Inhibitory effect of *Nymphoides indica* extract on α -MSH induced melanin synthesis

Dong-Hee Kim¹ · You-Ah Kim² · Jae-Myo Yu¹ · Chae-Bin Park² ·
Byoung-Jun Park² · Tae-Soon Park¹

어리연꽃 추출물이 α -MSH 유도에 의한 멜라닌 생성 억제에 미치는 영향

김동희¹ · 김유아² · 유재묘¹ · 박채빈² · 박병준² · 박태순¹

Received: 14 August 2017 / Accepted: 14 September 2017 / Published Online: 31 December 2017
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2017

Abstract In this study, the whitening activity of *Nymphoides indica* extract in B16F10 cells were measured. Inhibition rate of tyrosinase from mushroom was 42% at 1,000 μ g/mL. And inhibition of tyrosinase and melanin biosynthesis in B16F10 cells were 26 and 25% at 5 μ g/mL, respectively. The expression levels of cAMP and protein kinase A (PKA), which are higher levels of melanin-related factors, were found to be decreased in a dose-dependent manner. In addition, the expression rate of protein and mRNA of tyrosinase, tyrosinase related protein 1 (TRP1), tyrosinase related protein 2 (TRP2) and microphthalmia associated transcription factor (MITF). In this study, it was confirmed that the *N. indica* extract effectively inhibited the activity of tyrosinase, TRP1, TRP2 and MITF as well as the activity of PKA by effectively inhibiting cAMP. Therefore, it was confirmed that the *N. indica* extract has high value as a functional material.

Keywords B16F10 · Melanin · α -melanocyte stimulating hormone · *Nymphoides indica* · Tyrosinase

Tae-Soon Park (✉)
E-mail: taesoon2p@nikom.or.kr

¹Applied Product Development Team, National Development Institute of Korean Medicine, Gyeongsangbuk-do 38540, Republic of Korea

²Skin Science Research Institute, Kolmar Korea Co., Ltd., Chungcheongbuk-do 28116, 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

피부는 진피와 표피로 구성되어 있고 그 중 표피는 최외각에 위치하여 피부 보호 기능을 하며 각질형성세포로 이루어져 있다(Kim 2016). 피부 보호에 있어서 피부 장벽의 손상은 현대사회에서 증가하는 건조 환경 및 사회적 스트레스 등의 원인으로 악화되고 있으며 이를 개선하기 위한 천연소재 개발에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 특히 피부에 대한 관심이 높아짐에 따라 멜라닌 생성 억제에 관한 미백 소재 개발이 지속적으로 증가하고 있다.

피부에서 멜라닌은 피부색 결정에 관여를 하는데 이것은 멜라닌 생성세포가 합성하는 멜라닌의 양과 종류에 따라 결정되며, 또한 멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하고 여기에서 발생하는 활성산소를 제거하여 세포의 손상을 줄이는 역할을 하기도 한다(Kang 등, 2014). 멜라닌은 UV와 같은 외적인 요인이나 스트레스 및 호르몬 등의 내적요인에 의해 조절된다(Yamaguchi와 Hearing 2009; Cho 등, 2011). 또한 자외선에 의한 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)의 영향이 중요하며(Kim 등, 2011), α -MSH는 melanocortin 1 receptor (MC1R)와 결합하여 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)와 protein kinase A (PKA)를 통해 melanin 생성에 관련된 인자들을 활성화시켜 멜라닌 증식과 색소 증가에 관여하는 것으로 알려져 있다(Park 등, 2010; Park 등, 2011). 멜라닌 색소가 형성되는 산화반응 단계에 관여하는 효소로는 melanogenesis의 속도결정단계인 초기반응에 작용하는 tyrosinase, 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase인 tyrosinase related protein 1 (TRP-1), 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) chrome tautomerase로 불리는 tyrosinase related protein (TRP-2)이 있다(Jang 등, 2010; Chan 등, 2011; Gismondi 등, 2013; Kim 등, 2013). 즉 멜라닌은 tyrosine이 tyrosinase에 의해 DOPA로 전환되고,

