hyperpigmentation and its Action Mechanism Induced by $\alpha$ -MSH

Jin-Ho Lee<sup>1</sup> · Myung-Hee In<sup>1</sup> · Suk-Hoon Kang<sup>2</sup> · Yeun-Ja Mun<sup>1,3</sup> · Won-Hong Woo<sup>3,4</sup> · Kyu-Sang Lim<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>BK21-plus Team, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

<sup>2</sup>Dept. of Oriental Pharmacy, College of pharmacy, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University

<sup>3</sup>Dept. of Anatomy, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

<sup>4</sup>Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

<sup>5</sup>Dept. of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

### Abstract

**Objective** : This study investigated the inhibitory mechanism of the hypopigmentating effects on ethanol extract of *Rosae rugosae* Flos (ERR) that has not yet been examined.

**Methods** : We analyzed the anti-melanogenic effects of ethanol extracts from *Rosae rugosae* Flos by tyrosinase activity, melanin contents, We also examined protein expression levels of tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF and ERK by western blot analysis in melanoma cells.

© 2015 the Society of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology

This is an Open Access journal 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.

**Results** : In this investigation, ERR effectively reduced  $\alpha$ -MSH-stimulated melanin synthesis by suppressing expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 (TRP-1). On the other hand, the expression of tyrosinase-related protein-2 (TRP-2) were not affected by treatment with ERR. ERR inhibited the expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) as a key transcription factor for tyrosinase expression regulating melanogenesis. The upstream signaling pathway including cAMP response element-binding protein (CREB) and MAPKs were also inhibited by ERR. Pretreatment with PD98059, ERK inhibitor, attenuated the inhibitory effect of ERR on  $\alpha$ -MSH-induced tyrosinase activity.

**Conclusions** : Our study suggested that the anti-melanogenic activity of ERR is correlated with the suppression of tyrosinase gene through CREB/MITF/ERK pathway.

**Key words** : Ethanol extract *Rosae rugosae Flos* (ERR); Melanin; Tyrosinase; Microphthalmia-associated transcription factor (MITF); Extracellular signal-regulated kinase (ERK).

## 1. 서 론

최근 야외활동 및 캠핑문화의 증가로 인해 자외선에 노출 되어지는 시간이 많아짐에 따라 멜라닌 생성이 과발현 되어 과색소침착을 유발하게 된다. 따라서 건강한 피부, 백옥 같은 피부를 갖고자 하는 현대인들에게 미백에 대한 관심은 점점 증가하는 추세이다. 표피는 각질형성세포(Keratinocyte), 멜라닌세포(Melanocyte), 랑게르한스세포(Langerhans cell), 머켈세포(Merkel cell) 등 4가지 세포가 존재하며, 이 중 멜라닌세포는 멜라닌을 생성하여 피부색과 밀접한 관련이 있다<sup>1)</sup>. 멜라닌은 아미노산인 tyrosin 을 기질로 하며 tyrosinase에 의해 3, 4-dihydroxy phenylalanine (DOPA)를 거쳐 DOPA quinone으로 전환되고 자동산화반응과 효소반응으로 DOPA chrome을 거쳐 흑갈색의 공동합체인 멜라닌을 생성하게 된다<sup>2,3)</sup>. 이러한 멜라닌 생성에 관련된 신호전달경로는 cyclic AMP/protein kinase A (cAMP/PKA)경로를 비롯하여 diacylglycerol/protein kinase C (DAG/PKC) 경로와 Ras 활성화에 의존적인 mitogen activated protein kinase (MAPK) 등의 경로가 존재한다. MAPKs 신호전달 경로에 속하는 extracellular

signal-regulated kinase (ERK)는 membrane-to-nucleus 신호를 통해 세포의 증식, 분화에 관여하며, ERK의 활성화는 Microphthalmia-associated transcription factor (MITF)를 인산화시킴으로써 ubiquitin-dependent proteasome에 의해 MITF의 분해를 유도하고 그 결과 tyrosinase의 전사가 저해된다고 알려져 있다<sup>4)</sup>.

한의학에서는 멜라닌 과다 형성으로 인한 피부 색소침착에 대하여 면진(面塵)<sup>8)</sup>, 면흑(面黑)<sup>6-8)</sup>, 간점(黥點)<sup>6,9)</sup>, 작란(雀卵)<sup>10)</sup>, 반간증(斑點癩)<sup>10,11)</sup>, 간증(黥癩)<sup>11,12)</sup>, 염자(鰐子)<sup>10,11)</sup>, 작반(雀斑)<sup>12-15)</sup>, 흑반(黑斑)<sup>14)</sup>, 여흑반(鰐黑斑)<sup>12)</sup>, 황갈반(黃褐斑)<sup>15)</sup> 등으로 다양하게 표현되어 왔다.

해당화의 꽃인 매괴화(玫瑰花)는 낙엽관목의 장미과에 속하며, 성미(性味)는 감(甘), 미고(微苦), 온(溫), 무독(無毒)하며, 이기해울(理氣解鬱), 화혈산어(和血散瘀)의 효능이 있다. 주요성분으로는 유기산과 비타민 C,  $\beta$ -carotene 등이 풍부하며, phenol성 화합물로서 quercetin, tannin, rugosin A-G, strictinin, isostrictinin 등이 있다고 알려져 있다<sup>16)</sup>. 천연물을 이용한 미백연구를 살펴보면, 교맥, 감초, 사삼 등 식물의 추출물들이 멜라닌 합성을 억제한다고 보고되어 있다<sup>17-19)</sup>. 특히 유<sup>20)</sup>는 매괴화가 tyrosinase 활성화와 멜라닌 합성을 억제하였으며, tyrosinase, TRP-1의 단백질 발현 감소로 인해 미백에 효과가 있다고 보고하였다.

