

## Antioxidant Effect of *Nelumbo nucifera* G. Leaf Extract and Inhibition of MITF, TRP-1, TRP-2, and Tyrosinase Expression in a B16F10 Melanoma Cell Line

Dan-Hee Yoo, Da-Hye Joo, Soo-Yeon Lee and Jin-Young Lee\*

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

Received June 29, 2015 / Revised July 31, 2015 / Accepted August 5, 2015

The purpose of this study was to investigate the potential of *Nelumbo nucifera* G. leaf (NNL) extract as a cosmetic additive. The electron-donating ability of the NNL extract at a concentration of 1,000 µg/ml was 67.83%. In xanthine oxidase, the inhibition effect of the NNL extract was 92.7% at the same concentration. For whitening effects, tyrosinase inhibition effect of NNL extract was 42.7% at a 1,000 µg/ml concentration. The cell toxicity of the NNL extract was examined in melanoma cells (B16F10) using a 3-[4, 5 - dimethyl - thiazol - 2 - yl]-2, 5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) assay. The cell toxicity assay revealed that the NNL extract had a toxicity of 81.61% at a concentration of 1,000 µg/ml. The microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2), and tyrosinase protein expression inhibitory effect by Western blot of NNL extract were measured by a Western blot at concentrations of 25, 50, and 100 µg/ml. At a 100 µg/ml concentration of the NNL extract, the expression of the MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase protein was decreased by 69.59%, 27.74%, 67.33%, and 67.78% respectively. The MITF, TRP-1, TRP-2 and tyrosinase mRNA expression inhibitory effect were measured by reverse transcription- polymerase chain reaction (PCR) at concentrations of 25, 50, and 100 µg/ml. GAPDH was used as a positive control. At a concentration of 100 µg/ml of the NNL extract, the expression of MITF, TRP-1, TRP-2, and tyrosinase mRNA was decreased by 67.51%, 71.36%, 85.74%, and 83.64%, respectively. These findings suggest that the NNL extract has antioxidant and whitening effects and that it has great potential as a cosmetic ingredient.

**Key words :** Microphthalmia-associated transcription factor, *Nelumbo nucifera* G. leaf, tyrosinase, tyrosinase related protein-1, tyrosinase related protein-2

### 서 론

현대사회는 생활수준의 향상으로 다양한 연령층과 성별에 상관없이 사람들의 관심은 건강하게 오래 살며 아름다운 삶에 대한 관심이 집중되고 있다. 따라서 질병의 예방 및 개선을 위해 동, 식물 등으로부터 얻어지는 생리활성 물질들을 이용하여 연구가 활발히 진행되고 있다[28]. 피부 노화는 내인성 노화와 외인성 노화로 분류할 수 있는데, 시간이 지남에 따라 호르몬의 분비가 감소하고 생체 구성 단백질들의 생합성이 감소하면서 생기는 노화를 내인성 노화라고 하며, 외적으로 오염된 공기나 오존층 파괴로 인한 자외선에 의해 생기는 광노화에 의해 피부가 얇아지고 주름이 증가하고 탄력이 떨어질 뿐만 아니라, 기미, 주근깨 및 검버섯이 증가하게 되는 노화가

외인성 노화라고 할 수 있다[10, 12]. 피부는 자외선의 노출이 쉽고 영향을 받기 쉬운 기관이며, 자외선으로 활성산소종이 생성되면 피부 세포를 손상시키며 손상된 세포는 식세포에 의해 제거된다[8]. 과량의 활성산소는 체내에 존재하는 항산화 물질을 고갈시키면서 기미, 색소침착 및 검버섯 등의 피부질환의 원인이 되는 멜라닌 생성반응을 증가시킨다[5]. 멜라닌은 피부에 존재하는 색소로서, 표피의 기저층에 존재하는 멜라노사이트의 멜라노솜이라는 소포체에서 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1)과 dopachrome tautomerase (DCT) 등의 효소로 인해 멜라닌이 생성된다[31]. 멜라닌의 합성은 tyrosinase가 멜라노솜 내에 tyrosine이 3,4-dihydroxyphenyl-alanine (DOPA)를 DOPA를 산화시키고 DOPA quinone으로 전환되고 자동산화반응과 효소반응으로 DOPA chrome을 걸쳐 최종적으로 melanin polymer를 합성하게 된다. 따라서 흑갈색의 공동합체인 멜라닌의 생성을 억제하는 tyrosinase활성 억제 실험은 피부 미백제의 개발에 있어 유용한 일차 평가법으로 사용되고 있다[24, 25].

연(*Nelumbo nucifera* G.)은 수련과(Nymphaeaceae)에 속한 다년생 수생 식물로서 주로 뿌리인 연근, 홍색 또는 백색의 연꽃, 열매인 연밥과 연잎으로 나뉘는데 연잎은 하엽이라 불리며 크기는 지름 40 cm정도의 방패모양과 유사하게 생겼다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-41-540-9552, Fax : +82-41-540-9538

E-mail : jylee@hoseo.edu

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.

