

# 산약의 멜라노마 세포(B16F10)에서 MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase, PKA, ERK 발현 억제 효과

이수연<sup>#</sup>, 유단희, 주다혜, 이진영<sup>\*</sup>

호서대학교 한방화장품과학과

## Inhibitory Efficacy of *Dioscoreae Rhizoma* on MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase, PKA and ERK Expression in Melanoma Cells (B16F10)

Soo-Yeon Lee<sup>#</sup>, Dan-Hee Yoo, Da-Hye Joo, Jin-Young Lee<sup>\*</sup>

Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Chungnam, 336-795, Korea

### ABSTRACT

**Objectives** : The purpose of this study was to research the whitening effects and developing by cosmetics of the extract from *Dioscoreae Rhizoma*, which is one of the most popular health-promoting herb in herbal medications.

**Methods** : We performed tyrosinase inhibition assay, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and western blot for whitening effects. Also we measured MTT assay for cell viability.

**Results** : The results were obtained as follows : For whitening effect, tyrosinase inhibition rate of extract from *Dioscoreae Rhizoma* showed more than 42.28% at 1,000  $\mu\text{g/ml}$  concentration. Cell toxicity effect on melanoma cells (B16F10) of extract from *Dioscoreae Rhizoma* showed 81.97% with toxicity at 50  $\mu\text{g/ml}$  concentration. So we were measured at a concentrations of 5, 10 and 50  $\mu\text{g/ml}$  in all experiments involving cell. In addition, whitening related mRNAs including microphthalmia associated transcription factor (MITF), tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2), tyrosinase were reduced by *Dioscoreae Rhizoma*. We also found *Dioscoreae Rhizoma* transiently decreased protein kinase A (PKA) which is known to be upstream to the down regulation of MITF and tyrosinase. But phosphorylation of extracellular signal related kinase (pERK) were increased by *Dioscoreae Rhizoma*. These results imply that *Dioscoreae Rhizoma* decrease melanogenesis via ERK activation and subsequent down regulation of MITF and tyrosinase.

**Conclusions** : Therefore, all these findings suggested the potent usage of *Dioscoreae Rhizoma* as materials of functional cosmetics by confirming whitening activity related with melanin content.

**Key words** : *Dioscoreae Rhizoma*, whitening, cosmetic ingredient, cosmeceutical

### 서론

최근 오존층의 파괴로 자외선의 조사량이 증가하고 있는데 이때 자외선의 영향을 많이 받는 기관은 피부이다. 피부 내에 존재하는 멜라노사이트(melanocyte)는 외부 신호 전달물질 및 호르몬 수용체를 가지고 있어 자외선 등과 같은 외부 환경이나 호르몬, 사이토카인 (cytokine) 등에 의해서 멜라닌 생성 촉진 인자(MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase)와 같은 효소

들에 영향을 주어 멜라닌 (melanin)을 형성한다<sup>1,2)</sup>. 이렇게 형성된 멜라닌(melanin)은 기미와 주근깨 등과 같은 색소침착 현상을 야기 시킨다. 멜라닌의 생합성에서 가장 중요한 단계는 tyrosinase의 촉매작용을 통해 일어나는 초기 반응<sup>3)</sup>으로 tyrosin에 hydroxyl기를 부착 시켜 DOPA를 생성하는 작용이다<sup>4)</sup>. 따라서 최근까지 미백 기능성 물질에 관한 연구는 tyrosinase의 활성을 억제함으로써 멜라닌 생합성을 억제하는

\*Corresponding author : Jin-Young Lee, Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University  
· Tel : +82-41-540-9552 · Fax : +82-41-540-9538 · E-mail : jylee@hoseo.edu

#First author : Soo-Yeon Lee, Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University  
· Tel : +82-41-540-9559 · Fax : +82-41-540-9538 · E-mail : suyun\_14@naver.com  
· Received : 24 June 2015 · Revised : 10 July 2015 · Accepted : 12 July 2015