다시 tyrosinase에 의해 DOPA quinone으로 전환되어 멜라닌을 생성하게 된다(Hearing 1999; Hwang과 Lee 2007). 따라서 tyrosinase의 활성 억제제는 피부내에서의 melanin중합체 생합성을 효과적으로 저해할 수 있으므로 유용한 효능 검증법으로 사용되어지고 있다(Jimenez-Cervantes 등, 1994; NO 등, 1999; Woo 등, 2009). 현재 arbutin, kojic acid, linoleic acid를 포함하는 많은 tyrosinase 저해제가 미백원료로 광범위하고 사용하고 있으나, 백반증(hydroquinone), 염증(kojic acid) 등의 부작용으로 제한된 양만 사용되고 있다(Chun 등, 2002; Seo 등, 2003). 따라서 tyrosinase 저해제를 통한 미백효과를 가져올 수 있는 독성이 없는 천연소재 물질에 대한 연구가 필요하게 된다. 어리연꽃(*Nymphaea indica* (L.) Kuntze)은 조름나물과(Menyanthaceae)에 속하는 다년생, 부엽성 수생식물로서 주변 못이나 호수에서 자라는 대표적인 수생식물이다(Oh 등, 2007). 뿌리줄기가 진흙 속에서 옆으로 길게 뻗고 잔뿌리가 사방으로 퍼지며, 줄기는 물속에서 자라고 끝부분에 1-3개의 잎이 달리고, 꽃은 7-8월에 핀다. 한방에서는 잎을 금은련화(金銀蓮花)라는 약재로 쓰는데, 갈증을 풀어주고 건위 효과가 있다(Jeong 등, 2010). 주요성분으로는 meliatin이 알려져 있고 기존에 연구결과를 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 어리연꽃의 추출물과 마우스 흑색세포(B16F10)를 이용하여 멜라닌 생합성 억제 기전에서 tyrosinase 저해로 인한 미백효과를 검증하고 미백화장품의 소재로서의 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

시료제조

본 실험에 사용된 어리연꽃은 국내산으로 광주광역시에 소재한 농업회사법인 (주)로터스그린에서 구매하여 사용하였으며, 국립생물자원관 생물자원연구부 식물자원과의 확증표본(NIBRPV 0000592689)으로 생물 종 판별 시스템에 의해 확인되었다. 어리연꽃의 전초는 음건한 후 실온에서 methyl alcohol에 3일 동안 침지시키고 이 과정을 3회 반복하여 농축 후 동결 건조하여 추출물을 얻었다.

시약 및 기기

세포독성 측정에 사용된 세포주는 마우스 멜라노마 세포인 B16F10으로 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였으며, mushroom tyrosinase, tyrosine, L-DOPA, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 세포배양을 위해 dulbecco's modified eagle medium, fetal bovine serum, penicillin/streptomycin, trypsin 250, 0.4% trypan blue stain와 RIPA buffer는 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하여 사용하였다. cAMP와 PKA kit는 Enzo (Farmingdale, NY, USA)에서 구매하였으며, 1차 항체 mouse anti-microphthalmia-associated transcription factor (MITF), TRP1, TRP2, goat anti-tyrosinase와 mouse-anti-goat IgG, rabbit-anti-mouse IgG 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. mRNA 측정된 시약인 Go Script™ Reverse Transcriptase, GoTaq® Flexi DNA

Polymerase는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 사용된 측정기기는 ELISA reader (Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 분석하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포를 48-well plate에 5×10^4 cells/well 이 되게 500 μ L씩 분주하고, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양 하였다. 배양 후 어리연꽃 추출물을 농도별로 처리 한 후 48시간 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL농도로 제조한 MTT 용액 50 μ L를 첨가하여 3시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 500 μ L를 가하여 실온에서 15분간 반응 시킨 뒤 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tyrosinase 저해활성 및 Melanin synthesis측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 버섯유래의 tyrosinase와 B16F10 세포내에서의 cellular tyrosinase 저해활성을 측정하였다. 먼저 버섯 유래의 tyrosinase 저해능은 0.175 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 100 μ L에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 40 μ L 및 시료용액 20 μ L의 혼합액에 mushroom tyrosinase (125 U/mL) 40 μ L를 첨가하여 25 °C에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였으며 (Yagi 등, 1986), B16F10에서 유래된 cellular tyrosinase 저해활성은 5×10^4 cells/well에 lysis buffer (67 mM sodium phosphate buffer, 1% triton X-100, 0.1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride) 80 μ L를 첨가한 후 얼음에 방치한 후 13,200 rpm에서 10분간 원심분리 하여 얻어진 상등액을 효소용액으로 사용하여 67 mM phosphate buffer, pH 6.8에 녹인 8.0 mM의 L-DOPA 160 μ L를 기질로, 세포 상등액 40 μ L를 첨가하여 37 °C에서 60분간 반응한 후, 생성된 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정하였다.

