

호장으로부터 분리한 Polydatin의 미백 및 주름억제 효능에 대한 연구

진 무 현 · 정 의 택 · 김 미 선 · 송 혜 진 · 곽 택 종 · 박 선 규 · 이 상 민[†]

(주)LG생활건강 기술연구원

(2011년 10월 4일 접수, 2011년 10월 31일 수정, 2011년 11월 2일 채택)

The Effects of Polydatin Isolated from *Polygonum cuspidatum* on Melanogenesis and Wrinkle Formation

Mu Hyun Jin, Eui Taek Jeong, Mi-Sun Kim, Hye Jin Song, Taek-jong Kwak,
Sun Gwoo Park, and Sang Min Lee[†]

LG Household and Health Care Co. Ltd., Research Park, 84 Jang-Dong, Yuseong-Gu, Daejeon 305-343, Korea

(Received October 4, 2011; Revised October 31, 2011; Accepted November 2, 2011)

요약: 5,4'-dihydroxystilbene-3-O-D-glucopyranoside (polydatin)는 호장(*Polygonum cuspidatum*)에 존재하는 stilbenes류의 하나로 지금까지 피부에서의 효능이 잘 알려지지 않았다. 우리는 호장으로부터 Polydatin을 분리하여 얻었으며, 피부유래의 멜라노사이트와 fibroblast를 이용하여 효능을 검증하였다. 실험결과 멜라노사이트에서 polydatin은 타이로시네이즈 활성과 멜라닌 생성을 억제하였고, 멜라닌 생합성 과정에 관여하는 타이로시네이즈와 전사인자인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현을 억제하는 것을 확인하였다. 미백효과가 확인된 polydatin에 대하여 human fibroblast를 대상으로 type I procollagen 생합성에 미치는 영향을 분석한 결과 polydatin은 농도 의존적으로 콜라겐 합성을 촉진함을 알 수 있었다. 또한 polydatin의 피부에서의 효능을 검증하기 위해 인체효력시험을 통해 주름개선과 미백개선 효능을 검증하였으며 이를 통해 주름과 미백기능에 있어 유의한 효과를 확인하였다. 이상의 결과로부터 polydatin은 안전한 피부 미백 개선제 및 주름개선제로 사용될 수 있는 후보물질임을 제안하며, 상업적으로 활용하기 위해 원료화를 성공하였다.

Abstract: 5,4'-dihydroxystilbene-3-O- β -D-glucopyranoside (Polydatin) is one of the stilbenes found in *Polygonum cuspidatum* (*P. cuspidatum*), however, the effects of polydatin on skin biology remain to be elucidated. In this study, we obtained polydatin from *P. cuspidatum* and investigated the effects of polydatin in skin-derived melanocytes and fibroblasts. In melanocytes, polydatin inhibited not only the tyrosinase activity and melanin production but the expression of melanogenic factors, tyrosinase and microphthalmia-associated transcription factor (MITF). In addition, the level of type I procollagen in fibroblasts was analyzed, and polydatin significantly induced the production of type I procollagen in a dose-dependent manner. Finally we conformed that topical treatment of polydatin improved wrinkle and induced whitening of human skin *in vivo*. These data provide evidence that polydatin can be a potent candidate for the improvement of both skin wrinkle and whitening from the point of industry view.

Keywords: *Polygonum cuspidatum*, 5,4'-dihydroxystilbene-3-O-D-glucopyranoside, melanogenesis, MITF, collagen synthesis

1. 서 론

호장은 동양에서 예로부터 다양한 염증성 질병, 설사,

간염, 중양, 피부병에 사용했었다. 호장의 뿌리에서 분리해낸 stilbenes는 항산화능력과 타이로시네이즈 억제효과가 있는 것으로 보고되었으며[1,2], 그 중 몇 가지 stilbenes는 타이로시네이즈를 억제하는 효과가 있음이 밝혀졌다[3,4]. 우리는 본 연구를 통하여 호장으로부터

[†] 주 저자 (e-mail: smleeb@lgcare.com)

stilbenes 종류 중 하나인 5,4'-dihydroxystilbene-3-O- β -D-glucopyranoside (polydatin)를 분리하였고, polydatin의 피부에서의 효능을 관찰하고자 멜라닌 형성, 콜라겐 합성에 미치는 효과 및 피부 미백과 주름 생성에 미치는 효과를 연구하였다.

멜라닌은 피부와 머리카락의 색상을 결정하는 주요한 인자이며 자외선으로부터 피부세포를 보호하기 위한 역할을 가지고 있다[5]. 그러나 과도한 멜라닌의 축적은 주근깨, 기미와 같은 과색소 현상을 유발한다. 표피층의 basal layer에 존재하는 멜라닌 형성 세포에는 멜라노솜이라고 불리는 특정한 구조를 가지고 있으며 이곳에서 melanogenic enzymes들의 도움을 받아 멜라닌이 만들어진다[6,7]. 멜라닌 형성과정은 melanocyte specific enzymes인 타이로시네이스와 tyrosinase-related proteins (TRPs) 등에 의해 조절되며[8,9] 크게 두 가지 타입의 멜라닌이 만들어지는데, 노란색에서 붉은색의 색소를 보이는 페오멜라닌과 검은색에서 갈색을 띠는 유멜라닌이다[10]. 멜라닌 생성에 필요한 타이로시네이스는 tyrosine을 3,4-dihydroxyphenyl-alanine (DOPA)으로 변환시키고, 이것이 DOPA quinone으로 산화되는 것을 촉진하며, 5,6-dihydroxyindole (DHI)을 indole-5,6-quinone으로 산화하는 것을 촉진한다. 반면 TRPs는 그 뒤 단계인 eumelanogenesis에 관여한다[11,12]. 또한, 멜라닌 형성의 조절인자로 잘 알려진 Microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 helix-loop-helix-leucine zipper 구조를 가진 transcription factor로서 멜라닌 형성을 통한 흑화과정, 세포의 증식 및 생존을 조절함이 잘 알려져 있다[13-16]. MITF는 타이로시네이스 및 TRPs의 M-box sequences에 결합하여 멜라닌 형성에 관여하는 효소들의 발현을 조절하는 것으로 잘 알려져 있기 때문에[17] 멜라닌 합성을 조절하는 skin-lightening agents를 개발하기 위한 주요 타겟으로서 여겨지고 있다[13,18-21].