Corresponding author : Kyu-Sang Lim, PhD, Professor, School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan Blvd 460, Iksan city, Chonbuk, 570-749, South Korea.  
(Tel : 82-63-850-6916, E-mail : kslim@wku.ac.kr)

• Recieved 2015/1/9 • Revised 2015/1/29 • Accepted 2015/2/5

이에 저자는 미백 효과가 있다고 보고된 매괴화의 멜라닌 억제 기전을 규명하고자  $\alpha$ -MSH로 과색소침착을 유발한 후 매괴화 에탄올추출물에 대한 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등의 단백질 발현 양상을 확인하였다. 또한 멜라닌 형성 경로 중 하나인 MAPKs 경로를 조사하여 보고 하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용된 매괴화 (玫瑰花, *Rosae rugosae* Flos)는 경동시장 (서울, 한국)에서 구입하여 사용하였다.

#### 2) 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS)은 Gibco사 (NY, USA) 제품을, dimethyl sulfoxide (DMSO),  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), bovine serum albumin (BSA), triton X-100, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), goat polyclonal IgG tyrosinase, TRP-1, TRP-2는 Santa Cruz사 (CA, USA) 제품을 anti-Goat, anti-Rabbit, anti-Mouse IgG HRP conjugate antibody, hybond-ECL nitrocellulose membrane, Western Blotting detection reagent는 Amersham Biosciences사 (Buckinghamshire, England) 제품을, non-fat skim milk는 Becton사 (Le Pont de Claix, France) 제품을, leupeptin, aprotonin, sodium fluoride (NaF), sodium orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), *N,N,N,N*-tetramethylethylenediamine (TEMED), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), L-3,4-dihydroxyphenyl alanine (L-DOPA)은 Sigma 사 (St. Louis, MO, USA) 제품을, 단백질 정량 시약

은 Bio-Rad (CA, USA)사 제품을 사용하였다.

#### 3) 세포주

Mouse 흑색종 세포주 B16F10 세포는 한국 세포주 은행 (KCLB, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

#### 4) 사용기기

원심분리기 (centrifuge HA-12, micro 17TR centrifuge), clean bench, CO<sub>2</sub> incubator는 한일기기사 (Inchun, Korea) 제품을, ELISA reader는 Bio-T사 (Winooski, USA) 제품을, Electrophoresis power supply는 Amersham사 (Buckinghamshire, England) 제품을, ChemiDoc image analysis는 Bio-Rad사 (CA, USA) 제품을, 감압농축기는 EYELA사 (Rotary evaporator N-100, Digital water bath SB-1000, Temp controller coolace CCA-1100, Japan) 제품을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 시료 추출

매괴화 꽃봉오리 부분을 자연건조한 후 건조된 매괴화 200 g을 에탄올 2L를 가하여 실온에서 sonication 시킨 후 3일간 추출한 것을 일차로 거즈 여과한 다음 filter paper로 vacuum pump를 이용하여 여과하였다. 여과된 매괴화 에탄올추출물을 rotary evaporator로 감압 농축하여 27.60 g (수득율 : 13.8%)의 건조된 추출물을 얻어 시료로 사용하였다. 매괴화 에탄올추출물 시료는 DMSO에 녹여 사용하였으며, DMSO는 최종 0.01% 이하의 농도 범위에서 사용하였다.

### 2) 세포 배양

분양받은 B16F10 세포는 5% FBS가 첨가된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 그리고 48시간 주기로 배양액을 교체하여

주었으며 0.25% trypsin EDTA로 세포를 떼어내어 계대 배양하였다.

### 3) 세포 생존율 측정

B16F10 세포를 24-well 배양용기에  $1 \times 10^4$  cell/well의 밀도로 분주하여 24 시간 배양 후 매괴화 에탄올추출물을 처리하고 48시간 배양하였다. MTT 용액을 0.5 mg/ml이 되도록 처리하고 3시간 배양하였다. MTT 용액을 처리한 배지를 제거하고 은박지로 포장하여 빛을 차단 후 실온에서 건조시킨 다음 DMSO로 용해시켜 ELISA reader 를 이용하여 570 nm 파장의 흡광도를 측정하였다.

### 4) Tyrosinase 활성 측정

B16F10 세포의 세포내 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 등 (1998)의 방법으로 측정하였다. 10 cm 배양용기에 B16F10 세포를  $1 \times 10^5$  개씩 분주하여 48시간 배양후, 매괴화 에탄올추출물을 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하고 1시간 후  $\alpha$ -MSH (100 nM)를 처리하였다. 48시간 배양 후 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하고, 5 mM EDTA가 포함된 0.1 M sodium phosphate buffer (SPB, pH 6.8) 1 ml에 1% (V/V) triton X-100과 0.1% (V/V) 0.1 M PMSF를 혼합한 lysis buffer를 200  $\mu\text{l}$ 씩 분주하고 세포를 수거하여 얼음에서 30분간 용해시킨 다음 4 $^{\circ}\text{C}$ , 15,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford 시약으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 동량의 단백질 양을 계산하였으며, 계산된 단백질과 0.1 M SPB (pH 6.8)의 총량이 150  $\mu\text{l}$ 가 되도록 분주하고 0.1% (W/V) L-DOPA를 50  $\mu\text{l}$ 씩 분주하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시켰으며, 30분 간격으로 475 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

### 5) 세포내 멜라닌 합성량 측정

B16F10 세포의 멜라닌 정량은 Hosoi 등 (1985)의

방법을 변형하여 사용하였다. 10 cm 배양용기에  $1 \times 10^5$  개씩 분주하여 24시간 배양 후, 매괴화 에탄올추출물 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$ 씩 처리하고 1시간 후  $\alpha$ -MSH (100 nM)를 처리한 다음 48시간 배양하였으며, 각 군당  $2 \times 10^6$  개씩 수거하여 lysis buffer [5 mM EDTA, 0.1 M SPB (pH 6.8), 0.1% triton X-100]로 세포를 용해하였다. 원심분리 하여 얻은 세포 침전물은 알코올로 세척한 후 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액으로 90 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 용해하여 405 nm로 흡광도를 측정하였다.