멜라닌 함량 측정은 상기의 B16F10세포의 원심분리 후 남은 pellet을 이용하여 멜라닌 함량 측정에 사용하였다. 상등액이 제거된 pellet을 건조 시킨 뒤 1 N NaOH 1 mL를 넣어 80 °C에서 1시간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 내 cAMP 및 PKA 농도 측정

세포 내 cAMP 농도는 Cayman사의 cAMP immunoassay kit (Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 측정하였다. 5×10^4 개의 B16F10 세포를 0.1 M HCl에 용해하여 phosphodiesterase 활성을 억제하였다. 상등액을 모아서 중화 시키고 희석하여 고정된 cAMP conjugate를 이용하여 면역반응 시켰으며, cell lysate를 이용하여 PKA conjugate와 면역반응 시켰다. 각각의 면역반응 반응 후 substrate solution을 넣어 결합한 효소의 활성 정도를 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot을 이용한 멜라닌 생성 관련 단백질의 발현 측정

멜라닌 생성 관련 인자 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 B16F10 세포를 6-well에 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 α -MSH (10 nM)를 처리한 뒤 각 well에 어리연꽃 추출물을 48시간 동안 처리한 뒤 cold PBS로 2번 세척해주었다. RIPA buffer를 이용하여 B16F10 세포를 용해시키고, 4 °C 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리 하였다. 원심 분리하여 얻은

Table 1 The sequences of the primers of the MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase and GAPDH for B16F10 cells

Gene	Primer	Sequence (5' 3')
MITF	Forward	AGC GTG TAT TTT CCC CAC AG
	Reverse	TAG CTC CTT AAT GCG GTC GT
TRP-1	Forward	ACT TCA CTC AAG CCA ACT GC
	Reverse	AGC TTC CCA TCA GAT GTC GT
TRP-2	Forward	GCT CCA AGT GGC TGT AGA CC
	Reverse	AAT GCA GTG GCT TGG AAA TC
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	TOC ACC ACC CTG TTG CTG TA

상층액은 BCA assay로 정량하여 25 µg의 단백질을 10%의 SDS-PAGE gel에서 전기영동 하여 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane에 옮긴 다음 실온에서 1시간 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 incubation 시켰다. 각각의 1차 항체를 1:1000으로 희석하여 4 °C에서 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 washing하고 mouse anti-rabbit IgG HRP의 각각의 2차 항체를 1:1,000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 붙이고, 3회 세척 후 LAS 4000 image analyzer (Fugifilm life science, Tokyo, Japan)기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량 하였다.

RT-PCR을 이용한 멜라닌 생성 관련 mRNA 발현 측정

어리연꽃 추출물의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF 유전자 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 B16F10 세포를 6-well에 1×10^5 cells/well이 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 시료를 농도별로 처리한 배지로 교환하고 48시간 동안 처리한 뒤 cold PBS로 세척해주었다. Total RNA는 PBS로 3번 세척하고 세포를 포집한 다음 trizol reagent (Biosesang, Seongnam, Korea)를 이용하여 분리하였다. Total RNA 0.8 µg과 PCR primer oligonucleotide를 RT-PCR mixer와 혼합하고 PT-PCR을 시행하였다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF의 염기서열은 Table 1과 같다. PCR 조건은 94 에서 30 초(denaturation), 50 °C에서 45초(annealing), 72 °C에서 90초(extension)의 반응을 30-35회 반복하는 것을 기본으로 target cDNA 종류에 따라 최적의 조건으로 조절하였다. 증폭된 cDNA는 1.5% agarose gel을 사용한 전기영동으로 분리하고 LAS 4000 image analyzer으로 확인하였다.