콜라겐은 진피의 85 %를 구성하는 주요 세포의 기질 단백질(extracellular matrix)로서 섬유아세포로부터 생성된다. 콜라겐의 주된 기능으로는 피부의 기계적 견고성, 결합조직의 저항력과 조직의 결합력, 세포접착의 지탱, 세포증식과 분화(유기체의 성장 혹은 상처치유)에 관여함이 알려져 있다[22]. 피부의 진피에 존재하는 콜라겐은 연령이 증가할수록 감소하며(내인성노화) 자외선에 노출될수록 감소한다(광노화). 이러한 진피 내 콜라겐의 감소는 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있음이 잘 알려져 있다[23-25]. 또한, 콜라겐은 상처치유에

있어서도 중요한 역할을 담당하며, 손상된 피부에서 콜라겐의 합성을 촉진시켜 상처를 신속하게 회복시킬 수 있다.

본 연구에서, 우리는 호장에서 polydatin을 분리 및 동정하였고, polydatin이 멜라닌형성 세포인 melan-a cells로부터 멜라닌을 생성함에 있어서 억제효능을 가지는지 조사하였으며, 인체유래의 섬유아세포를 이용하여 콜라겐 합성 촉진 효능이 있는지 조사하였다. 마지막으로 사람의 피부에서 미백과 주름개선 효능이 있는지 임상시험을 통해 확인하였다.

2. 재료 및 실험방법

2.1. 재료준비

서울 경동시장에서 호장을 구입하여 사용하였다. 개방형 칼럼 크로마토그래피를 위해 RP C1 column (Shiseido C1 DM1020, 200 μ m, Japan)을, TLC 분석을 위해 silica gel 60F254 (Merck, Germany), Prep-HPLC (Shimadzu Prominence LC8A, Japan)를 위해 Prevail RP C18 column (Alltech, 10 mm \times 250 mm, USA)을 각각 사용하였다. 구조분석을 위해 Auto Spec mass spectrometer (Micromass, UK)와 Bruker DMX-400 FT-NMR spectrometer IR-435 (Shimadzu, Japan)를 사용하였다. 세포 배양을 위해서 사용한 배지는 Gibco BRL사(Long Island, NY)에서 구입하여 사용하였으며, Arbutin, L-tyrosine, phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT), Triton X-100은 Sigma사로부터 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 구입하여 사용하였다. Protease inhibitor cocktail은 Boehringer-Mannheim (Indianapolis, IN)에서 구입하여 사용하였으며 L-[U-14C] tyrosine와 [3H] tyrosine는 Amer-sham사로부터(Piscataway, NJ) 구입하였다. 콜라겐 분석을 위해 사용한 Emzyme-linked immunosorbent assay kit는 TAKARA (Japan)사에서 구입하였다. 실험에 사용한 모든 항체는 Santa Cruz (Santa Cruz Co. CA, USA)사에서 구입하여 사용하였다.

2.2. Polydatin 분리

호장의 건조된 뿌리 5 kg을 50 L 에탄올로 70 $^{\circ}$ C에서 4 h 동안 3회 추출하고 감압농축하여 에탄올 추출물을 얻었다. 농축된 에탄올 추출물 1.4 kg을 50 $^{\circ}$ C 물에 현탁하고 지질을 제거하기 위해 같은 부피의 클로로포름을

가지고 용매분획하였다. 남은 물층에 같은 부피의 부탄올을 가지고 용매분획하여 물층과 부탄올층을 분리하였다. Melanogenic-inhibitory activity ($IC_{50} = 100 \mu\text{g/mL}$)를 보이는 216 g의 부탄올층 농축물을 물-메탄올 혼합용액(25 : 75)으로 C1 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 12개의 분획을 얻었다. 12개의 분획 중 3개 분획에서 강한 melanogenic-inhibitory activity를 보였고, 이들 3개 분획을 다시 물-메탄올 혼합용액(4 : 6 - 3 : 7)으로 C18 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 polydatin이 주성분인 분획을 얻었다. 주성분 분획은 물-메탄올 혼합용액(6 : 4)을 가지고 C18 prep-column을 이용한 prep-HPLC를 수행하여 6 g의 polydatin을 고순도로 분리하였다. 이 화합물의 물리적 특성인 용점(MELTEMP- II laboratory devices, Inc., USA) 및 UV spectrum에서의 최대 흡수파장(DU 7500 Spectrophotometer, Beckman counter, USA)을 측정하였다. Polydatin의 구조와 형태는 spectrometric methods로 규명하였으며, ^{13}C -NMR 및 ^1H -NMR (Bruker DRX 600 MHz, Germany) 스펙트럼 분석 데이터를 이전의 assignment 데이터와 비교하여 최종적으로 본 화합물이 polydatin임을 확인하였다[26,27].

