

상엽(桑葉) 추출물의 미백활성 및 피부섬유구조 형성에 미치는 효과

권오준*#

대경지역사업평가원 경북지역산업평가단

Effect of *Mori Follium* Extract on the Melanogenesis and Skin Fibril Matrix

O Jun Kwon*#

Gyeongbuk Institute For Regional Program Evaluation, Gyeongsan 38542, Korea

ABSTRACT

Objectives : The Skin is composed of multiple layers, including the epidermis, dermis, and hypodermis. It provides a vital barrier structure that protects vertebrates from external environmental antigens, solvents, ultraviolet light, microorganisms, toxins, and weather conditions. Although several biological effects of *Mori Follium* have been reported, beneficial effects of *Mori Follium* in skin health remain unclear. In this study, we prepared water extract of *Mori Follium* (MLE) and evaluated the effects on melanin accumulation and expression levels of skin fibril-related proteins.

Methods : The cytotoxicities of MLE in B16F10 melanoma and human skin fibroblasts (HSF) were examined by MTT assay. Inhibitory effect of MLE on the α -MSH- and IBMX-induced melanosis in B16F10 melanoma was examined. The expression levels of fibronectin, collagen 1 α 2, and CCN2 in MLE-treated HSF were analyzed by reverse transcription-polymer chain reaction (RT-PCR) and western blotting.

Results : The MLE treatment for 24 h did not affect to the B16F10 and HSF at concentrations of 1, 10, 50, 100, 200, 400 and 800 μ g/ml. The MLE treatment for 72 h significantly and dose dependently suppressed melanin accumulation in B16F10 melanoma. In addition, the MLE treatment up-regulated expression levels of skin fibril-related genes such as fibronectin, collagen 1 α 2, and CCN2 in HSF. Our western blot analysis revealed MLE-induced up-regulation of skin fibril-related genes required the activation of CCN2 protein.

Conclusions : In conclusion, these findings suggest that the MLE could be used in development of cosmetic natural material of maintaining healthy skin.

Key words : *Mori Follium*, melanogenesis, melanin, skin, depigmentation

I. 서 론

피부는 인체의 가장 큰 기관으로 표피, 진피, 그리고 피하 지방으로 구성되어 있으며¹⁾, 표피와 진피는 주로 collagen 및 elastic 섬유, proteoglycan, 그리고 glycoprotein과 같은 기질로 구성 된다²⁾. 피부의 주요 기능은 신체 내부와 외부환경 사이에서의 보호층으로서 기계적 손상, 미생물의 침입, 방사선 및 자외선 등 외적 요인들로부터 신체를 보호하고 체내 수분 손실을 최소화하여 체온을 조절함으로써 체내 항상성을 유지한다³⁾. 사람의 피부는 외적 요인과 연령의 증가, 정신적 스

트레스, 불규칙적인 식습관 및 수면 부족 등의 내적 요인들로부터 과도한 산화적 스트레스가 유도됨으로써 피부의 정상적인 기능이 저하된다. 또한 과도한 지방의 축적 및 비대를 통해 여분의 피하지방은 진피내의 섬유 격막에서 피부 안으로 이어지는 정상적인 피부구조의 변화를 초래하여 피부 탄력과 collagen 구조형성 등에 부정적인 영향을 미칠 뿐만 아니라, 지방생성 및 분해 사이의 불균형에 의해 결합조직 등의 노화를 초래할 수 있다⁴⁾. 진피는 피부의 구조와 탄력을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 진피에 다량 존재하는 collagen은 피부 세포 외 기질의 주요 구성요소로서 피부의 형태를 유지하는

*#Corresponding and First author : O Jun Kwon, Gyeongbuk Institute For Regional Program Evaluation

· Tel : +82-53-818-9504 · E-mail : gbria@hanmail.net

· Received : 11 August 2016 · Revised : 30 August 2016 · Accepted : 20 September 2016

역할을 하며, Type I collagen이 인간 피부의 약 70-80%를 구성하고 있다⁵⁾. 피부 섬유 구조를 구성하는 collagen을 생성하고 탄력을 유지하는 데 있어 fibronectin의 역할 또한 중요하다. Fibronectin은 세포 외 기질 성분 중 non-collagen 단백질로서, 피부의 밀착성과 조직 복구 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 따라서, 피부 섬유구조 단백질의 발현을 증가시키고 과도한 지방의 축적을 억제하는 것은 피부의 주름을 예방하는데 도움이 된다. 최근 피부건강에 도움이 될 수 있는 기능성 소재들의 탐색에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다⁷⁾.

