

Tyrosinase 발현 조절을 통한 *Panax vietnamensis* 추출물의 Anti-pigmentation 효과

김 영 주^{*,†} · 차 화 준^{**,††}

*오산대학교, 뷰티코스메틱계열, 교수

**오산대학교, 뷰티코스메틱계열, 교수

(2022년 3월 14일 접수, 2022년 3월 29일 수정, 2022년 3월 30일 채택)

Anti-pigmentation Effects of *Panax vietnamensis* Extracts via Tyrosinase Expression

Young Joo Kim[†] and Hwa Jun Cha^{††}

Osan university, Department of Beauty & Cosmetics, Osan University,
45 Cheonghak-ro, Osan, Gyeonggi-do 18119, Korea

(Received March 14, 2022; Revised March 29, 2022; Accepted March 30, 2022)

요 약: 본 연구에서는 베트남에서 자생하고 있는 인삼인 *Panax vietnamensis* (*P. vietnamensis*)의 anti-pigmentation 효능을 확인하였다. 마우스 유래 melanocytes인 B16F10세포에 *P. vietnamensis* 70% ethanol 추출물을 처리하여 melanin의 생성량을 확인한 결과 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 추출물을 처리시 100 ng/mL α -MSH를 처리한 대조군 대비 64.04%의 melanin 생성억제를 확인하였다. 또한 melanin합성에 주요한 단백질인 tyrosinase의 활성 및 발현을 100 ng/mL α -MSH를 처리한 대조군 대비 tyrosinase의 활성은 53.34%, tyrosinase의 발현은 59.39%의 억제율을 보였다. 본 연구결과를 통해 *P. vietnamensis* 70% ethanol추출물은 α -MSH에 의한 melanin 생성을 방지하여 미백 기능성 소재로써 가치가 있는 것으로 사료된다.

Abstract: In this study, the anti-pigmentation efficacy of *Panax vietnamensis* (*P. vietnamensis*), a ginseng native to Vietnam, was confirmed. Melanin synthesis was repressed by ethanolic extracts of *P. vietnamensis* in B16F10 cells, melanocytes originated from mouse. At 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethanolic extracts of *P. vietnamensis*, melanin contents were repressed by 64.04% compared to the control group. In addition, ethanolic extracts of *P. vietnamensis* downregulated tyrosinase activity and expression to 53.34% and 59.39%, respectively. As shown our result, ethanolic extracts of *P. vietnamensis* blocks α -MSH-mediated melanogenesis and is valuable whitening ingredients in cosmetics.

Keywords: *Panax vietnamensis*, melanin, pigmentation, tyrosinase

1. 서 론

Melanin은 피부, 눈, 모발의 색을 결정하고, 자외선 흡수 및 활성산소 제거를 통해 피부를 보호하는 매우 중요한 물질이다[1-3]. 이러한 melanin은 melanocyte의 소기관인

melanosome에 위치하는 L-tyrosine가 tyrosinase, TRP1, TRP2의 반복적인 산화작용으로 생성되는 것으로 알려져 있다 [1,2]. 하지만 melanin 생성조절의 실패로 melanin이 과도하게 생성이 되면 기미, 주근깨, 검버섯 같은 과색소침착증을 유발하기도 한다. 과색소침착증은 미용학적으로 불균일한 피부를 만들기 때문에 화장품에서는 melanin의 합성을 억제해 균일한 피부를 만들려고 노력하고 있다[4,7].

인삼은 *Panax*속으로 지역마다 대표종이 다른데 한국은

† 주 저자 (e-mail: blue@osan.ac.kr)
call: 031-370-2861

†† 교신저자 (e-mail: michael83@naver.com)
call: 031-370-2864

Panax ginseng (*P. ginseng*), 중국은 *Panax notoginseng*, 미국은 *Panax quinquefolius*가 분포되어 있는 것으로 알려져 있고, 베트남에서는 *Panax vietnamensis* (*P. vietnamensis*)이라는 종이 분포되어 있고, 이에 대한 연구가 아직 미진하여 최근 활발한 연구를 통해 간보호, 간암 및 피부암에 대한 항암 효능 등이 하나씩 밝혀지고 있다[8-13]. 이러한 일반적으로 인삼에는 protopanaxadiols 구조를 가지는 ginsenoside가 존재하고 각각의 ginsenoside는 화학적특징에 따라 항염, 면역조절, 항암, 항산화 효과 등을 가진다[10,11]. 특히 *P. ginseng*에서는 주로 사용하는 뿌리를 비롯하여 열매, 씨앗, 꽃받침 등에서 미백효과가 있는 것이 밝혀졌고[14-16], 주요성분인 ginsenoside Rg3, Rb2, F1 등이 tyrosinase의 활성을 감소시켜 미백작용을 하는 것으로 알려지고 있다[17-20].