수준에서 이루어져 왔으며, 이러한 tyrosinase 저해제로 많이 알려져 있는 물질로는 hydroquinone, ascorbic acid, kojic acid, arbutin 등이 있다<sup>5)</sup>. 이들은 tyrosinase의 활성을 억제하고 자외선으로 인해 생긴 검은색, 기미, 주근깨 방지와 같은 목적으로 의약품 및 미백 기능성 원료로 사용되어져 왔다<sup>6)</sup>. 이러한 원료들은 경제성 및 화장품의 부작용 등과 같은 안전성에 문제 등으로 최근 화장품 업계에서는 화장품의 기능성 원료를 천연 소재로부터 얻으려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

산약(*Dioscoreae Rhizoma*)은 백합목 마과(Dioscoreaceae)에 속하는 덩굴성 다년생 식물로서 한방에서는 뿌리줄기의 주피를 벗겨 그대로 찌서 말린 것을 말하며, 약용으로 사용되어 왔다<sup>7)</sup>. 산약의 구성성분은 식이섬유가 대부분을 차지하며, 탄수화물, 아미노산, 점액성 당단백질, polyphenol성 화합물 등을 함유하고 있다<sup>8)</sup>. 최근 연구 보고에 의하면 산약에서 분리 추출한 저장성 단백질 dioscorin, 점액성 다당류 및 polyphenol성 화합물 등이 중금속 (Co, Cr, Cu) 흡착 제거능과 항산화성이 뛰어나다고 보고되었다<sup>8,9)</sup>. 산약의 주요 약리작용으로는 혈당 강화 효과, 콜레스테롤 저하작용, 면역조절효과, 세포독성 저해 작용 등이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>10)</sup>. 또한 최근 산약추출물이 대식세포활성을 억제하며, 특히 산약의 diosgenin에 의해 대식세포로부터 염증매개물질 분비를 억제한다고 보고되었다<sup>11,12)</sup>.

본 연구에서는 천연물질인 산약 추출물이 화장품의 기능성 원료로서 사용의 가치가 있는지 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 시료 추출

본 실험에 사용한 산약(*Dioscoreae Rhizoma*)은 대전대학교 부속 한방병원에서 구입 정선하여 사용하였으며 원산지는 한국 경북 청송군 부남면이다. 산약 100g에 증류수 2,000ml를 가하여 열탕 추출기에서 2시간 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하여, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 산약 추출물을 냉동 보관(-84℃)하면서 적당한 농도로 희석하여 사용하였다.

### 2. 실험 시약 및 기기

실험에 사용된 시약인 tyrosinase mushroom, dimethyl sulfoxide (DMSO) 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. PCR에 사용된 extracellular signal-regulated kinase (ERK), cAMP-response element binding protein (CREB), Microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase related protein 1 (TRP-1), tyrosinase related protein 2 (TRP-2), tyrosinase, GAPDH, primary antibody와 mouse-anti-goat, rabbit-anti-mouse 등 secondary antibody는 Santacruz (CA, USA)에서 구입하였다. 세포 독성 측정에 사용된 세포주는 마우스 흑색 세포종인 B16F10을 ATCC에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양을 위해 dulbecco's modified eagle

medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), penicillin/streptomycin, trypsin은 Thermo Scientific Hyclone (USA) 및 Gibco BRL Co. (Grand Island, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 독성 측정에 사용된 Haemocytometer (Marienfeld, Germany), 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), centrifuge (Hanil Science Industrial Co. Korea), freeze drier (ILShin BioBase Co. Korea), microscope (Olympus, Japan), CO<sub>2</sub> incubator (Vision Scientific, Korea), vortex (Scientific Industries, INC, USA), pH meter (Mettler-Toledo AG, Switzerland), BOD incubator (DAIHAN Scientific, Korea), autoclave (JS Research Inc, Korea), ELISA Reader (Tecan, Austria), PCR (C-100, Bio-Rad, USA)을 사용하였다.