### 6) DOPA 염색에 의한 육안적 관찰

B16F10 세포를 chamber slide에  $2 \times 10^3$  개씩 분주한 후 24시간 배양 후, 매괴화 에탄올추출물을 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$ 씩 처리한 다음 1시간 뒤  $\alpha$ -MSH (100 nM)를 처리하였다. 48시간 동안 배양 후 5% formalin 용액으로 30분간 고정하고 PBS로 3회 세척한 다음 0.1% L-DOPA와 실온에서 4시간 반응시켰다. PBS로 2회 세척하고 10% formalin 용액으로 30분간 고정한 후 PBS로 2회 세척 하고 에탄올로 탈수시킨 다음 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### 7) Western blot 분석

B16F10 세포를 10 cm 배양용기에  $3 \times 10^5$  개씩 부 착시키고 매괴화 에탄올추출물을 처리하여 48시간 배양하였다. 배양된 세포를 모두 수거하여 lysis buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 5 mM EGTA, 100 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 2 mM PMSF, 10  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin, 10  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin)로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 용해시킨 후, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 세포 용해액은 Bradford 방법을 이용하여 단백질정량을 하였다. 동량의 세포 용해액 (단백질 100  $\mu\text{g}$ )은 2 $\times$ sample buffer와 혼합하여 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 끓인 후 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 후 polyvinylidene difluoride membrane

(Millipore, Bedford, MA, USA)에 전이 시켰다. Membrane은 5% skim milk-TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 동안 blocking 하고, tyrosinase, TRP-1, TRP-2, p-CREB, MITF, p-ERK, p-38, SAPK/JNK 등의 측정하고자 하는 1차 antibody를 1:1000으로 희석하여 실온에서 2시간 반응시켰다. TBST로 3회 세척한 후 tyrosinase, actin, TRP-1 및 TRP-2는 2차 항체를 1:1000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. TBST로 3회 세척 후 WEST-ZOL®(plus) Western blot detection system(iNtRON, Korea)을 사용하여 ChemiDoc으로 촬영하였다.

### 8) 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였으며, 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였고, SigmaPlot (San Jose, CA, USA)의 Student's t-test를 이용하여 p-value를 구하였으며, p<0.05인 경우 \*로 표기하였고, p<0.01인 경우 \*\*(##)로 표기하여 유의성을 나타내었다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 매괴화 에탄올추출물이 B16F10 세포의 증식에 미치는 영향

B16F10 세포에서 세포생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 매괴화 에탄올추출물을 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고, 48시간 배양하여 MTT assay를 실시하였다.

실험 결과 대조군 (100  $\pm$  11.0%)과 비교하였을 때 매괴화 에탄올추출물 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 48시간 후 각각의 생존율은 98  $\pm$  18.4%, 90  $\pm$  1.1%, 79  $\pm$  1.9%, 39  $\pm$  1.3%, 17  $\pm$  2.9%로 매괴화 에탄올추출물의 농도가 증가함에 따라 세포증식이 억제 되었다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 특히 25  $\mu\text{g/ml}$ 까지 농도범위에서 75% 이상 세포독성을 보

이지 않았지만 50  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서는 세포 생존율이 현저하게 감소 하였다. 따라서 이후 실험 진행에 있어 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도를 사용하였으며, 현재까지 알려진 미백화합물 대부분은 독성으로 인한 부작용과 제품의 안정성의 문제점을 천연물질에서 찾고자 하는 연구가 보고되고 있다<sup>21)</sup>.

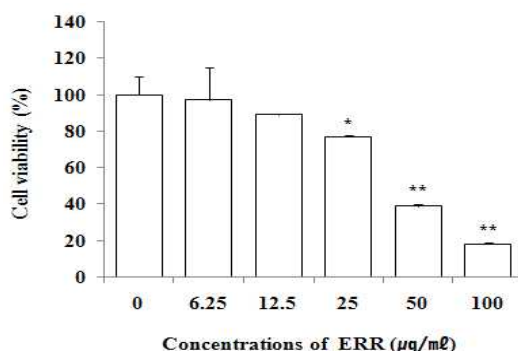


Fig. 1. Effect of ethanol extract of *Rosae rugosae* Flos on the cell viability in B16F10 cells.

Cells were plated at  $1 \times 10^4$  cells/well and incubated in media containing from 6.25  $\mu\text{g/ml}$  to 100  $\mu\text{g/ml}$  ethanol extract of *Rosae rugosae* Flos (ERR) for 48 hours. Cell viabilities were measured by MTT assay as described in materials and methods. Data are means  $\pm$  S.D. of three experiments. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. control group.

### 2. $\alpha$ -MSH로 유도된 멜라닌 세포의 형태학적 변화

멜라닌 세포는 신경능(neural crest)에서 유래한 세포로서 수지상 돌기(dendritic process)를 갖고 있으며 약 30-40개의 각질형성세포와 연결되어 표피 멜라닌 단위(epidermal-melanin unit)를 형성하는데 이 돌기를 통하여 멜라노솜이 각질형성세포로 이동된다<sup>22)</sup>.

실험 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 대조군에 비해  $\alpha$ -MSH 단일 처리군에서 증가 하였던 수지상 돌기가  $\alpha$ -MSH와 매괴화 에탄올추출물을 병용 처리한 군에서 농도 의존적으로 감소하였다. 그러나 양성대조군의  $\alpha$ -MSH와 코직산을 병용 처리한 군에서는 수

지상 돌기의 형태에 있어 감소를 보였으나,  $\alpha$ -MSH 단독 처리군에 비해 변화가 거의 없었다. 따라서  $\alpha$ -MSH에 의해 증가되어진 돌기형성을 매괴화 에탄올 추출물이 멜라닌 세포에서 유래하는 수지상돌기의 형성을 억제하고 세포의 형태는 길고 크게 변한 것으로 사료된다.

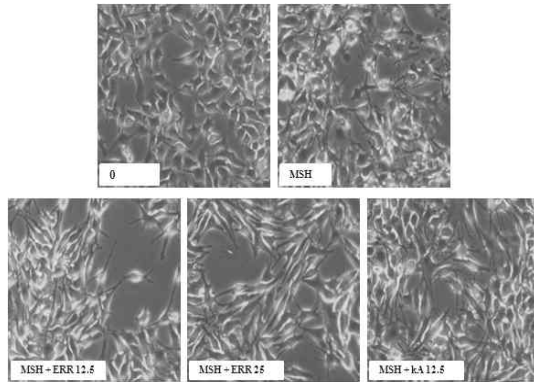


Fig. 2. Light micrographical observation of B16F10 cells after treatment with ethanol extract of *Rosae rugosae* Flos and  $\alpha$ -MSH.