Connective tissue growth factor (CCN2) 단백질은 세포의 부착, 이동, 상처회복, extracellular matrix (ECM)을 형성하고 유지하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다¹⁾. 최근의 연구에 따르면 피부세포의 성장과 증식이 ECM의 형성과 밀접하게 관련되어 있음이 보고되었고⁸⁾, CCN2 단백질이 transforming growth factor- β (TGF- β) 신호전달체계 활성화를 통해 ECM의 합성에 관여하고 있으며, 상처를 회복하는 작용에도 CCN2 단백질이 밀접하게 관련되어 있음이 알려졌다⁹⁾. 이상의 기 보고된 연구결과는 피부건강을 유지하는데 CCN2 단백질의 활성화는 피부세포의 성장, 분화, 상처회복에 도움을 줄 수 있음을 시사한다.

뽕나무는 중국 및 한국을 비롯한 아시아 국가에서 약용식물로 널리 사용되어 왔으며 다양한 생리활성이 보고되어 왔다. 뽕나무의 잎인 상엽 (*Mori Follium*)이 12주 동안 고지방 식이를 섭취한 동물실험에서 지질대사 수준을 정상으로 유지하였음이 보고된 바 있으며¹⁰⁾, streptozotocin으로 유도된 당뇨병 모델 동물에서 상엽 에탄올 추출물을 6주간 섭취한 결과(1 g/kg - body weight), 혈당 수준을 대조군 대비 22% 감소시켰다고 보고되었다¹¹⁾. 다른 연구에서는 상엽 추출물과 silkworm 혼합 추출물 섭취가 당뇨를 유발한 대조군 동물과 비교하여 50% 혈당 수준을 낮추었다고 보고하였다¹²⁾. 이상의 결과에서 보듯이, 상엽과 관련하여 당뇨병의 예방 및 치료와 관련한 연구가 많은 것을 알 수 있었으며, 피부건강과 관련한 상엽의 연구는 상대적으로 부족한 실정이었다.

본 연구에서는 상엽 물 추출물(MLE)을 제조하여 B16F10 melanoma 세포에서 melanin축적 억제활성 및 human skin fibroblasts (HSF)에서 피부섬유 단백질인 collagen, 그리고 fibronectin의 발현에 영향을 미치는지 알아보려고 하였으며, 상엽 추출물의 피부미용 소재로서의 이용 가능성에 대해 평가하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

본 실험에 사용된 상엽은 대한민국 부안에서 재배된 것으로 (주)비아이지 (Daejeon, Korea)에서 제공받아 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin, 그리고 phosphate-buffered saline (PBS)는 Welgene Inc. (Daegu, Korea)에서 구입하였다. Fetal bovine

serum (FBS)은 GE Healthcare Bio-Sciences Co. (Piscataway, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 그리고 chloroform은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. dimethyl sulfoxide (DMSO), isopropanol은 Junsei (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. Trizol[®]은 Life Technologies, Inc. (Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다. AccuPower[®] Cycle Script RT PreMix와 각각의 primer들은 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 구입하였으며, PCR PreMix (i-Taq)는 iNtRON (Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 공급받아 사용하였다.

2) 상업 물 추출물 (MLE)의 제조

분쇄된 상엽 1.0 kg에 10 l의 증류수를 가하여 잘 섞어준 뒤 autoclave에서 121°C에서 15분간 열수 추출하였다. 상업 물 추출물은 Whatman No.1 여과지로 여과한 뒤 동결건조하여 -20°C에서 보관하며 이후 분석에 사용하였다. 상업 물 추출물(MLE)의 수율은 15.2% (w/w-dry basis)였다.

2. 방법

1) 세포배양

B16F10 melanoma와 human skin fibroblasts (HSF)는 American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD USA)에서 분양받아 사용하였다. B16F10과 HSF 세포는 10%(v/v) FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 환경에서 2일 주기로 배지를 교체해주면서 배양하였다.