연은 연잎(lotus leaf), 연자육(lotus seed), 연근(lotus root) 등의 부위에 따라 식용 및 약용으로 널리 사용되어 왔으며 그 중 연잎은 해독, 지사, 진통, 진정, 산후 어혈제거 등의 작용에 쓰여 다양한 민간치료제로 사용되어 왔다[32]. 연잎에서 분리된 생리활성 성분으로는 nelumboside, nuciferine, coclaurine 등의 alkalod류, gallic acid와 methyl gallate 등의 aromatic acid류 및 quercetin, isoquercitrin, hyperoside, rutin, kaempferol 등의 flavonoid 류가 있다[5, 9, 14]. 최근 환경친화적이고 자연지향적인 추세에 따라 화장품에 사용되는 유효성분도 식물 유래의 천연물이 그 기능을 바탕으로 화장품에 배합되어 사용되고 있다[22]. 연잎 추출물에 대하여 이 등[17]이 연잎 에탄올 추출물 ethyl acetate 분획물이 항산화 능력을 보였다고 보고하였으나, 화장품의 항산화 및 미백 효과에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 연잎 추출물의 항산화 효능과 tyrosinase 저해활성 및 미백인자인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 Melanoma 발현억제 효과를 확인하여 미백화장품의 소재로서의 가능성을 검증하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험의 재료는 충청남도 아산시에서 생산된 연잎을 구입하여 추출시료로 사용하였다. 건조된 연잎을 과쇄 후 연잎 200 g의 10배의 70% ethanol 2,000 ml 가하여 3시간 진탕 혼합하여 이후 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 분리한 상등액은 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 EYELA evaporator로 감압 농축하여 용매를 제거한 후, 동결 건조기를 이용하여 완전히 건조된 연잎 추출물 30.5 g을 -20℃에 보관하였고, 시료는 추출용매에 희석하여 사용하였다.

### 시약 및 기기

항산화 및 tyrosinase 활성억제 측정에 사용된 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), xanthine, xanthine oxidase, tyrosinase mushroom, L-3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (L-DOPA), dimethyl sulfoxide (DMSO) 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다. 세포 독성 측정에 사용된 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다. mRNA 발현억제 측정에 사용된 Trizol lysis buffer은 ambion (U.S.A)에서 구입하였고, DNA polymerase, 5X reaction buffer, MgCl<sub>2</sub>, PCR nucleotide mix등의 시약은 Promega (U.S.A)에서 구입하여 사용하였다. 단백질 발현 억제와 mRNA 발현억제 측정에 사용된 항체는 Tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related pro-

tein-2 (TRP-2), tyrosinase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH),  $\beta$ -actin, primary antibodies와 mouse-anti-goat, rabbit-anti-mouse 등 secondary antibodies는 Santacruz (CA, U.S.A)에서 구입하였으며, microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 Abcam (U.S.A)에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 ELISA reader (Tecan, Austria), image quant LAS 4,000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), CO<sub>2</sub> incubator (vision scientific, Korea), pH meter (Mettler-Toledo AG, Switzerland), centrifuge (Hanil Science Industrial Co. Korea), autoclave (JS Research Inc, Korea), Davinch-Chemi™ imager CAS-400SM System (Davinch-K Co, Korea), PCR (C-100, Bio-Rad. U.S.A) 등을 사용하였다.

### 전자공여능 측정

전자공여능(EDA: electron donating abilities) 측정 실험은 Blois의 방법[2]을 변형하여 시행하였다. 에탄올에 용해한 0.2 mM DPPH용액 60  $\mu$ l와 농도 별로 조제한 시료용액 120  $\mu$ l를 96 well plate에 넣어 실온에서 15분 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

### Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성은 Stirpe와 Corte의 방법[26]에 따라 측정하였다. 각 시료용액 0.1 ml와 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 0.6 ml에 xanthine (2 mM)을 녹인 기질액 0.2 ml를 첨가하고 xanthine oxidase (0.2 U/ml) 0.1 ml를 가하여 37℃에서 15분간 반응시킨 후 1N HCl 1 ml를 가하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액 중에 생성된 uric acid의 양을 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. Xanthine oxidase 저해활성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

### Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등의 방법[30]에 따라 측정하였다. 반응구는 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) 80  $\mu$ l에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 40  $\mu$ l 및 시료용액 40  $\mu$ l의 혼합액에 200 U/ml mushroom tyrosinase 40  $\mu$ l을 첨가하여 37℃에서 10분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 492 nm에서 측정하였다. Tyrosinase 저해활

성은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

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

### 세포 배양

본 실험에 이용한 B16F10인 melanoma cell을 ATCC (U.S.A)에서 구입하여 사용하였다. 세포의 배양은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가한 DMEM 배지를 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 적응시켜 계대 배양하였다.

### 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 Carmichael의 방법[3]에 따라 시행하였다. 멜라노마 세포(B16F10)를 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well이 되게 0.18 ml 분주하고, 농도 별로 조제한 시료를 0.02 ml 첨가한 후 37°C, 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 0.04 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.