2.3. 세포배양

Melan-a melanocytes는 Dr. Bennette D.C. (St. George's Hospital, U.K.)로부터 얻었다. Melan-a cells는 C57BL mice 유래의 nontumorigenic melanocyte cell line이다. Melan-a cells는 37°C , 5 % CO_2 인큐베이터에서 배양하였으며 세포는 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), β -mercaptoethanol $100 \mu\text{M}$, penicillin 50 U/mL , streptomycin $50 \mu\text{g/mL}$, L-glutamine 2 mM , PMA 200 nM [28]을 첨가한 RPMI 1640 배지(Gibco BRL, USA)를 사용하여 배양하였다. 사람 foreskin 유래의 인체 피부 섬유아세포는 ATCC로부터 구입하였으며, 10 % FBS가 첨가된 DMEM (Gibco BRL, USA) 배지를 사용하여 37°C , 5 % CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

2.4. 멜라닌 정량

세포추출액을 $15,000 \text{ rpm}$ 에서 5 min 동안 원심분리하여 얻은 침전물을 1 N NaOH에 녹여 상대적 인 멜라닌 함량은 Power Wave X340 ELISA reader (Bio-tech Instruments Inc., Winooski, VT)에서 405 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 타이로시네이즈 활성도 측정

타이로시네이즈의 활성도는 Virador 등의 방법을 변형하여 사용하였다[29]. 간단히 설명하면, 세포추출액을 96-well plates에 분주한 뒤, 0.01 % 알부민을 함유한 pH 7.2의 1 M sodium phosphate buffer를 만들어 $10 \mu\text{L}$ 의 L-[U- ^{14}C] tyrosine과 $10 \mu\text{L}$ 의 L-DOPA cofactor 0.25 mM 을 더한 시약을 만들어 4 h 동안 37°C 에서 반응시킨 뒤 차갑게 보관하여 반응을 중지시킨다. 각 well의 내용물을 지름 2.5 cm의 3M filter disks (Whatman, U.K.)에 옮긴 뒤 공기 중에 말린다. Disks를 excess cold L-tyrosine을 함유한 0.1 N HCl로 2번, 95 % 에탄올로 1번 세척하고 아세톤으로 세척한다. 각 disk를 공기 중에 말린 뒤 liquid scintillation vial에 넣어 scintillation cocktail을 넣어 LS 6500 scintillation system (Beckman, CA, USA)으로 radioactivity를 측정한다.

2.6. Quantitative Real Time PCR

RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germany)으로 샘플을 처리한 Melan-a cells에서 전체 RNA를 추출하고 RNA 샘플을(100 mg/reaction) QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN, Germany)과 특정 primer로 증폭하였다. 사용한 primers는 다음과 같다. 타이로 시네이즈(TYR_L: 5'-CTT GGA ACA AGC CAG TCG TA-3' TYR_R: 5'-TGG GGT TGC TTC TTCTTC TT-3'); MITF (MITF_L: TCG GAT CAT CAA GCA AGA AC; MITF_R: CCG AGG TTG TTG GTA AAG GT); β -actin (-actin_L: ACG GCC AGG TCA CTA TT; -actin_R: ACG GAT GTC AAC GTC ACA CT). 모든 primers는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 주문 제작하였다.

2.7. Western Blot

Melan-a cells를 $2.5 \times 10^4 \text{ cells/well}$ 농도로 6-well plates에 밤새 키운 뒤 다음날 polydatin을 처리하고 48 h 동안 더 배양하였다. 반응이 끝난 세포를 모은 후 extraction buffer (Intron biotechnology, Korea)와 protease inhibitor cocktail (Roche, IL)로 용출시키고, BCA 방법으로 단백질 농도를 측정하였다. 4 ~ 12 % NuPAGE Bis-Tris gels (Invitrogen, CA)에 동량의 단백질을 loading하고 전기영동으로 전개시킨 뒤 nitrocellulose membranes (Invitrogen, CA, USA)로 이동시켰다. Membranes를 5 % nonfat skim milk를 함유한 TBS buffer로 1 h 동안 blocking한 뒤, 특정 1차 항체인

Table 1. ^{13}C - and ^1H -NMR Spectral Data for Polydatin

Position	$\delta\text{ C}$	$\delta\text{ H}$ (J in Hz)
1	141.6	
2	107.1	6.66 <i>t</i> (2.0)
3	160.4	
4	104.1	6.46 <i>t</i> (2.0)
5	159.4	
6	108.4	6.80 <i>t</i> (2.0)
7	126.6	6.90 <i>d</i> (16.5)
8	130.0	7.80 <i>d</i> (16.5)
1'	130.3	
2'	128.9	7.41 <i>d</i> (8.5)
3'	116.5	6.83 <i>d</i> (8.5)
4'	158.3	
5'	116.5	6.83 <i>d</i> (8.5)
6'	128.9	7.41 <i>d</i> (8.5)
Glc 1''	102.3	4.93 <i>d</i> (7.7)
2''	74.9	3.45 <i>t</i> (8.9)
3''	78.0	3.51 <i>m</i>
4''	71.4	3.43 <i>t</i> (8.9)
5''	78.1	3.53 <i>m</i>
6''	62.5	3.91 <i>dd</i> (11.8), 3.71 <i>dd</i>