The cells were exposed to  $\alpha$ -MSH (100 nM) in the presence of 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  of ERR or 12.5  $\mu\text{g/ml}$  of Kojic acid (KA). After 48 hours, cells were photographed with phase contrast inverted microscope ( $\times 100$ ).

### 3. 매괴화 에탄올추출물이 $\alpha$ -MSH로 유도된 멜라닌 세포의 DOPA 염색 과 tyrosinase 활성 억제효과

$\alpha$ -MSH는 멜라닌 합성에 있어서 가장 중요한 tyrosinase의 활성을 촉진시키며, 멜라닌 세포의 주변 분비(paracrine)와 자기분비(autocrine) 인자로서 피부의 색소침착에 관여하고 있다<sup>24,25</sup>. 이에 본 실험에서는 B16F10 세포의 세포수준에서  $\alpha$ -MSH 유도 후 매괴화 에탄올추출물에 의한 tyrosinase의 DOPA oxidase 활성에 미치는 영향과 tyrosinase의 활성 억제효과에 대하여 조사 하였다. 양성 대조군으로 기존의 *in vitro*, *in vivo* 실험에서 tyrosinase의 활성 억제

효능이 인정되어 현재 대표적인 arbutin, hydroquinone 등의 미백제 중의 하나로 잘 알려져 있는 미백화합물<sup>21</sup>인 코직산을 양성대조군으로 사용 하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 매괴화 에탄올추출물은 대조군에 비해  $\alpha$ -MSH 단일 처리군에서 tyrosinase의 DOPA oxidase 활성이 증가 되었으며, 세포의 색깔은 매우 진하다.  $\alpha$ -MSH 단일 처리군보다  $\alpha$ -MSH와 매괴화 에탄올추출물을 병용 처리한 군에서는 세포의 색깔이 현저히 옅어졌다. 그러나 양성 대조군의  $\alpha$ -MSH와 코직산을 병용 처리한 군에서는 tyrosinase DOPA oxidase의 활성에 있어 감소를 보였으나,  $\alpha$ -MSH 단독 처리군에 비해 변화가 거의 없었다. 또한 Fig. 4의 실험 결과와 같이 매괴화 에탄올추출물은  $\alpha$ -MSH 단일처리군은 대조군에 비하여 tyrosinase의 활성이 증가하였으나, 매괴화 에탄올추출물과  $\alpha$ -MSH를 병용처리한 군에서는 tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 감소 시켰다. 그러나 양성 대조군인 코직산 12.5  $\mu\text{g/ml}$ 과  $\alpha$ -MSH를 병용처리한 군은 tyrosinase 활성에 크게 영향을 주지 않았다. 멜라닌세포의 돌기형성(dendricity)과 인접한 각질형성 세포 사이의 연결은 멜라노솜의 수송에 주요한 역할을 하고 있으며, 자외선과  $\alpha$ -MSH에 의해 이러한 epidermal-melanin network이 확장된다<sup>1,22,23</sup>고 알려져 있다. 그러나 Fig. 3,4의 결과를 미루어 보아  $\alpha$ -MSH와 매괴화 에탄올추출물을 병용 처리한 군에서 tyrosinase의 활성이 농도 의존적으로 억제효과를 보였으며, 생태학적으로 관찰 했을 때 세포의 색깔이 현저히 옅어지는 것을 관찰 할 수 있었다. 이는 매괴화 에탄올추출물이  $\alpha$ -MSH에 의해 증가되었던 epidermal-melanin network 확장을 억제하여  $\alpha$ -MSH 단독 처리시에 비해 병용처리시 세포의 색깔이 옅어진 것으로 사료되며, 또한 단일 화합물이 아닌 추출물임을 감안할 때 미백 활성을 가지고 있는 매우 좋은 천연물로 판단된다. 이러한 억제 효과는 기존의 tyrosinase inhibitor로 알려진 코직산 보다 뛰어난 것으로 보여 진다.

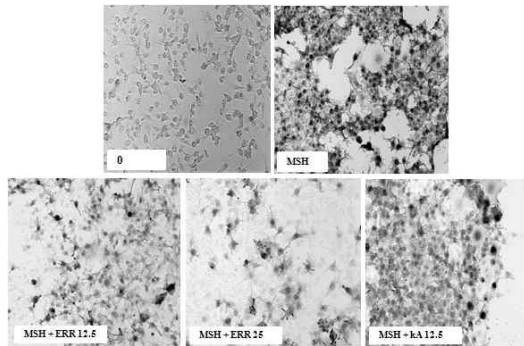


Fig. 3. Observation of tyrosinase activity by DOPA staining after treatment with ethanol extract of *Rosae rugosae* Flos and  $\alpha$ -MSH in B16F10 cells.

The cells were exposed to  $\alpha$ -MSH (100 nM) in the presence of 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  of ERR or 12.5  $\mu\text{g/ml}$  of Kojic acid (KA). After 48 hours, cells were stained with DOPA as described in materials and methods. Cells were photographed with phase contrast inverted microscope ( $\times 100$ ).

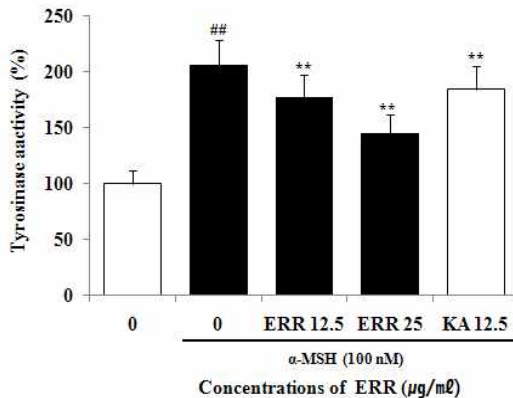


Fig. 4. Effect of ethanol extract of *Rosae rugosae* Flos on the tyrosinase activity in B16F10 cells stimulated with  $\alpha$ -MSH.