때문에 본 연구에서는 *P. vietnamensis* 추출물의 미백효과를 규명하고 이를 통해서 새로운 화장품 미백원료로서 활용가능성을 제시하고자 한다.

2. 실험방법

2.1. *P. vietnamensis* 추출

*P. vietnamensis*의 추출은 열수 추출과 70% ethanol 추출로 진행되었다. *P. vietnamensis*을 세척 후 60 °C dry oven에서 건조하였고, 건조된 *P. vietnamensis*를 분쇄하여서 증류수와 70% ethanol에 각각 10%씩 넣었다. 증류수에 넣은 *P. vietnamensis*는 70 °C에서 초음파를 처리하면서 24 h 추출하였고, 70% ethanol 추출은 상온에서 초음파를 처리하면서 2 h 추출하였다. 추출이후 추출물은 filter paper (Filter No.2, GE Healthcare Life Science, USA)를 이용하여 잔여물을 제거하였고, 회전증발농축기(EYELA, Japan)와 동결건조기(Illshin, Korea)를 이용하여 건조하였다. 이후 실험에는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, USA)에 녹여 사용하였다.

2.2. 세포독성시험

세포독성시험은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 측정하였다. B16F10 cell (American Type Culture Collection, USA)에 *P. vietnamensis*를 실험에 나타난 농도로 48 h 처리 후 500 µg/mL MTT를 처리하여 4 h 반응을 시키고 상등액 제거 후 각 well에 DMSO 100 µL을 넣어 녹여준 뒤 plate reader (Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3. Melanin Contents 측정

Melanin contents 측정은 흡광도를 이용하여 세포내 melanin 양을 측정하였다. α-Melanocyte stimulating hormone (α-MSH, Sigma-Aldrich, USA)와 추출물을 동시에 처리하고, 48 h 동안 처리가 끝난 B16F10 cell에 1N NaOH를 처리하여 완전하게 용해시키고, melanin는 450 nm에서 흡광도를 측정하여 그 양을 측정하였다. Melanin양은 전체 단백질을 측정하여 보정한 값을 사용하였다.

2.4. Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성 측정은 α-MSH와 추출물을 동시에 처리하고, 48 h 동안 처리가 끝난 B16F10 cell에 Triton X-100 lysis buffer (1% Triton X-100, 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 5 mM EDTA)를 이용하여 세포 용해한 뒤 2 mM L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, Sigma-Aldrich, USA)를 넣고 37 °C에서 30 min 반응한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 활성을 측정하였다. Tyrosinase 활성은 전체 단백질을 측정하여 보정한 값을 사용하였다.

2.5. Tyrosinase 발현 측정

Tyrosinase mRNA의 발현은 quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)을 이용하여 측정하였다. α-MSH와 추출물을 동시에 처리하고, 48 h 동안 처리가 끝난 B16F10 cell에 TRIzol (Invitrogen, USA)을 이용하여 total RNA를 추출한 후 reverse transcriptase (Qiagen, Germany)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 각각 합성된 cDNA에 tyrosinase의 발현을 확인하기 위해 tyrosinase primer (Tyrosinase forward 5'-CAAGTACAGGGATCGGC CAAC-3'; Tyrosinase reverse 5'-GGTGCATTGGCTTCTGGG TAA-3')을 이용하여 RT-qPCR을 진행하였고, 모든 결과는 β-actin mRNA의 양을 측정하여 normalization한 값으로 결과를 도출하였다.

2.6. 통계분석

모든 결과는 3 회 반복 실험되었으며, student's *t*-test를 통해 $p < 0.05$ 의 결과에 통계적인 유의성이 있다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. B16F10에서 *P. vietnamensis* 추출물의 세포독성확인
P. vietnamensis 추출물에 의한 B16F10 cell의 세포생존율

은 MTT assay를 통해 확인하였다(Figure 1). *P. vietnamensis* 열수(PVW) 추출은 25, 50, 100, 250, 500, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도별로 측정된 결과 500 $\mu\text{g/mL}$ 까지 90% 이상의 생존율을 보였다. 또한 *P. vietnamensis* 70% ethanol (PVE) 추출물의 경우 10, 25, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도별로 측정된 결과 250 $\mu\text{g/mL}$ 까지 90% 이상의 생존율을 보였다. 때문에 이후 실험에서는 열수추출과 70% ethanol추출에서 공통적으로 독성이 없는 50, 100, 250 $\mu\text{g/mL}$ 농도 구간으로 설정하여 진행하였다.