통계처리

본 실험의 통계처리는 SPSS 12.0을 사용하였다. 각 실험군의 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 각 실험군의 간의 결과는 t-test를 사용하여 분석하고 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 검정하였다. 실험군 간의 차이는 95% 수준 ($*p < 0.01$, $**p < 0.001$)에서 유의성 있는 것으로 하였다.

Fig. 1 Cell viability of methanol extract from *Nymphoides indica* in B16F10. Bars indicate Mean $\pm$ standard deviation of triplicate. Bars indicate Mean $\pm$ standard deviation of triplicate. $*p < 0.01$, $**p < 0.001$ compared with control group. Cont: treated with α -MSH

결과 및 고찰

B16F10세포내 어리연꽃 추출물의 생존율 평가

어리연꽃 추출물의 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 평가한 결과 Fig. 1과 같이 나타내었다. 추출물의 농도를 5, 10, 25, 50, 75, 100 µg/mL로 처리 후 세포 독성을 측정된 결과 5, 10, 25 µg/mL의 농도까지 90%이상의 세포 생존율을 나타내었으며 50, 75, 100 µg/mL의 농도에서는 80% 미만의 낮은 세포 생존율을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 B16F10 세포를 이용한 tyrosinase, 멜라닌 생합성, 미백관련 신호전달 단백질 및 mRNA 발현 실험은 어리연꽃 추출물 25 µg/mL 이하의 농도에서 실험을 진행하였다.

어리연꽃 추출물의 Tyrosinase 및 멜라닌 생합성 저해활성

Tyrosinase 저해제는 미백화장품의 주요 기능성 성분으로 임상적으로 피부암과 과색소 침착에 관련되는 피부병 치료에 유효한 것으로 알려져 있다(Yang 등, 2008). 따라서 본 연구에서는 먼저 버섯 유래의 tyrosinase를 사용하여 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 µg/mL의 어리연꽃 추출물을 처리하여 효소활성을 측정된 결과 1,000 µg/mL의 농도에서 52%의 저해능을 나타내었다. 반면 만형자 열수추출물은 동일한 농도에서 46.67% (Lee 등, 2009)로 다소 낮은 저해효과를 보여주었다. 또한, B16F10 세포에서의 cellular tyrosinase 활성을 억제하는 알아보기 위하여 B16F10 세포에 어리연꽃 추출물 5, 10, 25 µg/mL의 농도로 처리한 결과 각각 10, 18, 35%로 농도 의존적 저해능을 나타내었다. 이에 반해 싸리꽃 에탄올 추출물은 25 µg/mL의 농도에서 16.2% (Ryu 등, 2007), 여정자 추출물은 동일 농도에서 26.2% (Han 등, 2010)로 다소 낮은 저해활성을 보여주었다. 멜라닌 생합성 저해능을 측정된 결과 25 µg/mL에서 33%의 저해능을 나타내었다(Fig. 2). 반면 연잎 에탄올 추출물의 경우 동일한 농도에서 19.8% (Chang 등, 2007)의 저해활성을 보여주었다. 이러한 결과로 보아 어리연꽃 추출물은 B16F10 세포내에서의 tyrosinase 활성을 저해시킴으로써 멜라닌 생합성 저해에 효능이

Fig. 2 Effect of *Nymphoides indica* on inhibition of tyrosinase and melanin synthesis. (A): mushroom tyrosinase activity, (B): cellular tyrosinase activity, (C): melanin synthesis rate. Bars indicate Mean $\pm$ standard deviation of triplicate. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ compared with control group. Nor: non-treated. Cont: treated with α -MSH

Fig. 3 Decreased cAMP levels in B16F10 cells by methanol extract *Nymphoides indica* treatment. Bars indicate Mean $\pm$ standard deviation of triplicate. * $p < 0.01$ compared with control group. Nor: non-treated. Cont: treated with α -MSH

있음을 확인 할 수 있었다. 이 3가지의 결과에서 어리연꽃 추출물은 세포내에서 tyrosinase가 작용하는 상위단계 과정에 영향을 미쳐 활성을 억제한 것이라 추정되어 cAMP/PKA 경로의 인자들의 단백질 및 유전자 발현 저해능을 측정하였다.