2) MLE의 세포독성 평가

B16F10 및 HSF에서 MLE의 세포독성은 MTT assay를 이용하여 분석하였다. B16F10 세포와 HSF가 confluent 상태가 된 후, 두 세포에 MLE를 1, 10, 50, 100, 200, 400, 그리고 800 μ g/ml의 농도로 처리하였다 (B16F10 세포 72시간, HSF는 24시간). MLE를 처리한 후 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 5 mg/ml의 농도로 용해시킨 MTT 용액을 1시간 동안 추가로 처리하였다. 처리 후 DMEM 배지를 제거하고 37°C에 미리 데워진 1 ml의 PBS로 3T3-L1 전지방세포를 1회 씻어 주었다. 400 μ l의 dimethylsulfoxide (DMSO)를 이용하여 3T3-L1 전지방세포내의 MTT formazan을 녹인 후, DMSO에 용해된 MTT formazan을 96-well plate에 200 μ l/well 씩 옮겨 microplate reader (VersaMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. MLE를 처리하지 않은 B16F10 및 HSF 세포를 대조군으로 하여 세포생존률 (cell viability, % of control)을 계산하였다.

3) Melanin 함량 분석

B16F10 melanoma에 melanin 형성은 1 μ M의 alpha melanocytes stimulating hormone (α -MSH) 및 100 μ M IBMX를 72시간 동안 처리하여 유도하였다. MLE를 10, 100, 그리고 200 μ g/ml 농도로 α -MSH 및 IBMX와 병행처리하여 B16F10 melanoma에서 melanin 축적 억제활성을 평가하였다. MLE를 처리한 후, B16F10 세포는 200 μ l의 trypsin-EDTA 용액을 첨가하여 부착된 세포를 떼어 주었다. 떨어진 B16F10 세포는 18,472xg에서 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리한 B16F10 세포는 200 μ l의 1 N NaOH와 10%(v/v) DMSO를 첨가하여 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하여 세포내 축적된 melanin을 추출하였다. 그 후 다시 18,472xg에서 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 96-well plate에 200 μ l/well 씩 옮겨 microplate reader (VersaMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. MLE의 melanin 축적 억제활

성은 MLE를 처리하지 않은 B16F10 세포를 대조군으로 하여 melanin 축적활성을 평가하였다.

4) RT-PCR을 통한 피부섬유 유전자의 발현수준 분석
 HSF 세포에 MLE를 24시간 동안 처리하고, 200 μ l의 TRIzol[®]을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA에 100 μ l의 chloroform을 넣고 15분 동안 상온에 정치한 뒤 14,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 얻은 상층액에 isopropanol 80 μ l를 넣고 15분 동안 상온에 한번 더 정치한 다음 14,000rpm에서 15분간 원심분리하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 정량한 뒤 SuperScriptII kit (Invitrogen)을 이용하여 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 cDNA를 합성하였다. 본 실험에 사용된 fibronectin, collagen 1 α 2 (COL1A2), CCN2, 그리고 β -actin의 primer sequences는 Table 1과 같다.

Table 1. Primer Sequences for Polymerase Chain Reaction Analysis

Name	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
Fibronectin	GGCTTGAACCAACCTACGGA (sense)	CATGAAGCACTCAATTGGGCA (antisense)
Collagen 1 α 2 (COL1A2)	ACTGGCGAAACCTGTATCCG (sense)	ACCGATGTCCAAGGTGCAA (antisense)
CCN2	TCCACCCGGGTTACCAATGA(sense)	TCAAACCAAGTGTCTGGGAAGAT (antisense)
β -Actin	GCAGGAGTATGACGAGTCCG (sense)	AGGGACTTCTGTAAACAATGC (antisense)

5) Western blot

HSF에서 RIPA lysis buffer (1 mM PMSF, 50 mM Tris-HCl, NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, and phosphatase inhibitor cocktail)를 이용하여 cell extract를 모은 뒤 SDS/PAGE를 통해 단백질을 분리하고 이를 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 transfer 하였다. 1%(w/v) bovine serum albumin (BSA) 용액으로 PVDF membrane을 blocking하고 표적 단백질에 관한 특정 항체를 반응시켰다. 이를 TBST (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% NP-40)로 여러 번 세척한 다음 horse radish peroxidase (HRP)와 결합한 2차 항체와 반응시키고 ECL을 이용하여 목적 단백질을 ChemiDoc Molecular Imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 확인하였다.

6) 통계분석

모든 데이터는 평균 \pm 표준편차로 표현하였으며, 데이터의 통계처리는 Statistical Package for Social Science (SPSS, Chicago, USA)을 이용하여 분석하였다. 신뢰수준 p<.05에서 평균값들에 대한 유의성을 검증하였다. 각 항목은 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 시행하였으며, Student t-test 방법에 의하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다 (*<0.05, **<0.01, 그리고 ***<0.001).