### 3. Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법<sup>13)</sup>에 따라 측정하였다. 반응구는 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 80 μl에 10 mM L-DOPA (Sigma, USA)를 녹인 기질액 40 μl 및 시료용액 40 μl의 혼합액에 200 U/ml mushroom tyrosinase (Sigma, U.S.A) 40 μl을 첨가하여 37℃에서 10분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 492 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

### 4. 세포 배양

본 실험에 이용한 각 세포의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

### 5. MTT Assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 독성 측정은 Carmichael<sup>14)</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 멜라노마 세포 (B16F10)을 96 well plate에 5 × 10<sup>4</sup> cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 시료를 농도 별로 조절하여 0.02 ml 첨가한 후 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 2.5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 ml를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 0.15 ml를 가하여 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 독성 측정은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{세포 독성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

### 6. Total RNA 분리 및 cDNA 합성

세포를 100 mm culture dish에 cell seeding한 뒤 24시간 동안 배양한 후  $\alpha$ -MSH (100 nM)과 sample을 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 상등액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 각 well에 1ml씩 분주하여 세포를 lysis한 후 chloroform 200  $\mu$ l를 분주하여 20초간 위아래로 흔들어서 주었다. 그 후 13,200 rpm 에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500  $\mu$ l이 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 13,200 rpm에서 20분간 원심분리 하였고, 그 상층액을 제거 한 후 75% EtOH-diethylpyrocarbonate water 를 각 튜브에 1ml씩 분주하여 13,200 rpm에서 5분간 원심 분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. DEPC 를 50  $\mu$ l씩 분주하여 녹인 후 96 well plate에 RNA 5  $\mu$ l와 멸균수 195  $\mu$ l를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측정하였다. Oligo (dT) 15primer (500  $\mu$ g/ml) 1  $\mu$ l, 추출한 RNA(2  $\mu$ g)와 nuclease free water 로 10  $\mu$ l를 맞추고 75 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 5X reaction buffer, MgCl<sub>2</sub>, PCR necleotide mix, rnasin inhibitor, reverse transcriptase, nuclease free water를 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 5분, 42 $^{\circ}$ C에서 60분, 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다.

### 7. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

미백인자인 Micropthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase related protein 1 (TRP-1), tyrosinase related protein 2 (TRP-2), tyrosinase의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 Go Flexi DNA polymerase, primer, 합성한 cDNA를 첨가하여 잘 섞은 후 PCR을 실행하였다. Glycerlaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 는 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 55 $^{\circ}$ C에서 45초, 72 $^{\circ}$ C에서 45초 (35 cycles), tyrosinase는 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 45초, 72 $^{\circ}$ C 45초 (40 cycles), TRP-1, TRP-2, MITF는 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 45초, 72 $^{\circ}$ C에서 45초 (40 cycles)을 하였다. PCR로 합성 시킨 후 0.002% ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 100 V에서 40분간 전기영동 후 LAS 4,000을 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

Table 1. Sequence of the primers used for RT-PCR

Gene	Primer	Sequence(5' -3')
MITF	Forward	AGC GTG TAT TTT OCC 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	sense	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC
	anti-sense	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC

### 8. Western blot을 통한 단백질의 발현 측정

ERK, PKA 활성을 보기 위하여 cell line (B16F10)을 100 mm tissue culture dish에 cell seeding 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화 시켰다. 배지를 제거한 후  $\alpha$ -MSH (100 nM)과 추출물을 농도별로 처리한 배지로 24~48시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척해주었다. RIPA buffer 10ml에 complete mini 1 tab를 가함 100  $\mu$ l로 용해해서 4 $^{\circ}$ C 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리 하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 Bradford assay로 정량하여 30  $\mu$ l의 단백질을 10%의 SDS-PAGE사에서 전기 영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 semi dry transfer cell 기기 (Hofer, USA)를 이용하여 PVDF membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 incubation 시켰다. 1차 항체를 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 세척하고 mouse anti-rabbit IgG HRP, bovine anti-goat IgG HRP의 각각의 2차 항체를 1 : 1,000로 희석하여 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 3회 세척한 뒤 LAS 4,000 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량 하였다.

