

Whitening Effect and Skin Regeneration Effect of Red Sea Cucumber Extract

Mi Ji Jeon¹, Eun Ji Kim¹, Geun Tae Kim¹, Ga Yeon Kim¹, Seung Jae Lee¹, In Cheol Jung², Sang-Yong Kim³ and Young Min Kim^{1*}

¹Department of Biological Sciences and Biotechnology, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University, Daejeon 34054, Korea

²Shinhan ECO Co., Ltd. Jeju 63242, Korea

³Department of Food Science & Bio Technology, Shinansan University, Ansan 15435, Korea

Received February 19, 2018 / Revised May 17, 2018 / Accepted June 1, 2018

Recently, several researchers have been developing cosmetics from natural ingredients for skin whitening and anti-aging products. The red sea cucumber (RSC), *Apostichopus japonicas*, is a species of sea cucumber in the family Stichopodiae, which is widely distributed in China, Japan, and Korea. To use Red Sea Cucumber as a cosmetic ingredient, its inhibitory effects on melanogenesis and the anti-aging effects of RSC extracts were investigated. First, a tyrosinase activity assay was performed, which showed that RSC inhibited tyrosinase activity at a concentration of 200 µg/ml. An MTT assay was carried out to evaluate cell toxicity, and the results showed that RSC extract has no cytotoxicity in HaCaT cells. Furthermore, the mRNA expression levels of tyrosinase, tyrosinase related protein 1 (TRP-1), tyrosinase related protein 2 (TRP-2), microphthalmia-associated transcription factor (MITF), and matrix metalloproteinase (MMPs) genes treated with RSC extract in B16F10 and HaCaT cells decreased. Moreover, a wound-healing assay was performed to identify the cell regeneration effect of RSC extracts. Also, a skin turnover effect was confirmed by creating a three-dimensional cell culture with HaCaT and human fibroblasts. Altogether, the results suggested that Red Sea Cucumber may possess a high ability to induce whitening and anti-wrinkle effects as a cosmeceutical ingredient.

Key words : Anti-melanogenesis, anti-wrinkle, B16F10 cells, organotypic culture, Red Sea Cucumber

서 론

멜라닌은 피부 내 기저 층에 존재하는 melanocyte에서 생성되는 천연 색소로, 생성된 melanin은 각질세포(keratinocyte)로 이동하며, 흑색과 갈색의 eumelanin, 노란색과 붉은색의 pheomelanin 계열의 멜라닌 비율에 따라 인간의 피부색이 결정된다[6]. melanin에 의한 색소침착은 여러 자극에 의해 야기되는데, 자외선으로 인한 DNA손상과 회복과정에서 생긴 thymine dinucleotides (pTpT), 활성산소(ROS)의 조직 내 발생, melanocyte growth factor, 염증계의 chemical mediator 등이 주요 원인이 되고 있다[3, 19]. 이러한 외부자극에 대한 방어 기작으로 세포 내 melanin 생성이 증가하면 기미, 주근깨, 점, 검버섯 등의 색소침착이 일어나 피부노화를 촉진시키며, 흑색종을 비롯한 피부암 유발에도 관여하는 것으로 보고된다[12].

한편, 피부 노화는 여러 가지 구조적, 기능적 변화를 보이는

데 그 원인으로는 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 내인성 노화(intrinsic aging)는 시간의 흐름에 따라 피부 구조와 생리적 기능이 떨어지는 것을 말하며, 두 번째는 광노화(photoaging)로 피부조직이 자외선 등 외부 스트레스에 의해 손상되어 일어난다[4]. 이와 같은 노화들이 지속될 경우 collagenase 같은 Matrix Metalloproteinase (MMPs) 합성이 증가하고, 진피 내 피부를 구성하는 collagen, elastin, hyaluronic acid 등의 교원질 분해를 유도하여 피부탄력 저하와 주름의 생성이 야기된다[2, 18].

최근 이러한 피부 미백 및 주름개선에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 현재 미백제로 가장 많이 사용되고 있는 소재로 arbutin은 L-tyrosinase의 competitive inhibitor로 작용하며, Ascorbic acid의 경우 tyrosinase의 active site의 copper를 chelating함으로써 melanogenesis를 저해한다[9, 16]. 하지만 arbutin을 제외한 미백 소재들은 안정성 문제로 인하여 사용이 제한되고 있는 실정이다[1]. 최근에는 천연 추출물을 이용한 피부 미백 및 주름개선 효능에 관한 다양한 연구가 진행되고 있으며, 해양 천연물 또한 식물 추출물과 더불어 탁월한 기능성 화장품 개발 소재로 자리매김하고 있다.

홍해삼(*Stichopus japonicus*)은 한국, 일본 등 아시아 일대에서 자생하고 있는 돌기해삼과의 한 종으로[11], 선행연구에 따르면 해삼은 Taurine, Tanin, 비타민 B₁ (Thiamin), B₂ (riboflavin), B₃ (niacin) 등을 포함하여 항암, 비만예방, 고혈압

*Corresponding author

Tel : +82-42-629-8753, Fax : +82-42-629-8873

E-mail : kym@hnu.kr

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.