Effect on tyrosinase activity was tested with various doses of ethanol extract of *Rosae rugosae* Flos (ERR) and  $\alpha$ -MSH in B16F10 cells for 48 hours. The cells were exposed to  $\alpha$ -MSH (100 nM) in the presence of 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  of ERR or 12.5  $\mu\text{g/ml}$  of Kojic acid (KA). Data are means  $\pm$  S.D. of triplicate determinations. <sup>##</sup> $p < 0.01$  vs. untreated group, <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$  vs.  $\alpha$ -MSH-treated group (100 nM).

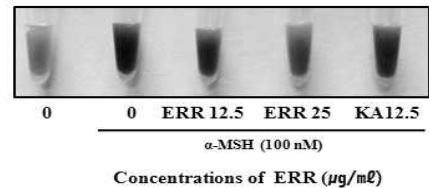
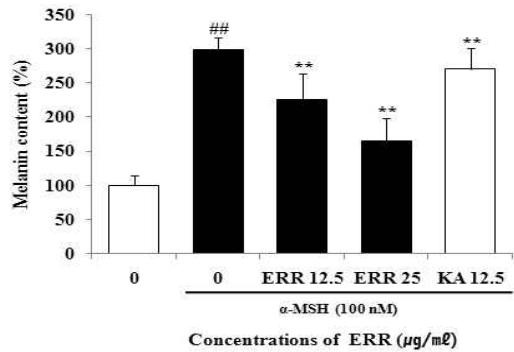


Fig. 5. Effect of ethanol extract of *Rosae rugosae* Flos on melanin synthesis in B16F10 cells stimulated with  $\alpha$ -MSH.

Cells were seeded  $1 \times 10^5$  cells/dish. After 48 hours, cells were treated with several concentrations of ethanol extract of *Rosae rugosae* Flos (ERR) and  $\alpha$ -MSH (100 nM) (A & B) for 48 hours. The cells were exposed to  $\alpha$ -MSH (100 nM) in the presence of 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  of ERR or 12.5  $\mu\text{g/ml}$  of Kojic acid (KA), then, melanin contents were measured as described in materials and method. Data are means  $\pm$  S.D. of triplicate determinations. <sup>##</sup> $p < 0.01$  vs. untreated group, <sup>\*\*</sup> $p < 0.01$  vs.  $\alpha$ -MSH-treated group (100 nM).

## 5. $\alpha$ -MSH로 유도된 세포내 멜라닌 생성 억제 효과

앞선 실험 결과 Fig. 3, 4에서  $\alpha$ -MSH에 의해 증가되었던 epidermal-melanin network 확장을 매괴화 에탄올 추출물이 tyrosinase의 활성을 억제 하여 멜라닌 세포에 존재 하는 멜라노솜의 수송역할을 하는 수지상 돌기의 형성을 억제하는 것을 확인 하였다. 따라서 본 실험에서는  $\alpha$ -MSH로 멜라닌 생성을 유도한 후 매괴화 에탄올추출물이 멜라닌생성에 미치는 영향을 조사 하였다. 그 결과 Fig. 5(A & B)에 나타난 바와 같이  $\alpha$ -MSH 단일처리군은 대조군에 비하여 멜라닌 생성이 증가하였으나, 매괴화 에탄올추출물과

$\alpha$ -MSH를 병용처리한 군에서는 멜라닌 생성을 농도 의존적으로 감소 시켰다. 그러나 양성 대조군인 코직산 12.5  $\mu\text{g/ml}$ 과  $\alpha$ -MSH를 병용처리한 군은 멜라닌 생성량에 크게 영향을 주지 않았다. 따라서 매괴화 에탄올추출물은  $\alpha$ -MSH에 의해 현저하게 증가된 멜라닌 생성을 유의성 있게 억제시키는 것은 매괴화 에탄올추출물이 tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 감소시켜 멜라닌 생성을 억제 시킨 것으로 보인다.

**6. 멜라닌 합성 관련 단백질 발현에 미치는 영향**

멜라닌 합성 억제에 있어서 어떠한 멜라닌 합성 관련 단백질을 억제하는지 밝히기 위해 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 관련 단백질 발현을 조사하였다. 실험 결과 대조군에 비해  $\alpha$ -MSH 단일처리군은 tyrosinase 단백질 발현이 현저하게 증가되었으며, 매괴화 에탄올추출물과  $\alpha$ -MSH를 병용처리 한 경우 tyrosinase, TRP-1의 단백질 발현이 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적으로 감소되었다. 그러나 TRP-2의 단백질 발현에는 변화가 거의 없었다. 양성 대조군인  $\alpha$ -MSH와 코직산을 병용 처리한 군은  $\alpha$ -MSH 단일 처리 군에 비해 거의 변화가 없었다(Fig. 6). 따라서 매괴화 에탄올추출물은  $\alpha$ -MSH에 의해 유도된 B16F10 세포의 멜라닌 합성을 tyrosinase, TRP-1 단백질의 발현을 조절함으로써 억제하는 것으로 사료되며, Fig. 4, 5의 결과와 연관성이 있음을 시사한다.

**7. 매괴화 에탄올추출물이 CREB과 MITF 발현에 미치는 영향**

피부는 자외선에 장기간 노출 되게 되면 세포내  $\alpha$ -MSH 생성이 증가하게 되고, 증가된  $\alpha$ -MSH는 멜라닌세포에서만 발현되는 막수용체인 melanocortin receptor 1 (MC1R)과 결합하여 하위 신호를 전달하는데, adenylate cyclase를 활성화 시켜, cAMP를 증가 시킨다. 증가된 cAMP는 핵 내의 CREB을 인산화한다. 그 후 인산화 된 CREB는 MITF의 gene

promoter에 결합하여 MITF의 인산화를 촉진하고 인산화 된 MITF는 E box와 M box에 결합하여 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진 시킨다<sup>2,26</sup>. 따라서 Fig 6. 결과에서 보는 바와 같이 tyrosinase, TRP-1 단백질 발현의 감소가 MITF 발현 감소로 인한 결과인지 알아보기 위하여 매괴화 에탄올추출물과  $\alpha$ -MSH를 처리하고 단백질 발현의 변화를 측정하였다.

