

B16F10 Melanoma 세포에서 낙과 배 물 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과

신보연¹ · 정보람¹ · 정종기¹ · 조승식² · 방미애¹

¹(재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터

²목포대학교 약학과

Inhibitory Effects on Melanin Production in B16 Melanoma Cells of Fallen Pear

Bo Yeon Shin¹, Bo Ram Jung¹, Jong Gi Jung¹, Seung Sik Cho², and Mi Ae Bang¹

¹Food Research Center, Jeonnam Bioindustry Foundation

²Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Mokpo National University

ABSTRACT This study investigated the water extracts of fallen pear (FPWE) on tyrosinase activity and melanogenesis. In the present study, we examined the effects of FPWE on mushroom tyrosinase activity *in vitro*, B16F10 melanoma cell tyrosinase activity, melanin contents, and expression of melanogenic enzyme proteins such as tyrosinase. An apparent down-regulatory effect on tyrosinase activity was observed when B16F10 cells were incubated with FPWE. Results of melanin assay using B16F10 cells treated with different concentrations (50, 125, and 250 µg/mL) of FPWE showed a dose-dependent decrease in melanin content. To determine whether or not FPWE indirectly affects tyrosinase activity, we assessed mushroom tyrosinase activity upon treatment with various concentrations (125, 250, 500, and 1,000 µg/mL) of FPWE. In addition, we investigated changes in the protein level of tyrosinase by using Western blotting. Tyrosinase and microphthalmia-associated transcription factor expression levels in B16F10 melanoma cells were reduced in a dose-dependent manner by FPWE. These results suggest that FPWE reduced melanin formation by inhibition of tyrosinase activity. Therefore, we suggest that FPWE could be used an effective whitening agent for skin.

Key words: fallen pear, B16F10 melanoma cell, melanin, tyrosinase, mushroom tyrosinase

서 론

사람의 피부색을 결정하는 요인 중 melanin의 영향이 가장 큰 것으로 알려져 있다. Melanin의 합성에 관여하는 몇 가지 효소 중에 구리를 함유한 tyrosinase는 생체 내 tyrosine을 DOPA로, 나아가 DOPA quinone으로 산화되는 과정을 촉매하여 melanin 생합성에 관여한다(1). Melanocyte에 α-melanocyte stimulating hormone(α-MSH)을 처리하면 tyrosinase의 발현이 증가한다. α-MSH는 melanocortin-1-receptor(MC1R)를 통해 cyclic AMP(cAMP)를 증가시키고 활성화된 MiTF에 의해 tyrosinase의 발현이 증가한다(2). 현재 미백제로 가장 많이 사용되는 arbutin은 L-tyrosine과 경쟁적으로 작용하는 저해제이며(3), arbutin은 tyrosinase 활성 부위의 copper를 chelating 하여 tyrosine에서 DOPA 그리고 DOPA에서 DOPA quinone으로 진행되는 과정을 저해한다(4). 그러나 피부 안정성, 제형 안정성 문제로 인해 현재 의학계나 화장품업계에서는 제한된 양만

이 사용되고 있어 천연물 물 추출물에 대한 관심이 고조되고 있다(5,6).

배는 배나무과(Pomoideae), 배나무속(*Pyrus*)에 속하는 식물로 세계에서 가장 많이 소비되는 과일 중 하나이며, 원산지에 따라 동양배(*Pyrus pyrifolia*), 서양배(*Pyrus communis*) 및 중국배(*Pyrus ussuriensis*)로 분류된다(7,8). 예로부터 배는 잎과 껍질, 과실을 민간요법으로 사용되어 왔으며, 잎은 토사광난의 약을, 껍질은 부스럼이나 피부질환에 사용하였으며, 과일은 가래 기침, 숙취, 해열, 배변, 연육 등에 쓰여 왔다(9). 과일에는 많은 폴리페놀과 플라보노이드 성분 등 다양한 기능성 성분이 함유되어 있어 항산화, 항노화, 항암, 항염 작용 등 효과가 있는 것으로 알려지고 있으며, 배에 관한 연구로는 품종별 가공적성, 항산화 생리활성(10), 배 폴리페놀 분획물의 지질대사(11) 및 배의 저장 중의 포장재에 따른 품질 변화(12) 등의 연구가 있다. 배에는 arbutin, chlorogenic acid 등이 함유되어 있어 다양한 기능성 활성을 나타내는 것으로 알려져 왔다. 특히 arbutin은 피부미백 작용이 있는 물질로 배에 다양 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. Arbutin은 melanin 색소가 피부에 침착되어 발생하는 기미, 주근깨의 원인이 되는 물질인 tyrosinase의 활성을

Received 20 October 2016; Accepted 24 February 2017

Corresponding author: Mi Ae Bang, Food Research Center, Jeonnam Bioindustry Foundation, Naju, Jeonnam 58275, Korea
E-mail: methyl@nate.com, Phone: +82-61-339-1250

저해함으로써 미백작용을 한다고 보고되었다(13,14).