예방, 피부면역, 항산화 효능이 있다고 알려져 있다[5, 8, 20]. 그러나 홍해삼의 미백 및 주름개선에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 홍해삼을 소재로 선정하여 미백 및 주름개선 기능성 화장품으로서 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 기기

실험에 사용된 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-tetrazolium Bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Co. (St.Louis, MO, USA)에서 구입하였으며 에탄올, 클로로포름, 이소프로판올 등의 시약은 특급 시약을 사용하였다. 홍해삼 추출물의 비교구로 사용된 Scinic Aqua EX dual layer ampule (S.A)은 (주) SK planet (SK planet, Sungnam, Republic of Korea)에서 구입하여 사용하였다. 시료의 흡광도는 ELISA microplate reader (Model 680, Bio-Rad Laboratories, Inc., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

홍해삼추출물 제조

본 실험에서 사용된 홍해삼은 제주 해안지에서 구입하여 사용하였으며, 원료 홍해삼을 분쇄하여 얻은 홍해삼 분쇄물 800 g에 70% Ethanol 3.2 kg을 가하여 80°C 조건에서 3 hr 동안 가열하여 추출하였다. 가열 추출 후, 여과 보조제인 0.1% 규조토를 첨가하고 여과지를 이용하여 부유물을 제거하였다. 추출 용액은 60°C에서 농축(고형분 40%) 하여 95°C에서 5분간 살균 후, 냉장 보관하였다. 실험에 사용된 홍해삼 추출물은 500 mg/ml의 농도로 보관하여 실험에 사용하였다.

세포 배양

HaCaT 세포는 Dr.Fusenig (German Cancer Research Center, DKFZ, Heidelberg, Germany)로부터 분양 받았으며, B16F10 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 세포는 10% Fetal Bovine Serum과 1% Antibiotics가 포함된 DMEM media (Hyclone, Laboratories Inc., Logan, UT, USA)를 이용하여 세포를 부유 상태로 만든 후 1×10^6 cells/ml로 분주하고 계대 배양하였다.

In vitro tyrosinase 활성 측정

시험관에 0.1 M PBS (phosphate buffer saline, pH7.0) 110 μ L와 농도별 홍해삼추출물 10 μ L, mushroom tyrosinase (Sigma- Aldrich, USA; 1,500~2,000 U/ml) 10 μ L를 넣고 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 이 용액에 1.5 mM tyrosine 20 μ L를 넣고 37°C에서 15분 동안 반응시킨 후 96well plate에 100 μ L씩 옮겨서 microplate Reader (BIO-RAD Laboratories, Inc,

USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 펩타이드는 80, 100, 120 μ g/ml의 농도를 사용하였고, 시료액 대신 시료를 녹인 용매를 사용하여 공시료액을 만들었다. Positive control으로는 시료물질 대신 Vitamin C 2 μ g/ml 농도로 사용하였다.

Tyrosinase 활성 저해율 (%) = $\times 100$

a: 공시료액의 반응 후의 흡광도

b: 시료액의 반응 후의 흡광도

a', b': Tyrosinase 대신 완충액으로 대체하여 측정된 흡광도

In vitro DOPA 산화반응 저해 시험

시험관에 0.1 M PBS (phosphate buffer saline, pH7.0) 170 μ L와 농도별 홍해삼추출물 10 μ L, mushroom tyrosinase (Sigma- Aldrich, USA; 1,500~2,000 U/ml) 용액 10 μ L를 순서대로 넣고, 37°C에서 6분 동안 반응시켰다. 이 용액에 0.06 mM L-DOPA (Sigma-Aldrich) 용액 10 μ L를 넣은 다음 37°C에서 1분 동안 반응시켰다. 반응 후 96 well plate에 100 μ L씩 옮겨서 microplate Reader (BIO-RAD Laboratories, Inc, USA)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 펩타이드는 80, 100, 120 μ g/ml의 농도를 사용하였다. 공시료액(negative control)으로 시료액 대신 0.1 M PBS (pH7.0)를 사용하였으며, Positive control로는 시료물질 대신 Vitamin C 2 μ g/ml 농도로 사용하였다.

DOPA 산화활성 저해율(%) = $100 - \times 100$

세포 생존율 측정

세포 생존율은 MTT assay법을 이용하여 측정하였다. 12 well plate에 HaCaT 세포를 각각 1×10^5 cells/ml로 분주하고 24시간 동안 안정화 시킨 후, Delivery (D)는 PBS 1 μ L/ml, Vitamin C (V)는 2 μ g/ml, 홍해삼 추출물은 각각 50, 100, 150, 200 μ g/ml을 처리하여 5% CO₂, 37°C 조건 하에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 5 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Co.) solution을 각 well 당 40 μ L씩 첨가하여 한 시간 동안 CO₂ incubator에 반응시켰다. MTT solution이 포함된 media를 제거하고 PBS washing 후 PBS를 완전히 제거하였다. 각 well 당 DMSO 150 μ L를 첨가하여 생성된 formazan을 모두 녹인 다음 96 well plate에 100 μ L씩 옮긴 후 ELISA microplate reader (Bio-Rad model 680, Bio-Rad Laboratories Inc., Tokyo, Japan)로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정은 모두 3번 이상 하였으며, 평균값과 표준오차는 Microsoft Excel Program을 이용하여 분석하였다.