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

### Western blot을 통한 단백질 발현 측정

멜라닌 생성에 관여하는 미백인자 중 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 활성을 확인하기 위해 melanoma cell (B16F10)을 100 mm tissue culture dish에  $1 \times 10^6$  cells/well을 seeding한 후 24시간 동안 배양하여 세포를 안정화시켰다. 배지를 제거한 후 추출물을 농도 별로 처리한 배지로 24시간 배양한 후 다시 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)로 2번 세척하였다. Radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer 10 ml에 protease & phosphatase inhibitor 1 tab을 가한 lysis buffer로 용해하여 4°C, 13,200 rpm에서 20분 간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액을 BCA protein assay kit를 사용하여 정량하였으며, 20 µl의 단백질을 10% SDS-PAGE사에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 semi dry transfer cell 기기를 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 옮긴 다음 실온에서 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 1시간 배양하였다. 1차 항체를 희석하여 4°C에서 over night한 다음, 10분 간격으로 tris-buffered saline과 tween 20 (TBST)로 3회 washing하고 2차

항체를 1:2,000으로 희석하여 실온에서 2시간 배양하였다. 다시 TBST로 3회 세척한 후 Davinch-Chemi™ Imager CAS-400SM System를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

### Total RNA 분리 및 cDNA 합성

Melanoma cell (B16F10)을 100 mm culture dish에  $1 \times 10^6$  cells/well을 seeding하고 24시간 동안 배양한 후 샘플을 농도 별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배지 상층액을 제거한 후 trizol lysis buffer를 각 dish에 1 ml씩 분주하여 세포를 lysis 한 후 chloroform 200 µl를 분주하여 20초간 위아래로 흔들어주었다. 그 후 13,200 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 isopropanol 500 µl이 들어있는 튜브에 옮겨 섞었다. 다시 4°C, 13,200 rpm에서 20분간 원심분리 하였고, 그 상층액을 제거한 후 75% EtOH-diethylpyrocarbonate water를 각 튜브에 1 ml씩 분주하여 4°C, 13,200 rpm에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거한 뒤 실온에서 건조시켰다. DEPC를 50 µl씩 분주하여 녹인 후 96 well plate에 RNA 5 µl와 멸균수 195 µl를 첨가하여 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 total RNA양을 측정하였다. Oligo (dT) 15 primer (500 µg/ml) 1 µl, 추출한 RNA (2 µg)와 nuclease free water로 10 µl를 맞추고 75°C에서 5분간 반응시킨 후 5X reaction buffer, MgCl<sub>2</sub>, PCR necleotide mix, rnasin inhibitor, reverse transcriptase, nuclease free water를 첨가하여 25°C에서 5분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다.

### Reverse transcription-PCR

미백인자인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA 발현을 알아보기 위하여 PCR을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequences는 Table 1과 같다. PCR tube에 Go Flexi DNA polymerase, primer, 합성한 cDNA를 첨가하여 섞어 준 후 PCR을 실행하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 94°C에서 30초, 55°C에서 45초, 72°C에서 45초(35 cycles), tyrosinase는 94°C에서 30초, 60°C에서 45초, 72°C 45초(40 cycles), TRP-1, TRP-2, MITF는 94°C에서 30초, 58°C에서 45초, 72°C에서 45초(40 cycles)을 하였다. PCR로 합성시킨 후 0.002% ethidium bromide를 첨가한 1.5% agarose gel에 100 V에서 40분간 전기영동 후 LAS 4,000을 이용하여 밴드를 확인하여 분석 정량하였다.

### 통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 결과 통계처리는 SPSS10.0 (Evanston, IL, USA) software를 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(analysis of variance ANOVA)을 한 후  $\alpha=0.05$  수준에서 Turkey's HSD test에 의해 유의성을 분석하였다.

Table 1. Sequence of the primers used for reverse transcription-PCR

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	sense	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC
	anti-sense	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC

## 결과 및 고찰

### 전자공여능 측정 결과

DPPH 실험법은 식물 추출물의 항산화 효과측정을 하는데 있어 간단하다는 장점과 동시에 실제 항산화 활성과도 연관성이 있어 많이 이용되고 있다. DPPH는 비교적 안정한 free radical로서 그것의 비공유전자로 인해 517 nm 부근에서 최대 흡광도를 나타내며 전자 또는 수소를 받게 되면 517 nm 에서 흡광도가 감소하게 된다. 또한 DPPH는 ascorbic acid, tocopherol, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의해 환원되어 짙은 자색이 탈색되어 노란색으로 변하는 원리를 이용하여 항산화 활성을 측정한다[1, 2, 7].

연잎 추출물의 전자공여능을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 연잎 추출물의 경우 농도가 증가함에 따라 전자공여능이 증가되는 것을 확인하였고, 1,000 µg/ml에서 67.8%의 활성을 나타내었다. 이는 Park [23]의 씬바귀 에탄올 추출물의 결과와 비교하였을 때 연잎 추출물과 같은 농도인 1,000 µg/

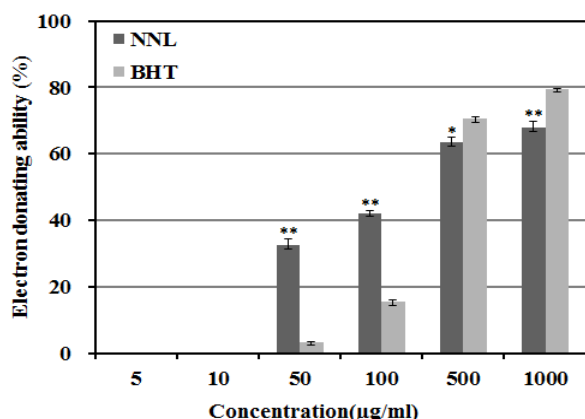


Fig. 1. Electron donating ability of *Nelumbo nucifera* G. leaf extract. ■ NNL : *Nelumbo nucifera* G. leaf extracted with 70% ethanol, ■ BHT : butyl hydroxy toluen, Results are means  $\pm$  S.D. of triplicate data. (Significant as compared to control. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01).

ml에서 24.62%의 활성을 나타내었고, Lee 등[16]의 마전자의 methanol, ethanol, acetone 추출물을 1,000 µg/ml에서 전자공여능을 측정한 결과는 각각 50.06%, 53.96%, 30.01%를 나타내어 연잎 추출물의 활성이 유의한 결과임을 확인할 수 있었다.

