



Whitening activity of *Ficus carica* L. fruits extract through inhibition of tyrosinase and MITF expression

Min Ji Kim¹ · Si Eun Park¹ · Geun soo Lee² · Jin Hwa Kim² · Sunwoo Kwon² · Hyung Seo Hwang¹

무화과(*Ficus carica* L.) 열매 추출물의 tyrosinase 및 MITF 발현 억제를 통한 미백 활성

김민지¹ · 박시은¹ · 이근수² · 김진화² · 권순우² · 황형서¹

Received: 15 March 2023 / Accepted: 3 May 2023 / Published Online: 11 May 2023
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract Whitening is inhibitory activity of the melanin synthesis of melanocytes. Recently, whitening materials have been developed on natural materials because of its side effects on skin. Figs (*Ficus Carica* L.) is a fruit belonging to the Moraceae family and whitening activity was reported in focusing on the fig's stem and leaf components, but whitening activity of the figs fruit was not known. Thus, in this study, we tried to observe its anti-melanogenesis as well as antioxidant and anti-inflammation. The radical scavenging activity of figs fruits extract (FFE) was observed as the level of 34.52±1.98%/60.71±1.26% compared to the control in the its maximum concentration in the DPPH/ABTS assay. Cytotoxicity of FFE was observed at 10% concentration by CCK-8 assay, so the maximum concentration was set at 5% and applied to all experiments. FFE concentration dependently decreased NO production associated with inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, interleukin-6 and tumor necrosis factor- α gene expression, these strongly suggesting anti-inflammatory activity.

In melanin contents assay, FFE significantly down-regulated melanin production in α -MSH-stimulated B16F10 cell as well as tyrosinase inhibition *in vitro*. In addition, FFE decreased the Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) mRNA expression about 94.34% compared to the α -MSH treatment group in RT-PCR. Finally, FFE significantly reduced the MITF, cAMP response element-binding protein and tyrosinase protein expression in the α -MSH stimulated B16F10 cell. Through these results, we found that FFE can not only directly inhibit tyrosinase enzyme activity but also suppress melanogenesis through regulation of MITF gene expression in α -MSH signal transduction.

Keywords Anti-inflammation · Anti-melanogenesis · Figs fruits extract · Microphthalmia associated transcription factor · Skin whitening · Tyrosinase

Hyung seo Hwang (✉)
E-mail: hshwang@semyung.ac.kr

¹School of cosmetic science and beauty biotechnology, Semyung University, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do 27136, Republic of Korea

²R&D center, ITS HANBUL, 634, Eonju-ro, Gangnam-gu, Seoul 06101, Republic of Korea

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.

서론

피부의 구조에서 표피층은 가장 바깥쪽에 위치하며 외부로부터 세균, 바이러스 및 유해인자의 인체 내 침투를 막는 장벽 기능을 담당한다[1]. 표피층에는 주로 각질형성세포(keratinocyte)가 주를 이루고 있으며, 멜라닌형성세포(melanocyte), 랑게르한스 면역세포 등이 존재한다[2].

면역세포 중 대식세포는 외부 항원의 포식작용과 염증반응에 밀접한 관련이 있다. 그람음성세균의 Lipopolysaccharide (LPS)가 대식세포 세포막에 위치한 Toll-like receptor 4 수용체에 결합하면 전사인자(transcription factor)인 nuclear factor kappa B

(NF- κ B)가 활성화되어 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) 유전자 발현을 증가시키고 이 때 iNOS 단백질은 세포 내 Nitric oxide (NO) 생성을 촉진하며 NO는 세포 밖으로 방출된다. 또한 NF- κ B는 inhibitor- κ B (I- κ B)와 결합되어 활성이 억제되어 있다가 LPS 신호에 의해 I- κ B가 인산화 되면 ubiquitination 되어 분해되고, 이내 NF- κ B를 자유롭게 놓아줘 세포질에서 핵으로 이동시켜 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1) α/β 같은 염증성 사이토카인 유전자 발현을 촉진한다. 또한 ERK1/2, JNK, p38 kinase로 알려진 Mitogen-activated protein kinase 신호 기전이 NF- κ B 조절과 연결된 것으로 보고된다[3-9].

멜라닌형성세포는 멜라닌 색소를 생성하여 피부를 자외선으로부터 보호한다. 자외선은 대표적인 피부의 외부 자극원 중 하나이다[10]. 자외선(UV)이 각질형성세포 내 DNA 손상을 유발하면, 전사인자인 p53이 활성화되어 α -MSH 호르몬이 생성된다[11]. α -MSH는 세포막 수용체 Melanocortin 1 receptor (MC1R)에 결합하여 멜라닌 합성 신호를 전달하는데, 신호전달 단백질인 Adenylate Cyclase (AC)를 활성화시켜 cyclic AMP 농도가 증가되고, 이는 protein kinase A (PKA)를 활성화시켜 전사인자 cAMP response element-binding protein (CREB)를 활성화한다. CREB 전사인자는 Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) 전사인자 활성화를 통해 tyrosinase, tyrosinase related protein 1/2 (TYRP 1/2)를 발현시켜 타이로신으로부터 멜라닌 색소를 생성한다. Tyrosinase는 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanin (DOPA) 및 DOPA-quinone으로 산화되는 생화학 반응을 촉매한다[12-14]. 이처럼 tyrosinase는 멜라닌 합성에 관여하는 핵심 효소이므로 미백 소재 연구에서 주요 타겟으로 사용된다[15,16]. 이렇게 생성된 멜라닌은 멜라노솜을 통해 각질형성세포로 다시 이동하여 표피의 각질층까지 멜라닌이 이동하여 피부를 자외선으로부터 보호해준다[17,18]. 멜라닌 생성은 다양한 피부 자극에 대응하여 피부세포를 보호해주는 중요한 생리작용이지만, 과도한 멜라닌 합성은 기미, 주근깨, 과색소 침착과 피부 노화 등을 유발하고, 심할 경우 피부암까지 발생할 수 있다[19]. 따라서 이러한 부작용 증상을 방지하기 위해서는 멜라닌 생성 과정의 일부분만을 선택적으로 저해하여 멜라닌 생성을 감소시켜야 한다. 대표적인 미백 소재인 알부틴, 코직산, 하이드로퀴논, 다크나무추출물은 tyrosinase의 활성을 억제하여 강력한 미백 효능을 나타낸다[20-25]. 그러나 이들은 피부 자극이나 안전성 문제로 일부 부작용이 보고되고 있어, 이를 개선하기 위한 천연유래 소재 개발 연구가 활발히 진행되고 있다[26,27].