B16F10 melanoma 세포에 1, 10, 50, 100, 200, 400, 그리고 800 μ g/ml의 MLE를 72시간 처리한 후 B16F10 세포의 생존률을 MTT 분석법을 통해 알아보았다. B16F10 세포에 1, 10, 50, 100, 200, 그리고 400, μ g/ml의 농도로 MLE를 처리한 결과, B16F10 세포의 생존률은 각각 105.21%, 104.52%, 97.65%, 99.68%, 그리고 91.58%로 유의적인 세포독성은 관찰되지 않았다. 그러나 800 μ g/ml 농도의 MLE를 72시간 처리하였을 때, 대조군 대비 세포생존률은 83.65%로 B16F10 세포에서 독성이 관찰되었다 (Fig. 1A). HSF에 MLE를 1, 10, 50, 100, 그리고 200 μ g/ml의 농도로 처리한 결과, HSF의 세포 생존률은 100.87%, 95.42%, 95.41%, 그리고 97.68%로 세포의 성장에 영향을 미치지 않았으나 400 그리고 800 μ g/ml의 MLE를 처리하였을 때 세포 생존률은 87.63%, 그리고 85.47%로 유의적으로 감소하였다 (Fig. 1B). 따라서 이후 실험에서는 200 μ g/ml 이하의 MLE를 선택적으로 사용하였다.

2. MLE의 melanin 축적 억제활성

B16F10 세포에 1 μ M의 α -MSH 및 100 μ M IBMX를 72 시간 동안 처리하여 melanin 형성을 유도하였으며, Melanin 형성 유도기간에 각각 10, 100, 그리고 200 μ g/ml의 MLE를 하여 melanin 축적 억제활성을 분석하였다. MLE를 각각 10, 100, 그리고 200 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때 대조군 대비 melanin 축적 억제활성은 각각 95.47%, 88.65%, 그리고 58.24%로 나타났다. MLE 처리는 B16F10 세포에서 농도 의존적으로 melanin 축적을 억제하였으며, 200 μ g/ml MLE

III. 결 과

1. B16F10 및 HSF에서 MLE의 세포독성

처리에서 melanin 축적이 유의적으로 감소하였다 (Fig. 2).

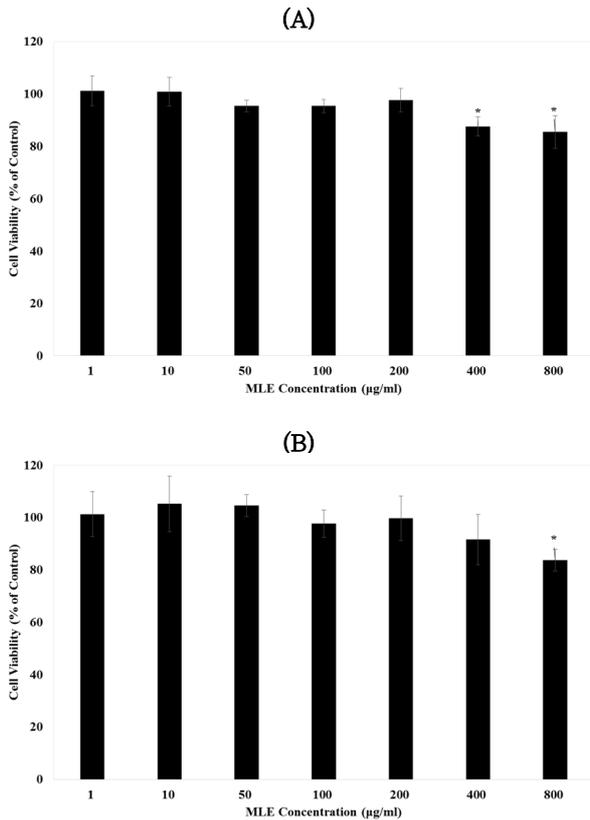


Fig. 1. Cytotoxic effect of MLE treatment. (A) B16F10 melanoma was exposed to 1, 10, 50, 100, 200, 400, and 800 µg/ml of MLE for 72 h. (B) HSF was treated with 1, 10, 50, 100, 200, 400, and 800 µg/ml MLE for 24 h. Significant differences were analyzed by one-way ANOVA followed by t-test (*<0.05 vs untreated cells).