낙과는 완숙과와 비교하여 외형상의 순실로 인하여 상품 가치를 상실할 뿐 비슷한 건강 기능적, 영양적 품질을 보유하고 있다. 하지만 대부분의 낙과는 비상품성 미과수로 분류되어 사료, 챙, 주스 등으로 제한적 식품가공원료로 이용되고 있어 낙과의 부가가치를 높일 수 있는 기능성 연구가 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 낙과 배를 이용하여 피부 기능성 소재로써 이용 가능성이 있는지를 확인하였다. 낙과 배 물 추출물을 α -MSH로 자극한 B16F10 melanoma 세포에서 melanin 생성 억제 및 tyrosinase 효소 활성 저해 효과를 통해 미백 활성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 제조

본 실험에서 사용한 낙과 배는 좋은영농조합법인에서 제공받아 동결건조 하여 분쇄한 후 사용하였다. 시료 20 g에 20배수의 증류수, 25, 50, 75, 100% 에탄올 5가지 용매로 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 상온에서 24시간 추출하여 여과지(Whatman No. 1, GE Healthcare, Arlington Heights, IL, USA)로 감압여과 한 후, 농축하여 동결건조한 것을 실험에 사용하였다.

세포 및 시약

미백 효과 측정에 사용된 세포 B16F10은 Korean Cell Line Bank(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 구입한 세포는 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL Co., Grand Island, NY, USA), 1% penicillin/streptomycin을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco BRL Co.) 배지에 100 nM α -melanocyte stimulating hormone(α -MSH, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포생존율 측정시약 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT), L-DOPA, L-tyrosine, arbutin, dimethyl sulfoxide(DMSO) 등은 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용하였다. Tyrosinase 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Texas, CA, USA)에서 구입하였으며, MiTF 및 2차 항체는 Abcam(Cambridge, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Arbutin 함량 분석

낙과 배 추출물에 함유되어 있는 arbutin 분석을 위한 HPLC 분석 조건은 Table 1에 요약하였다. HPLC 칼럼은 Zorbax extend-C18 Analytical(4.6×150 mm, 5 μ m)을 사용하였고, pump, autosampler, column oven, photodiode array UV/VIS detector(Waters HPLC system, Waters Corp., Milford, MA, USA) 장비를 사용하였다. A 용매는 methanol, B 용매는 0.2% acetic acid를 사용하였으며 모

Table 1. Analytical conditions of HPLC for analysis of arbutin

Parameters	Conditions		
Column	Zorbax extend-C18 Analytical (4.6×150 mm, 5 μ m)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	20 μ L		
UV detection	280 nm		
Run time	30 min		
	Time (min)	% A ¹⁾	% B ²⁾
Gradient	0	5	95
	15	5	95
	25	100	0
	26	5	95
	30	5	95

¹⁾Methanol. ²⁾0.2% acetic acid.

든 용매는 사용 전 탈기 및 필터로 여과 후 사용하였다. 칼럼의 유속은 1.0 mL/min이었고 330 nm 파장에서 측정하였으며, 시료는 20 μ L를 주입하였다.

MTT assay를 이용한 세포 독성 확인

마우스 흑색종(mouse melanoma, B16F10) 세포를 96-well plate에 5×10⁴ cells/well이 되도록 분주하여 24시간 동안 배양한 후 시료를 농도별로 조제하여 처리하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4~5일 동안 배양하였다. 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 0.01 mL를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO를 0.2 mL씩 넣어 formazan crystal 생성물을 용해시킨 후 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

기질에 따른 tyrosinase 측정

Tyrosinase 활성 측정 시 기질은 L-DOPA와 L-tyrosine을 사용하였다. L-DOPA와 L-tyrosine은 100 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 완전히 녹이고, tyrosinase는 25 units/mL와 125 units/mL로 각각 만들었다. L-DOPA는 2 mg/mL와 L-tyrosine 0.3 mg/mL를 Eppendorf tube에 450 μ L를 넣고, 시료는 최종 농도를 조절하여 5 μ L를 가했다. Tyrosinase는 최종 농도가 각각 25 units/mL, 125 units/mL가 되도록 계산하여 50 μ L를 처치하였으며 37°C에서 30분 반응시킨 다음 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 내 melanin 생성 억제 효과