Total RNA 추출 및 cDNA 합성

6 well plate에 B16F10, HaCaT 세포를 각각 1×10^5 cells/ml로 분주하고 24시간 동안 안정화 시킨 후, 시료를 농도별로

처리하여 24시간 동안 5% CO₂, 37°C 조건 하에서 배양하였다. 배양 후 media를 모두 제거한 뒤, PBS로 1회 washing 후 RiboEX Total RNA Isolation Solution (GeneAll Biotechnology, Seoul, Republic of Korea)을 가하여 세포를 용해한 뒤 클로로포름, 이소프로판올, 70% 에탄올을 각각 첨가하여 total RNA를 추출하였다. cDNA 합성은 DiaStar™ RT kit (SolGent, Seoul, Korea)를 이용하여 진행하였다. total RNA 1 µl와 Oligo (dT) 20 primer 9 µl를 혼합한 뒤 65°C에서 5분 동안 반응시킨 후 얼음에 넣어 반응을 중단하였다. 상기 과정을 통하여 oligo (dT) primer가 붙은 mRNA에 8 mM DTT 1 µl, RNase inhibitor (200 U/µl) 1 µl, 10 mM의 dNTPs가 포함된 5X RT reaction buffer 4 µl, DEPC - D.W를 첨가한 후 40°C에서 한 시간, 95°C에서 5분 동안 반응시킴으로써 cDNA를 합성하였다.

역전사 중합효소 연쇄반응

PCR은 DNA polymerase, buffer, dNTP, tracking dye가 포함된 2X Taq PCR Smart mix 1 (SolGent, Seoul, Korea)를 이용하여 실시하였다. PCR 증폭은 95°C에서 10분 동안 pre-denaturation하고, denaturation은 95°C에서 30 sec, annealing은 60°C에서 30 sec, Extension은 72°C에서 30 sec의 조건으로 35 cycle 동안 반응시켰으며, 72°C에서 10분 동안 안정화 시켰다. 각각의 specific primer sequence는 Table 1에서 나타났다.

Wound healing assay

HaCaT 세포를 6 well plate에 각 well 당 1×10⁵ cells/ml로 분주하여 24시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거한 뒤 10 µl pipette tip으로 스크래치를 내었다. 현미경으로 관찰한 뒤

배양액 교체 후 홍해삼 추출물을 농도별(100, 150, 200 µg/ml)로 처리하였다. 물질처리 후 24시간 뒤 wound area를 현미경으로 검경 후 사진을 찍었다.

Organotypic coculture을 통한 human skin model 제작

Organotypic 3D culture는 Hiro Nakagawa (MD, PhD)의 방법을 따랐다. SPL Insert™ Haging 6well plate (SPL Life Sciences)에 Purecol® Bovine Collagen type I 을 0.8 µm pore size를 갖는 inset 내부에 1mL씩 분주하여 acellular layer를 만든다. 겔이 굳은 뒤 10% FBS와 1% antibiotics가 포함된 DMEM media (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT, USA)에서 배양한 Human Fibroblast (1×10⁵ cells /ml)를 Matrigel® Basement Membrane Matrix (Corning, New York, USA)와 함께 섞은 후, acellular layer층 위에 3 ml을 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 14일간 배양하였다. DMEM media와 Ham’s F12 media (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT, USA)를 3:1로 섞은 배지를 넣어 gel matrix를 안정화 시킨 다음, p5-p6의 HaCaT세포를(German Cancer Research Center, DKFZ, Heidelberg, Germany, 1×10⁷ cells/ml) basement cell layer에 50 µl씩 분주하여 2 hr 동안 안정화 시켰다. 이후, co-culture된 Human Fibroblast와 HaCaT을 37°C, 5% CO₂ incubator에 약 2주간 배양하였다. HaCaT 세포의 각 질 분화 유도 후 세포배양액에 최종농도가 PBS 1 µl/ml, Vitamin C 10 µg/ml, RSC 200 µg/ml, Scinic Ampule은 1 µl/ml이 되도록 하여 7일 동안 처리하였다. 이후 조직을 10% phosphate-buffered formaldehyde에 넣고 1시간 동안 고정하였다. 탈수과정을 거친 후 paraffin에 embedding하여 5 µm 크기로 section을 나누고, hematoxylin과 eosin으로 염색하여