무화과(*Ficus Carica*)는 뽕나무 과에 속하는 무화과 열매이며 열매 내 다양한 폴리페놀 화합물들이 다량 존재한다[28,29]. 선행연구를 통해 무화과 latex에 존재하는 ficin 효소의 항산화, 항염증 및 미백 효능도 규명되었다[30]. 최근 연구에서 무화과나무의 열매 또는 잎 추출물의 생리 효능과 무화과 잎 추출물에 의한 미백 효능에 대한 연구가 보고되었는데, 열매의 주요 성분으로 apigenin, luteolin, quercetin, hesperetin, prenylated isoflavone, morin, cyanidine, rutin 등이 존재하며 잎과 줄기 또한 폴리페놀 화합물들이 존재하는 것으로 알려진다[31-33]. 그러나 최근까지 무화과 열매 추출물(Figs Fruits Extract, FFE) 자체의 미백 효능에 대해서는 거의 보고되지 않았다. 따라서 우리는 무

화과 열매를 70% 에탄올로 추출 정제 후 미백 활성 연구를 수행하여 새로운 천연 유래 미백 소재로 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

무화과 열매 추출물은 (주)잇츠한불(Eumseong, Chungbuk, Korea)에서 직접 제조했으며, 다음과 같은 방법이 적용되었다. 실험에 사용한 무화과는 전라남도 영암에서 생산한 유기농 무화과(무화과농장, Yeongam, Jeonnam, Korea)를 구매하여, 열매를 수세 및 분쇄하여 동결건조(Freeze dryer FD8508, ilshin lab, Yangju, Gyeonggi, Korea) 후 분말형태의 천연물로 사용하였다. 분쇄한 무화과 열매 10 g을 70% 주정(Ethanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 수용액 190 g에 분산시켜 200 g을 제조한 후 80 °C에서 약 6시간 동안 환류추출기(Combination Multi Heating Mantles, Fine Therm, Global lab, Siheung, Gyeonggi, Korea)에 넣어 추출한 후, 10,000 rpm에서 20분간 원심분리(High-speed Centrifuge, Supra R17, Hanil, Daejeon, Korea) 하였다. 원심분리한 상등액을 PVDF membrane (FPV-403-500, Vacuum-driven filters, BIOFIL, Guangzhou, China)을 사용하여 진공펌프(Vacuum pump, GAST, Benton Harbor, MI, USA)로 여과한 후, 본 연구에 사용하였다. 여과된 무화과 열매 추출물을 100% 농도 기준으로 설정하였으며 Dulbecco's phosphate-buffered saline (Gibco, Waltham, MA, USA)로 희석한 후 % 농도로 표기하였다. 또한 LPS, α -MSH, arbutin, tyrosine, tyrosinase, kojic acid 모두 sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다.

세포 배양

RAW264.7 마우스 대식세포와 B16F10 (CRL-6475) 마우스 흑색종 유래 세포는 american type culture collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 직접 분양 받았다. 두 종류의 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS, Welgene, Gyeongsan-si, Korea)와 1% penicillin/streptomycin (Gibco)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Welgene, Gyeongsan-si, Korea) 배양 배지를 이용해 배양하였고, 세포배양기는 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 최적화하여 사용하였다.

DPPH/ABTS 라디칼 소거능 평가

무화과 열매 추출물의 항산화 효능 평가는 DPPH 및 ABTS assay를 통해 관찰하였다. 먼저 DPPH (200 μ M), ABTS (7 mM) 용액을 제조한 후 각 농도별 제조된 무화과 열매 추출물 300 μ L와 DPPH, ABTS 용액 300 μ L를 섞어 반응시켰다. 이후 96 well plate에서 반응액을 100 μ L씩 분주한 후 DPPH는 517 nm 파장, ABTS는 734 nm 파장조건에서 각각 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 L-ascorbic acid (1 mg/mL)를 사용하였다.

NO 생성량 측정

RAW264.7 세포를 이용한 NO assay를 수행하였다. RAW264.7 세포를 1.0 \times 10⁵ cells/well가 되도록 24 well plate에 분주한 후 약 24시간 동안 배양시켰다. 그 후 배양액을 제거하고 무화과

열매 추출물을 각 농도 별로 LPS (0.5 µg/mL)가 포함된 phenol red가 없는 DMEM (10% FBS, 1% P/S)으로 희석한 용액을 분주하여 24시간 동안 배양시켰다. 그 후 griess reagent (40 mg/mL) 시약을 제조하고 이 용액과 각 농도별 상층액을 1:1로 섞어 반응시켰다. 반응 시킨 후 96 well plate에서 반응액을 100 µL씩 분주한 뒤 540 nm 파장 조건에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 quercetin (10 µg/mL)을 사용하였다.

Tyrosinase 활성 저해 평가

무화과 열매 추출물의 tyrosinase 활성 저해 효과는 tyrosinase assay를 통해 관찰하였다. 먼저 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.5), 1.5 mM tyrosine, tyrosinase (2000 UNIT)을 제조한 후 각 농도별 무화과 열매 추출물 20 µL와 tyrosinase와 tyrosine, sodium phosphate buffer 280 µL를 섞어 총 300 µL 조건으로 37 °C heating block에서 15분 동안 반응시켰다. 이후 96 well plate에서 반응액을 80 µL씩 분주한 후 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 kojic acid (1 mg/mL)를 사용하였고, 무화과 열매 추출물의 tyrosinase 활성 저해율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{tyrosinase 활성 저해율(\%)} = (1 - (b - b') / (a - a')) \times 100$$

a: 공시료액의 반응 후 흡광도 = buffer + tyrosine + tyrosinase

a': buffer의 흡광도 = buffer + tyrosine

b: 시료액의 반응 후 흡광도 = buffer + sample + tyrosine + tyrosinase

b': 시료 흡광도: buffer + sample + tyrosine

세포 독성 평가

무화과 열매 추출물의 세포 독성 및 세포 생존율을 평가하기 위해 RAW264.7 및 B16F10 세포를 배양하고 cell counting kit-8 assay (CCK-8 assay, DoGen bio, Seoul, Korea) 시험법을 적용하였다. 두 세포 모두 24 well plate에 5.0×10^4 cells/well가 되도록 분주한 후 약 24시간 동안 배양하여 세포를 안정화시켰다. 이후 RAW264.7 세포는 LPS (0.5 µg/mL)로 자극하고 무화과 열매 추출물을 동시 처리한 후 24시간 동안 배양시켰다. B16F10 세포에서는 α-MSH (200 nM)와 FFE를 각 농도별로 동시 처리 후 72시간 동안 배양하였다. 24 well plate에서 배양액은 완전히 제거한 후 phenol red가 존재하지 않는 DMEM (10% FBS, 1% P/S)과 CCK-8 reagent를 10:1로 dilution한 용액을 24 well plate 세포에 분주하여 30분 동안 반응 시킨 후 상층액을 96 well plate로 옮겨 450 nm 조건에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}}} \times 100$$

OD_{control}: 무처리군(Control) 흡광도

OD_{blank}: CCK-8 solution 흡광도

OD_{sample}: 시료 처리군 흡광도

멜라닌 생성 측정

B16F10 세포주를 이용 melanin contents assay를 수행하였다 [30]. B16F10 세포를 35 mm dish에 약 1.0×10^5 cells/well로 분주한 뒤 24시간 동안 배양하며 안정화 하였다. 이후 배지를

제거하고 α-MSH (200 nM)와 FFE를 각 농도 조건에서 동시 처리 하였고, 약 72시간 이후 35 mm dish에 있는 B16F10 세포 및 배양 배지의 색 변화를 관찰하였다. 이 때 멜라닌 생성 억제 양성대조군으로 arbutin (100 µg/mL)을 사용하였다.