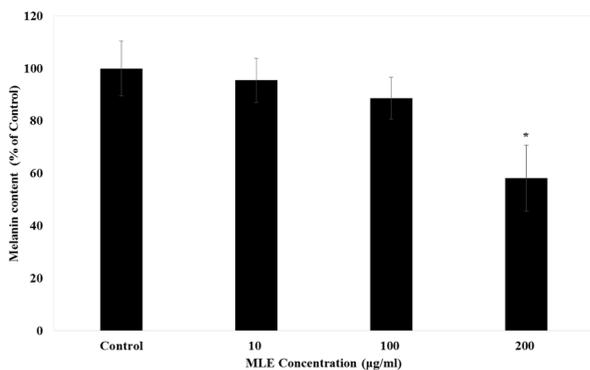


Fig. 2. Inhibitory effect of MLE treatment on the melanin accumulation in B16F10 melanoma. Significant differences were analyzed by one-way ANOVA followed by t-test (*<0.05 vs untreated cells).

3. MLE 처리가 HSF 세포의 피부섬유구조 관련 유전자 발현에 미치는 영향

진피의 피부섬유구조 관련 단백질의 발현은 피부의 탄력 및 세부구조를 결정하는데 중요하게 작용한다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 MLE 처리가 fibroblast 세포의 피부섬

유구조 유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 분석하고자 하였다. HSF에 독성을 나타내지 않은 10, 100, 그리고 200 µg/ml의 MLE를 24시간 동안 처리하고 fibronectin, COL1A2, 그리고 CCN2의 mRNA 발현수준을 분석하였다. 아무것도 처리하지 않은 대조군 대비 MLE 처리는 fibronectin 및 CCN2의 발현수준을 농도 의존적으로 증가시켰으며 COL1A2 역시 MLE 처리군에서 증가하는 경향을 나타냈다 (Fig. 3).

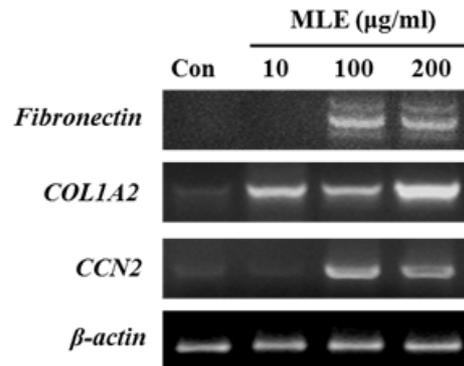


Fig. 3. The MLE treatment enhanced skin fibril-related genes such as fibronectin, COL1A2, and CCN2 in human skin fibroblasts. β-Actin was used as a control.

4. 피부섬유구조 단백질 발현증가에 대한 MLE의 기전분석

위의 결과로부터 MLE에 의해 피부섬유구조 단백질인 fibronectin, COL1A2, 그리고 CCN2의 발현이 증가됨을 확인하였다. 본 실험에서는 MLE에 의해 발현이 증가되는 피부섬유구조 단백질이 CCN2 활성화에 의한 것인지 확인해 보고자 CCN2의 하위신호전달체계인 transforming growth factor β (TGF-β) 특이적 저해제인 SB431542를 5 µM의 농도로 처리하였다. 10, 그리고 200 µg/ml의 MLE 처리는 예상대로 CCN2 및 fibronectin의 단백질 발현 수준을 증가시켰으나, SB431542를 병행 처리한 결과 MLE에 의해 증가된 CCN2 및 fibronectin의 발현 수준이 감소됨을 확인하였다 (Fig. 4). 이는 MLE 처리가 CCN2를 활성화 시켜 fibronectin 및 collagen 등의 피부섬유구조 단백질을 활성화 시키는 것으로 생각된다 (Fig. 4).

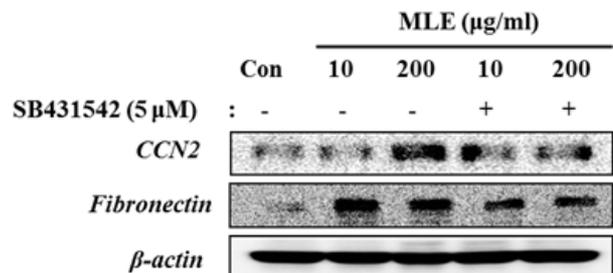


Fig. 4. The effect of SB431542 treatment on the MLE-induced CCN2 and fibronectin expression levels in human skin fibroblasts. β-Actin was used as a control.