Table.1 primer sequence for the amplification of target gene

Gene	primer sequence (5'-3')	Amplification size (bp)	Annealing temperature (°C)
TRP-1	For: GCTCCAGACAACCTGGGATA Rev: TCAGTGAGGAGAGGCTGGTT	185	59.5°C
TRP-2	For: GAAGGATGGACCAGGCAGTA Rev: GCCTCACCCATCAATCTGTT	165	60°C
MITF	For: CAACTCATGCGTGAGAT Rev: TACTTGGTGGGGTTTTTCGAG	203	60.5°C
Tyrosinase	For: TTTTGTACTGCCTGCTGTGG Rev: CAGGAACCTCTGCCTGAAAG	151	60°C
MMP-1	For: ATGCTGAAACCCTGAAGGTG Rev: CTGCTTGACCCTCAGAGACC	234	59°C
MMP-2	For: ATGACAGCTGCACCACTGAG Rev: TGATGTCATCCTGGGACAGA	411	61°C
MMP-3	For: TCATTTTGGCCATCTCTTCC Rev: ATCGATTTTCCTCACGGTTG	177	59.5°C
MMP-9	For: CATCGTCATCCAGTTTGGTG Rev: TCGAAGATGAAGGGGAAGTG	216	58°C

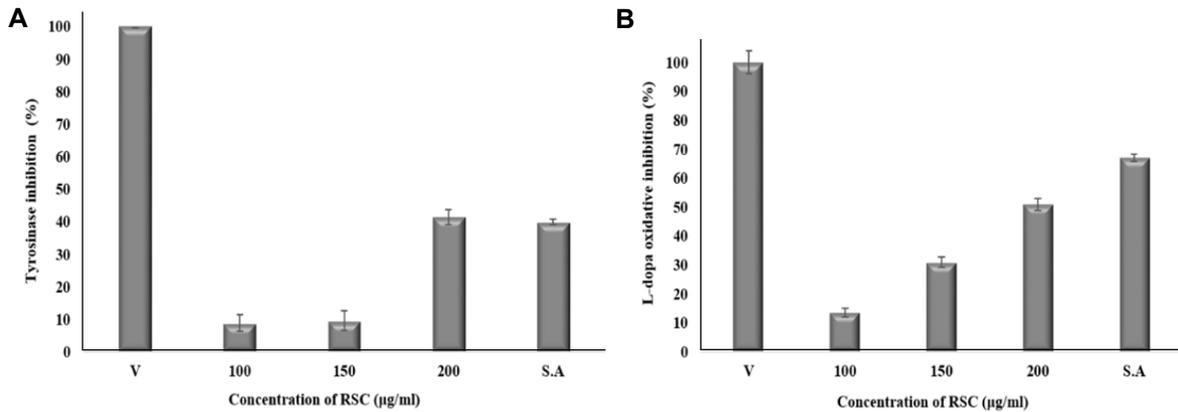


Fig. 1. Effect of RSC on mushroom tyrosinase activity. The relative activity of mushroom tyrosinase performed on (a) L-tyrosine hydroxylation, and (b) 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) oxidation in different concentrations of RSC (100, 150, 200 µg/ml). Ascorbic acid (2 µg/ml) was used as positive control. The results are expressed as percentages of positive control. (each experiment, n=3).

현미경으로 관찰하였다.

통계처리

통계 프로그램인 SPSS 22.0을 사용하였고 실험설계에 대한 분산분석은 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)과 독립 표본 t-test (independent sample t-test)를 실시하여 검정하였다. 각 자료는 3번 이상의 반복된 실험을 통하여 얻어진 결과로 검정하였고 p<0.05 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

In vitro tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase는 피부 내 melanogenesis에 매우 중요한 역할을 하는데, tyrosine에서 L-DOPA (L-3,4-dihydroxyl-Phenylalanine), L-DOPA에서 dopaquinone으로 전환되는 일련의 과정에서 촉매작용을 통해 melanin 합성의 초기단계에 관여한다[13]. 본 실험에서는 tyrosinase 활성 저해 및 DOPA 산화 측정을 위해 mushroom tyrosinase를 이용하여 100, 150, 200 µg/ml의 홍해삼추출물을 처리한 후 tyrosine과 DOPA 산화과정의 억제 효과를 측정하였다. 그 결과, Fig. 1A에서 나타난 바와 같이 대조군인 Vitamin C (2 µg/ml) 대비 홍해삼추출물의 tyrosinase 활성 저해율이 200 µg/ml에서 41%의 효과를 보였으며, Fig. 1B에서 DOPA 산화 저해율은 홍해삼추출물 200 µg/ml을 처리하였을 때 Vitamin C (2 µg/ml) 대비 50%의 효과를 보였다.

세포 생존율 측정 결과

홍해삼 추출물의 피부를 구성하고 있는 피부각질형성세포 (HaCaT)에 대한 독성과 용매에 따른 유효용량의 범위를 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 홍해삼 추출물 50, 100,

150, 200 µg/ml 처리 후 세포 생존율을 확인한 결과, Fig. 2에서 나타난 바와 같이 홍해삼추출물 처리 군에서 90% 이상의 세포 생존율을 보였으며, 홍해삼추출물이 피부각질형성세포에서 독성이 없는 것을 확인하였다.