B16F10 세포내 어리연꽃 추출물의 cAMP와 PKA 저해활성 측정
 α -MSH의 작용은 MC1R의 활성화를 통해 이루어지며 그 결과 세포 내 cAMP의 농도가 증가하고 cAMP의 하위 인자인 PKA의 농도도 증가한다. 이어서 melanocyte의 수치상 돌기, tyrosinase 활성 및 멜라닌 생성이 증가하게 된다(Buscà와 Ballotti 2000; Kim 등, 2011). 따라서 어리연꽃 추출물의 농도에 따른 cAMP와 PKA의 활성을 측정한 결과를 Fig. 3과 같이 나타내었다. 어리연꽃 추출물 5, 10, 25 µg/mL 농도를 처리한 결과 농도 의존적으로 cAMP와 PKA의 활성이 저해 되는 것을 확인하였으며, 특히 PKA의 높은 저해 활성을 확인할 수 있었다.

어리연꽃 추출물의 멜라닌 생성 관련 단백질 및 유전자 발현 저해효과

멜라닌 생합성 신호전달 체계에는 다양한 신호전달물질이 관여하고 있으며 주요한 세포 내 신호전달 경로는 cAMP/PKA 경로로서, cAMP는 PKA, cAMP responsive element binding protein 1을 경유하여 MITF의 발현을 촉진한다. 활성화된 MITF는 멜라닌 생성 과정에서 중요한 전사 조절 인자로 tyrosinase, TRP-1와 TRP-2 전사를 활성화 시키는 것으로 알려져 있다(Eipper와 Mains 1980; Thody 등, 1983). 이에 어리연꽃 추출물의 멜라닌 생합성 관련 인자 단백질 및 유전자 발현 정도를 측정하였다. 먼저 멜라닌 생합성 관련 단백질 발현의 경우 어리연꽃 추출물이 농도 의존적으로 발현을 저해시켰다. 특히 tyrosinase의 경우 25 µg/mL에서 40% 이상의 발현을 저해하여 가장 높은 저해능을 나타내었으며, MITF는 38%, TRP-1은 33%, TRP-2는 35%의 발현 저해능을 나타내었다(Fig. 4). 반면

Fig. 4 Inhibition effects *Nymphoides indica* extract on whitening related proteins of melanogenesis in B16F10 cells. Protein were detected by western blotting analysis with their own antibodies. Graph showed normalization of proteins. All signal of proteins except tyrosinase, MITF, TRP-1 and TRP-2 were divided by β-actin's signal. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ compared with control group. Nor: non-treated. Cont: treated with α-MSH

Fig. 5 Inhibition effects *Nymphoides indica* extract on whitening related mRNA of melanogenesis in B16F10 cells. Melanin related mRNA was detected by reverse transcription PCR. Graph showed normalization of proteins. All signal of proteins except tyrosinase, MITF, TRP-1 and TRP-2 were divided by GAPDH's signal. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ compared with control group. Nor: non-treated. Cont: treated with α-MSH

에 회화나무 꽃 추출물은 동일한 농도에서 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 순서로 각각 24.7, 42.6, 19.4, 1.8%로 보다 낮은 저해활성을 보여주었다(Jang과 Park 2017). 또한 어리연꽃 추출물의 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2의 유전자발현에 미치는 영향을 확인한 결과 멜라닌 생성 관련 단백질 발현 저해능과 유사한 결과를 나타내었다. 어리연꽃 추출물은 농도 25 μg/mL에서 대조군과 비교하여 tyrosinase mRNA의 경우 31% 저해능을 MITF mRNA의 경우 50% 이상의 저해능을 나타내었으며, TRP-1, TRP-2의 mRNA 발현 저해활성이 낮음을 확인하였다(Fig. 5). 기존에 보고된 청미래 덩굴 뿌리 추출물의 tyrosinase 및 MITF mRNA 저해율은 동일 농도에서 각각 10, 20%로 나타나 낮은 저해활성을 보여주었다(Lee 등, 2015).