B16F10 세포를 이용한 melanin 생합성 저해 측정은 Hosoi 등(15)의 연구 방법을 변형하여 측정하였다. DMEM 배지로 배양된 B16F10 세포를 6-well plate에 적정세포수(2×10⁴ cells/well)로 분주하였으며, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 시료를 처치하였다. 72시간 배양 후 인산 완충액(pH 7.4)으로 세척한 다음 원심분리 하여 세포 침전물을 얻었다. 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액을 130

μL 첨가하고 60°C 에서 1시간 용해시켰으며 405 nm 에서 흡광도를 측정하였다. Melanin 정량은 대조군의 melanin 양에 대한 백분율로 계산하여 다음 식에 의해 산출하였다.

$$\text{Melanin} = \left(\frac{\text{시료 첨가구의 흡광도}}{\text{시료 무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

세포 내 tyrosinase 활성 측정

B16F10 세포에 약물 처리 후 배양이 끝나면 1%(w/v) triton X-100을 함유한 10 mM phosphate buffer(pH 6.8)를 $100\text{ }\mu\text{L}$ 가하고 5분간 shaking 한 후 세포와 용액을 모두 Eppendorf tube로 이전시키고 원심분리 하여 상층액을 tyrosinase 활성과 단백질 정량에 이용하였다. 약물 처리 후 얻은 상층액은 96-well plate에 $40\text{ }\mu\text{L}$ 를 분주하고, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.2)에 녹인 10 mM L-DOPA $200\text{ }\mu\text{L}$ 를 가하여 37°C 에서 30분 동안 배양하였다. Tyrosinase에 의해 생성된 DOPA chrome은 475 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

Real time PCR을 통한 미백 관련 mRNA의 발현 측정

Total RNA 추출은 RNeasy mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하였다. cDNA 합성은 $2\text{ }\mu\text{g}$ 의 total RNA를 Reverse transcription kit(Qiagen)을 이용하여 역전사시켜 합성하였다. cDNA는 고성능 cDNA 합성 kit을 사용하여 증폭시켰다. Real time PCR은 SYBR green premix(Qiagen)를 이용하여 제조사의 지시된 방법에 따라 수행하였다. 프라이머는 Pioneer(Daejeon, Korea)에서 합성 제작하였으며 염기서열은 Table 2와 같다. PCR 조건은 95°C 에서 30초(denaturation), 50°C 에서 30초(annealing), 72°C 에서 90초(extension)의 반응을 35회 반복하는 것을 기본으로 하였다. 결과 값은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 상대적인 값으로 보정하였다.

Western blot

시료를 72시간 처리한 B16F10 세포를 모은 후 lysis buffer $100\text{ }\mu\text{L}$ 을 첨가하여 용해시키고 원심분리($15,000\times g$, 4°C , 15 min) 하였다. 원심분리 하여 얻은 단백질은 Bradford assay로 정량하여 각 샘플 $40\text{ }\mu\text{g}$ 의 단백질을 10% polyacrylamide gel에 전기영동하고 이를 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ pore size PVDF membrane에 옮긴 다음 80 V 에서 1시간 transfer하였다. Transfer가 끝나면 5% skim milk로 1시간 block-

Table 2. The sequences of the primers of the tyrosinase and GAPDH

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
Tyrosinase	Forward	GAC GGT CAC TGC ACA CTT TG
	Reverse	GCC ATG ACC AGG ATG AC
GAPDH	Forward	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
	Reverse	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

ing 하였다. 3회 TBST로 washing 후 1차 antibody를 상온에서 2시간 불인 다음 3회 washing 하여 2차 antibody를 붙였다. 1시간 washing 후 ECL kit(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 이용하여 band를 확인하였다.

통계분석

모든 실험 결과는 Statistical Package for the Social Sciences 17(SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 일원분산분석법을 사용하였다. 통계적 유의성은 Duncan's multiple range test로 P 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

HPLC 분석을 통한 낙과 배 추출물의 arbutin 함량

낙과 배 추출물에 존재하는 유효성분으로써 arbutin을 선정하였다. Table 1의 분석법을 바탕으로 하여 낙과 배 에탄올 비율별 추출물을 내의 arbutin 함량을 측정하였다. 그 결과 arbutin은 물 추출 시 0.690 mg/g 으로 제일 높은 함량을 보였으며(Table 3), 에탄올 함량이 증가할수록 점차 감소하였다(Fig. 1). 따라서 미백기능 성분인 arbutin의 함량을 바탕으로 낙과 배 물 추출물을 실험에 사용하였다.