RT-PCR을 이용한 mRNA 발현량 측정

6 well plate에서 RAW264.7를 6.0×10^5 cells/well 조건으로 분주하여 24시간 동안 배양하여 안정화 시킨 후, FBS free media 조건에서 LPS (0.5 µg/mL)와 무화과 열매 추출물(FFE)을 약 6시간 동안 동시 처리한 후 iNOS, COX-2 및 IL-6, TNF-α 같은 전염증성 사이토카인 변화를 관찰하였다. 또한 B16F10 세포를 6.0×10^5 cells/well 조건으로 분주한 후 24시간 동안 배양하여 안정화 시킨 후 FBS free media 조건에서 α-MSH (200 nM)와 FFE를 약 2시간 동안 동시 처리한 후 멜라닌 생성 변화를 관찰하였다[30]. 이후 과정은 동일하게 TRIzol reagent (Ambion, USA)를 1 mL씩 분주하여 세포를 lysis 한 후 chloroform (Sigma-Aldrich) 200 µL를 처리하여 층을 분리시킨 후 4 °C 원심분리기에서 14,000 rpm, 15 min 조건으로 원심 분리한 후 상층액을 취해 isopropanol (sigma-aldrich) 400 µL와 1:1로 혼합하고 다시 원심분리 하였다. 상층액을 제거 한 뒤 75% EtOH를 각 튜브에 1 mL씩 분주한 후 다시 원심 분리하여 상층액을 제거한 후 상온에서 완전히 말려준 뒤 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA는 1.5 µg/mL이 되도록 조정한 후 Revertra Ace Kit (Toyobo, Osaka, Japan)로 reverse transcription 반응을 통해 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA와 각 유전자의 taqman probe를 혼합한 후 real time PCR (Applied biosystems, Foster city, CA, USA)로 실시간 MITF 및 GAPDH 유전자의 mRNA 발현량을 비교분석 하였다. 본 연구에서 사용한 Taqman probe에 대한 정보는 Table 1에 별도로 표기하여 설명하였다.

Western blot을 통한 단백질 발현 측정

RT-PCR과 동일한 조건으로 6 well plate에 B16F10 세포를 8.0×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 안정화 시킨 후 DMEM 배지에서 α-MSH (200 nM)과 FFE를 2시간 동안 동시 처리 하였다. 이후 세포를 Phosphate buffered saline 로 3회 세척 한 후 RIPA lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), protease, phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific), 0.5 M EDTA (Thermo Fisher Scientific) 들의 혼합액을 200 µL를 첨가하여 세포를 용해시키고 원심분리 (14,000 rpm, 4 °C, 15 min) 하였다. 원심분리 하여 얻은 단백질은 Bradford (Bio-rad, Hercules, CA, USA) assay로 정량 하였다. 이후 β-mercaptoethanol과 4X laemmli sample buffer (31.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 1% SDS, 0.005% Bromophenol Blue) 혼합액에 첨가한 후 95 °C, 5 min 동안 단백질을 변성 시켰다. 10% polyacrylamide gel에 110 V, 75 min 동안 전기 영동을 통해 단백질을 크기 별로 분류하고, 이를 PVDF membrane에 옮긴 다음 iBlot dry blotting system (Invitrogen, Calsbad, CA, USA)을 이용하여 20 V에서 7분 동안 transfer하였다. 10% skim milk로 상온에서 1시간 blocking한 후 약 3회 1X TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4)로 washing 후 4 °C에서 primary antibody를 1:1000 비율로 12시간 동안 혼성화 하였다. 다시 1X TBST로 5분씩 3회 washing 하고

Table 1 Gene name and assay ID number in real-time PCR analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
MITF	Microphthalmia associated transcription factor	Mm00434954_m1
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	Mm00440502_m1
COX-2	Cyclooxygenase-2	Mm00478374_m1
IL-6	Interleukin 6	Mm00446190_m1
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha	Mm00443258_m1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Mm99999915_g1

Table 2 Protein and antibody catalog number in western blot analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
CREB	cAMP response element-binding protein	9246 ^b
MITF	Microphthalmia-associated transcriptian factor	4904 ^a
Tyrosinase	Tyrosinase	9145 ^a
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	MA5-15738 ^a
	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HPR	31460 ^a
	Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HPR	31430 ^a

^aInvitrogen

^bCell Signaling Technology

2차 antibody (1:10000)를 1시간 동안 상온에서 교반 시켰다. 1X TBST로 15분간 4회 washing 후 암실에서 ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 이용하여 반응시킨 후, 이미지 처리장치(Microchemi-DNR, Neve Wamin, Israel)로 특정 단백질들의 발현량을 관찰하였다. 실험에 사용된 모든 항체들은 Table 2에 별도로 표기하였다.

통계처리

본 연구에서 수행한 모든 실험은 3회 반복 측정된 결과값을 평균과 표준편차로 나타내었으며, Student's t-test를 통해 p 값이 0.05 미만일 때 통계적 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

무화과 열매 추출물(FFE)의 항산화 및 NO 생성 저해 효과

70% 에탄올로 추출한 무화과 열매 추출물(Figs Fruits Extract, FFE)의 항산화 효능을 확인하기 위해 *in vitro* 조건에서 DPPH/ABTS assay를 수행하였다. Ascorbic acid (1 mg/mL)는 양성대조군으로 사용하였다. 먼저 FFE 10%, 25%, 50% 조건에서 DPPH 라디칼 소거능은 양성대조군인 ascorbic acid 대비 높은 활성은 보이지 않았지만 각각 8.53±7.21, 18.88±1.9, 34.52±1.98%로 측정되었다. 또한 ABTS assay를 통한 ABTS 라디칼 소거능을 관찰한 결과 동일한 10, 25, 50% 조건에서 각각 12.41±1.87, 31.48±1.61, 60.71±1.26%로 유의성 있게 증가하였다(Fig. 1A). 또한, 무화과 열매 추출물의 항염증(anti-inflammation) 활성을 확인하기 위해 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포주를 활용하여 NO 생성 변화를 관찰하였다. 먼저 FFE가 RAW264.7 세포주에 미치는 세포독성을 관찰하기 위해 CCK-8 assay를 수행하였다. CCK-8 assay 수행 결과 FFE는 *in vitro* 실험과 달리 5% 농도까지 거의 변화가 없었으나 10% 농도 조건 이후부터 세포독성