이상의 결과를 통해 어리연꽃 추출물이 cAMP/PKA 경로에서 cAMP, PKA의 발현 저해를 통해 멜라닌 생성 관련 인자인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF 단백질 및 유전자들의 발현을 효과적으로 저해하여 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 사료된다. 따라서 어리연꽃 추출물은 기능성 미백 소재 개발에 응용할 수 있는 우수한 소재가 될 것이다.

초 록

본 연구에서는 어리연꽃 추출물의 B16F10 세포에서의 미백활성을 측정하였다. 버섯유래의 tyrosinase 활성 저해능 측정결과 1,000 μg/mL의 농도에서 42%의 저해율을 나타내었으며, B16F10 세포내의 tyrosinase, 멜라닌 합성성 저해능은 5 μg/mL에서 26, 25%의 저해능을 나타내었다. 멜라닌 생성 관련 인자 중 상위 단계인 cAMP와 PKA의 발현을 측정하고 결과 농도 의존적으로 발현양이 줄어드는 것을 확인하였다. 또한 어리연꽃 추출물의 미백과 관련된 tyrosinase, tyrosinase related protein (TRP) 1, TRP2, microphthalmia associated transcription factor (MITF)의 단백질 및 유전자 발현양이 감소함을 나타내었다. 본 실험을 통하여 어리연꽃 추출물이 cAMP를 효과적으로 억제함으로써, PKA의 활성을 저해 시켰으며, 이를 통해 tyrosinase 활성뿐만 아니라 TRP1, TRP2 그리고 MITF 발현을 효과적으로 저해 한다는 사실을 확인하여 기능성 미백 화장품 소재로서의 활용 가능성을 제시하고자 한다.

Keywords 멜라노마 세포 · 멜라닌 · 미백 · 어리연꽃 · 티로시나아제

감사의 글 본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (과제고유번호HN15C0103).