Wound healing assay를 이용한 홍해삼추출물의 피부 재생 효과

피부각질형성세포는 표피를 구성하는 대표적인 세포로 분화 및 분열을 통해 피부장벽을 형성하며, 스트레스환경에 노출되면 cytokine 등 촉진인자를 생성하여 염증 및 면역반응을 통해 상처 손상된 조직의 치유에 관여한다[10]. 본 연구에서는 홍해삼추출물의 세포 이동성과 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 Wound healing assay를 수행하였다. 그 결과 Fig. 3B

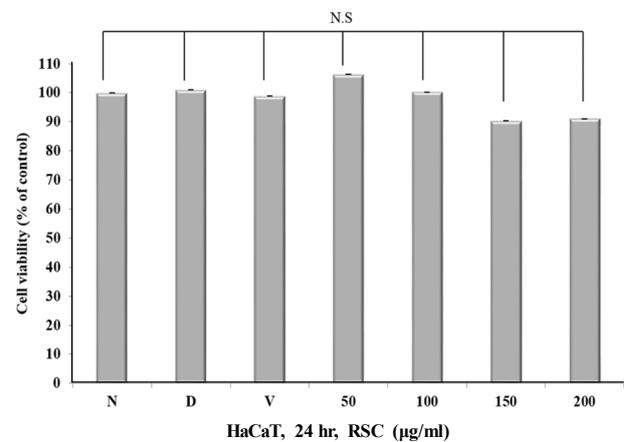


Fig. 2. The cytotoxicity of Red Sea Cucumber on HaCaT cells. Cells were incubated with samples for 24 hr. Viability was assessed by using an MTT assay. The statistical analysis of the data was carried out by using t-test. N.S means not significant (each experiment, n=3).

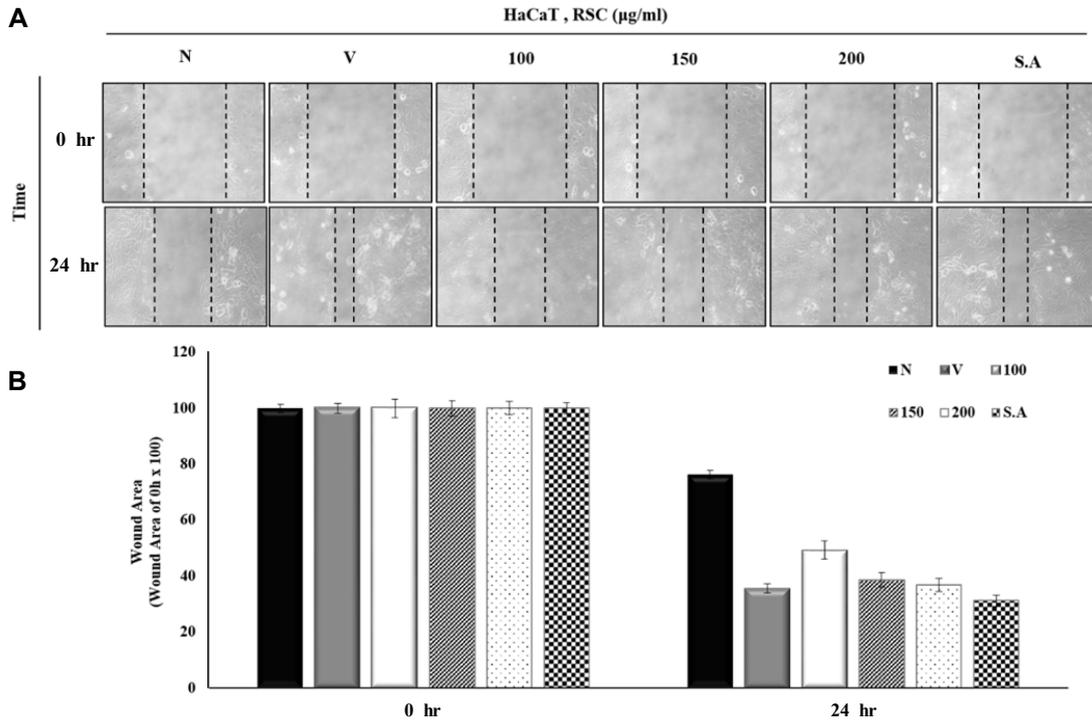


Fig. 3. Migration Effects of RSC in HaCaT cells in Wound-healing assay. Cells were treated with variable concentrations of RSC (100-200 $\mu\text{g/ml}$) before making a scratch in the cell layer. The migration of cells in the wound was observed under a phase-contrast microscope (200 \times) at the indicated times.