### 9. 통계처리

각 실험군 결과 값은 unpaired student's T-test 통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, p < 0.05 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

## 결 과

### 1. Tyrosinase 저해활성 측정 결과

산약 추출물의 tyrosinase 저해활성을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 산약 추출물의 경우 1000  $\mu$ g/ml의 농도에서 42.3% 이상의 효과를 나타내었다. 이는 Jung등<sup>15)</sup>의 논문에서 오매 및 복분자가 각각 81%, 63%의 활성을 나타내었다는 연구결과 비교하면 다소 낮은 활성이지만 오가피 22%, 두충 17%의 활성을 나타내었다는 연구결과와 비교하였을 때 산약 추출물의 tyrosinase 저해활성이 우수함을 확인할 수 있었다.

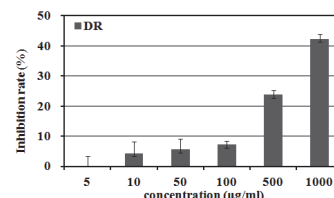


Fig. 1. Inhibition rate of *Dioscoreae Rhizoma* extract on tyrosinase. ■ DR : *Dioscoreae Rhizoma* extracted with ethanol. Results are means  $\pm$  S.D. of triplicate data.

### 2. MTT assay에 의한 세포 생존율 측정 결과

산약 추출물의 세포 독성을 측정한 결과 Fig. 2에 나타난 결과와 같이 50  $\mu$ g/ml의 농도에서 82% 이상의 세포 생존율을 보였음을 확인할 수 있었다. 따라서 이하 멜라노마 세포



(B16F10)에서의 미백 관련 인자 측정은 세포의 농도를 5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  의 농도로 하여 실험을 실시하였다.

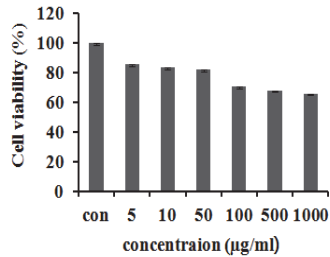


Fig. 2. Cell viability of *Dioscoreae Rhizoma* extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells ( $1 \times 10^5$  cells) were started in serum free medium for 1h the cells were treated of *Dioscoreae Rhizoma* extract for 24h. Results are means  $\pm$  S.D. of triplicate data.

### 3. MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA 발현 측정 결과

산약 추출물의 melanin 합성에 관계된 주요 효소인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA에 미치는 영향을 알아보기 위하여 멜라노마 세포(B16F10)에 5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 별로 처리한 후 24시간 뒤에 reverse transcription-polymerase chain reaction을 통해 mRNA 발현량을 측정하여 Fig. 3과 같이 나타내었다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 house keeping gene인 GAPDH를 positive control로 사용하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 산약 추출물을 5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 처리한 B16F10군에서는 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase mRNA 발현이 산약 추출물을 처리하지 않은 군보다 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 MITF, TRP-1, tyrosinase mRNA 발현이 비교군인 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도의 kojic acid 보다 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이는 Kim 등<sup>16)</sup>의 연구에서 짙신나물 물 추출물의 경우 TRP-1 및 TRP-2의 mRNA 발현에 변화가 거의 없었다고 하는 연구 결과와 비교하였을 때 산약 추출물이 멜라노마 세포 (B16F10)에 대하여 멜라닌 색소 생성 억제 및 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 억제 효과를 가지고 있음을 확인하였다.

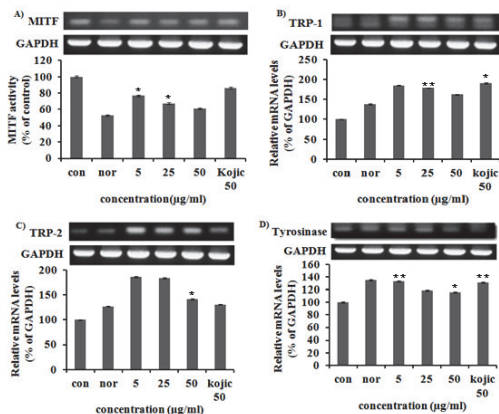


Fig. 3. MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase mRNA expression rate of *Dioscoreae Rhizoma* extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells ( $1 \times 10^6$  cells) were started in serum free medium for 1h the cells were treated with 5, 25 and 50  $\mu\text{g/ml}$  of *Dioscoreae Rhizoma* extract for 48h. Each values represents mean  $\pm$  SD of three individual experiments.