3.2. Melanin Contents 확인

P. vietnamensis 열수와 70% ethanol 추출물의 melanin 합성 억제 효과를 확인하기 위해 α -MSH에 의해 유도되는 melanin 합성에 *P. vietnamensis* 열수와 70% ethanol 추출물을 처리하였다. 실험결과 α -MSH에 의해 유도되는 melanin 합성이 *P. vietnamensis* 열수추출물에 의해서 melanin contents

변화가 없는 것을 확인하였고, *P. vietnamensis* 70% ethanol 추출물의 농도의존적으로 melanin 합성이 억제되는 것을 확인하였다(Figure 2). 본 실험에서는 α -MSH와 추출물을 동시에 처리하였으며, 이는 *P. vietnamensis* 추출물에 의해서 합성된 melanin의 감소되는 것이 아닌 melanin 생성기전의 저해를 통한 melanin 합성 억제함을 의미한다. 또한 α -MSH는 일반적으로 자외선에 노출되었을 때 발생하는 호르몬 중 하나이기 때문에 *P. vietnamensis* 70% ethanol 추출물은 UV노출 환경에서 발생하는 melanin 생성을 저해할 수 있을 것으로 판단할 수 있다[6].

3.3. Tyrosinase 활성 및 발현 확인

Melanin 합성에 주요한 단백질인 tyrosinase의 활성 및 발현을 확인하였다[21-25]. *P. vietnamensis* 열수와 70% ethanol 추출물의 tyrosinase의 활성 및 발현 억제 효과를 확인하기

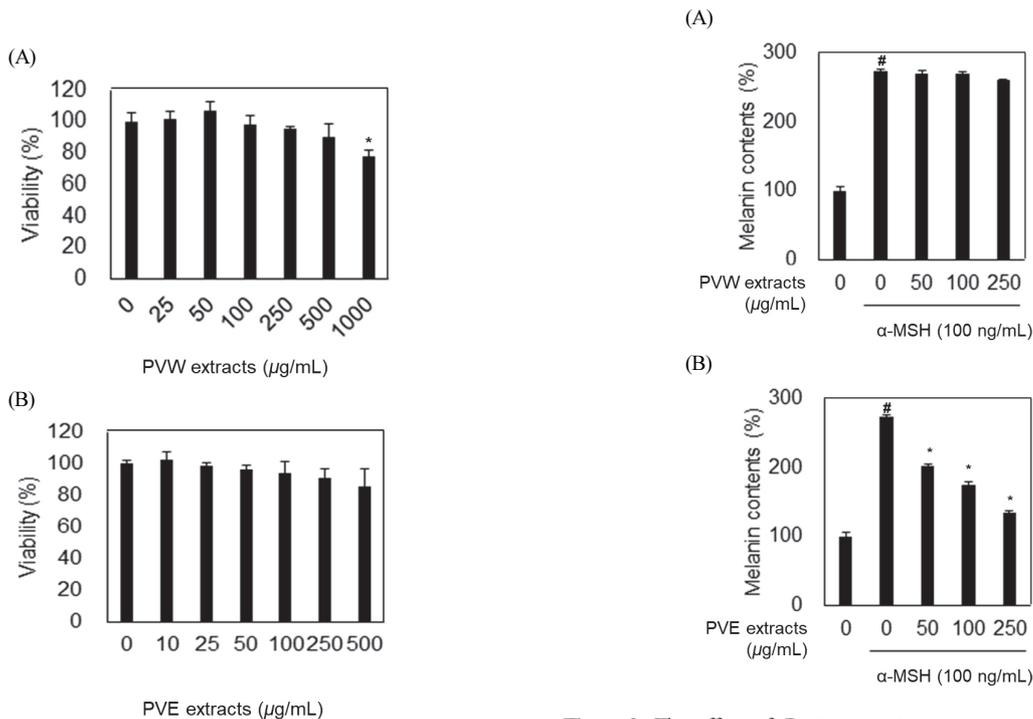


Figure 1. The cytotoxicity of *P. vietnamensis* extracts.