MTT assay를 이용한 세포 독성 확인

낙과 배 물 추출물을 세포에 장시간 노출하는 실험으로 세포 독성이 있는지를 확인하기 위해 MTT를 이용하여 낙과 배 에탄올 추출물을 농도별 처리하여 세포 독성을 측정하였다. 낙과 배 0, 50, 100% 에탄올 추출물을 농도별 세포독성을 측정한 결과 물 추출물을 제외한 에탄올 추출물에서는 세포 독성을 나타내었다(data not shown). 낙과 배 물 추출물은 $50\sim 1,000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 72시간 측정한 결과 $50\sim 250\text{ }\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 90% 이상의 생존율을 보였으며, $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 농도 이상에서는 생존율이 75% 이하로 감소하였다(Fig. 2). 따라서 장시간 노출에도 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 낙과 배 물 추출물을 실험에 사용하였으며 $250\text{ }\mu\text{g/mL}$ 농도까지를 실험 조건으로 설정하였다.

세포 내 melanin 생성 억제 효과

Melanin은 tyrosinase 효소의 생합성을 통해 세포 소기관인 ribosome에서 합성되기 시작한다. Tyrosinase 효소

Table 3. The content of arbutin of fallen pear water extracts and various concentration

Sample	EtOH (%)	Arbutin (mg/g)
Extract	0	0.690
	25	0.646
	50	0.633
	75	0.623
	100	0.639