### Xanthine oxidase 저해활성 측정 결과

Xanthine oxidase는 생체 내 유리기 생성계의 하나로 purine 대사에 관여하는 효소로 알려져 있으며, xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 urate를 형성하여 urate가 혈장 내에 증가되면 골절에 축적되어 심한 통증을 유발하는 통풍과 신장에 침착되어 신장질환을 일으키는 효소로 알려져 왔다[13, 27]. Urate로 인한 통풍 치료 약물에는 hypoxanthine의 유사체인 allopurinol과 allopurinol의 수산화물인 alloxanthine이 사용된다. Allopurinol은 xanthine oxidase에 의하여 alloxanthine으로 산화된 후, xanthine oxidase의 활성부위에 결합하여 효소의 활성을 저해함으로써 urate 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다[18]. 연잎 추출물의 xanthine oxidase 저해효과를 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었으며, 1,000 µg/ml에서 92.7%의 높은 저해활성을 확인할 수 있었다. Zanabaatar 등[34]의 꽃송이버섯, 양송이버섯, 새송이버섯, 잎새버섯에서 각각 19.5%, 56.7%, 37.0%, 21.8%의 저해 활성을 나타낸 결과와 Yoon 등[33]의 미숙, 완숙 및 과숙 찹보리수의 1,000 µg/ml 농도에서 30.0%, 28.2%, 18.2%의 xanthine oxidase 저해활성을 나타낸 결과와 비교하였을 때 연잎 추출물의 xanthine oxidase 저해활성이 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

### Tyrosinase 저해활성 측정 결과

피부색을 결정하는 것과 동시에 기미, 주근깨 등 색소침착의 원인이 되는 멜라닌은 melanocyte의 melanosome에서 생성된다. 멜라닌은 피부, 머리카락, 눈동자 등 생물체에 널리 분포되어 있는 색소성분으로 melanosome내에 tyrosin을 전구물질로 tyrosinase 효소에 의해 DOPA와 DOPA quinone으로 산화 및 중합반응을 일으켜 멜라닌이 생합성 된다[29]. 따라서 melanin polymer의 합성을 저해시키는 tyrosinase 저해활

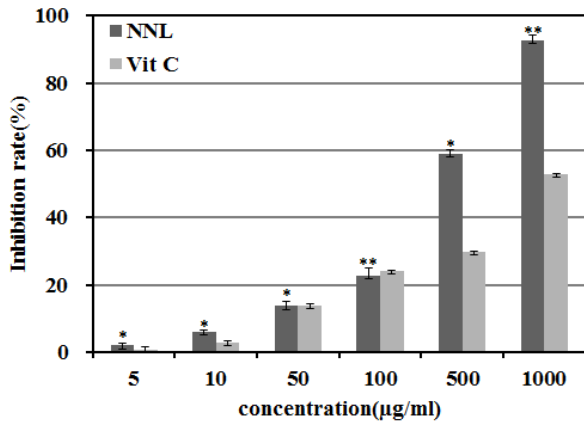


Fig. 2. Inhibition rate of *Nelumbo nucifera* G. leaf extract on xanthine oxidase. ■ NNL : *Nelumbo nucifera* G. leaf extracted with 70% ethanol, ■ Vit C : ascorbic acid, Results are means  $\pm$  S.D. of triplicate data. (Significant as compared to control. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01).

성을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

연잎 추출물의 경우 1,000 µg/ml에서 42.7 %를 나타내었으며, Cho 등[6]의 솔솔과 솔잎의 에탄올 추출물은 4,000 µg/ml에서 각각 15.2%, 6.9%의 tyrosinase의 활성저해를 나타낸 결과와 비교하였을 때 연잎 추출물의 tyrosinase 저해활성 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

#### 멜라노마 세포(B16F10)의 생존율 측정.

세포 생존율을 측정하는 MTT assay는 3-[4,5-dimethylthiazol]-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT)는 노란색을 띠는 수용성 물질로서 미토콘드리아의 reductase에 의해 물에 녹지 않는 보라색의 formazan의 형태로 변형되어 진다. 미토콘드리아의 reductase는 살아있는 세포에 존재하므로 세

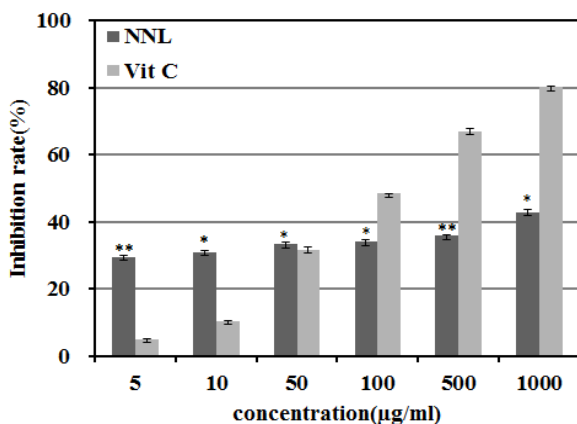


Fig. 3. Inhibition rate of *Nelumbo nucifera* G. leaf extract on tyrosinase. ■ NNL : *Nelumbo nucifera* G. leaf extracted with 70% ethanol, ■ Vit C : ascorbic acid, Results are means  $\pm$  S.D. of triplicate data. (Significant as compared to control. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01).