B16F10 cells were treated with *P. vietnamensis* extracts (concentration is $\mu\text{g/mL}$) for 48 h, 37 $^{\circ}\text{C}$. (A) Hot water extracts of *P. vietnamensis*, (B) 70% ethanol extracts of *P. vietnamensis*. The result is presented as the mean \pm SD of the experiment (N = 3). * p < 0.05 (vs. control). PVW (Hot water extracts of *P. vietnamensis*) and PVE (70% ethanol extracts of *P. vietnamensis*).

Figure 2. The effect of *P. vietnamensis* extracts on melanin contents. B16F10 cells were treated with α -MSH and *P. vietnamensis* extracts (concentration is $\mu\text{g/mL}$) for 48 h, 37 $^{\circ}\text{C}$. (A) Hot water extracts of *P. vietnamensis*, (B) 70% ethanol extracts of *P. vietnamensis*. The result is presented as the mean \pm SD of the experiment (N = 3). # p < 0.05 (vs. control), * p < 0.05 (vs. α -MSH treated B16F10 cells). PVW (Hot water extracts of *P. vietnamensis*) and PVE (70% ethanol extracts of *P. vietnamensis*).

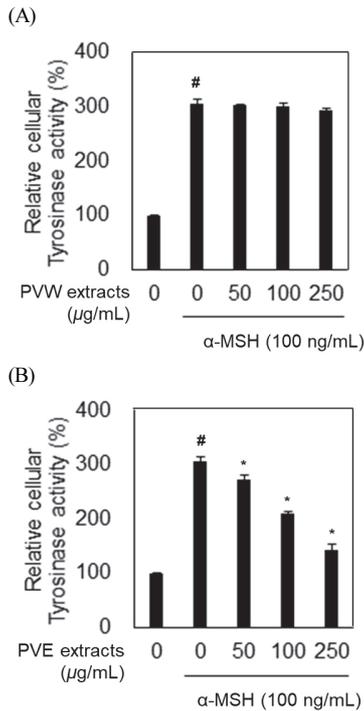


Figure 3. The effect of *P. vietnamensis* extracts on tyrosinase activity.

B16F10 cells were treated with α -MSH and *P. vietnamensis* extracts (concentration is $\mu\text{g/mL}$) for 48 h, 37 °C. (A) Hot water extracts of *P. vietnamensis*, (B) 70% ethanol extracts of *P. vietnamensis*. The result is presented as the mean \pm SD of the experiment (N = 3). # $p < 0.05$ (vs. control), * $p < 0.05$ (vs. α -MSH treated B16F10 cells). PVW (Hot water extracts of *P. vietnamensis*) and PVE (70% ethanol extracts of *P. vietnamensis*).

위해 α -MSH에 의해 유도되는 tyrosinase의 활성 및 발현에 *P. vietnamensis* 열수와 70% ethanol 추출물을 처리하였다. 실험결과 α -MSH에 의해 유도되는 tyrosinase의 활성이 *P. vietnamensis* 열수추출물에 의해서 tyrosinase의 활성 변화가 없는 것을 확인하였고, Tyrosinase mRNA의 발현도 변화가 없는 것을 확인하였다(Figure 3A, 4A). 또한 *P. vietnamensis* 70% ethanol 추출물의 농도의존적으로 tyrosinase의 활성이 억제되는 것을 하였고, 유사하게 Tyrosinase mRNA의 발현량도 감소되는 것을 확인하였다(Figure 3B, 4B). 때문에 본 논문의 결과를 종합하였을 때 *P. vietnamensis*가 자외선 노출에 의해 과도하게 생성된 melanin을 통한 과색소 침착증의 개선원료로 사용할 수 있는 가능성을 보여주었다[24-26]. 또한 기존실험을 통해 미백효과가 입증된 *P. ginseng*과 *P. vietnamensis*에서 동일한 미백효과가 있음을

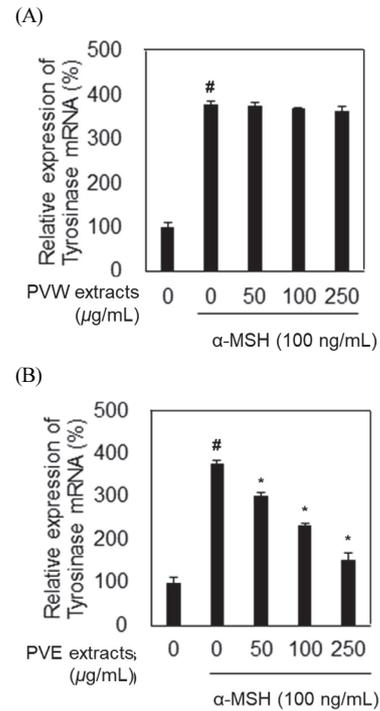


Figure 4. The effect of *P. vietnamensis* extracts on tyrosinase mRNA expression.