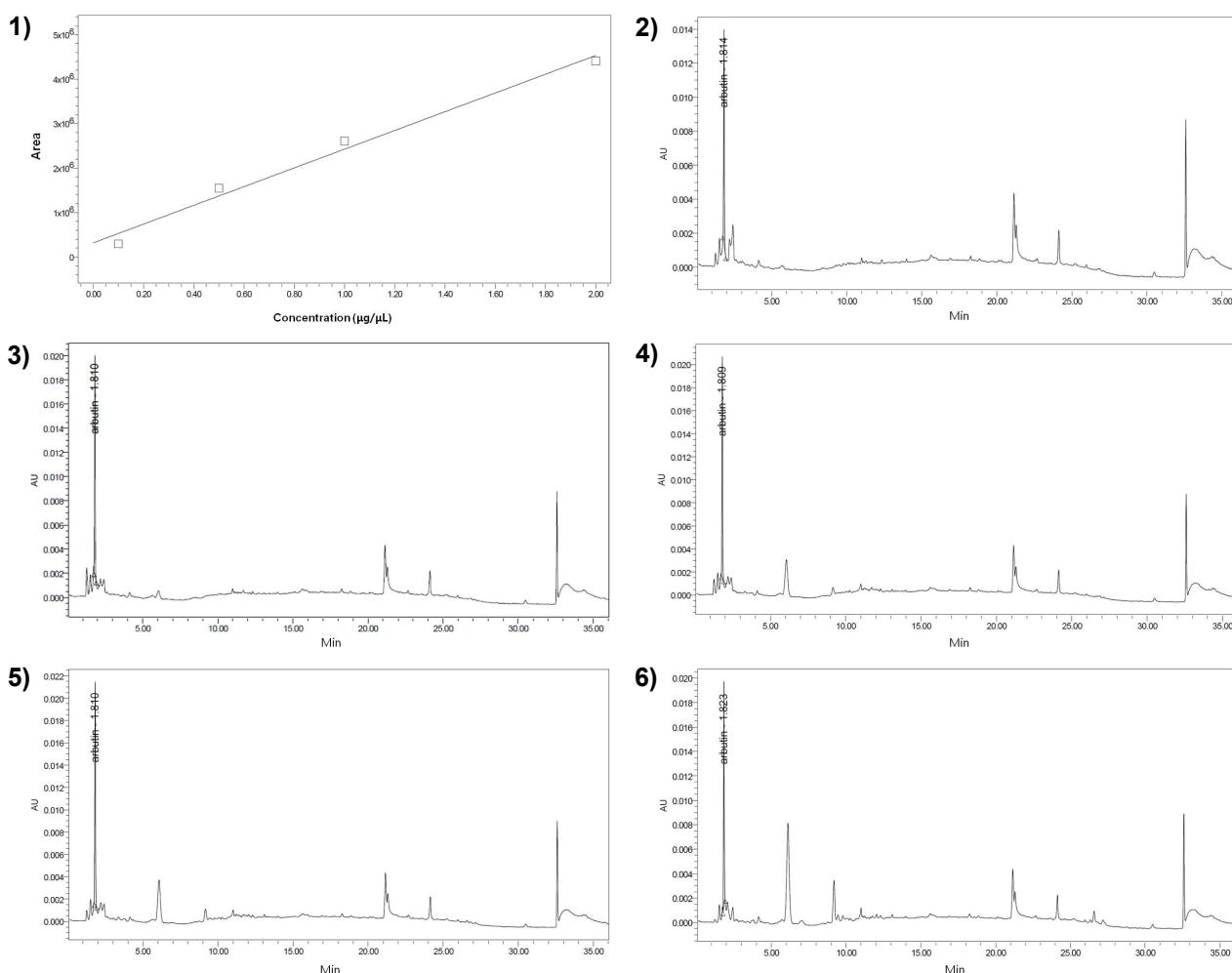


Fig. 1. HPLC chromatograms 1) standard and calibration curve of arbutin. Standard peak: 0.1, 0.5, 1, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2) FPWE, 3) 25% EtOH extract, 4) 50% EtOH extract, 5) 75% EtOH extract, and 6) 100% EtOH extract.

를 통해 아미노산의 일종인 tyrosine에서 몇 단계의 합성을 통해 흑화된 melanin 입자가 생성된다(16,17). 낙과 배 물

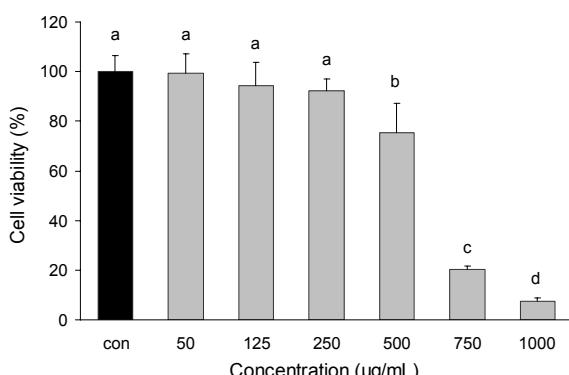


Fig. 2. Cell viability of water extracts from fallen pear (FPWE) on B16F10 melanoma cells. Cells were treated with various concentrations (0.05 ~ 1 mg/mL) of FPWE. The data shown represent the mean \pm SD derived from three determinations. Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

추출물이 melanin 합성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 α -MSH로 자극한 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 melanin 생성 저해 효과를 측정하였다. 그 결과 melanin 생성은 α -MSH의 처리로 증가하였으며, 낙과 배 물 추출물은 50, 125, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리했을 때 농도 의존적으로 저해 효과를 나타내었다. 또한, 낙과 배 물 추출물 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리했을 때 미백제로 알려진 양성대조군 arbutin과 각각 72%와 74%로 melanin 저해 활성이 유의한 수준을 보였다(Fig. 3). 따라서 낙과 배 물 추출물의 melanin 저해 활성이 우수함을 확인하였다.

세포 내 tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase는 melanin 생성과정에 관여하는 효소로써 tyrosine을 기질로 하여 DOPA로 전환시키며 나아가 DOPA quinone으로 산화시키는 등의 일련의 효소 반응을 통하여 melanin을 생성한다(1). 낙과 배 물 추출물의 melanin 생성과 관련한 tyrosinase의 저해 활성을 α -MSH로 자극한 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 측정하였다(Fig. 4).

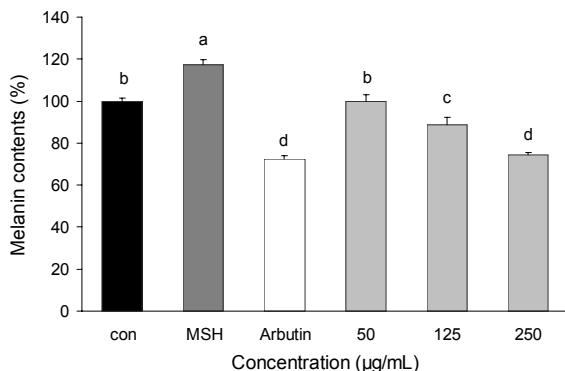


Fig. 3. Effects of FPWE on melanin contents in B16F10 melanoma cells. Cells were treated with various concentrations (50~250 $\mu\text{g/mL}$) of FPWE. The data shown represent the mean \pm SD derived from three determinations. Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

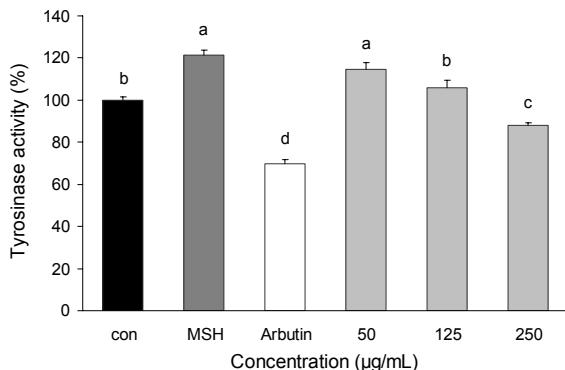


Fig. 4. Effects of FPWE on tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells. Tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells treated with various concentrations (50~250 $\mu\text{g/mL}$) of FPWE. The data shown represent the mean \pm SD derived from three determinations. Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