Chemical shifts (ppm) were recorded at 600 MHz for ^1H - (in Acetone- d_6) and for ^{13}C -NMR (in Methanol- d_4). Glc = -D-glucopyranosyl. Multiplicity patterns were unclear due to signal overlapping

타이로시네이즈 (sc-7833) 및 MITF (sc-10999)로 반응시켰다. Membranes를 1 : 2000으로 희석한 2차 항체, HRP-conjugated anti-goat IgG와 반응시키고, TBST로 씻어준 다음, ECL kit (Amersham, UK)를 사용하여 반응시키고, 필름을 사용하여 immunoreactive bands를 탐지하였다.

2.8. 콜라겐 정량

제I형 전구콜라겐 C말단 펩타이드의 양을 PICP EIA kit (Cat. # MK101, Takara shuzo, Japan)을 이용하여 분석하였다. 효소면역 측정과정은 one step sandwich method로서 PIP (procollagen I peptide)에 대한 마우스 단클론항체로 96 well을 코팅하고 37 °C에서 3 h 동안 20 μL 의 세포배양액과 peroxidase로 표지한 항마우스 PIP 단클론항체를 반응시키고 H_2O_2 와 para-phenylenediamine으로 발색시킨 후 1 N 황산을 첨가하여 반응을 종결시킨 후 ELISA 판독기로 450 nm 파장에서 흡광도를

측정하였다. PICP 표준 농도로 표준그래프를 작성하여 정량적인 계측을 하였으며 polydatin 농도당 3번 반복 실험하였고, 그 결과를 평균 표준편차로 표시하였다. 그리고 각 well의 총 단백질 양을 Lowry method를 통해 정량하였고, 이 총 단백질의 양으로 합성된 PICP의 양을 보정하여 비교 평가하였다.

2.9. 임상시험

미백효과는 한국여성 피험자 22명(평균연령: 44.1 \pm 4.9세, 연령범위: 32 ~ 51세)을 대상으로 임상전문연구기관을 통해 평가를 수행하였다. Xenon arc lamp (1 kW, Oriel solar simulator, USA)를 이용한 자외선 조사를 통해 인공적으로 흑화된 피험자의 팔 부위에 대하여 polydatin 0.2 % 함유 화장품(시험군)과 polydatin 미함유 화장품(대조군, placebo)을 1일 2회씩 총 8 wk 동안 적용하면서 피부과 전문의 2명에 의한 육안평가와 Chromameter CR-400 (Minolta, Japan)에 의한 피부색 측정을 실시하였다.

주름개선 효능은 한국여성 피험자 24명(평균연령: 48.3 \pm 3.0세, 연령범위: 43 ~ 54세)을 대상으로 역시 임상전문연구기관을 통해 이중맹검법으로 평가를 수행하였다. 피험자의 양쪽 눈가 주름 부위에 polydatin 0.2 % 함유 화장품(시험군)과 polydatin 미함유 화장품(대조군, placebo)을 1 d 동안 2회씩 총 12 wk 동안 적용하면서 피부과 전문의 2명에 의한 육안평가와 피부주름모사판(replica)과 영상분석장치(Visiometer, C+K, Germany)를 이용한 기기평가를 실시하였다.

2.10. 통계분석

결과는 각 실험그룹별 평균 표준편차(S.D)로 표기하였고 실험데이터는 대조군과 샘플처리 그룹간 Student's *t*-test 법을 이용하여 처리하였다. 통계적 유의성은 *p* value가 0.05 미만인 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Polydatin 구조 확인

호장에서 얻은 화합물의 특징은 흰색의 파우더로 녹는 점(m.p.)은 223 ~ 225 °C이며, UV λ_{max} (MeOH)는 306 nm이었다. FAB-MS *m/z*는 391.38 [M+H] $^+$ 이었다. 화합물의 구조를 확인하기 위해 ^{13}C 와 ^1H -NMR assay를 수행하였고, 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 화합물은 이전의 데이터 및 참고문헌과 비교한 결과[26,

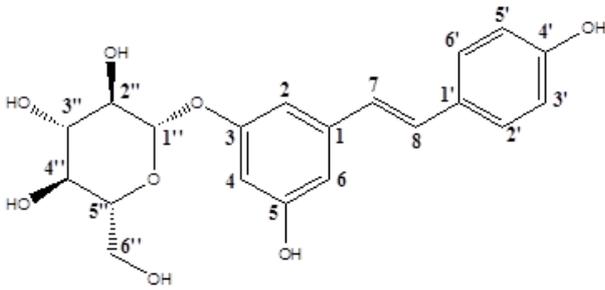


Figure 1. Structure of polydatin from *P. cuspidatum*.

27] 5,4'-dihydroxystilbene-3- O-β-D-glucopyranoside (polydatin)로 밝혀졌다(Figure 1).