에서 나타낸 바와 같이, 무처리군과 비교하였을 때, 홍해삼추출물 처리군에서 TRP-1, TRP-2, MITF, Tyrosinase 유전자의 발현이 Vitamin C 처리군과 비슷한 경향으로 감소하는 것을 확인하였다. 또한, Fig. 4B에서 홍해삼추출물 처리에 따라 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 유전자의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 선행연구에 따르면 B16F10 세포에 홍해삼추출물을 처리하였을 때, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF 단백질 발현이 감소했다고 보고되었으며, 본 연구에서도 상기 연구와 유사한 결과를 확인하였다[21]. 결과적으로 홍해삼추출물이 Melanogenesis related protein의 발현과 MMPs의 발현을 억제하여 멜라닌 생성억제효과와 노화방지에 효능이 있다고 판단하였다.

홍해삼추출물의 미백 관련 유전자 및 MMPs 유전자 발현 저해 효과

체내의 멜라닌 생성은 cAMP/PKA경로, Nitric Oxide (NO)에 의한 cGMP경로 등 여러 세포 내 신호전달 기전을 통해 진행되는데[14, 15], 이러한 일련의 신호전달은 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현을 증가시키고, MITF는 최종적으로 멜라닌 생성에 관여하는 단백질인 tyrosinase, Tyrosinase-related protein 1 (TRP-1), dopachrome tautomerase (TRP-2)의 발현을 촉진시킨다[17].

피부의 진피층에서 지지역할을 하는 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 감소는 피부노화의 주요 원인이 되는데, 이러한 세포외기질과 기저막 단백질 구성요소의 파괴는 Matrix metalloproteinase (MMPs)에 의해 일어난다[7, 9]. 따라서 본 연구에서는 B16F10 세포와 HaCaT 세포에서 홍해삼추출물의 처리에 따른 미백 효과 및 주름개선 효과를 확인하기 위해

RT-PCR을 실시하였다. 그 결과, Fig. 4A에서 보여지는 바와 같이 무처리군과 비교하였을 때, 홍해삼추출물 처리군에서 TRP-1, TRP-2, MITF, Tyrosinase 유전자의 발현이 Vitamin C 처리군과 비슷한 경향으로 감소하는 것을 확인하였다. 또한, Fig. 4B에서 홍해삼추출물 처리에 따라 MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 유전자의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 선행연구에 따르면 B16F10 세포에 홍해삼추출물을 처리하였을 때, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF 단백질 발현이 감소했다고 보고되었으며, 본 연구에서도 상기 연구와 유사한 결과를 확인하였다[21]. 결과적으로 홍해삼추출물이 Melanogenesis related protein의 발현과 MMPs의 발현을 억제하여 멜라닌 생성억제효과와 노화방지에 효능이 있다고 판단하였다.

3D organotypic culture를 통한 홍해삼추출물의 피부 재생 유도 효과

표피는 지속적으로 생성되는 피부구조물로 그 중 각질형성 세포는 표피의 90% 이상을 차지하는 주요 구성세포이다. 이러한 각질형성세포는 매우 복잡하고 정교한 분화과정을 거쳐 표피의 가장 바깥층인 각질층을 형성하게 된다. 각질형성세포는 피부장벽을 형성하는 동시에 cytokines을 생성해 염증 및 면역반응에 중요한 역할을 하는데, 피부가 자외선에 노출되면 멜라닌 색소의 축적과 동시에 각질 표피의 과각질화(hyperkeratosis)가 일어난다[10, 22]. 따라서 본 연구에서는

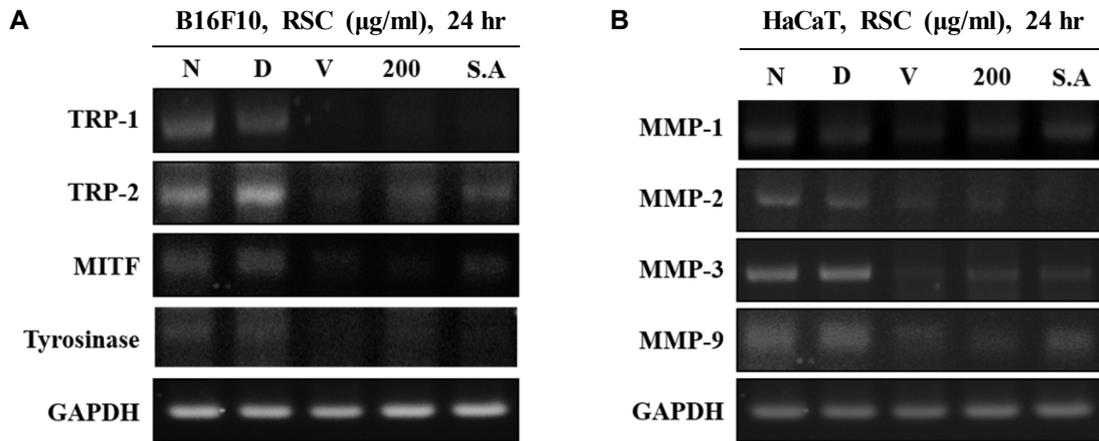


Fig. 4. Effects of RSC extracts on the gene expression level of melanogenic factors and Matrix metalloproteinases in B16F10 and HaCaT cells. Cells were incubated with medium containing Delivery (PBS 1 µl/ml), Vitamin C (2 µg/ml), RSC extract (200 µg/ml) and Scinic Ampule (1 µl/ml) for 24 hr. The mRNA levels in each sample was normalized to the quantity of GAPDH.