실험 결과 CREB와 MITF는  $\alpha$ -MSH 단일처리군의 경우 대조군에 비하여 단백질의 발현이 모두 증가하였다. 그러나  $\alpha$ -MSH와 매괴화 에탄올추출물 병용처리군은 농도 의존적으로 감소하였음을 관찰할 수 있었으며, 양성 대조군인  $\alpha$ -MSH와 코직산을 병용처리한 군은  $\alpha$ -MSH 단일 처리 군에 비해 큰 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 7). 이는 매괴화 에탄올추출물

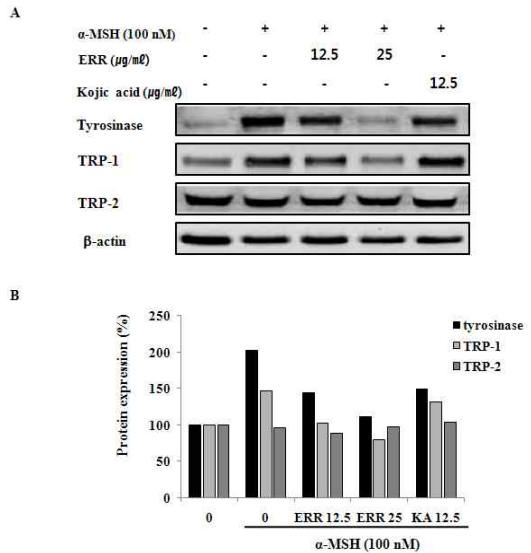


Fig. 6. Effect of ethanol extract of *Rosae rugosae* Flos on melanogenic enzyme expressions in B16F10 cells stimulated with  $\alpha$ -MSH.

The cells were exposed to  $\alpha$ -MSH (100 nM) in the presence of 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  of ERR or 12.5  $\mu\text{g/ml}$  of Kojic acid (KA). After 48 hours(A & B), whole cell lysates were then subjected to western blot analysis using antibodies against tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 as described in materials and methods.



이 CREB와 MITF의 인산화를 농도적으로 유의성 있게 억제하여 tyrosinase, TRP-1의 전사를 감소시킨 것으로 사료된다. 따라서 매괴화 에탄올추출물은 tyrosinase 발현을 조절하는 인자인 MITF의 발현억제와 관련이 있다고 사료된다.

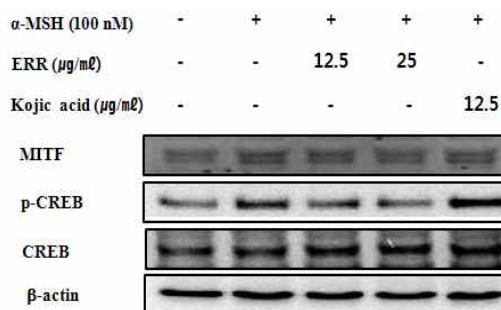


Fig. 7. Effect of ethanol extract of *Rosae rugosae* Flos on CREB phosphorylation and MITF expression in B16F10 cells stimulated with  $\alpha$ -MSH.

The cells were exposed to  $\alpha$ -MSH (100 nM) in the presence of 12.5, 25  $\mu$ g/ml of ERR or 12.5  $\mu$ g/ml of Kojic acid (KA). After 48 hours, whole cell lysates were then subjected to western blot analysis using antibodies against CREB, MITF and  $\beta$ -actin as described in materials and methods.

### 8. 매괴화 에탄올추출물이 MAPK 활성화에 미치는 영향

멜라닌 합성과 관련된 신호전달 경로 중 MAPK는 MITF의 인산화에 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 매괴화 에탄올추출물이 MAPK에 미치는 영향에 대하여 확인하였다.

실험 결과  $\alpha$ -MSH 단일처리군의 경우 ERK의 인산화가 억제되었고, p38과 JNK의 인산화가 유도 되었다.  $\alpha$ -MSH와 매괴화 에탄올추출물을 병용처리한 군에서는 억제되었던 ERK의 인산화가 12.5, 25  $\mu$ g/ml에서 농도 의존적으로 회복되었으며, p38과 JNK에는 영향을 미치지 못하는 것으로 확인하였다. 양성 대조군으로 사용된  $\alpha$ -MSH와 코직산을 병용 처리한 군에서는 MAPK 인산화에 변화를 주지 못했다(Fig. 8). 주로 세포의 증식, 분화에 관여하는 것으로 알려진

MAPK 경로에 속하는 ERK 신호는 MITF의 인산화를 유도하여 MITF의 ubiquitination을 이루어 proteosomal degradation을 일으키게 됨으로써 멜라닌 생성을 감소시키는 것으로 알려져 있다<sup>27)</sup>. 따라서  $\alpha$ -MSH에 의해 유도된 B16F10 세포의 과색소침착에 대해 매괴화 에탄올추출물이  $\alpha$ -MSH 단일처리군에서 억제되었던 ERK의 인산화가 회복되는 것으로 보아 Fig 7. 결과에서 확인 하였던 MITF의 발현 감소는 인산화 된 CREB은 전사인자인 MITF의 promotes에 binding 되어  $\alpha$ -MSH에 의해 증가된 tyrosinase의 활성을 MITF의 proteosomal degradation을 일으켜 ERK의 경로를 통하여 MITF의 발현을 억제 시켰다고 사료된다.