이 관찰되었다. 따라서, 세포독성이 관찰되지 않은 안전한 농도를 5% 조건으로 설정한 후 이후 모든 세포 실험에 적용하였다. 이와 동시에 FFE의 NO 생성 억제력을 확인하기 위해 LPS로 유도된 RAW264.7 세포에 FFE를 각각 0.1, 1, 2, 5% 농도로 동시 처리한 후 NO 생성 변화를 관찰하였다. 이 때 quercetin (10 µg/mL)은 양성대조군으로 사용하였다[3,34]. LPS (0.5 µg/mL) 단독처리 군에서는 NO 생성량이 무처리군 대비 약 695.5% 수준까지 증가하였고, 양성대조군 quercetin (10 µg/mL) 처리군에서는 LPS 처리군 대비 약 185.1±8.17% 수준으로 감소한 반면, LPS와 FFE를 0.1, 1, 2, 5% 농도로 동시 처리한 시험군에서는 각각 582.6±34.01, 373.89±12.52, 232.41±13.52, 110.99±12.7% 수준으로 NO 생성량이 감소하였다(Fig. 1B). 위 결과들은 FFE가 양성대조군인 quercetin (10 µg/mL)과 유사한 수준으로 라디칼 소거능과 NO 생성 억제 기능이 있음을 보여준다. 또한 LPS로 활성화된 RAW264.7 세포주에서 FFE에 의한 염증성 사이토카인의 mRNA 변화를 관찰하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. LPS (0.5 µg/mL) 처리군에서는 iNOS 유전자가 약 270배까지 증가하였고, 양성대조군 quercetin은 유의성 있게 iNOS mRNA 발현을 억제하였다. 뿐만 아니라 LPS+FFE (1-5%) 동시처리군에서도 농도 의존적인 발현 감소가 관찰되었다(Fig. 1C). FFE에 의한 COX-2 유전자의 mRNA 발현량 변화를 관찰한 결과 LPS에 의해 420배 증가된 COX-2 발현량은 FFE (1-5%)에 의해 유의성 있게 억제되었다(Fig. 1D). FFE는 전염증성 사이토카인들의 유전자 발현도 유의성 있게 억제하였다. LPS 자극 조건에서는 IL-6 mRNA 유전자가 정상적으로 증가되었다가 quercetin 및 FFE에 의해 억제됨이 확인되었다. 마지막으로 TNF- α 의 경우 LPS에 의해 50배 이상 증가하였고, 비록 quercetin에 의한 TNF- α 조절 효과는 크지 않았지만 FFE (5%)는 유의성 있게 mRNA 발현을 억제하였다(Fig. 1F). 따라서, 위 결과들을 통해 무화과열매 추출물(FFE)의 항산화 및 항염증 활성을 확인할 수 있었다.

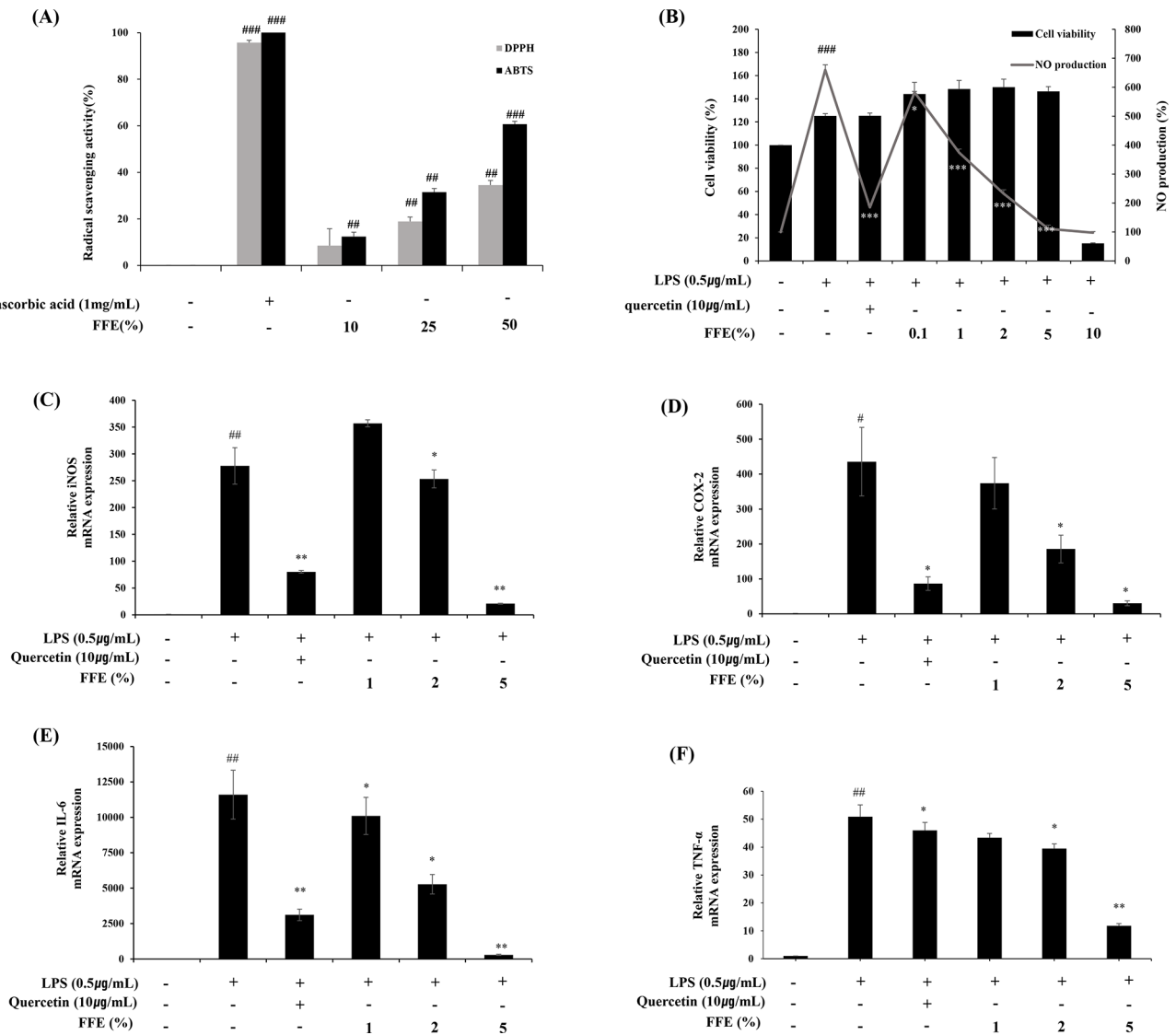


Fig. 1 Antioxidant and anti-inflammatory activity of Figs fruits extract (FFE). (A) Antioxidant activity of FFE was evaluated by DPPH/ABTS assay. (B) The cytotoxicity was evaluated by the CCK-8 assay and the maximum concentration of FFE was determined to be 5%. NO production was decreased as concentration dependent manner by FFE. (C) FFE decreased mRNA expression of iNOS. (D) COX-2 gene was down-regulated by FFE in LPS induced RAW264.7 cell. Pro-inflammatory cytokines such as (E) IL-6 and (F) TNF-α were suppressed by FFE. All experimental results were expressed as the mean ± standard deviation after repeating 3 experiments. ###*p* < 0.01, ####*p* < 0.001, compared to control, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, compared to LPS control