IV. 고 찰

피부는 우리 몸의 항상성을 저해하는 외부 요인의 위해를 막아주는 일차적인 보호기관으로 외부의 화학적, 물리적, 생물학적 장벽기능을 수행하고 있으나 다양한 환경적 요인과 접촉하고 있기 때문에 쉽게 손상을 받을 수 있다¹³⁾. 외부의 환경적 요인인 자외선, 미세먼지, 오염물질 등은 피부 세포의 하여 피부 세포의 손상과 사멸을 유도하고 피부의 탄력저하, 주름생성 등의 피부노화를 가속화 시킨다¹⁴⁾. Melanin은 동식물계에 널리 존재하는 색소로서 사람의 피부에서는 자외선 조사 등에 의한 피부손상에 대항하는 기작으로 생합성이 촉진된다¹⁵⁾. Melanin의 적절한 형성은 피부를 보호하는 긍정적인 면을 갖고 있으나 과도하게 생성된 melanin은 피부의 기미, 주근깨, 피부 반점 등을 유발하며 더 나아가 피부세포의 사멸 및 피부암 생성이 촉진되기도 한다¹⁶⁾. Melanin은 세포 내의 소기관인 리보솜에서 tyrosinase에 의해 생합성되며, 표피의 기저층에 존재하는 melanocytes에서 tyrosine이 tyrosinase 효소의 작용으로 여러 단계를 거쳐 melanin이 합성되어 melanosome 이라는 과립을 형성하고, 생성된 melanin은 각질세포로 이동되어 피부의 색소침착 및 멜라닌 전구물질들에 의한 독성을 유발한다¹⁷⁾. 최근 아름다움에 대한 욕구 및 마스크 등으로 인한 외모에 대한 관심의 증가를 통해 미용기능에 대한 수요가 급격히 증가하고 있으나, 이에 부합하는 미용소재에 대한 발굴은 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 기존에 항당노 소재로 잘 알려진 상엽의 미용기능 소재로서의 가능성에 대해 연구하고 그 작용기전을 탐색하고자 하였다.

본 연구에서 상엽 물 추출물 MLE를 B16F10 melanoma 세포에 1, 10, 50, 100, 200, 400, 그리고 800 $\mu\text{g/ml}$ 의 MLE를 72시간 처리한 후 B16F10 세포의 생존률을 분석한 결과 1-400 $\mu\text{g/ml}$ 의 MLE는 B16F10 세포에 독성을 유발하지 않았다. 또한 HSF에 동일한 농도의 MLE를 24시간 동안 처리하였을 때 1-200 $\mu\text{g/ml}$ 의 MLE는 HSF에 유의적인 독성을 나타내지 않았다. 따라서 본 연구에서는 독성이 나타나지 않은 상대적으로 안전한 200 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 MLE를 분석에 이용하였다. B16F10 melanoma 세포에 MLE를 처리하였을 때 melanin 축적이 유의적으로 감소하였다. 이전 연구에 따르면 호장근 추출물이 α -MSH로 유도된 melanin 형성을 SK-MEL-2 세포에서 유의적으로 억제하였음을 보고하였고¹⁸⁾, 민들레 추출물이 B16F10 melanoma에서 tyrosinase 효소활성을 억제하여 melanin 축적을 억제한다고 보고한 바 있다⁸⁾. 다양한 연구를 통해 천연물의 미백활성은 다양하게 보고되어 왔으며, 본 연구에서도 상엽 추출물 MLE는 B16F10의 melanin 형성을 효과적으로 억제하여 미백소재로서의 가능성을 나타냈다. 그러나 melanin 형성 억제에 있어 MLE 처리에 의한 tyrosinase의 활성에 미치는 효과, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2), dopachrome tautomerase, 그리고dopaquinone 형성에 미치는 영향 등을 체계적으로 분석하여 MLE의 미백활성에 대한 기전을 규명하는 연구가 추가로 요구된다. 또한 본 연구에 사용된 B16F10 melanoma 세포는 melanin 형성 억제에 대해 다방면으로 활용되기는 하지만 암세포의 성격을 지니고 있어, 후후 동물에서 분리한 primary 세포모형을 확

립하여 일반 세포주에서 MLE의 melanin 형성 억제에 대한 추가적인 검증이 필요하다고 생각한다.