### 4. Melanin 합성에 관계 되어진 신호 전달 기전 검증

본 연구에서 melanin 합성과 관련된 단백질의 신호전달 경로의 저해활성을 확인하기 위하여 western blot 기법을 통해 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 상위 단계 유전자인 PKA 와 p-ERK의 단백질 발현을 확인한 결과 Fig. 4와 같이 나타내었다. 산약 추출물을 5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도별로 처리한 B16F10군에서 PKA의 단백질 발현량이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한 ERK의 단백질 발현이 농도별로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 대조군인 kojic acid보다 발현량이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 산약 추출물에 의해 ERK가 activation됨으로써 ERK 신호전달 경로를 조절하여 색소 침착 저해 활성을 가짐으로써 산약 추출물의 미백 효과를 확인할 수 있었다<sup>17,18)</sup>. cAMP 활성화에 의해 활성화되어지는 Protein kinase A (PKA)를 활성화하며 PKA는 핵 내로 들어가 CREB의 단백질을 인산화하여 MITF의 활성을 촉진시키므로 산약 추출물에 의한 미백효과는 멜라닌 생성에 있어서 분자적 기작의 상위에 자리 잡고 있는 신호 전달을 억제함으로써 기인하는 것으로 생각되어진다.

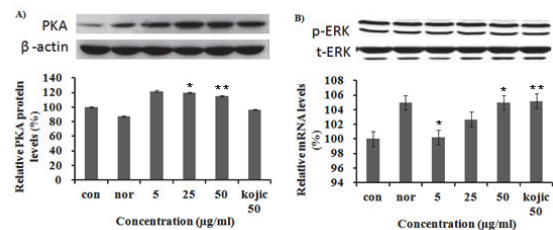


Fig. 4. PKA and ERK protein expression rate of *Dioscoreae Rhizoma* extract on melanoma cell (B16F10). After B16F10 cells ( $1 \times 10^5$  cells) were started in serum free medium for 1h the cells were treated with 5, 25 and 50  $\mu\text{g/ml}$  of *Dioscoreae Rhizoma* extract for 48h. Each values represents mean  $\pm$  SD of three individual experiments.

## 고찰

최근 화장품에 첨가되는 천연물 원료 중에는 대부분 식물성 소재가 사용되어지고, 화장품으로 사용되는 약재의 유효 성분은 주로 주근깨, 검버섯 등과 같은 황갈반을 방지하는 작용이 있다. 그래서 본 연구에서는 백합목 마과에 속하는 덩굴성 다년생 식물인 산약을 추출하여 기능성 화장품 중 미백 화장품의 첨가물로서의 사용 가능성을 알아보려고 하였다.

Tyrosinase는 멜라닌을 형성하는데 있어서 주요 단백질로서 피부 색소 조절 과정연구에서 중요한 지표로 여겨지며 티로신(tyrosine)으로부터 도파퀴논(DOPA quinone)의 전환과정에 관여하고 유멜라닌(eumelanin)의 중간 대사물질인 DHI를 indole-5,6-quinone으로 전환시키는 과정에 관여하는 단백질이다<sup>19)</sup>. 따라서 산약 추출물의 멜라닌생성에 있어 주요 역할을 하는 tyrosinase의 저해활성을 측정한 결과 산약 추출물이 1000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 42.3% 이상의 저해활성을 나타낸 것을 확인할 수 있었다.

멜라노마 세포(B16F10)의 세포 생존율을 측정하기 위해

사용된 MTT 검색법은 96-well plate를 사용하여 그 결과를 ELISA reader(Multiwell microplate reader)를 이용하여 많은 시료를 간단하게 판독할 수 있어 세포 독성 및 증식을 검색하는 법으로서 흔히 사용되고 있는 분석 방법이다<sup>20)</sup>. MTT는 mitochondrial succinate dehydrogenase에 의해 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띠는 비 수용성의 MTT formazan으로 환원시켜 그 환원되는 정도를 측정하는 것으로 세포 독성을 평가한다<sup>21)</sup>. 이 방법을 이용하여 산약 추출물의 세포 생존율을 측정하였으며 그 결과 80% 이상의 세포 생존율을 보인 5, 25, 50 µg/ml의 농도에서 이하 미백 관련된 세포 실험을 진행하였다.