FFE의 미백 활성 효과

FFE의 미백 (whitening) 효과를 확인하기 위해 *in vitro* 조건에서 tyrosinase assay를 수행하였다. 양성대조군인 kojic acid (1 mg/mL)에서는 tyrosinase 저해 효과가 무처리군 대비 약 96.53±0.89%로 관찰되었다. 비록 FFE의 tyrosinase 활성 저해 효과는 kojic acid 대비 높은 활성은 보이지 않았으나 10-100% 농도 조건까지 최대 39.53±0.34% 수준으로 증가되어 FFE 내에 tyrosinase 효소 저해 성분이 존재하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 2A). 본 연구 이전부터 천연 추출물들에 의한 tyrosinase 저해 효과는 보고되었고, 대표적인 것이 포도씨 추출물, 흑백나무 추출물, 썩 추출물이다. 따라서 무화과 추출물 내에도 직접적인 tyrosinase

저해 활성성분들이 존재하고 있을 것으로 예상할 수 있다[35]. 따라서 우리는 B16F10 세포주를 이용해 FFE의 미백 기능을 세포 내 분자수준에서 규명하고자 하였다. 먼저 FFE에 의한 세포독성을 CCK-8 assay를 통해 확인하였는데 α-MSH (200 nM)로 활성화된 B16F10 세포에 FFE를 처리한 후 세포독성을 관찰하였다. CCK-8 assay를 통해 FFE와 α-MSH (200 nM)를 72시간 동시 처리한 후 세포 생존율을 관찰한 결과, 이전 실험과 동일하게 FFE (5%) 농도 조건까지는 세포독성이 전혀 관찰되지 않았지만, 10% 농도 조건부터는 세포독성이 나타났다(Fig. 2B). 따라서 본 연구에서 B16F10세포에 처리하는 FFE의 최대 농도를 5% 조건으로 설정하였고, 이후 모든 B16F10 세포 실험에

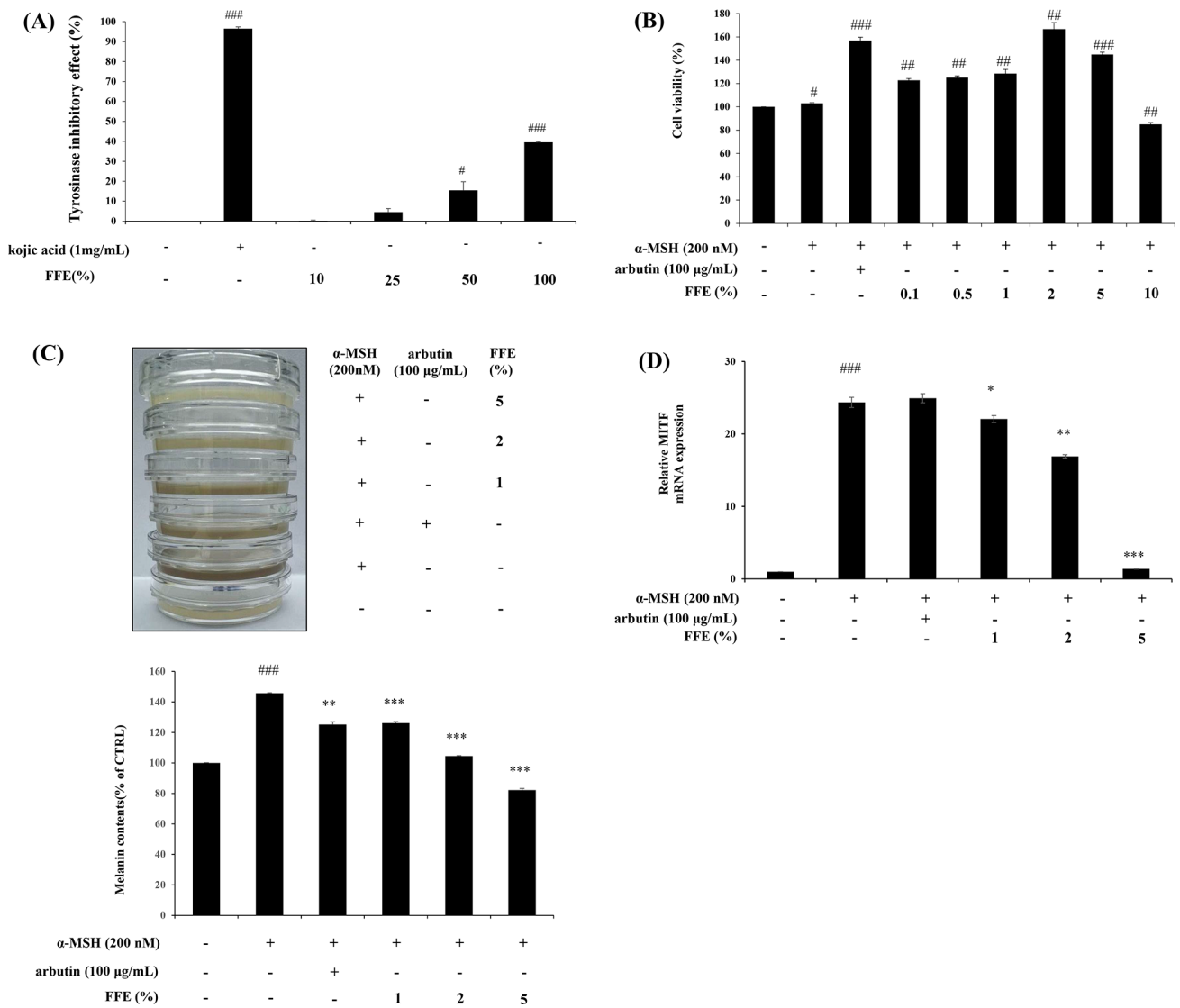


Fig. 2 The inhibitory activity of FFE on the tyrosinase activity and melanin synthesis. (A) Tyrosinase activity was decreased by FFE *in vitro*. Kojic acid (1 mg/mL) was used as positive control (B) Cell viability was performed through CCK-8 assay. B16F10 cells were co-treated with FFE (0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10%) and α-MSH (200 nM) for 72 h. Cell toxicity of FFE was not observed until 5% concentration. (C) To observe melanin synthesis, B16F10 cells were co-treated with FFE (1, 2, 5%) and α-MSH for 72 h. Melanogenesis was significantly reduced at its maximum concentration (5%). Melanin production was significantly decreased by FFE more rather than arbutin. (D) The MITF mRNA level was measured by RT-PCR. MITF was suppressed by FFE (1~5%) as concentration dependent manner. The data were expressed as the mean ± SD. #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001, compared to the control group. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, compared to the α-MSH group