포에 MTT 시약을 처리할 경우 생성되는 formazan의 양은 살아있는 세포의 양에 비례하게 되는 것이다[11, 21].

연잎 추출물에 의한 멜라노마 세포(B16F10)의 MTT assay를 통한 세포 생존율을 확인한 결과 Fig. 4와 같이 나타내었다. 연잎 추출물은 1,000 µg/ml에서 82.2%의 세포 생존율을 확인할 수 있었다. Chin [4] 등의 어성초 메탄올 추출물의 경우 100 µg/ml의 농도에서 74%의 증식억제를 보인 결과와 비교하였을 때 연잎 추출물의 멜라노마 세포(B16F10)에 대한 세포 독성이 적은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 미백관련 신호전달인자의 측정은 100% 이상의 세포 생존율을 보이는 100 µg/ml 이하의 농도에서 실험을 실시하였다.

#### MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 단백질 발현 및 mRNA 발현억제효과 확인

생체 내에 멜라닌 생성은 주로 tyrosin에 의해 산화적 반응을 통해 발생하는데 이와 관련된 효소로는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등이 있다. TRP-1과 TRP-2는 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)를 흑갈색으로 나타내는 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid (IQCA)로 전환시켜 최종적으로 멜라닌을 합성하는 역할을 하고, tyrosinase는 melanin을 생성하는 효소로서 tyrosin, hydroxylase, DOPA oxidase의 활성을 나타내며, melanocyte 세포내 유전자 발현이 증가하게 되면 melanin 합성이 증가하게 된다. 따라서 tyrosinase 발현을 억제하면 melanin 합성을 억제할 수 있다. 또한 MITF는 microphthalmia transcription factor로서 tyrosinase 발현을 조절하여 MITF의 억제는 tyrosinase의 발현억제를 통하여 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다. 멜라닌의 생성을 억제하는 경로와 생성된 멜라닌을 분해를 촉진하는 단계에 관여하는

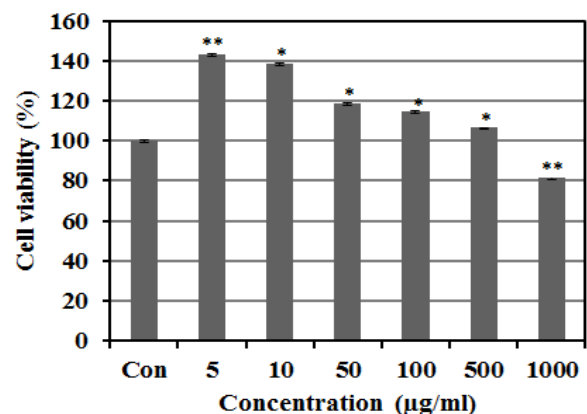


Fig. 4. Cell viability of extract from *Nelumbo nucifera* G. leaf (NNL) on melanoma cells. After B16F10 cells ( $1 \times 10^5$  cells) were started in medium for 24 hr the cells were treated with 5, 10, 50, 100, 500 and 1,000 µg/ml of NNL extract for 24 hr. Each value represents mean  $\pm$  SD of three individual experiments. (Significant as compared to control \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01).

효소의 활성을 조절이 중요하게 알려져 있어 미백관련 신호전달인자의 측정은 미백제의 효능을 검증하는데 유용한 방법으로 사용되고 있다[15, 19, 20].

연잎 추출물이 melanin 합성에 관련 있는 효소인 tyrosinase의 미치는 영향을 알아보기 위하여 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현을 측정하였다. 멜라노마 세포에 연잎 추출물을 농도별로 25, 50, 100 µg/ml 처리하여 24시간 뒤에 western blotting으로 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase 단백질 발현 측정 결과를 Fig. 5와 같이 나타내었다. 이 때, 세포의 종류나 환경에서도 발현 정도의 차이가 거의 없는 housekeeping gene인  $\beta$ -actin을 positive control로서 사용하였다. 또한 비교군으로서 기존에 미백 화장품에 첨가물로서 사용하는 kojic acid 100 µg/ml를 사용하여 나타내었다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 연잎 추출물을 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리한 멜라노마 세포에서 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 단백질 발현이 농도가 높아짐에 따라서 억제됨을 확인하였으며, 100 µg/ml에서 각각 69.6%, 27.7%, 67.3%, 67.8%의 발현 억제를 보여주었다. 또한 MITF, TRP-2, tyrosinase의 단백질

발현은 비교군인 kojic acid 100 µg/ml에 비해 감소한 것을 확인하였고, TRP-1은 kojic acid 100 µg/ml와 유사한 결과를 나타내어 우수한 억제 효과를 확인할 수 있었다.