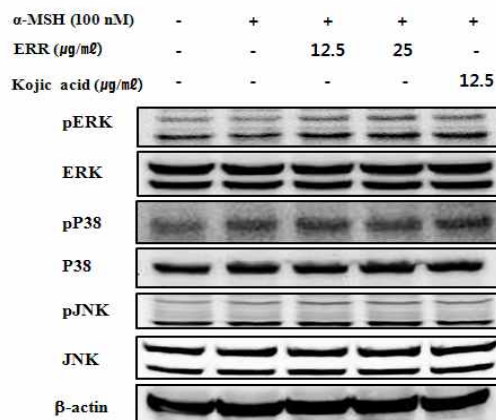


Fig. 8. Effect of ethanol extract *Rosae rugosae* Flos on the phosphorylation of MAPKs in B16F10 cells.

The cells were exposed to  $\alpha$ -MSH (100 nM) in the presence of 12.5, 25  $\mu$ g/ml of ERR or 12.5  $\mu$ g/ml of Kojic acid (KA). After 48 hours, The expression levels of pERK, ERK, pP38, P38, pJNK, and JNK protein were examined by western blot. Equal protein loading was confirmed by  $\beta$ -actin expression.

### 9. ERK 경로 차단시 tyrosinase 활성화에 미치는 영향

본 실험에서는  $\alpha$ -MSH로 인해 증가되었던 멜라닌이 매괴화 에탄올추출물에 의해 ERK의 활성화에 영향을 주어 tyrosinase 활성 조절에 관련이 있는지 알아

보기 위하여 ERK 억제제인 PD98059를 사용하여, tyrosinase 활성과 멜라닌 합성을 측정 하였다. 실험 결과 PD98059와 매괴화 에탄올추출물을 함께 처리한 경우와 매괴화 에탄올추출물을 단독 처리한 경우를 비교하였을 때 매괴화 에탄올추출물에 의해 억제되었던 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성이 PD98059 처리에 의하여 회복되는 것을 확인할 수 있다. 또한 PD98059와 매괴화 에탄올추출물을 같이 처리한 경우에는 매괴화 에탄올추출물에 의해 억제되었던 MITF, tyrosinase 및 TRP-1 단백질 발현이 다시 증가 되는 것을 확인할 수 있다(Fig. 9). Fig. 9에서 보는 바와 같이 매괴화 에탄올추출물 처리로 감소되었던 tyrosinase 활성과 멜라닌 함량이 PD98059 전 처리로 인해 다시 증가 되었다. 또한 매괴화 에탄올추출물에 의해 억제되었던 tyrosinase, TRP-1, MITF

의 발현도 PD98059에 의해 회복된 것은 매괴화 에탄올추출물로 인해 활성화 되었던 ERK 신호가 PD98059 전 처리에 의하여 MITF 인산화를 유도 하여 tyrosinase 활성이 증가 되어 멜라닌 생성 억제 효과가 상대적으로 감소 된 것으로 사료된다.

#### IV. 결 론

본 연구에서는  $\alpha$ -MSH에 의해 유도된 B16F10 세포에서 매괴화 에탄올추출물의 멜라닌 합성 억제효과 및 작용기전에 대해 멜라닌 양과 tyrosinase 활성을 측정하여 유의한 결과를 얻었으며, p-ERK, MITF, tyrosinase 등의 단백질 발현은 Western blot을 통해 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

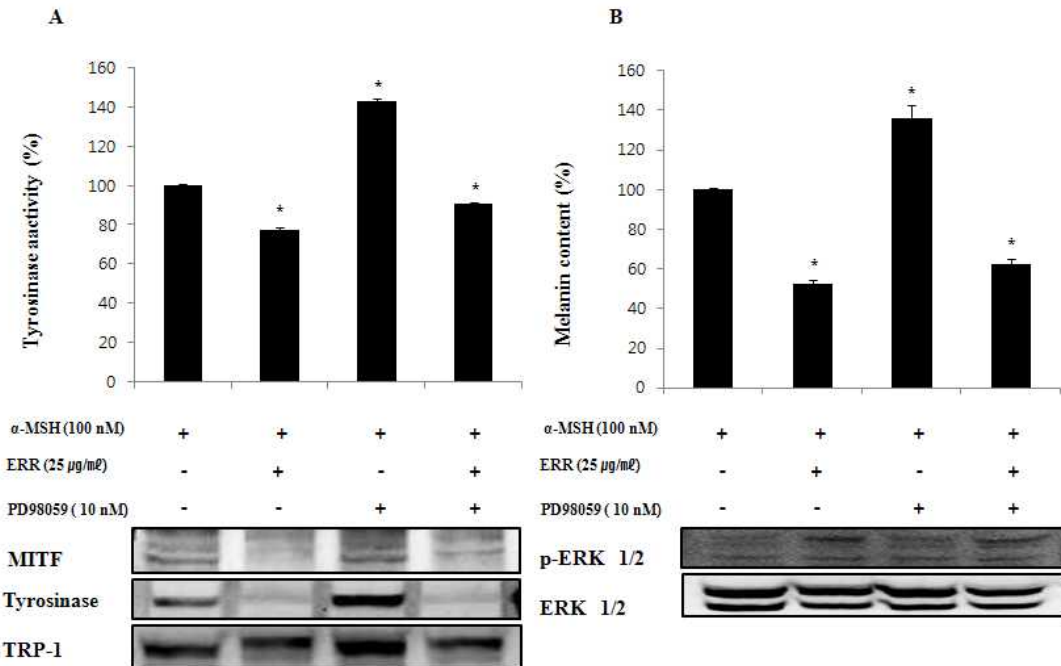


Fig. 9. Effects of PD98059 on cellular tyrosinase activity, melanin synthesis and phosphorylation of ERK in ethanol extract *Rosae rugosae* Flos treated B16F10 cells.

Cells were incubated with pretreated with 20  $\mu$ M of PD98059 for 1 hour, 25  $\mu$ g/ml of ERR for 1 hour, and  $\alpha$ -MSH (100nM) for 1 hour. After 48 hours, whole cell lysates were then subjected to western blot analysis. Data are means  $\pm$  S.D. of three experiments. \*p<0.05 vs.  $\alpha$ -MSH-treated group (100 nM).