Polydatin은 한국, 일본, 중국에서 일반적으로 소비되는 호장의 뿌리에서 얻을 수 있는 stilbenes 중 하나이다. 항산화 효과와 더불어, polydatin은 타이로시네이즈 억제에 대한 효능이 보고된 바 있다[2,30]. 어떠한 연구자들은 polydatin이 버섯 타이로시네이즈에 의한 L-tyrosine oxidation을 억제하는 효과가 없다고 밝히기도 하였다 [1,4,30]. 언급한 연구들은 모두 세포수준이 아닌 cell-free system에서 확인된 결과이므로 우리는 멜라닌 형성 세포와 피부 섬유아세포를 이용하여 피부의 미백과 주름에 관련된 연구를 진행하였고, 인체적용 시험을 통해 얻어진 polydatin의 효능을 확인하였다.

3.2. 멜라닌 생성 및 타이로시네이즈 효소활성 억제 효과

Melan-a cells는 C57BL 쥐에서 유래된 nontumorigenic melanocyte cell line이고 tumorigenic B16 melanoma cell보다 primary melanocytes에 더욱 유사하기 때문에, non-melanoma cells에서 일어나는 멜라닌 생합성 상에서의 polydatin 효능을 규명하는데 적합하다고 사료되어 우리는 Melan-a를 사용하였다. Polydatin의 멜라닌 생산 억제능을 검증하기 위해, Melan-a cells에 50 µg/mL 농도의 polydatin을 4일 동안 처리하였다. 50 µg/mL 농도의 polydatin을 4일간 처리시 Melan-a 세포에서 독성이 없음을 MTT viability assay를 통해 확인하였다 (data not shown). Figure 2a에서 보듯, polydatin은 멜라닌 생성을 무처리 대조군에 비해 약 70 % 억제하는 효과를 보였다. 이때 양성대조군으로 사용한 알부틴(200 µg/mL) 처리군은 물질 처리하지 않은 대조군에 비해 약 30 %의 억제 효과를 보였다. 이 결과에서 polydatin은 양성대조군인 알부틴보다 낮은 농도에서 더 우수한 멜라닌 생성 억제 효능이 있다는 것을 알 수 있었다. 그 다음으로 polydatin의 타이로시네이즈 활성 억제 효능을 확인

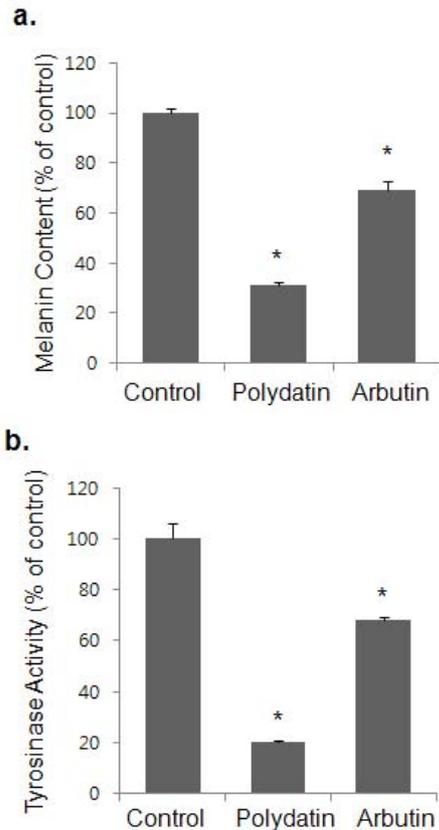


Figure 2. Effects of polydatin on melanin synthesis and tyrosinase activity in Melan-a cells. (a) Melanin contents in harvested cells were assayed as described in Materials and Methods. The melanin contents were expressed as percent of control. Each bar represents mean ± S.D. of three separate experiments. (b) Tyrosinase was extracted from Melan-a cells and tyrosinase activity was assessed by counting [14C] tyrosine incorporation into nascent insoluble. Changes in tyrosinase activity were expressed as percent of control. Significantly different from the control (*p < 0.05). 50 µg/mL Polydatin and 200 µg/mL of arbutin, as a positive control, were used.

하기 위해, 세포증식 동안 만들어지는 멜라닌에 L- [U-14C] 타이로신을 포함하도록 하였고, polydatin을 처리한 Melan-a cells에서 분리해낸 타이로시네이즈의 활성을 확인하였다. 무처리 대조군과 비교할 때 50 µg/mL polydatin을 처리한 실험군에서 타이로시네이즈 활성은 약 80 %가 저해되었고, 이때 양성대조군인 알부틴(200 µg/mL) 처리군은 약 33 %의 타이로시네이즈 활성 억제를 보였다 (Figure 2b).

Table 2. Collagen Synthesis in Human Fibroblast (PICP enzyme immunoassay)

	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Rate of increase (% of control)
Polydatin	0.0001	114.0*
	0.001	118.9*
	0.01	127.6*
Vit. C	52.8	132.2*

*P < 0.01

Table 3. Objective Evaluation of Skin Whitening

	Placebo	Polydatin 0.2 %	p-Value
VGp* (week 0)	4.86 \pm 1.04	5.09 \pm 0.97	-
VGp (week 8)	3.36 \pm 1.00	3.27 \pm 0.98	-
ΔVGp	-1.50 \pm 0.67	-1.82 \pm 0.66	0.01572

* VGp : visual grade of skin pigmentation (0 : none -7 : very severe pigmented)