서 적용하였다. Melanin contents assay를 수행하여 α-MSH (200 nM)로 활성화 된 B16F10 세포에 FFE를 최대 5% 농도 조건으로 동시 처리한 후 72시간 동안 멜라닌 생성 변화를 관찰하였다 [30]. 그 결과 무처리군 대비 α-MSH 처리군에서는 멜라닌 색소가 정상적으로 생성되어 진갈색으로 변했고, 양성대조군인 arbutin (100 μg/mL) 동시 처리군에서는 멜라닌 생성이 유의성 있게 감소하였다. 또한 α-MSH 및 FFE를 각각 1, 2, 5% 농도조건으로 동시 처리한 시험군에서 arbutin 처리군 대비 멜라닌 생성이 유의적으로 감소하였다(Fig. 2C). 위 결과에서 FFE는 *in vitro*에서 tyrosinase 효소 활성을 직접적으로 저해 할 뿐 아니라 α-MSH로 활성화 된 멜라닌세포에서 멜라닌 생성을 유

의적으로 억제하는 것이 관찰되어, 이는 향후 추가 미백 인체 적용시험이 수행된다면 FFE를 신규 미백 활성 기능성 소재로 개발할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, FFE의 멜라닌 생성 억제 기전을 세포 및 분자수준에서 규명하기 위해 B16F10 세포 주에서 멜라닌 색소 생성에 중요한 전사인자인 MITF 유전자를 RT-PCR을 통해 비교 분석하였다. B16F10세포에 α-MSH (200 nM)와 FFE를 2시간 동안 동시 처리한 후 RT-PCR을 통해 MITF 유전자 발현량 변화를 관찰하였다. 그 결과 MITF는 α-MSH (200 nM) 단독 처리 시 무처리군 대비 약 24.7배 증가하였으나 양성대조군인 arbutin (100 μg/mL)에서는 α-MSH 단독 처리군 대비 거의 변화가 없었다. 이는 arbutin이 tyrosinase 효

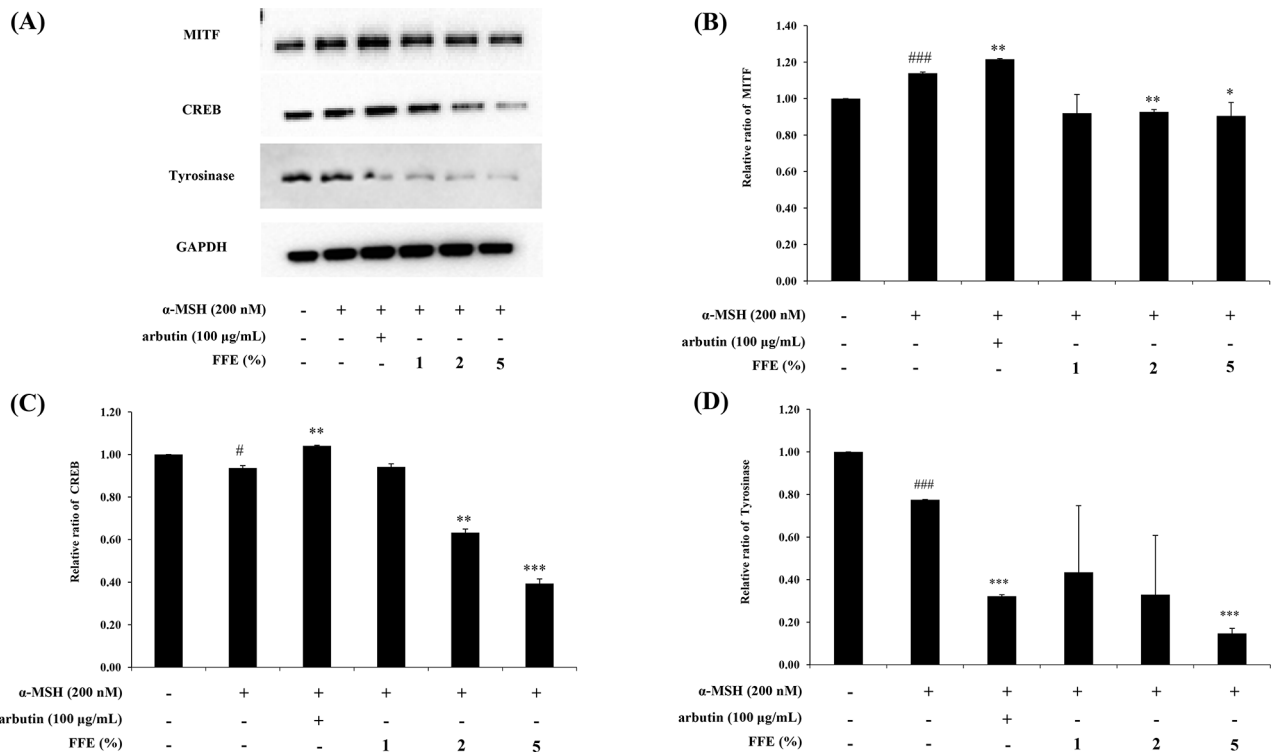


Fig. 3 FFE suppressed MITF, CREB and tyrosinase protein expression in α -MSH stimulated B16F10 cells. (A) After activating B16F10 cells with α -MSH, FFE (1-5%) was co-treated for 2 h under serum-free conditions. MITF, CREB and tyrosinase protein were observed through western blotting. FFE significantly inhibited the MITF as well as CREB and tyrosinase protein as concentration dependently. GAPDH was used as a loading control in this experiment. Protein density was defined as the relative ratio of (B) MITF/GAPDH, and it was measured with Image J software. (C) CREB and (D) tyrosinase were also presented in the same method. The data were expressed as the mean \pm SD. ### p < 0.001, compared to the control group. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, compared to the α -MSH treated group

소에 대한 직접적인 억제 물질이며, MITF 발현조절에는 관여하지 않기 때문이다. 그러나, 동일한 조건에서 FFE를 동시에 처리한 결과 MITF mRNA 발현량은 무처리군 대비 약 9.48, 30.61, 94.34%만큼 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 2D). 위 결과들을 통해 FFE는 *in vitro*에서 tyrosinase 활성을 직접적으로 조절할 수 있을 뿐 아니라 B16F10 세포 내에서는 MITF 전사 조절에 관여하여 세포 내 멜라닌 생성이 하향 조절된다고 이해할 수 있다. 그러나 추출물 특성 상 추출물 내 어떤 성분에 의한 미백 활성이 나타나는지에 대해서는 향후 추가 성분분석 및 활성 연구가 필요할 것으로 보인다.