B16F10 cells were treated with α -MSH and *P. vietnamensis* extracts (concentration is $\mu\text{g/mL}$) for 48 h, 37 °C. (A) Hot water extracts of *P. vietnamensis*, (B) 70% ethanol extracts of *P. vietnamensis*. The result is presented as the mean \pm SD of the experiment (N = 3). # $p < 0.05$ (vs. control), * $p < 0.05$ (vs. α -MSH treated B16F10 cells). PVW (Hot water extracts of *P. vietnamensis*) and PVE (70% ethanol extracts of *P. vietnamensis*).

확인할 수 있는데[14-16], 이는 *P. ginseng*와 *P. vietnamensis*가 공통적인 genesenoside를 가지고 있기 때문에 유사한 효능을 보여주는 것으로 판단할 수 있다[12, 17-20]. 현재 점점 높아지고 있는 *P. ginseng* 단가를 고려해 볼 때, *P. vietnamensis*를 기능성원료로 화장품에 사용시 가격 경쟁력이 높은 인삼화장품의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

4. 결 론

본 연구에서 *P. vietnamensis*의 70% ethanol 추출물을 활용하여 melanin 합성 억제 효과를 확인하였다. B16F10 cell에서 세포독성을 확인하고, melanin contents와 tyrosinase 활성 및 발현 변화를 측정하여 미백효과를 연구하였다. 연구결과 B16F10 cell에 세포독성은 250 $\mu\text{g/mL}$ 까지 영향을 미

치지 않았으며, α -MSH로 유발된 melanin 합성이 *P. vietnamensis*의 70% ethanol 추출물 250 μ g/mL에서 31.08%의 억제율을 보였다. 또한 melanin 합성에 중요 단백질인 Tyrosinase mRNA 발현이 *P. vietnamensis*의 70% ethanol 추출물 250 μ g/mL에서 31.08%의 억제함을 확인함으로써 *P. vietnamensis* 추출물의 melanin 합성억제를 통한 anti-pigmentation 기능이 기대된다. 또한 추후 연구를 통해 *P. vietnamensis*의 주요성분에 의한 melanin 합성 저해효과 및 세부기전에 대한 연구가 지속되어 *P. vietnamensis*의 미백기전에 대한 과학적인 제시가 필요할 것으로 판단된다.