3.3. 타이로시네이즈 및 MITF의 발현 억제 효과

Polydatin의 멜라닌 합성 과정을 저해하는 메커니즘을 찾기 위해, 우리는 타이로시네이즈와 멜라닌 형성에 중요한 transcription factor인 MITF의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저, mRNA 발현 변화를 확인하기 위해 quantitative real-time PCR을 수행하였다. 4 d 동안 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 polydatin을 세포에 처리하고 mRNA 발현 수준을 확인하였다. 무처리 대조군과 비교했을 때, 타이로시네이즈와 MITF의 mRNA 발현이 polydatin 처리에 의해 유의하게 감소함을 알 수 있었다(Figure 3a). Polydatin이 이들 단백질 발현변화에도 영향을 미치는지 확인하기 위해, Melan-a cells에서 추출한 단백질 발현 변화를 Western blot으로 확인하였으며, 무처리 대조군과 비교하였을 때, polydatin은 Melan-a cells에서 타이로시네이즈 뿐만 아니라 MITF의 단백질 발현을 확연하게 감소시켰다(Figure 3b).

포유류에서는 melanoblasts의 분화 후 멜라노사이트에서 멜라닌 생합성이 일어난다. 타이로시네이즈, TRP1, 그리고 TRP2의 세 가지 melanocyte-specific enzymes는 tyrosine을 멜라닌으로 변환하는데 관여하는 효소로 알려져 있다[19,20,31]. 이러한 효소들의 발현은 멜라노사이트에만 존재하는데, 이는 그들의 유전자 promoter가 조직특이적인 발현에 관여하는 주요 조절인자를 가지고 있음을 말하는 것이다. 기능적으로, MITF는 위에 언급한 멜라닌 생합성에 관련된 효소들의 DNA에 dimer로 결합함으로써 melanogenic enzymes의 발현을 조절하는

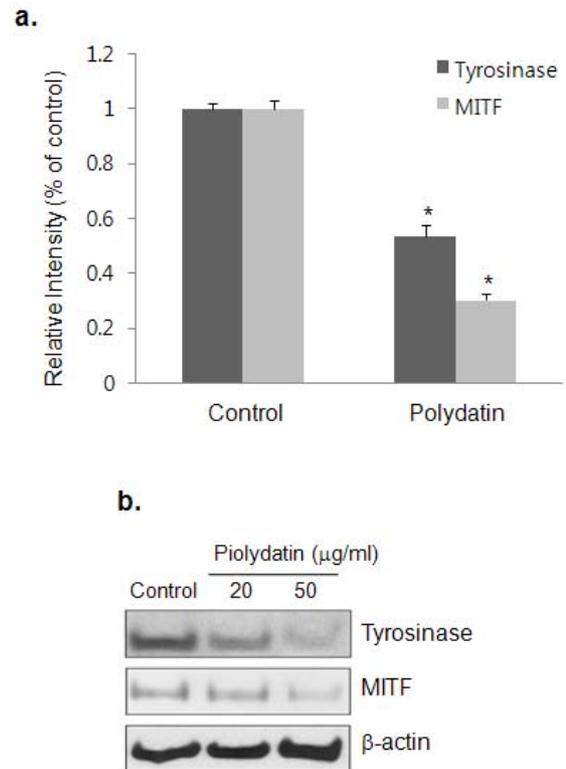


Figure 3. Effects of polydatin on tyrosinase and MITF expression in Melan-a cells. (a) Total RNA was extracted from cells with non-treated control and polydatin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)-treated samples. The levels of related gene expression were determined by quantitative real-time PCR analysis as described under Materials and Methods. (b) Total protein was extracted from cells with non-treated control and polydatin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)-treated samples. The levels of related protein expression were determined by Western blot analysis. Significantly different from the control.

기작이 보고되었다[13,32,33]. 또한, 감소된 MITF 유전자 발현은 멜라노사이트의 분화를 감소시키는 것으로도 알려져 있다[15]. 이러한 작용을 통해 멜라닌 생합성 과정에서 MITF 발현이 MITF에 의존적인 타이로시네이즈, TRP-1 및 TRP-2의 유전자 발현 및 활성을 조절하는 주요 역할을 한다는 것을 시사한다. 흥미롭게도 이번 연구결과에서 보듯 polydatin은 타이로시네이즈와 MITF의 mRNA 발현 및 단백질 발현을 감소시켰고, 이는 polydatin이 MITF와 melanogenic enzymes를 억제하는데 효능이 우수함을 시사하고 있다.

Table 4. Changes in L* value of Skin Color

	Placebo	Polydatin 0.2 %	p-Value
L* (week 0)	62.75 ± 2.32	62.55 ± 2.23	-
L* (week 8)	64.90 ± 2.28	65.13 ± 1.99	-
ΔL*	2.15 ± 0.95	2.58 ± 0.82	0.03955

Table 5. Objective Evaluation of Skin Wrinkles

	Placebo	Polydatin 0.2 %	p-Value
VGw* (week 0)	3.54 ± 0.93	3.71 ± 0.86	-
VGw (week 12)	3.54 ± 0.93	3.54 ± 0.93	-
ΔVGw	0.00 ± 0.00	-0.17 ± 0.38	0.04277

* VGw : visual grade of skin wrinkle (0 : none -7 : very severe wrinkle)

3.4. 콜라겐 합성 촉진 효과

Polydatin의 콜라겐 생성에 미치는 효과를 확인하기 위해, 인체 피부유래 섬유아세포에 0.01, 0.001, 0.001 μg/mL 농도의 polydatin을 24 h 동안 처리하였다. Vit. C는 콜라겐 생성을 증가시키는 물질로서 양성 대조군으로 사용하였다. Table 2에서와 같이 polydatin은 농도의 존적으로 콜라겐 생성 촉진효과를 보였다. 특히 0.01 μg/mL의 농도에서 양성 대조군으로 사용된 52.8 μg/mL Vit. C와 비슷한 정도로 콜라겐 생성 촉진효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. Polydatin이 어떠한 메커니즘에 의하여 콜라겐 합성을 촉진시키는지에 대해서는 향후 지속적인 연구를 통한 규명작업이 필요하다고 사료된다.

