

오이로부터 분리된 cucurbitacin B의 미백 효능 연구

장운희[†] · 추정하[†] · 이소영[†] · 김태윤 · 진무현 · 장민열 · 이상화 · 이천구 · 박선규

LG 생활건강 기술연구원 화장품 연구소
(2014년 11월 9일 접수, 2014년 11월 11일 수정, 2014년 12월 9일 채택)

Inhibition of Melanogenesis by Cucurbitacin B from *Cucumis sativus* L.

Yun-Hee Chang[†], Jung-Ha Choo[†], So-Young Lee[†], Tae-Yoon Kim, Mu-Hyun Jin, Min-Youl Chang, Sang-Hwa Lee, Cheon-Koo Lee, and Sun-Gyoo Park

Cosmetic Research & Development Center, LG Household & Healthcare Ltd., 84 Jang-dong, Youseong-gu, Daejeon 305-343, South Korea
(Received November 9, 2014; Revised November 11, 2014; Accepted December 9, 2014)

요약: 효능이 우수한 신규 미백 소재 개발을 위하여, 민간 및 전통 미백 처방에 사용되어 온 오이(*Cucumis sativus* L.)에서 활성 물질 분획 추적 연구를 통하여 cucurbitacin B를 분리 정제하고, cucurbitacin B의 멜라닌 합성에 미치는 효과를 B16F1 멜라노마 세포를 이용해 확인하였다. Cucurbitacin B는 세포 독성을 보이지 않는 농도에서 실험한 결과, 멜라닌 생합성을 농도 의존적으로 감소시켰다. Cucurbitacin B는 mushroom tyrosinase의 활성은 직접적으로 저해하지 않았지만, 세포에 처리했을 때 세포 내의 tyrosinase의 활성을 감소시켰음을 확인하였다. 또한, cucurbitacin B의 이러한 멜라닌 합성 저해의 기전 연구를 위하여, 멜라닌 합성에 중요한 단백질인 tyrosinase와 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 단백질 발현을 조사한 결과, cucurbitacin B가 tyrosinase와 MITF의 단백질의 발현을 농도 의존적으로 감소시키는 결과를 확인하였다. 또한, cucurbitacin B는 자외선에 의한 피부암 발생 억제인자(tumor repressor) 및 Wnt/ β -catenin 신호전달 과정에 대한 억제 기능이 밝혀진 WW domain-containing oxidoreductase (WWOX)의 단백질 발현을 증가시켰음을 추가적으로 확인하였다. 따라서, 이상의 연구 결과를 통해, 오이에서 분리 정제된 cucurbitacin B는 멜라닌 세포(melanocytes)에서 멜라닌 합성을 저해하는 효능이 있음을 확인하였으며, 향후 피부 미백 소재로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

Abstract: To develop an effective skin whitening agent for cosmetics, we isolated cucurbitacin B from *Cucumis sativus* L. which has been used as traditional skin lighting regimen by the bioactivity-guided fractionation, and investigated the inhibitory effects of cucurbitacin B on melanogenesis. At a non-cytotoxic concentration, cucurbitacin B reduced melanin contents of B16F1 melanoma cells in a dose-dependent manner. Cucurbitacin B did not directly inhibit mushroom tyrosinase activity, but it inhibited intracellular tyrosinase activity in a dose-dependent manner. Its inhibitory mechanism on melanin biosynthesis was further assessed, and we found that cucurbitacin B significantly decreased the protein level of tyrosinase, a major melanogenic enzymes and MITF, a master transcriptional factor of melanogenesis. In addition, cucurbitacin B increased the expression of WW domain-containing oxidoreductase (WWOX) which is known to function as tumor repressor and inhibits Wnt/ β -catenin pathway. Collectively, these results suggest that cucurbitacin B from *C. sativus* could be used as an active ingredient for skin whitening.