References

- Buscà R, Ballotti R (2000) Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* 13(2): 60–69
- Chan YY, Kim KH, Cheah SH (2011) Inhibitory effects of Sargassum polycystum on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *J Ethnopharmacol* 137(3): 1183–1188
- Chang MS, Kim HM, Yang WM, Kim DR, Park EH, Ko EB, Choi MJ, Kim HY, Oh JH, Shim KJ, Yoon JW, Park SK (2007) Inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* on tyrosinase activity and melanogenesis in clone M-3 melanocyte cells. *Kor J Herbol* 22(4): 87–94
- Cho HR, Kang KA, Bhuiyan MH, Oh MS, Lee MH, Kim YJ (2011) Antimelanogenic effect of *Pini Nodi Lignum* extract in HM3KO melanoma cells. *Mol cell Toxicol* 7(2): 135–139
- Chun HJ, Choi WH, Baek SH, Woo WH (2002) Effect of quercetin on melanogenesis in melan-a melanocyte cells. *Kor J Pharmacol* 33: 245–251
- Eipper BA, Mains RE (1980) Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides. *Endocr Rev* 1(1): 1–27
- Gismondi A, Canuti L, Impei S, Di Marco G, Kenzo M, Colizzi V, Canini A (2013) Antioxidant extracts of African medicinal plants induce cell cycle arrest and differentiation in B16F10 melanoma cells. *Int J Oncol* 43(3): 956–964
- Han GS, Kim DS, Woo WH, Mun YJ (2010) Inhibitory effect of fructus *Ligustri Lucidi* on tyrosinase and MITF expressions. *Kor J Ori Physiol Pathol* 24(2): 296–301
- Hearing VJ (1999) Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J Invest Dermatol Symp Proc* 4(1): 24–28
- Hwang J, Lee BM (2007) Inhibitory effects of plant extracts on tyrosinase, L-DOPA oxidation, and melanin synthesis. *J Toxicol Environ Health A* 70(5): 393–407
- Jang JY, Kim HN, Kim YR, Kim BW, Choi YH, Choi BT (2010) Studies of Inhibitory Mechanism on Melanogenesis by Partially Purified *Asiasari radix* in α -MSH Stimulated B16F10 Melanoma Cells. *J Life Sci* 20(11): 1617–1624
- Jang TW, Park JH (2017) Evaluation of Whitening Activities of Flower and Fruit of *Sophora japonica* L. *Kor J Plant Res* 30(1): 22–28
- Jeong YO, Park NB, Gwak JS, Jeong SJ (2010) *Yasaenghwadogam*. Purenhaengbok, Seoul
- Jimenez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, Urabe K, Hearing VJ, Lozano JA, Garcia-Borrón JC (1994) A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *J Biol Chem* 269(27): 17993–18000
- Kang MK, Lee YE, Woo WH, Mun YJ (2014) *Commelina communis* Ledeb inhibits melanin synthesis in α -MSH-stimulated B16F10 cells. *J Physiol Pathol Korean Med* 28: 506–511
- Kim AY, Yim NH, Im MJ, Jung YP, Liang C, Cho WK, Ma JY (2013) Ssanghwa-tang, an oriental herbal cocktail, exerts anti-melanogenic activity by suppression of the p38 MAPK and PKA signaling pathways in B16F10 cells. *BMC Complement Altern Med* 13(1): 214
- Kim DS, Sung BG, Lee JC, Lee BK, Woo WH, Lim KS (2011) Inhibitory Effect of *Belamcandae Rhizoma* on the Melanogenesis in MSH-stimulated B16F10 cells. *J Kor Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol* 24(1): 25–35
- Kim HS (2016) The anti-melanogenic effect of *Geranium kraneru* Extract. *Korean J Food Sci Technol* 48(1): 72–76
- Lee SY, Yoo DH, Joo DH, Jo HS, Lee JY (2015) Inhibitory Efficacy of *Smilax china* L. on MITF, TRP-1, TRP-2, Tyrosinase Protein and mRNA Expression in Melanoma Cell (B16F10) Microbiol Biotechnol Lett 44(1): 1–8
- Lee YS, Choi BD, Joo EY, Shin SR, Kim NW (2009) Antioxidative activities and tyrosinase inhibition ability in various extracts of the *Vitex rotundifolia* seeds. *Kor J Food Preserv* 16(1): 101–108
- No JK, Soung DY, Kim YJ, Shim KH, Jun YS, Rhee SH, Yokozawa T, Chung HY (1999) Inhibition of tyrosinase by green tea components. *J Life Sci* 65(21): 241–246
- Oh MJ, Min SR, Liu JR, Kim SW (2007) Plant regeneration from floral stem cultures of *Nymphoides indica* (L.) O. Kuntze. *Via somatic embryogenesis*. *J plant Biotechnol* 34(1): 7–10
- Park SY, Jin ML, Kim YH, Kim YH, Lee SJ (2011) Aromatic-turmerone inhibits α -MSH and IBMX-induced melanogenesis by inactivating CREB and MITF signaling pathways. *Arch Dermatol Res* 303(10): 737–744
- Park SY, Kim YH, Kim YH, Park GT, Lee SJ (2010) Beta-carboline alkaloids harmaline and harmalol induce melanogenesis through p38 mitogen-activated protein kinase in B16F10 mouse melanoma cells. *BMB Reports* 43(12): 824–829
- Ryu IS, Park SJ, Mun YJ, Ko JS, Shin KD, Lee JC, Woo HW, Lim KS (2007) Inhibitory effects of Flowers of *Lespedeza bicolor* on Tyrosinase Activity and Melanin Synthesis. *Kor J Ori Physiol Pathol* 21(5): 1142–1147
- Seo SY, Sharma VK, Sharma N (2003) Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *J Agric Food Chem* 51(10): 2837–2853
- Thody AJ, Ridley K, Penny RJ, Chalmers R, Fisher C, Shuster S (1983) MSH peptides are present in mammalian skin. *Peptides* 4(6): 813–816
- Woo HS, Choi HJ, Han HS, Park JH, Son JH, An BJ, Son GM, Choi C (2009) Isolation of polyphenol from Green Tea by HPLC and its physiological activities. *Kor J Food Sci Technol* 35(6): 1199–1203
- Yagi A, Kanbara T, Morinobu N (1986) The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta medica* 3981: 517–519
- Yamaguchi Y, Hearing VJ (2009) Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* 35(2): 193–199
- Yang ES, Hwang JS, Choi HJ, Hong RH, Kang SM (2008) The effect of genistein on melanin synthesis and in vivo whitening. *Kor J Microbiol Biotechnol* 36(1): 72–81