FFE에 의한 MITF 단백질 조절

α -MSH가 MC1R 수용체에 결합하면 cAMP가 생성되어 PKA가 활성화 되고, 이는 CREB 전사인자의 활성화를 가져오는데, CREB의 target 중 하나가 바로 MITF 전사인자이다[36]. 이러한 MITF 전사인자는 단백질 생성 이후 p38, JNK, GSK3 β 에 의해 ser 298 부위가 인산화 되면 기능이 최대로 활성화되어 tyrosinase, tyrosinase related protein (TRP) 1/2등을 생성하고 이로 인해 멜라닌 생성이 촉진된다. 따라서 우리는 B16F10 세포주에서 α -MSH와 FFE를 2시간 동안 동시 처리한 후 CREB, MITF 및 tyrosinase 단백질의 변화를 관찰하였다. 먼저 무처리군 대비 α -MSH 단독 처리한 결과 인산화된 MITF 단백질은

무처리군 대비 증가하였고, 1-5% FFE 처리군에서는 α -MSH 처리군 대비 MITF 단백질 발현량이 감소하였다(Fig. 3A). Image J program을 이용해 정량한 결과에서도 MITF 발현량은 FFE에 의해 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 3B). CREB 단백질 발현 또한 FFE에 의해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 3C). 마지막으로 Tyrosinase 단백질 발현 또한 농도 의존적인 발현량 감소가 관찰되었다(Fig. 3D). 따라서 FFE는 α -MSH에 의한 melanogenesis 신호전달 과정에서 CREB, MITF, tyrosinase 보다 더 upstream에서 작용하는 것으로 예상할 수 있다. 지중해에 서식하는 아스포델 일종의 식물인 *Asphodelus microcarpus*는 예로부터 건선, 미생물 감염성 피부질환등에 유효한 약용식물로 알려졌으며, apigenin, luteolin, rutin 등의 폴리페놀 화합물이 존재하는 것으로 알려진다[37]. *Asphodelus microcarpus* 추출물 또한 무화과 열매 추출물과 동일한 tyrosinase 저해 및 멜라닌 합성 억제효능이 보고되었다. 따라서 추후 연구에서는 추출물 내 유효성분으로 예상되는 apigenin과 luteolin 같은 폴리페놀 화합물들을 중심으로 함량 분석 및 melanogenesis 미백 기능을 보다 명확히 규명할 예정이다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때 무화과 열매 추출물(FFE)은 직접적인 tyrosinase 저해 및 세포 내 멜라닌 생성 억제 기능이 확인되었고, 향후 미백 관련 인체적용시험등을 통해 화장품 소재로 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

초 록

미백은 멜라닌 세포 내 멜라닌 생성 억제 기능을 의미한다. 기존 미백소재의 피부 부작용 때문에 최근에는 천연 소재를 활용한 미백 연구가 활발히 진행되고 있다. 무화과(*Ficus Carica* L.)는 뽕나무과에 속하는 열매로 줄기와 잎 성분의 미백 활성은 보고되었으나 무화과 열매의 미백 활성은 알려지지 않아 본 연구를 통해 멜라닌 생성 억제, 항산화 및 항염증 활성을 규명하고자 하였다. 무화과 열매 추출물(Figs fruits extract, FFE)의 라디칼 소거 활성은 DPPH/ABTS 분석에서 최대 농도에서 대조군 대비 34.52±1.98%/60.71±1.26% 수준으로 관찰되었다. CCK-8 assay를 통한 FFE의 세포독성은 약 10% 농도부터 관찰 되어 독성이 없는 최대 농도를 5%로 설정하여 모든 실험에 적용하였다. FFE는 inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, interleukin-6 및 tumor necrosis factor- α 유전자 발현 억제와 함께 NO 생성을 농도 의존적으로 감소시켜 항염증 활성이 있음을 알 수 있었다. 또한 미백 기능 규명을 위해 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 FFE를 농도별로 처리한 결과 세포 내 멜라닌 생성을 유의하게 하향 조절했을 뿐만 아니라 시험관 내에서 tyrosinase 활성이 억제되었다. 또한 FFE는 RT-PCR에서 α -MSH 처리군에 비해 Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) mRNA 발현을 약 94.34% 감소시켰다. 마지막으로, FFE는 α -MSH로 자극된 B16F10 세포에서 MITF, cAMP response element-binding protein 및 tyrosinase 단백질 발현을 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과를 통해 우리는 FFE가 tyrosinase 효소 활성을 직접적으로 억제할 수 있을 뿐만 아니라 α -MSH 신호 기전 내 MITF 유전자 발현 조절을 통해 멜라닌 생성을 억제할 수 있음을 확인하였다.

Keywords 멜라닌 생성 억제 · 무화과 열매 추출물 · 피부 미백 · 항염증 · Microphthalmia associated transcription factor · Tyrosinase

Acknowledgment 본 과제는 2022년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 지자체-대학 협력기반 지역혁신 사업의 결과입니다 (2021RIS-001, 1345356234, 무화과 열매 추출물을 활용한 피부진정 및 항노화 화장품 소재 개발).