위 결과(Fig. 3)와 마찬가지로 낙과 배 물 추출물 처리 시 농도 의존적으로 tyrosinase 활성을 저해시켰으며 arbutin의 저해 활성보다는 미약했지만 유사한 정도로 높은 저해 활성을 나타내었다.

낙과 배 물 추출물의 mushroom tyrosinase 활성 측정

낙과 배 물 추출물의 melanin 생합성에 있어서 tyrosinase의 직접적인 작용을 미치는지 알아보기 위하여 mushroom tyrosinase의 활성을 측정하였다. Tyrosinase의 기질은 L-DOPA와 L-tyrosine을 이용하였으며 양성대조군은 1 mM arbutin을 사용하였다. 그 결과 L-tyrosine을 기질로 사용했을 때 1 mM arbutin은 65%의 저해 활성을 나타내었고, L-DOPA를 기질로 사용했을 때는 저해 활성을 나타내지 않았다(18). Arbutin은 tyrosinase에 기질이 결합하는 부위에 작용하여 기질이 tyrosinase에 결합하는 것을 방해하는 것으로 알려져 있으며, arbutin은 tyrosinase 작용

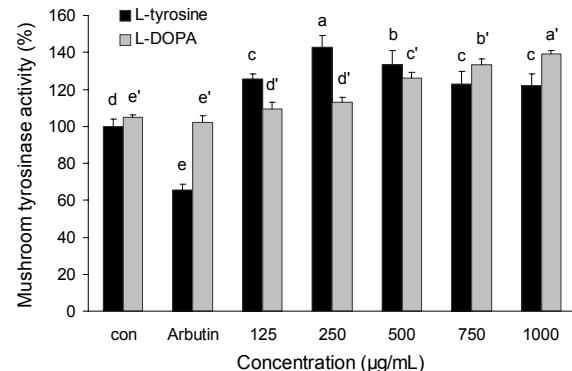


Fig. 5. Effects of FPWE on mushroom tyrosinase activity. Purified tyrosinase was mixed with FPWE and incubated with 0.3 mg/mL L-tyrosine of 2 mg/mL L-DOPA for 30 min at 37°C, Results are means \pm SD from 3 separate experiments. Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

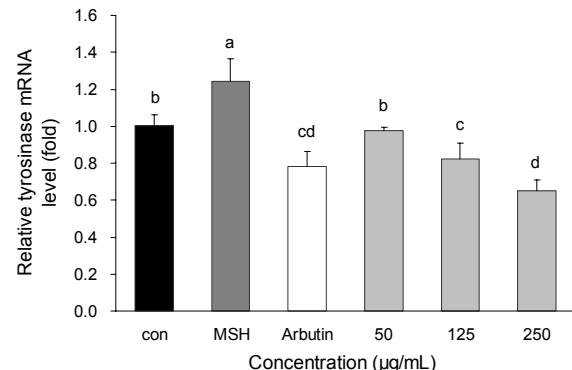


Fig. 6. Inhibition effects of FPWE on the expression of tyrosinase mRNA in B16F10 melanoma cells. Tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells treated with various concentrations (50~250 $\mu\text{g/mL}$) of FPWE. The data shown represent the mean \pm SD derived from three determinations. Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

중 tyrosine hydroxylase 작용을 억제하는 것으로 생각된다(1,3). 낙과 배 물 추출물은 0.125~1 mg/mL의 농도로 mushroom tyrosinase의 저해 활성을 측정하였으며 L-tyrosine 및 L-DOPA를 기질로 사용했을 때 모두 저해 활성이 나타나지 않았다(Fig. 5). 이는 낙과 배 물 추출물이 melanin 생성에 있어서 직접 저해하는 것이 아닌 세포 내에서 tyrosinase의 발현을 조절한다는 가능성을 나타낸다.