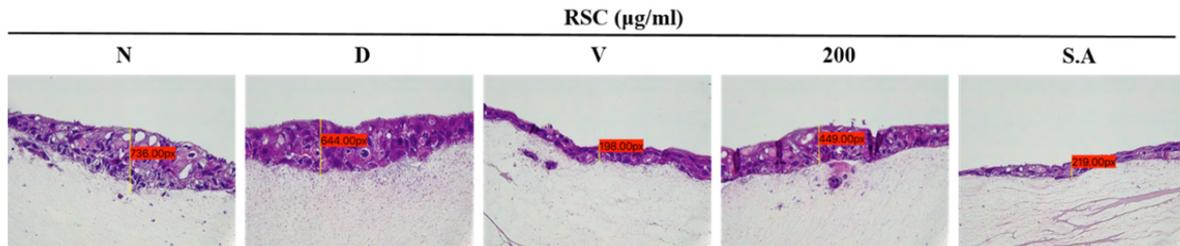


Fig. 5. RSC extracts regulated hyperkeratosis in organotypic culture of human fibroblast cell with HaCaT cell via H&E staining. 3D organotypic cultures were established as detailed in Materials and methods as described on figure. Organotypic model were maintained for 14 days and treated for 7 days. A representative hematoxylin and eosin (H&E) stained section were photographed with Leica DM750 microscope at 10× magnification. (1 px = 0.02645833... cm)

Organotypic cell culture를 이용해 홍해삼 추출물의 피부 턴오버(turn over) 개선효과를 확인하였다. Fig. 5에서 보이는 바와 같이, 대조군의 피부각질층이 홍해삼 추출물을 처리한 결과, 양성대조군인 Vitamin C 처리군과 비슷하게 피부 각질층이 얇아진 것을 확인하였다. 이로써, 홍해삼 추출물이 피부각질층을 안정화시켜 턴오버 주기를 개선하는 것을 확인하였다.

고 찰

본 연구에서는 홍해삼추출물의 tyrosinase 활성 저해, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 및 MITF 발현 억제를 통해 미백 효능을 확인하고, 세포재생, 턴오버주기 개선 효능 및 MMPs의 발현 억제를 통해 주름개선효과를 검증하였다. Tyrosinase inhibition assay에서는 Tyrosinase 및 DOPA 활성이 홍해삼추출물 200 µg/ml를 처리하였을 때 감소하였고, RT-PCR을 통한 멜라닌 생성에 관여하는 단백질인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF의 발현을 확인한 결과 홍해삼추출물이 상기 유전자 발현을 억제하였으며, 이는 홍해삼추출물이 tyrosinase의 활성을 저해할 뿐만 아니라 멜라닌 세포 내에 존재하는 tyrosinase,

TRP-1, TRP-2, MITF의 발현 억제를 통해 멜라닌 생성을 억제하는 것을 확인하였다. 또한, 홍해삼추출물이 피부각질형성세포의 증식을 유도하고 세포기질 분해효소로 알려진 MMPs의 발현 억제, 피부 턴오버 주기의 개선효과를 통해 피부 주름 개선 효능 및 피부장벽의 유지를 돕는 것을 확인하였다. 이를 토대로 하였을 때, 홍해삼추출물이 미백 및 주름 개선 효능을 가진 화장품 소재로서 충분한 활용 가치가 있을 것으로 예상된다.

감사의 글

본 연구는 2016년도 중소기업청에서 지원하는 융복합기술개발사업(과제번호: S2357434)에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Curto, E. V., Kwong, C., Hermersdorfer, H., Glatt, H., Santis, C., Virador, V., Hearing, V. J. and Dooley, T. P. 1999. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: *in vitro*

- comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 663-672.
2. Fisher, G. J., Wang, Z., Datta, S. C., Varani, J., Kang, S. W. and Voorhees, J. J. 1997. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N. Engl. J.* **337**, 1419-1429.
 3. Gilchrist, B. A. and Eller, M. S. 1999. DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **4**, 35-40.
 4. Helfrich, Y. R., Sachs, D. L. and Voorhees, J. J. 2008. Overview of skin aging and photoaging. *Dermatol. Nurs.* **20**, 177.
 5. Husni, A., Shin, I. S., You, S. and Chung, D. 2009. Antioxidant properties of water and aqueous ethanol extracts and their crude saponin fractions from a far-eastern sea cucumber, *Stichopus japonicus*. *Food Sci. Biotechnol.* **18**, 419-424.
 6. Jeon, Y. S., Jung, Y. J., Youm, J. K., Kim, Y. K. and Kim, S. N. 2013. Inhibitory effect of endarachne binghamiae extract on melanin synthesis. *Kor. J. Plant Resources* **26**, 526-532.
 7. Kähäri, V. M. and Saarialho Kere, U. 1997. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* **6**, 199-213.
 8. Kan-no, M. and Kijima, A. 2003. Genetic differentiation among three color variants of Japanese sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Fish. Sci.* **69**, 806-812.
 9. Maeda, K. and Fukuda, M. 1996. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 765-769.
 10. Meinhardt, M., Krebs, R., Anders, A., Heinrich, U. and Tronnier, H. 2008. Effect of ultraviolet adaptation on the ultraviolet absorption spectra of human skin *in vivo*. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **24**, 76-82.
 11. Namgung, J., Ahn, K. J. and Yeo, I. K. 2015. Growth and physiological effects of immunity feed additives on the Juvenile Red Sea Cucumber *Stichopus japonicus*. *Fish. Aquatic. Sci.* **48**, 466-473.
 12. Oh, M. C., Kim, K. C., Ko, C. I., Ahn, Y. S. and Hyun, J. W. 2015. Peptides-derived from scales of branchiostegus japonicus inhibit ultraviolet B-induced oxidative damage and photo-aging in skin cells. *J. Life Sci.* **25**, 269-275.
 13. Prota, G. 1995. The chemistry of melanins and melanogenesis. In *fortschritte der chemie organischer naturstoffe/progress in the chemistry of organic natural products*, pp. 93-148, Springer Vienna.
 14. Rodríguez, C. I. and Setaluri, V. 2014. Cyclic AMP (cAMP) signaling in melanocytes and melanoma. *Arch. Biochem. Biophys.* **563**, 22-27.
 15. Roméro-Graillet, C., Aberdam, E., Biagoli, N., Massabni, W., Ortonne, J. P. and Ballotti, R. 1996. Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 28052-28056.
 16. Ros, J. R., Rodriguez-Lopez, J. N. and Garcia-Canovas, F. 1993. Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochem. J.* **295**, 309-312.
 17. Saha, B., Singh, S. K., Sarkar, C., Bera, R., Ratha, J., Tobin, D. J. and Bhadra, R. 2006. Activation of the Mitf promoter by lipid stimulated activation of p38 stress signalling to CREB. *Pigment Cell Melanoma Res.* **19**, 595-605.
 18. Scharffetter - Kochanek, K., Brenneisen, P., Wenk, J., Herrmann, G., Ma, W., Kuhr, L., Meewes, C. and Wlaschek, M. 2000. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp. Gerontol.* **35**, 307-316.
 19. Tadokoro, T., Kobayashi, N., Zmudzka, B. Z., Ito, S., Wakamatsu, K., Yamaguchi, Y., Korossy, K. S., Miller, S. A., Beer, J. Z. and Hearing, V. J. 2003. UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin. *FASEB. J.* **17**, 1177-1179.
 20. Tian, F., Zhang, X., Tong, Y., Yi, Y., Zhang, S., Li, L., Sun, P., Lin, L. and Ding, J. 2005. PE, a new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenic and anti-tumor activities *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 874-882.
 21. Yoon, W. J., Kim, M. J., Koh, H. B., Lee, W. J., Lee, N. H. and Hyun, C. G. 2010. Effect of Korean red sea cucumber (*Stichopus japonicus*) on melanogenic protein expression in murine B16 melanoma. *Int. J. Pharmacol.* **6**, 37-42.
 22. Yoon, Y., Bae, S., An, S., Choe, Y. B., Ahn, K. J. and An, I. S. 2013. Effects of ultraviolet radiation on the skin and skin cell signaling pathways. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **11**, 417-426.

초록 : 홍해삼 추출물의 멜라닌 형성 억제를 통한 미백효과 및 피부 재생효과에 관한 연구

전미지¹ · 김은지¹ · 김가연¹ · 이승제¹ · 정인철² · 김상용³ · 김영민^{1*}

(¹한남대학교 생명나노과학대학 생명시스템과학과, ²주신한예코, ³신안산대학교 식품생명학과)

홍해삼 또는 *Apostichopus japonicus*는 동남아시아에서 발견되는 *stichopodiae*의 한 종이다. 본 연구에서는 홍해삼의 화장품 소재로서 사용가능한지 알아보기 위해 홍해삼 추출물의 미백, 항주름에 관한 실험을 진행하였다. tyrosinase 활성 분석 결과, 홍해삼 추출물 200 µg/ml에서 tyrosinase 활성을 억제하였다. 또한, 홍해삼은 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF 및 matrix metalloproteinase (MMPs)의 mRNA 발현을 억제하였다. 이어서 HaCaT 과 human Fibroblast를 이용한 3차원 세포배양을 통해 홍해삼의 피부 턴오버 주기 개선효과를 검증하였다. 이러한 결과를 바탕으로 홍해삼이 높은 미백효과 및 주름개선효과를 가지는 화장품 소재로서 충분한 가치를 지닐 것으로 판단된다.