3.5. 임상시험 효과: 미백 및 주름개선 효과

우리는 실제 polydatin을 함유한 제형이 피부의 미백과 주름에 개선효과가 있는지 확인하기 위하여 상업적 생산공정 개발을 통해 생산된 원료에 대하여 한국여성피험자를 대상으로 미백 인체효력 시험과 주름개선 인체효력 시험을 시행하였다. 미백 인체효력 시험은 총 8 wk 동안 자외선에 의해 인공흑화된 부위에 대하여 전문가 육안 판정과 chromameter CR-400을 이용한 피부색 측정을 실시하였으며, 주름개선 인체효력 시험은 총 12 wk 동안 눈가 주름 부위에 대하여 전문가 육안 판정 및 피부 주름 모사판(replica)을 이용한 영상분석을 실시하였다.

임상 시험 결과 피부과 전문의에 의한 미백효과의 육안판정에서 화장품 도포 후 8 wk에 polydatin 함유 화장품이 placebo에 비해 통계적으로 유의하게 미백효과가 있었다(p-value < 0.05)(Table 3). 또한 Chromameter CR-400 (Minolta, Japan)으로 색소 침착된 부위의 피부 밝기변화인 ΔL* value (0 wk 대비 측정 주치의 피부밝

Table 6. Changes in Average Roughness (R3) of Skin Replica

	Placebo	Polydatin 0.2 %	p-Value
R3 (week 0)	0.23 ± 0.04	0.23 ± 0.04	-
R3 (week 12)	0.23 ± 0.05	0.21 ± 0.04	-
ΔR3	-0.01 ± 0.04	-0.03 ± 0.02	0.02846

기 차이)를 분석한 결과, 8 wk에서 polydatin 함유 화장품이 placebo에 비해 통계적으로 유의한 미백효과를 보여주었다(p-value < 0.05)(Table 4). 주름개선 효능을 임상시험을 통해 확인한 결과, 피부과 전문의에 의한 주름개선 효과의 육안판정에서 화장품 사용 12 wk 후에 polydatin 함유 화장품이 placebo에 비해 통계적으로 유의하게 주름개선 효과가 있었다(p-value < 0.05)(Table 5). 또한 피부 주름 모사판(replica)과 Visiometer (C+K, Germany)를 통해 측정된 모사판 주름의 평균 표면 거칠기(R3, Average roughness)의 변화율(ΔR3)을 계산하였을 때 12 wk에서 polydatin 함유 화장품이 placebo에 비해 통계적으로 유의한 주름 감소 효과를 보여주었다(p-value < 0.05)(Table 6).

4. 결 론

이번 연구는 polydatin이 멜리노사이트에서 세포 생존율에 영향을 미치지 않고 타이로시네이즈와 멜라닌 생성을 억제할 수 있음을 확인한 것이다. 또한 polydatin이 피부 섬유아세포로부터 콜라겐 합성을 촉진할 수 있음을 확인하였다. 마지막으로 polydatin이 함유된 화장품을 8 wk, 12 wk 사용한 후 미백과 주름이 각각 유의하게 개선되는 결과를 확인하였다. 이러한 연구결과를 통해, polydatin이 새로운 안전한 피부 미백제 및 주름 개선제가 될 수 있음을 제안하고자 한다.

참 고 문 헌

1. Y. M. Kim, J. Yun, C. K. Lee, H. Lee, K. R. Min, and Y. Kim, Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action, *J. Biol. Chem.*, **277**, 16340 (2002).
2. K. Likhitwitayawid, Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity, *Current Science*, **94**, 44 (2008).
3. K. Ohguchi, T. Tanaka, T. Ito, M. Iinuma, K.