낙과 배 물 추출물의 tyrosinase mRNA 발현 저해 효과

낙과 배 물 추출물이 melanin 합성 관련 tyrosinase mRNA 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해서 α -MSH 처리한 B16 세포로 real time PCR을 수행하였다. α -MSH를 단독 처리한 경우 tyrosinase mRNA의 발현이 증가하였으며, 양성대조군인 arbutin 150 ppm에서 발현이 억제하는 것을 확인하였다. 낙과 배 물 추출물의 효과는 50, 125, 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 측정하였으며, 그 결과 α -MSH 자극에 의

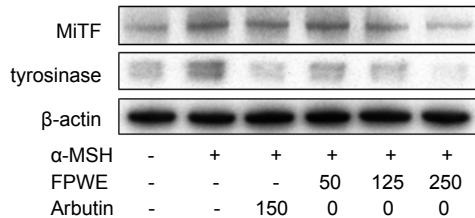
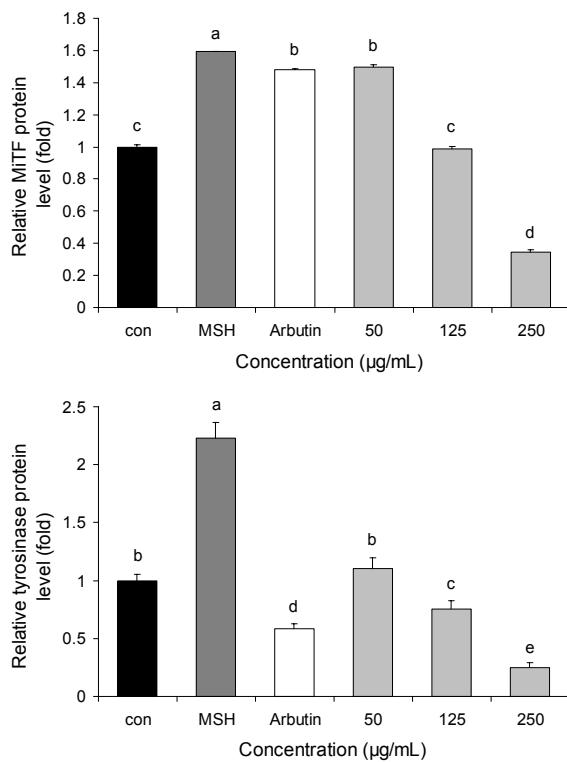


Fig. 7. Effects of FPWE on protein expression in B16F10 melanoma cells. Expression levels of tyrosinase were analyzed by western blot. The tyrosinase or MiTF protein levels in each sample was normalized to the quantity of β -actin. The data shown represent the mean \pm SD derived from three determinations. Significant differences were determined by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

해 유도된 tyrosinase mRNA 발현이 낙과 배 물 추출물 처리에 의해 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다(Fig. 6).

낙과 배 물 추출물의 tyrosinase, MiTF 단백질 발현 억제 효과

B16F10 세포에 α -MSH를 처리하게 되면 cAMP의 양이 증가하게 되며, 이는 PKA를 매개로 하여 CREB를 활성화시키고 활성화된 CREB는 MiTF의 발현을 유도한다. MiTF는 tyrosinase를 비롯해 melanin 생성 관련 효소 발현의 전사인자로서 melanin 생성효소의 발현량이 늘어나 흑화에 기여하게 된다(19). 낙과 배 물 추출물이 α -MSH 자극에 의해 유도된 melanin 생성과 tyrosinase 활성을 억제시키는 것을 위 실험을 통해 확인하였다. 이러한 결과가 melanin 생성에 관련된 단백질 발현과도 연관이 있는지를 확인하기 위해 낙과 배 물 추출물의 미백 효과를 melanin 생합성 과정에서 중요한 전사인자인 MiTF와 tyrosinase 단백질 발현 정도를 통해 측정하였다(Fig. 7). 그 결과 α -MSH를 단독 처리한 경우 MiTF와 tyrosinase 각 단백질의 발현이 현저히 증가하였으며, 낙과 배 물 추출물을 50, 125, 250 μ g/mL 농도로 처리한 결과 낙과 배 물 추출물 처리에 의해 MiTF 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. Tyrosinase 발현 역시 농도 의존적으로 감소하여 앞선 실험들과 동일한 결과를 확인할 수 있었다. 따라서 낙과 배 물 추출물은 melanin 합성에 관여하는 유전자 발현을 통하여 melanin 생성을 저해하는 것으로 보이며, melanin 생합성의 신호전달 기전은 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.