1. 매괴화 에탄올추출물은 멜라닌 생성과 tyrosinase 활성을 유의성 있게 감소 시켰다.
2. 매괴화 에탄올추출물은 DOPA 염색을 통해 세포 수준에서 관찰한 결과 tyrosinase 활성을 감소 시켰다.
3. 매괴화 에탄올추출은 tyrosinase, TRP-1 단백질 발현을 농도 의존적으로 억제 시켰다.
4. 매괴화 에탄올추출물은 멜라닌 생성과 관련된 단백질의 전사를 조절하는 CREB, MITF의 발현을 감소 시켰다.
5. 매괴화 에탄올추출물은 ERK 인산화를 유도하여 tyrosinase, TRP-1, MITF 단백질의 발현을 감소 시켰다.
6. 매괴화 에탄올추출물에 의해 억제되었던 tyrosinase, TRP-1, MITF 단백질의 발현이 ERK 억제제인 PD98059에 의해 증가 하였다.

이상의 결과 매괴화 에탄올추출물은  $\alpha$ -MSH에 의해 자극된 B16F10 세포에서 CREB/MITF/MAPK/ERK의 활성화를 통하여 tyrosinase, TRP-1의 멜라닌 생성 관련 단백질을 억제함으로써 멜라닌생성을 저해한다. 따라서 매괴화 에탄올추출물은 미백관련 기능성 화장품 소재로서 이용 가능성이 있다고 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 2014학년도 원광대학교의 교비지원에 의하여 수행됨.

### References

1. Kang TC, Go JS, Kwon OY, Gi YG, Kim KY. Human histology. Seoul, Ko Moon Sa, 2012;7:263.
2. Tsukamoto K, Jackson IJ, Urabe K, Montague PM, Hearing VJ. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. The Journal of the European Molecular Biology Organization, 1992;11(2): 519-26.
3. Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation, melanocytes modulate skin color in response to stree. The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2007;21:976-94.
4. Kim, DS, Hwang ES, Lee JE, Kim SY, Kwon SB, Park KC. Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. Journal of Cell Science, 2003;116:1699-706.
5. Hong WS, Jing Xiao Huang Di Ne Jjing Su Wen, Seoul, Oriental Medicine Institute Press, 1981:179.
6. Lu ying, Yi Xue Gang Mu, Seoul, Bu Bin Publishers Company, 2010:681-2, 509, 510.
7. Hua S, Zhong Hua Yi Shu Ji Cheng, Nan Jing Ben Yi, Beijing, Traditional Chinese Medicine Ancient Publishing Company 1999;1(3):12.
8. Zhou ZH, Dan Xi Yi Ji, Beijing, People's Health publisher, 1995:1(2):511, 513.
9. Zhao Ji, Sheng Ji Zong Lu, Beijing, People's Health publisher, 1987:1763.
10. Zhou MS, Yi Xue Bao Jian, Seoul, Haeng Rim Seo Won, 1975:186-7.
11. Heo J, Dong Ui Bo Gam, Seoul, Han Mi Medical Publishing Co, 2001:268-9, 271.
12. Qi K, Wai Ke Da Cheng, Munkwang library Limited, 1968:218.

13. Chen SG, Wai Ke Zheng Zong. Beijing, Traditional Chinese medicine Ancient publishing company, 1999;1:248.
14. Gu SC, Yang Yi Da Quan. Beijing, People's Health publisher, 1987;1:479-82.
15. Gynaecology Oriental Medicine Compilation Committee. Korean Medicine Gynecology & Obstetrics, Seoul, Jeong Dam, 2002;2(2):431.
16. Ju YS. Ungok Herbology. Jeonju, Woosuk Press, 2013;2(2):846-7.
17. Kim DS, No ST, Lee JC, Lim KS, Shin MR, Woo WH, Mun YJ. Inhibitory effect of the ethanol extract of fagopyrum esculentum on melanin synthesis. The Journal of Tradition Korean Medicine, 2006;15(1):70-6
18. Lee JS, Kim JA, Cho SH, Son AR, Jang TS, So MS, Chung SR, Lee SH. Tyrosinase Inhibitors isolated from the Roots of Glycyrrhiza glabra L. Korean Journal of Pharmacognosy, 2003;34(1):33-9.
19. Lim NY, Kwon KJ, Kim YS, Baek SG, Lim JR, Mun YJ, Woo WH. Inhibitory Effect of Methanolic Extract from Adenophorae Radix on Melanogenesis. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology, 2004;18(3):747-53.
20. Yu HS, Mun YJ, Woo WH, Song JH. Anti-Melanogenic Effects of Ethanol Extracts from Rosa rugosa Thunb. Department of Beauty Desing Graduate School of Wonkwang University, 2014;20(1):39-41.
21. Hwang JG, Yun JK, kim SK, Lee SH, Han KH. Mass Production of Chaff-vinegar and Its Effect of Anti-Aging and Whitening. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012;40(3):208-14.
22. Kim DS, Sung BG, Lee JC, Lee BK, Woo WH, Lim KS. Inhibitory Effect of Belamcandae Rhizoma on the Melanogenesis in MSH-stimulated B16F10 cells. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol, 2011;24(1):25-35.
23. Provance DW, Jr, Wei M, Ipe V, Mercer JA. Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America, 1996;93:14554-8.
24. Bertolotto C, Busca' R, Abbe P, Bille K, Aberdam E, Ortonne JP, Ballotti R. Different cis-acting element are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. Molecular and Cellular Biology, 1998;18:694-702.
25. Hunt G, Todd C, Cresswell JE, Thody AJ. Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle<sup>4</sup>DPhe<sup>7</sup> alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. Journal of Cell Science, 1994;107 (Pt 1):205-11.
26. Rodrigez-Lo'pez JN, Tudela J, Var'on R, Garc'a-Carmona F, Garcia-Ca'novas F. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. The Journal of Biological Chemistry, 1992;267:3801-10.
27. Jang JY, Kim HN, Kim YR, Kim BY, Choi YH. Studies of Inhibitory Mechanism on Melanogenesis by Partially Purified Asiasari radix in  $\alpha$ -MSH Stimulated B16F10 Melanoma Cells. Journal of Life Science, 2010;20(11):1617-24.