References

- M. Rinnerthaler, J. Bischof, M. K. Streubel, and A. Trost, and K. Richter, Oxidative stress in aging human skin, *Biomolecules*, **5**(2), 545 (2015).
- K. Tief, M. Hahne, A. Schmidt, and F. Beermann, Tyrosinase, the key enzyme in melanin synthesis, is expressed in murine brain, *Eur J Biochem*, **241**(1), 12 (1996).
- M. A. Farage, K. W. Miller, P. Elsner, and H. I. Maibach, Characteristics of the aging skin, *Adv Wound Care (New Rochelle)*, **2**(1), 5 (2013).
- S. Zhang and E. Duan, Fighting against skin aging: The way from bench to bedside, *Cell Transplant*, **27**(5), 729 (2018).
- R. Pandel, B. Poljšak, A. Godic, and R. Dahmane, Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention, *ISRN Dermatol*, **2013**(11), 930164 (2013).
- M. Brenner, and V. J. Hearing, The protective role of melanin against UV damage in human skin, *Photochem Photobiol*, **84**(3), 539 (2008).
- J. D'Orazio, S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz, and T. Scott, UV radiation and the skin, *Int J Mol Sci*, **14**(6), 12222 (2013).
- S. Zolghadri, A. Bahrami, M. T. Hassan Khan, J. Munoz-Munoz, F. Garcia-Molina, F. Garcia-Canovas, and A. A. Saboury, A comprehensive review on tyrosinase inhibitors, *J Enzyme Inhib Med Chem*, **34**(1), 279 (2019).
- B. Desmedt, P. Courselle, J. O. De Beer, V. Rogiers, M. Grosber, E. Deconinck, and K. De Paepe, Overview of skin whitening agents with an insight into the illegal cosmetic market in Europe, *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **30**(6), 943 (2016).
- C. Couteau and L. Coiffard, Overview of skin whitening agents: drugs and cosmetic products, *Cosmetics*, **3**(3), 27 (2016).
- I. F. Videira, D. F. Moura, and S. Magina, Mechanisms regulating melanogenesis, *An Bras Dermatol*, **88**(1), 76 (2013).
- Q. L. Tran, I. K. Adnyana, Y. Tezuka, T. Nagaoka, Q. K. Tran, and S. Kadota, Triterpene saponins from Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis*) and their hepatocytotoxic activity, *J Nat Prod*, **64**(4), 456 (2001).
- K. Yamasaki, Bioactive saponins in vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis*, *Pharm Biol*, **38**(Suppl 1), 16 (2000).
- D. Lee, B. Cha, Y. Lee, G. Kim, H. Noh, S. Kim, H. C. Kang, J. H. Kim, and N. Baek, The potential of minor ginsenosides isolated from the leaves of *Panax ginseng* as inhibitors of melanogenesis, *Int J Mol Sci*, **16**(1), 1677 (2015).
- Y. Lee, K. Kim, S. S. Kim, J. Hur, S. K. Ha, C. Cho, and S. Y. Choi, Inhibitory effects of ginseng seed on melanin biosynthesis, *Pharmacogn Mag*, **10**(Suppl 2), S272 (2014).
- E. Saba, S. Kim, Y. Y. Lee, C. Park, J. Oh, T. Kim, H. Kim, S. Roh, and M. H. Rhee, Korean red ginseng extract ameliorates melanogenesis in humans and induces anti-photoaging effects in ultraviolet B-irradiated hairless mice, *J Ginseng Res*, **44**(3), 496 (2020).
- S. J. Lee, W. J. Lee, S. E. Chang, and G. Lee, Antimelanogenic effect of ginsenoside Rg3 through extracellular signal-regulated kinase-mediated inhibition of microphthalmia-associated transcription factor, *J Ginseng Res*, **39**(3), 238 (2015).
- D. Y. Lee, Y. T. Jeong, S. C. Jeong, M. K. Lee, J. W. Min, J. W. Lee, G. S. Kim, S. E. Lee, Y. S. Ahn, H. C. Kang, and J. H. Kim, Melanin biosynthesis inhibition effects of ginsenoside Rb2 isolated from *Panax ginseng* berry, *J Microbiol Biotechnol*, **25**(12), :2011 (2015).
- H. Lee, J. M. Jung, J. Seo, S. E. Chang, and Y. Song, Anti-melanogenic property of ginsenoside Rf from *Panax ginseng* via inhibition of CREB/MITF pathway in melanocytes and *ex vivo* human skin, *J Ginseng Res*,

- 45(5), 555 (2021).
20. C. Lee, G. Nam, I. Bae, and J. Park, Whitening efficacy of ginsenoside F1 through inhibition of melanin transfer in cocultured human melanocytes-keratinocytes and three-dimensional human skin equivalent, *J Ginseng Res*, **43**(2), 300 (2019).
 21. X. H. Yuan and Z. H. Jin, Paracrine regulation of melanogenesis, *Br J Dermatol*, **178**(3), 632 (2018).
 22. Z. Rzepka, E. Buszman, A. Beberok, and D. Wrzesniok, From tyrosine to melanin: signaling pathways and factors regulating melanogenesis, *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, **70**(0), 695 (2016).
 23. S. A. DMello, G. J. Finlay, B. C. Baguley, M. E. Askarian-Amiri, Signaling pathways in melanogenesis, *Int J Mol Sci*, **17**(7), E1144 (2016).
 24. N. Smit, J. Vicanova, and S. Pavel, The hunt for natural skin whitening agents, *Int J Mol Sci*, **10**(12), 5326 (2009).
 25. T. Pillaiyar, M. Manickam, and S. H. Jung, Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis, *Cell Signal*, **40**(1), 99 (2017).
 26. M. Cichorek, M. Wachulska, A. Stasiewicz, and A. Tymińska, Skin melanocytes: biology and development, *Postepy Dermatol Alergol*, **30**(1), 30 (2013).