멜라닌(melanin)은 흑갈색의 유멜라닌(eumelanin)과 적황색의 페오멜라닌(pheomelanin)이 있으며, melanin 합성 효소 중 티로시나아제(tyrosinase)는 두가지 멜라닌 합성에 필요하고, TRP-1과 TRP-2는 유멜라닌 합성에 더 많은 관여를 하는 것으로 알려져 있다<sup>22)</sup>. 멜라닌 합성 신호전달 체계에는 매우 다양한 신호전달물질이 관여하고 있는데 그 중 cAMP/PKA 경로 멜라닌 합성의 주요 경로로써 자외선에 피부가 노출되었을 때 멜라닌 세포의 cAMP가 증가되고 하류 신호전달 물질인 PKA를 활성화시키며, CREB를 거쳐 MITF의 발현을 증가 시킨다<sup>23-25)</sup>. 또한 주로 세포의 증식, 분화에 관여하는 것으로 알려진 ERK 신호는 MITF의 인산화를 유도하여 MITF의 ubiquitination이 이뤄져 proteosomal degradation을 일으키게 됨으로써 멜라닌 합성을 감소시키는 것으로 알려져 있다<sup>26,27)</sup>. 산약 추출물을 5, 25, 50 µg/ml의 농도별로 처리한 B16F10군에서는 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase mRNA 발현이 산약 추출물을 처리하지 않은 군보다 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 MITF, TRP-1, tyrosinase mRNA 발현이 비교군인 50 µg/ml의 농도의 kojic acid 보다 감소한 것을 확인하였으며 PKA의 단백질 발현량이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한 ERK의 단백질 발현이 대조군인 kojic acid보다 발현량이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

## 결론

최근 천연 한방소재를 첨가한 화장품 연구개발이 증가하고 있어 본 연구에서는 산약 추출물을 첨가하였을 때 기존의 효과보다 향상된 효과를 갖는 화장품 원료로서의 사용 가능성을 검토하였다.

1. Tyrosinase의 저해활성을 측정한 결과 산약 추출물이 1000 µg/ml의 농도에서 약 42.3% 이상의 저해활성을 나타낸 것을 확인하였다
2. 산약 추출물을 5, 25, 50 µg/ml의 농도별로 처리한 B16F10군에서는 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase mRNA 발현이 산약 추출물을 처리하지 않은 군보다 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 MITF, TRP-1, tyrosinase mRNA 발현이 비교군인 50 µg/ml의 농도의 kojic acid 보다 감소한 것을 확인하였다.
3. PKA의 단백질 발현량이 감소하였으며 ERK의 단백질

발현이 대조군인 kojic acid보다 발현량이 증가한 것을 확인하였다.

따라서 본 연구에서 천연 한방 소재인 산약추출물을 이용하여 미백 활성에 관한 연구를 한 결과 우수한 미백 활성을 확인하였고, 아울러 향후 이를 첨가한 미백 기능성 화장품 등의 기능성 원료로서 충분한 사용 가치가 있다고 판단된다.