요약

본 연구에서는 낙과 배 물 추출물에 존재하는 미백기능 유효성분으로써 arbutin을 선정하여 HPLC를 통해 가장 높은 함량을 보인 낙과 배 물 추출물로 미백 효과를 알아보았다. 낙과 배 물 추출물의 미백 효과를 알아보기 위하여 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 세포 내 tyrosinase 저해 효과, melanin 생성 저해 효과, tyrosinase와 관련된 단백질 발현에 미치는 영향을 연구하였다. 그 결과 낙과 배 물 추출물은 tyrosinase 활성과 B16F10 melanoma 세포의 melanin 생성 저해 효과를 나타내었다. 또한, MiTF와 tyrosinase의 발현의 억제를 통해 미백 효과를 나타내는 것으로 확인되었으며, mushroom tyrosinase 결과를 통해 melanin 생성 과정에 있어 tyrosinase를 직접 저해하는 것이 아닌 세포 내에서 tyrosinase의 발현 조절을 통해 저해하는 것으로 확인하였다. 따라서 낙과 배 물 추출물은 천연 arbutin 미백 기능성 화장품 소재 개발로 이용 가능성이 높은 것으로 판단된다. 낙과 배를 이용한 새로운 뷰티케어 소재를 개발하고 이들의 피부 기능성을 밝혀냄으로써 낙과 배의 다양한 활용성이 증대될 것으로 기대되며, 이를 통하여 국내 과실 농가 및 관련 사업에 기여할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업(313019-03-3-HD020)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Song HS, Moon HJ, Park BE, Choi BS, Lee DJ, Lee JY, Kim CJ, Sim SS. 2007. Anti-oxidant activity and whitening activity of bamboo extracts. *Yakhak Hoeji* 51: 500-507.
- Abdel-Malek Z, Swope VB, Suzuki I, Akcali C, Harriger MD, Boyce ST, Urabe K, Hearing VJ. 1995. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1789-1793.
- Maeda K, Fukuda M. 1996. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 765-769.
- Battaini G, Monzani E, Casella L, Santagostini L, Pagliarin R. 2000. Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. *J Biol Inorg Chem* 5: 262-268.
- Chun HJ, Choi WH, Baek SH, Woo WH. 2002. Effect of quercetin on melanogenesis in Melan-a melanocyte cells. *Kor J Pharmacogn* 33: 245-251.
- Curto EV, Kwong C, Hermersdörfer H, Glatt H, Santis C, Virador V, Hearing VJ Jr, Dooley TP. 1999. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: *in vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochem Pharmacol* 57: 663-672.
- Challice JS, Williams AH. 1968. Phenolic compounds of the genus *Pyrus* - I : The occurrence of flavones and phenolic acid derivatives of 3,4-dihydroxybenzyl alcohol 4-glucoside in *Pyrus calleryana*. *Phytochemistry* 7: 119-130.
- Cho EJ, Bang MA, Cho SS. 2015. validation of analytical method of marker compounds in extract of pear pomace as a functional health ingredient. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1682-1686.
- Yu TJ. 1989. *Sikpumbogam*. Munundang, Seoul, Korea. p 166.
- Lee PH, Park SY, Jang TH, Yim SH, Nam SH, In MJ, Kim DC, Chae HJ. 2014. Effects of complex carbohydrase treatment on physiological activities of pear peel and core. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 404-410.
- Choi HJ, Park JH, Han HS, Son JH, Son GM, Bae JH, Choi C. 2004. Effect of polyphenol compound from Korean pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) on lipid metabolism. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 299-304.
- Park WP, Jung JH, Cho SH, Kim CH. 2004. Quality characteristics of *unshiu* orange and pear packaged with paper incorporated with antimicrobial agents. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 1715-1719.
- Chen JS, Wei C, Marxhall MR. 1991. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* 39: 1897-1901.
- Urabe K, Aroca P, Tsukamoto K, Mascagna D, Palumbo A, Prota G, Hering VJ. 1994. The inherent cytotoxicity of melanin precursors: a revision. *Biochim Biophys Acta* 1221: 272-278.
- Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. 1985. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and retinoic acid. *Cancer Res* 45: 1474-1478.
- Cho YJ. 2004. Study on the tyrosinase activity inhibition and free radical scavenging activity of natural materials. *MS Thesis*. Sookmyung Woman's University, Seoul, Korea.
- Hwang EY, Kim DH, Hwang JY, Kim HJ, Park TS, Lee IS, Son JH. 2012. A study on the depigmenting effect of *Carthamus tinctorius* seed, *Cyperus rotundus* and *Schizonepeta tenuifolia* extracts. *Korean J Food Sci Technol* 44: 76-81.
- An SM, Koh JS, Boo YC. 2010. *p*-Coumaric acid not only inhibits human tyrosinase activity *in vitro* but also melanogenesis in cells exposed to UVB. *Phytother Res* 24: 1175-1180.
- Lee P. 2009. Inhibitory effect of Muscat Bailey A seed extract on melanin production in α -melanin stimulating hormone-stimulated B16 cell. *Korean J Plant Res* 22: 447-482.