References

- Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R (2012) Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol* 30: 257–262. doi: 10.1016/j.cindermatol.2011.08.007
- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM (2008) The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17: 1063–1072. doi: 10.1111/j.1600-0625.2008.00786
- Choi DH, Kim MR, Kim MY, Kim HH, Park SY, Hwang HS (2019) Studies on Antioxidant, Anti-inflammatory and Whitening Effects of Oriental Herbal Extracts (Mix) including *Eucommiae cortex*. *J Soc Cosmet Scientists Korea*, 45: 37–47. doi: 10.15230/SCSK.2019.45.1.37
- Rosol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, Hauschildt S (2011) LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol* 31: 379–446. doi: 10.1615/critrevimmunol.v31.i5.20
- Kim SJ, Kim TJ, Kim EH, Kim YM (2020) Anti-inflammatory and Anti-oxidant Studies of Osung-tang Extracts in LPS-Induced RAW 264.7 Cells. *J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 33: 1–11. doi: 10.6114/jkood.2020.33.1.001
- Akira S (2003) Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 278: 38105–38108. doi: 10.1074/jbc.R300028200
- Lai JL, Liu YH, Liu C, Qi MP, Liu RN, Zhu XF, Zhou QG, Chen YY, Guo AZ, Hu CM (2017) Indirubin inhibits LPS-induced inflammation via TLR4 abrogation mediated by the NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Inflammation* 40: 1–12. doi: 10.1007/s10753-016-0447-7
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 18: 621–663. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.621
- Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911–1912. doi: 10.1126/science.1072682
- Brenner M, Hearing VJ (2008) The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol* 84: 539–549. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x
- Murase D, Hachiya A, Amano Y, Ohuchi A, Kitahara T, Takema Y (2009) The essential role of p53 in hyperpigmentation of the skin via regulation of paracrine melanogenic cytokine receptor signaling. *J Biol Chem* 284: 4343–4353. doi: 10.1074/jbc.M805570200
- Aroca P, Urabe K, Kobayashi T, Tsukamoto K, Hearing VJ (1993) Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. *J Biol Chem* 268: 25650–25655. doi: 10.1016/s0021-9258(19)74439-1
- Vachtenheim J, Borovanský J (2010) “Transcription physiology” of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. *Exp Dermatol* 19: 617–627. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.01053.x
- D’Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME (2016) Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci* 17:1144. doi: 10.3390/ijms17071144
- Shim J (2019) Whitening effect of brazilin in B16F10 cells. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology* 17: 287–294. doi: 10.20402/ajbc.2019.0281
- Kim HJ, Seo SH, Lee BG, Lee YS (2005) Identification of tyrosinase inhibitors from *Glycyrrhiza uralensis*. *Planta Med* 71: 785–787. doi: 10.1055/s-2005-871232
- Van Den Bossche K, Naeyaert JM, Lambert J (2006) The Quest for the Mechanism of Melanin Transfer. *Traffic*, 7: 769–778. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00425.x
- Choi DH, Jeon GC, Yoon JH, Min JH, Park SJ, Kim JS, Hwang HS (2019) Study on the Whitening Efficacy and Skin Barrier by Lysosome-related Organelle Extract (LOE) from Egg White. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 45: 389–397. doi: 10.3839/jabc.2022.013
- Yamaguchi Y, Beer JZ, Hearing VJ (2008) Melanin mediated apoptosis of epidermal cells damaged by ultraviolet radiation: factors influencing the incidence of skin cancer. *Arch Dermatol Res Suppl* 1: S43–50. doi: 10.1007/s00403-007-0807-0
- Cho JH, Kim JH, Eom SA, Kang MJ, Han YS, Hur MJ (2019) Investigation on the Safety of Hydroquinone and Preservatives among Whitening Functional Cosmetics Containing Albutin in Korea. *J Soc Cosmet Scientists Korea*, 45: 399–408. doi: 10.15230/SCSK.2019.45.4.399
- Hong SH, Park BR, Lee SB (2018) Preparation of Cosmeceuticals Containing *Broussonetia kazinoki* Extracts: Optimization Using Central Composite Design Method. *Appl Chem Eng* 6: 682–689. doi: 10.14478/ace.2018.1071
- Inoue Y, Hasegawa S, Yamada T, Date Y, Mizutani H, Nakata S, Matsunaga K, Akamatsu H (2013) Analysis of the effects of hydroquinone and arbutin on the differentiation of melanocytes. *Biol Pharm Bull* 36: 1722–1730. doi: 10.1248/bpb.b13-00206
- Wang W, Gao Y, Wang W, Zhang J, Yin J, Le T, Xue J, Engelhardt UH, Jiang H (2022) Kojic Acid Showed Consistent Inhibitory Activity on Tyrosinase from Mushroom and in Cultured B16F10 Cells Compared

- with Arbutins. *Antioxidants* (Basel) 11: 502. doi: 10.3390/antiox11030502
24. Jeong HL, Kim HW, Kim JH, Kim JH, Kim DU (2012) Cosmetic effect of mixed plant extracts including *Saururus Chinensis*, *Morus Bombycis* stem and *Morus Papyrifera* stem. *Korean Chem Eng Res* 50: 610–613. doi: 10.9713/kcer.2012.50.4.610
25. Draeos ZD (2007) Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. *Dermatol Ther* 20: 308–313. doi: 10.1111/j.1529-8019.2007.00144.x
26. Hwang HS, Yoo DS, Shim JH (2016) Whitening Effect of Banana Leaf Extract. *J Soc Cosmet Scientists Korea*, 42: 37–43. doi: 10.15230/scsk.2016.42.1.37
27. Barolo MI, Ruiz Mostacero N, López SN (2014) *Ficus carica* L. (Moraceae): An ancient source of food and health. *Food Chem* 164: 119–127. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.04.112
28. Kebal L, Pokajewicz K, Djebli N, Mostefa N, Poliwoda A, Wiecezorek PP (2022) HPLC-DAD profile of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant activity of *Ficus carica* L. fruits from two Algerian varieties. *Biomed Pharmacother* 155: 113738. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113738
29. Arvaniti OS, Samaras Y, Gatidou G, Thomaidis NS, Stasinakis AS (2019) Review on fresh and dried figs: Chemical analysis and occurrence of phytochemical compounds, antioxidant capacity and health effects. *Food Res Int* 119: 244–267. doi: 10.1016/j.foodres.2019.01.055
30. Cho UM, Choi DH, Yoo DS, Park SJ, Hwang HS (2019) Inhibitory Effect of Ficin Derived from Fig Latex on Inflammation and Melanin Production in Skin Cells. *Biotechnol Bioproc E* 24: 288–297. doi: 10.1007/s12257-019-0010-0
31. Salma S, Shamsi Y, Ansari S, Nikhat S (2020) *Ficus carica* L.: A Panacea of nutritional and medicinal benefits. *CELLMED* 10: 1–6. doi: 10.5667/tang.2020.0001
32. Ali B, Mujeeb M, Aeri V, Mir SR, Faiyazuddin M, Shakeel F (2012) Anti-inflammatory and antioxidant activity of *Ficus carica* Linn. Leaves. *Nat Prod Res* 26: 460–465. doi: 10.1080/14786419.2010.488236
33. Cha HJ, Kim JH (2020) *Ficus carica* leaf extract decreases melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. *Int J Clin Exp Med* 7: 4954–4959
34. Lee HN, Shin SA, Choo GS, Kim HJ, Park YS, Kim BS, Kim SK, Cho SD, Nam JS, Choi CS, Che JH, Park BK, Jung JY (2017) Anti-inflammatory effect of quercetin and galangin in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages and DNCB-induced atopic dermatitis animal models. *Int J Mol Med* 41(2): 888–898. doi: 10.3892/ijmm.2017.3296
35. Ahn HY, Heo SJ, Kang MJ, Lee JH, Cha JY, Cho YS (2011) Antioxidative activity and chemical characteristics of leaf and fruit extracts from *Thuja orientalis*. *J Life Sci* 21(5): 746–752. doi: 10.5352/jls.2011.21.5.746
36. Saha B, Singh SK, Sarkar C, Bera R, Ratha J, Tobin DJ, Bhadra R (2006) Activation of the MITF promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signaling to CREB. *Pigment Cell Res* 19: 595–605. doi: 10.1111/j.1600-0749.2006.00348.x
37. Di Petrillo A, González-Paramás AM, Era B, Medda R, Pintus F, Santos-Buelga C, Fais A (2016) Tyrosinase inhibition and antioxidant properties of *Asphodelus microcarpus* extracts. *BMC Complement Altern Med* 16(1): 453. doi: 10.1186/s12906-016-1442-0