또한 본 연구에서는 연잎 추출물이 melanin 합성에 관여하는 효소인 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase mRNA에 미치는 영향을 알아보기 위하여 멜라노마 세포에 25, 50, 100 µg/ml의 샘플을 농도별로 처리한 후 24시간 뒤에 PCR로 mRNA 발현량을 측정하여 Fig. 6과 같이 나타내었다. 이때 세포의 여러 조건에서도 그 발현 정도의 차이가 거의 없는 housekeeping gene인 GAPDH를 positive control로 사용하였다. 그 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 연잎 추출물을 25, 50, 100 µg/ml의 농도로 처리한 멜라노마 세포에서 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 mRNA발현이 농도가 높아짐에 따라서 억제됨을 확인하였으며, 100 µg/ml에서 각각 65.5%, 72.4%, 85.7%, 83.6%의 발현 억제를 보여주었다. 또한 MITF, TRP-1, TRP-2의 mRNA발현은 비교군인 kojic acid 100 µg/ml에 비해 감소한 것을 확인하였고, tyrosinase는 kojic acid 100 µg/ml와 유사한 결과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

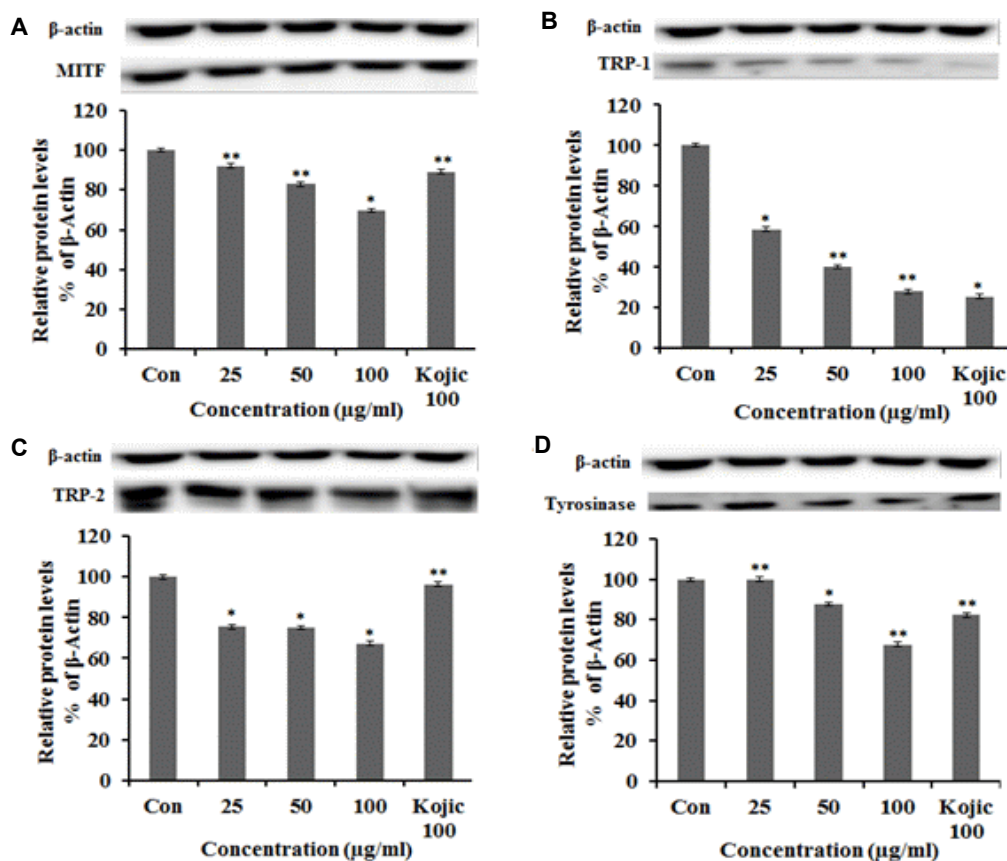


Fig. 5. MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase protein expression rate of extract from *Nelumbo nucifera* G. leaf (NNL) on melanoma cells. A: MITF protein expression rate of NNL extract. B: TRP-1 protein expression rate of NNL extract. C: TRP-2 protein expression rate of NNL extract. D: Tyrosinase protein expression rate of NNL extract. After B16F10 cells ( $1 \times 10^6$  cells) were started in serum free medium for 1 hr the cells were treated with 25, 50 and 100 µg/ml of NNL extract for 24 hr. Each values represents mean  $\pm$  SD of three individual experiments. (Significant as compared to control \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).