## References

1. Libert A, Ghanem G, Arnould R, Lejeune FJ. Use of an alpha-melanocyte-stimulating hormone analogue to improve alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor binding assay in human melanoma. *Pigment Cell Res.* 1989 ; 2 : 510-8.
2. Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* 2000 ; 13 : 60-9.
3. Hearing VJ, Tsukamoto K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 1991 ; 5 : 2902-9.
4. Jimenez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, Urabe K, Hearing VJ, Lozano JA, Garcia-Borron JC. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *J Biol Chem.* 1994 ; 269 : 17993-8000.
5. Han JY, Sung JH, Kim DJ, Jeong HS, Lee JS. Inhibitory effect of methanol extract and its fractions from grape seeds on mushroom tyrosinase. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2008 ; 37 : 1679-83.
6. Qiu F, Komatsu K, Saito K, Kawasaki K, Yao X, Kano Y. Pharmacological properties of traditional medicines. XXII. Pharmacokinetic study of mulberroside A and its metabolites in rat. *Biol Pharm Bull.* 1996 ; 19 : 1463-7.
7. Jang SM, Noh SH, Park SD. Botany of herbal medicine resources. Seoul : Hakmun Publishing Ltd. 1999 : 299.
8. Chung YC, Chiang BH, Wei JH, Wang CK, Chen PC, Hsu CK. Effects of blanching, drying and extraction processes on the antioxidant activity of yam (*Dioscorea alata*). *Int J Food Sci Technol.* 2008 ; 43 : 859-64.
9. Ha YD, Lee SP, Kwak YG. Removal of heavy metal and ACE inhibition of yam mucilage. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 1998 ; 27 : 751-5.
10. Yang SM, Shon MY, Sung NJ. Effects of sujungro on blood glucose and lipid level in streptozotocin-diabetic rats. *Food Nutr.* 2004 ; 9 : 40-4.
11. Jin MH, Suh SJ, Yang JH, Lu Y, Kim SJ, Kwon

- SY, Jo TH, Kim JW, Park YI, Ahn GW, Lee CK, Kim CH, Son JK, Son KH, Chang HW. Anti-inflammatory activity of bark of *Dioscorea batatas* DECNE through the inhibition of iNOS and COX-2 expressions in RAW264.7 cells via NF- $\kappa$ B and ERK1/2 inactivation. *Food Chem Toxicol*, 2010 ; 48 : 3073-9.
12. Jung DH, Park HJ, Byun HE, Park YM, Kim TW, Kim BO, Um SH, Pyo S. Diosgenin inhibits macrophage-derived inflammatory mediators through downregulation of CK2, JNK, NF- $\kappa$ B and AP-1 activation. *Int Immunopharmacol*, 2010 ; 10 : 1047-54.
13. Yagi A, Kanbara T, Morinobu N. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica*, 1986 ; 3981 : 517-9.
14. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, 1987 ; 47 : 936-42.
15. Jung SW, Lee NY, Kim SJ, Han DH. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korea J Food Sci Technol*, 1995 ; 27 : 891-6.
16. Kim TH, Kim JM, Baek JM, Kim TW, Kim DJ, Park JH, Choe M. Antioxidant and whitening effects of *Agrimonia pilosa* Ledeb water extract. *Korean J Medicinal Crop Sci*, 2011 ; 19 : 177-84.
17. Cooper DM. Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem J*, 2003 ; 375 : 517-29.
18. Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park JY, Jin C. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *Bio Chem*, 2003 ; 278 : 5493-6.
19. Han R, Baden HP, Brissette JL, Weiner L. Redefining the skin's pigmentary system with a novel tyrosinase assay. *Pigment cell Res*, 2002 ; 15 : 290-7.
20. Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol methods*, 1984 ; 70 : 257-68.
21. Park JG, Kramer BS, Steinberg SM, Carmichael J, Collins JM, Minna JD, Gazdar AF. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res*, 1987 ; 47 : 5875-9.
22. Park SH, Lee BY, Lee SH, Han CS, Kim JG, Kim KT, Kim KH, Kim YH. Whitening effect of dayflower (*Commelina communis* L.) extract by inhibition of N-linked glycosylation process and melanogenesis. *J Soc Cosmet Scientists Korea*, 2009 ; 35 : 73-8.
23. Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res*, 2000 ; 13 : 60-9.
24. Sassone-Corsi P. Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998 ; 30 : 27-38.
25. 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. *Pigment Cell Res*, 2006 ; 19 : 595-605.
26. Kim DS, Hwang ES, Lee JE, Kim SY, Kwon SB, Park KC. Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and sub-sequent MITF degradation. *J Cell Sci*, 2003 ; 116 : 1699-706.
27. Xu W, Gong L, Haddad MM, Bischof O, Campisi J, Yeh ET, Medrano EE. Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Exp Cell Res*, 2000 ; 255 : 135-43.