- Matsumoto, Y. Akao, and Y. Nozawa, Inhibitory effects of resveratrol derivatives from dipterocarpaceae plants on tyrosinase activity, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1587 (2003).
4. K. Ohguchi, T. Tanaka, T. Kido, K. Baba, M. Iinuma, K. Matsumoto, Y. Akao, and Y. Nozawa, Effects of hydroxystilbene derivatives on tyrosinase activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **307**, 861 (2003).
 5. B. A. Gilchrist and M. S. Eller, DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **4**, 35 (1999).
 6. R. E. Boissy, Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte, *Exp. Dermatol.*, **12**(2), 5 (2003).
 7. K. Okazaki, M. Uzuka, F. Morikawa, K. Toda, and M. Seiji, Transfer mechanism of melanosomes in epidermal cell culture, *J. Invest. Dermatol.*, **67**, 541 (1976).
 8. V. J. Hearing and M. Jimenez, Analysis of mammalian pigmentation at the molecular level, *Pigment Cell Res.*, **2**, 75 (1989).
 9. V. J. Hearing and K. Tsukamoto, Enzymatic control of pigmentation in mammals, *FASEB J.*, **5**, 2902 (1991).
 10. T. Kobayashi, W. D. Vieira, B. Potterf, C. Sakai, G. Imokawa, and V. J. Hearing, Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eumelanogenesis to pheomelanogenesis, *J. Cell Sci.*, **108**(6), 2301 (1995).
 11. T. Kobayashi, K. Urabe, A. Winder, C. Jimenez-Cervantes, G. Imokawa, T. Brewington, F. Solano, J. C. Garcia-Borron, and V. J. Hearing, Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis, *EMBO J.*, **13**, 5818 (1994).
 12. K. Yokoyama, H. Suzuki, K. Yasumoto, Y. Tomita, and S. Shibahara, Molecular cloning and functional analysis of a cDNA coding for human DOPA-chrome tautomerase/tyrosinase-related protein-2, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1217**, 317 (1994).
 13. I. Aksan and C. R. Goding, Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements *in vitro* and *in vivo*, *Mol. Cell Biol.*, **18**, 6930 (1998).
 14. C. A. Hodgkinson, K. J. Moore, A. Nakayama, E. Steingrimsson, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and H. Arnheiter, Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein, *Cell*, **74**, 395 (1993).
 15. E. Steingrimsson, K. J. Moore, M. L. Lamoreux, A. R. Ferre-D'Amare, S. K. Burley, D. C. Zimring, L. C. Skow, C. A. Hodgkinson, H. Arnheiter, N. G. Copeland, and N. A. Jenkins, Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences, *Nat. Genet.*, **8**, 256 (1994).
 16. H. R. Widlund and D. E. Fisher, Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival, *Oncogene*, **22**, 3035 (2003).
 17. N. J. Bentley, T. Eisen, and C. R. Goding, Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator, *Mol. Cell Biol.*, **14**, 7996 (1994).
 18. C. Bertolotto, P. Abbe, T. J. Hemesath, K. Bille, D. E. Fisher, J. P. Ortonne, and R. Ballotti, Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes, *J. Cell Biol.*, **142**, 827 (1998).
 19. C. Levy, M. Khaled, and D. E. Fisher, MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene, *Trends Mol. Med.*, **12**, 406 (2006).
 20. K. Yasumoto, K. Yokoyama, K. Takahashi, Y. Tomita, and S. Shibahara, Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes, *J. Biol. Chem.*, **272**, 503 (1997).
 21. U. Yavuzer, E. Keenan, P. Lowings, J. Vachtenheim, G. Currie, and C. R. Goding, The microphthalmia gene product interacts with the retinoblastoma protein *in vitro* and is a target for deregulation of melanocyte-specific transcription, *Oncogene*,

- 10, 123 (1995).
22. S. P. Jerome, L. Gabrielle, and F. Raul, Identification of collagen fibrils in scleroderma skin, *J. Invest. Dermatol.*, **90**(1), 48 (1998).
 23. K. Balin and A. M. Kligman, *Aging and skin*, Raven press, New York (1989).
 24. M. El-Domyati, S. Attia, F. Saleh, D. Brown, D. E. Birk, F. Gasparro, H. Ahmad, and J. Uitto, Intrinsic aging vs. photoaging : a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin, *Exp. Dermatol.*, **11**(5), 398 (2002).
 25. M. Wlaschek, I. Tantcheva-Poor, L. Naderi, W. Ma, L. A. Schneider, Z. Razi-Wolf, J. Schuller, and K. Scharffetter-Kochanek, Solar UV irradiation and dermal photoaging, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **63**(1), 41 (2001).
 26. G. S. Jayatilake, H. Jayasuriya, E. S. Lee, N. M. Koonchanok, R. L. Geahlen, C. L. Ashendel, J. L. McLaughlin, and C. J. Chang, Kinase inhibitors from *Polygonum cuspidatum*, *J. Nat. Prod.*, **56**, 1805 (1993).
 27. P. W. Tegu, A. Decendit, J. Vercauteren, G. Deffieux, and J. M. Merillon, Trans-resveratrol-3-O- β -Glucoside (piceid) in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*, *Phytochemistry*, **42**, 1591 (1996).
 28. D. C. Bennett, P. J. Cooper, and I. R. Hart, A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth, *Int. J. Cancer*, **39**, 414 (1987).
 29. V. M. Virador, N. Kobayashi, J. Matsunaga, and V. J. Hearing, A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation, *Anal. Biochem.*, **270**, 207 (1999).
 30. Y. L. Leu, T. L. Hwang, J. W. Hu, and J. Y. Fang, Anthraquinones from *Polygonum cuspidatum* as tyrosinase inhibitors for dermal use, *Phytother. Res.*, **22**, 552 (2008).
 31. C. Bertolotto, R. Busca, P. Abbe, K. Bille, E. Aberdam, J. P. Ortonne, and R. Ballotti, Different *cis*-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia, *Mol. Cell Biol.*, **18**, 694 (1998).
 32. C. Bertolotto, K. Bille, J. P. Ortonne, and R. Ballotti, In B16 melanoma cells, the inhibition of melanogenesis by TPA results from PKC activation and diminution of microphthalmia binding to the M-box of the tyrosinase promoter, *Oncogene*, **16**, 1665 (1998).
 33. D. Fang, T. Kute, and V. Setaluri, Regulation of tyrosinase-related protein-2 (TYRP2) in human melanocytes: relationship to growth and morphology, *Pigment Cell Res.*, **14**, 132 (2001).