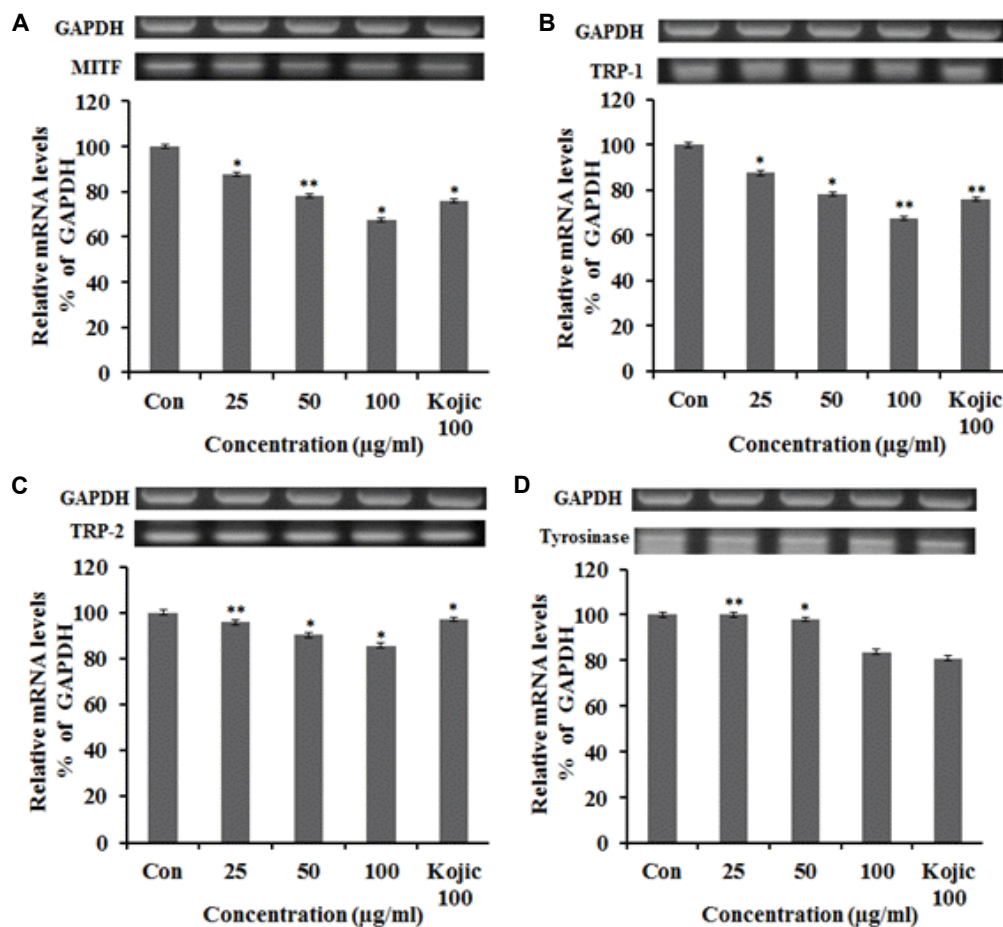


Fig. 6. MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase mRNA expression rate of extract from *Nelumbo nucifera* G. leaf (NNL) on melanoma cells. A: MITF mRNA expression rate of NNL extract. B: TRP-1 mRNA expression rate of NNL extract. C: TRP-2 mRNA expression rate of NNL extract. D: Tyrosinase mRNA expression rate of NNL extract. After B16F10 cells ( $1 \times 10^6$  cells) were started in serum free medium for 1 hr the cells were treated with 25, 50 and 100 µg/ml of NNL extract for 24 hr. Each values represents mean  $\pm$  SD of three individual experiments (Significant as compared to control \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

## References

- An, B. J., Lee, J. T., Lee, S. A., Kwak, J. H., Park, J. M., Lee, J. Y. and Son, J. H. 2004. Antioxidant effects and application as naturalizing residents of Korean *Sanguisorba officinalis* L. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 244-250.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1120.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, H. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
- Chin, J. E. and Cho, N. C. 2005. Effect of *Houttuynia cordata* extracts on tyrosinase gene expression. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 1284-1288.
- Cho, E. J., Yokozawa, T., Rhyu, D. Y., Kim, S. C., Shibahara, N. and Park, J. C. 2003. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicine* **10**, 544-551.
- Cho, E. K., Song, H. J., Cho, H. E., Kim, M. Y., Choi, I. S. and Choi, Y. J. 2009. Inhibitory effects of ethanol extracts from Pine Buds (*Pinus densiflora*) on angiotensin converting enzyme, xanthine oxidase and nitric oxide synthesis. *J. Life Sci.* **19**, 1629-1636.
- Choi, H. J., Lee, W. S., Hwang, S. J., Lee, I. J., Shin, D. H., Kim, H. Y. and Kim, K. U. 2000. Changes in chemical compositions of green tea under the different extraction conditions. *J. Life Sci.* **10**, 202-209.
- Choi, W. S., Kwon, H. S., Lim, H. W., No, R. W. and Lee, H. Y. 2013. Whitening effects of *Lactobacillus rhamnosus* associated with its antioxidative activities. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 183-189.
- Furukawa, H. 1966. On the alkaloids of *Nelumbo nucifera* Gaertn, alkaloids of loti embryo. *Yakugaku Zasshi* **86**, 75-77.
- Gilchrest, B. A. 1990. Skin aging and photoaging. *Dermatol. Nurs.* **2**, 79-82.
- Gross, J. and Lapiere C. M. 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissue: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54**, 1197-1204.