본 연구에서 MLE 처리는 human skin fibroblasts의 피부섬유구조 단백질의 유전자 발현 수준을 현저히 증가시켰다. 피부섬유구조 단백질은 피부의 진피층에 주로 존재하며, ECM은 피부섬유구조를 지탱하는 구조물의 역할로서 다량의 collagen, 그리고 fibronectin 등에 의해 구성된다¹⁾. 따라서, ECM을 유지하고 발달시키는 것은 건강한 피부를 유지하는데 중요하다. Collagen 단백질은 전구체인 pro-collagen으로부터 형성되며 진피의 fibroblast에서 주로 생성된다. Fibronectin은 고분자 당단백질로 ECM의 collagen과 fibrin의 결합에 중요한 구성요소로 작용하며 특히 fibronectin은 피부의 구조를 유지하여 주름형성을 예방하고 상처회복에 밀접하게 관련되어 있다고 알려져 있다¹⁸⁾. 따라서 MLE 처리에 의한 fibronectin 및 collagen 단백질의 발현 증가는 MLE가 피부의 탄력 및 구조를 유지하는데 기여할 수 있음을 의미한다. 또한 본 연구에서는 MLE의 미용기능이 CCN2 단백질에 의해 작용하는지 inhibitor assay를 통해 분석하였다. CCN2 하위 신호전달체계로 잘 알려진 TGF- β 의 특이적 저해제인 SB431542를 MLE와 같이 처리한 후 fibronectin 및 CCN2 단백질의 발현을 분석한 결과, MLE는 CCN2 활성화를 통해 피부섬유구조 단백질의 발현을 증가시키는 것으로 생각된다. 본 결과는 기존의 보고와 같이 CCN2는 세포의 부착, 이동, 상처회복, extracellular matrix (ECM)을 형성하고 유지하는데 기여할 것으로 생각되며, 기존에 보고된 CCN2 및 TGF- β 의 기능에 대한 결과와 부합한다¹⁹⁾.

이상의 연구는 상엽 추출물의 미백 활성 및 피부섬유구조 단백질의 발현증가를 통해 기능성 미용소재로 활용될 수 있다는 가능성을 제시하였다. 또한 상엽 추출물의 기능성에 있어 CCN2의 활성화가 관여하고 있음을 밝혔다. 향후 본 연구의 결과는 피부관련 의약품 보조제, 처방, 화장품 및 미용기능식품의 개발에 유용한 연구자료로 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

V. 결 론

상엽 물 추출물의 미백활성 및 피부섬유구조와 관련한 실험을 진행한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. B16F10 세포에서 MLE를 72시간 처리하였을 때 400 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 유의적인 세포독성이 관찰되지 않았으며, HSF 세포에 MLE를 24시간 처리하였을 때 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 유의적인 세포독성이 관찰되지 않았다.
2. 세포독성이 나타나지 않은 농도범위의 MLE를 1 μM 의 α -MSH 및 100 μM IBMX를 72시간 동안 처리하여 melanin 형성을 유도한 후, 각각 10, 100, 그리고 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 MLE를 병행 처리한 결과 MLE 처리는 유의적으로 melanin 축적을 억제하였다.
3. HSF에 MLE를 10, 100, 그리고 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 MLE를

처리한 결과, MLE 처리는 fibronectin 및 CCN2의 발현수준을 농도 의존적으로 증가시켰으며 COL1A2 역시 MLE 처리군에서 증가하는 경향을 나타냈다.

4. 10, 그리고 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 MLE 처리는 HSF 세포의 CCN2 및 fibronectin의 단백질 발현 수준을 증가시켰으나, TGF- β 특이적 저해제인 SB431542의 병행처리는 MLE에 의해 증가된 CCN2 및 fibronectin의 발현수준이 감소시켰다. 이는 MLE 처리가 CCN2 활성화를 통해 피부섬유구조 관련 단백질의 발현을 증가시키는 것으로 추측된다.

본 연구는 상업 물 추출물 MLE가 기능성 미용소재로 효과적으로 사용될 수 있음을 제시하며, MLE의 미용 기능성은 CCN2 활성화와 밀접한 관련이 있음을 제시하였다. 추후 체계적인 기전분석 및 임상실험을 통해 MLE의 효능과 기전이 확보된다면 천연물을 활용한 의약품 및 기능성 식품 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것이라 생각한다.