12. Ha, T. Y. 2006. Development of functional food materials for healthy Life. *Kor. J. crop Sci.* **51**, 26-39.
13. Hatano, T., Yasuhara, T., Fukuda, T., Noro, T. and Okuda, T. 1989. Phenolic constituents of licorice. II. Structures of licopyranocoumarin and glisoflavone, and inhibitory effects of licorice phenolics on xanthine oxidase. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 3005-3009.
14. Kashiwada, Y., Aoshima, A., Ikeshiro, Y., Chen, Y. P., Furukawa, H., Itoigawa, M., Fujioka, T., Mihashi, K., Cosentino, L. M., Morris-Natschke, S. L. and Lee, K. H. 2005. Anti-HIV benzylisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera* and structure-activity correlations with related alkaloids. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 443-448.
15. Kim, H. H., Park, G. H., Park, K. S., Lee, J. Y., Kim, T. H. and An, B. J. 2010. The effects of *Aster glehni* Fr. Schm. extracts on whitening and anti-wrinkle. *J. Life Sci.* **20**, 1034-1040.
16. Lee, J. M., Park, J. H., Park, H. R. and Park, E. J. 2010. Antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory activity of *Strychnos nux-vomica* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **39**, 1243-1248.
17. Lee, K. S., Kim, M. G. and Lee, K. Y. 2006. Antioxidant activity of ethanol extract from lotus (*Nelumbo nucifera*) leaf. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 182-186.
18. Lehninger, A. L. 1988. Principles of biochemistry, pp. 634-640, Worth publishers INC, NY.
19. Mallick, S., Singh, S. K., Sarkar, C., Saha, B. and Bhadra, R. 2005. Human placental lipid induces melanogenesis by increasing the expression of tyrosinase and its related proteins *in vitro*. *Pigment Cell Res.* **18**, 25-33.
20. Oh, H. C., Lim, K. S., Hwang, C. Y., Youn, I. H. and Kim, N. K. 2007. A study on the melanin synthesis inhibition and whitening effect of *bombyx* corpus. *J. Korean Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* **20**, 1-13.
21. Park, J. G., Karmer, B. S., Steinberg, S. M., Carmichael, J., Collins, J. M., Minna, J. D. and Gazdar, A. F. 1987. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res.* **47**, 5875-5879.
22. Park, J. M., Lee, J. Y., Park, S. J., Hyun, S. J., Kim, H. H., Cho, Y. J., Kwon, O. J., Son, A. R., Kim, D. S. and An, B. J. 2008. A study on the cosmeceutical activities of *Prunus Sargentii* R. J. *Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **51**, 70-78.
23. Park, S. J. 2014. Antioxidant and anti-adipogenic effects of ethanolic extracts from *Ixeris dentata* Nakai. *Kor. J. Culinary Res.* **20**, 133-142.
24. Pavel, S. and Muskiet, F. A., 1980. Euemlanin (precursor) metabolites as markers for pigmented malignant melanoma, a preliminary report. *Cancer. Detect. Prev.* **6**, 311-318.
25. Prota, G. 1990. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest Dermatol.* **75**, 122-128.
26. Stirpe, F. and Della Corte, E. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* **244**, 3855-3863.
27. Storch, J. and Ferber, E. 1988. Detergent-amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase. *Anal. Biochem.* **169**, 262-267.
28. Tsuji, N., Moriwaki, S., Suzuki, Y., Takema, Y. and Imokawa, G. 2001. The role of elastases secreted by fibroblasts in wrinkle formation: implication through selective inhibition of elastase activity. *Photochem. Photobiol.* **74**, 283-290.
29. Vile, G. F. and Tyrrell, R. M. 1995. UVA radiation-induced oxidative damage to lipid and protein in vitro and in human skin fibroblast is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 721-725.
30. Yagi, A., Kanbara, T. and Morinobu, N. 1987. Inhibition of mushroom-tyrosinase by aloe extract. *Planta Med.* **53**, 515-517.
31. Yamakoshi, J., Otsuka, F., Sano, A., Tokutake, S., Saito, M., Kikuchi, M. and Kubota, Y. 2003. Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Pig. Cell Res.* **16**, 629-638.
32. Yook, C. S. 1989. A medicinal plant illustrated guide of Korea, pp. 219-230, Academy Book, Korea.
33. Yoon, K. Y., Hong, J. Y., Nam, H. S., Moon, Y. S. and Shin, S. R. 2007. Antioxidant Activities and xanthine oxidase inhibitory effects of hot-water extracts from fruits of *Elaeagnus multiflora* Thunb. in maturity. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 14-19.
34. Zanaabaatar, B., Sonng, J. H., Seo, G. S., Noh, H. J., Yoo, Y. B. and Lee, J. S. 2010. Screening of anti-gout xanthine oxidase inhibitor from mushrooms. *Kor. J. Mycol.* **38**, 85-87.



---

**초록 : 연잎 추출물의 항산화 활성 및 멜라노마 세포(B16F10)에서 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 발현  
저해 효과**

유단희 · 주다혜 · 이수연 · 이진영\*  
(호서대학교 한방화장품과학과)

본 연구는 연잎 추출물의 미백 화장품 첨가물로서 사용이 가능한지를 연구하였다. 연잎 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위해 전자공여능 측정, xanthine oxidase 억제 효과 실험을 실시하였고, 미백활성을 알아보기 위하여 tyrosinase 저해활성을 측정하여 1,000 µg/ml의 농도에서 42.7%의 효과를 나타내었다. 또한 연잎 추출물에 대한 세포생존율을 MTT assay로 측정한 결과 1,000 µg/ml 농도에서 81.61%를 이상의 세포생존율을 확인할 수 있었다. 미백 관련 인자인 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 단백질 발현과 mRNA 발현 억제를 25, 50, 100 µg/ml 농도에서 측정하였다. MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 단백질 발현은 100 µg/ml 농도에서 각각 69.6%, 27.7%, 67.3%, 67.8%의 저해 효과를 나타내었고, MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase의 mRNA 발현은 100 µg/ml 농도에서 각각 67.5%, 71.4%, 85.7%, 83.6%의 억제를 나타내었다. 이러한 연구결과를 보았을 때, 연잎 추출물이 항산화 및 미백활성에 효과를 나타내었고, 화장품 첨가물로서의 가능성을 확인할 수 있었다.