참고문헌

- Shon MS, Kim RH, Kwon OJ, Roh SS, Kim GN. Beneficial role and function of fisetin in skin health via regulation of the CCN2/TGF- β signaling pathway. *Food Sci Biotechnol*, 2016 ; 25 : 133-41.
- Alexander PK, John TC, Asa HB. 3D nanomechanical evaluations of dermal structures in skin. *J Mech Behav Biomed*, 2016 ; 57 : 14-23.
- Esther B, Henk FJH, Len R. Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids¹⁻³. *Am J Clin Nutr*, 2001 ; 73 : 853-64.
- Magnus SA, Reinhild S, Lise HC, Ursula M. Tumor necrosis factor- α -accelerated degradation of type I collagen in human skin is associated with elevated matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 *ex vivo*. *Eur J Cell Biol*, 2015 ; 94 : 12-21.
- Ana PCS, Carissa AG, Eduardo AGR, Renan FT, Ludmila FV, Tuania SC, Maria CTC, Antonio LBP, Jean NS. Infrared LED light therapy influences the expression of fibronectin and tenascin in skin wounds of malnourished rats-A preliminary study. *Acta Histochem*, 2014 ; 116 : 1185-91.
- Mariana D, Argirova, Beryl JO. Activation of protein-bound copper ions during early glycation: study on two proteins. *Arch Biochem Biophys*, 2003 ; 420 : 176-184.
- Liu LK, Chou FP, Chen YC, Ho HH, Wang CJ. Effects of mulberry (*Morus alba* L.) extracts on lipid homeostasis *in vitro* and *in vivo*. *J Agric Food Chem*, 2009 ; 57(16) : 7605-11.
- Usui T, Takase M, Kaji Y, Suzuki K, Ishida K, Tsuru T, Miyata K, Kawabata M, Yamashita H. Extracellular matrix production regulation by TGF- β in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1988 ; 39 : 1981-9.
- Samad F, Yamamoto K, Pandey M, Loskutoff DJ. Elevated expression of transforming growth factor- β in adipose tissue from obese mice. *Mol Med*, 1997 ; 3 : 37-48.
- Naowaboot J, Pannangpetch P, Kukonqviriyan V, Kongyingoes B, Kukonqviriyan U. Antihyperglycemic, antioxidant and antiglycation activities of mulberry leaf extract in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. *Plant Foods Hum Nutr*, 2009 ; 64 : 116-21.
- Jang MJ, Rhee SJ. Hypoglycemic effects of pills made of mulberry leaves and silkworm powder in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2004 ; 33(10) : 1611-7.
- Kim SY, Ryu KS, Lee WC, Ku HO, Lee HS, Lee KR. Hypoglycemic effect of mulberry leaves with anaerobic treatment in alloxan-induced diabetic mice. *Kor J Pharmacogn*, 1999 ; 30(2) : 123-9.
- Kim J, Lee CW, Kim EK, Lee SJ, Park NH, Kim HS, Kim HK, Char K, Jang YP, Kim JW. Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts. *J Ethnopharmacol*, 2011 ; 137 : 427-33.
- Yoneta A, Yamashita T, Jin YH, Kondo S, Jimbow K. Ectopic expression of tyrosinase increases melanin synthesis and cell death following UVB irradiation in fibroblasts from familial atypical multiple mole and melanoma (FAMMM) patients. *Melanoma Res*, 2004 ; 14 : 387-94.
- Urabe K, Aroca P, Tsukamoto K, Mascagna D, Paulumbo A, Prata G, Hearing VJ. The inherent cytotoxicity of melanin precursors. *Biochim Biophys Acta*, 1994 ; 1221 : 272-8.
- Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishi-yama S. Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPAchrome tautomerase (TRP2) and a melanogenic inhibitor. *J Invest Dermatol*, 1993 ; 100 : 126-32.
- Kim MJ, Ryu MJ. Inhibition of melanogenesis and anti-UV properties *Reynoutria elliptica*. *Kor J Aesthet Cosmetol*, 2012 ; 10 : 961-8.
- Kang JR, Yoo SM. A study on effect on skin whitening action in *Taraxanum platycarpum* fractions. *Kor J Aesthet Cosmetol*, 2009 ; 7 : 199-205.
- Samad F, Yamamoto K, Pandey M, Loskutoff DJ. Elevated expression of transforming growth factor- β in adipose tissue from obese mice. *Mol Med*, 1997 ; 3 : 37-48.