Keywords: cucurbitacin B, melanogenesis, tyrosinase, mitf, wwox

[†] 주 저자 (e-mail: yunizzang@lgcare.com, jhchoo@lgcare.com, soyounglee@lgcare.com)
call: 042)860-8728

1. 서 론

멜라닌(melanin)은 표피에 존재하는 멜라닌세포(melanocytes) 내의 멜라노솜(melanosome)이라고 하는 특수한 세포 소기관에서 생성되는 색소이다. 멜라노솜에서 합성된 멜라닌은 멜라닌세포의 수지상 돌기를 통해 각질세포(keratinocytes)로 전달되어, 피부 각질층으로 이동하게 된다. 이러한 멜라닌은 사람의 피부색을 결정하는 중요한 인자이며, 태양으로부터 오는 자외선을 흡수하거나, 자외선에 의해 발생하는 자유 라디칼(free radical)을 소거함으로써, 피부를 자외선으로부터 보호하는 중요한 방어 시스템의 하나이다[1,2]. 따라서, 피부에 존재하는 멜라닌의 양이 상대적으로 적은 백인의 경우 상대적으로 흑색종(melanoma)과 같은 피부암의 발생률이 높은 것으로 알려져 있다[3]. 멜라닌은 멜라노솜 내에 있는 tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1)과 dopachrome tautomerase (DCT)라고도 불리는 tyrosinase-related protein 2 (TRP2) 등의 여러 가지 효소의 복합 작용에 의해 생성된다. 특히, tyrosinase는 멜라닌 생합성의 속도 조절 단계(rate-limiting step)인 tyrosine이 도파(3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA)로 hydroxylation 된 후, 다시 도파퀴논(dopaquinone)으로 산화되는 과정에 작용하는 주요 조절 효소이다[4-6]. 이러한 멜라닌 합성 효소의 발현을 조절하는 대표적인 전사 인자로 알려진 것이 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)이다. MITF는 멜라닌 합성을 조절하는 뿐만 아니라 멜라닌 세포의 분화에도 중요한 역할을 하며, 이러한 MITF는 Wnt/b-catenin pathway 등에 의해 조절된다고 알려져 있다[7]. 따라서, 이러한 Wnt/ β -catenin pathway을 저해하여 MITF의 발현을 억제함으로써, 멜라닌 합성을 저해하는 물질의 개발이 시도되어 왔다.

앞서 언급한 것처럼 멜라닌은 피부를 보호하는 중요한 방어수단이나, 자외선, 호르몬 또는 약물 부작용 등의 여러 가지 요인으로, 멜라닌이 과도하게 합성되어 피부 표면에 침착되면, 기미, 주근깨 등의 원하지 않는 색소 침착을 유발하게 된다. 따라서, 이러한 색소 침착을 방지 및 해결하기 위해, 멜라닌 합성을 조절 및 저해하는 알부틴(arbutin), 하이드로퀴논(hydroquinone), 비타민 C 유도체(vitamin C derivatives) 등의 물질이 개발되어 왔으나, 효과가 충분하지 않거나 피부 자극

등의 안전성, 제형내의 안정성 등의 한계로 화장품 제형에는 제한적으로 사용되어 왔다[8,9]. 그리고, 멜라닌의 합성 저해는 미용적인 측면에서는 장점이 있을 수 있으나, 생체가 가지고 있는 고유의 방어 시스템을 저해하는 측면에서는 그 단점을 고려해 보아야 할 필요가 있다.

최근 연구에서, 염색체 16q3.3-24.1에 위치해 있는 WW domain-containing oxidoreductase (WWOX)는 종양 억제인자로서, 유방암, 식도암, 난소암, 폐암 등의 암에서 이종접합(heterozygosity) 손실 또는 과메틸화(hypermethylation)가 일어나 WWOX의 발현이 감소되어 있다고 보고되어 있을 뿐만 아니라, UVB에 의해 유도되는 apoptosis에 작용하는 종양억제 인자로, 피부 편평세포(cutaneous squamous cell carcinoma)에서도 그 발현이 감소되어 있다고 알려졌다[10,11]. 또한, WWOX가 Wnt 신호전달 과정에서 세포질과 세포 핵에서 신호를 조절하는 역할을 하는 Dishevelled (Dvl)과 결합하여 Wnt 신호를 억제하기 때문에, WWOX의 발현을 증가시키는 물질의 개발은 멜라닌 합성을 저해하는 미백 효과와 함께, 피부암을 방지하는 효과에 대한 가능성이 제시되어 왔다[12].

따라서, 본 연구에서는 멜라닌세포에서 멜라닌 합성을 저해함과 동시에 피부의 방어 체계에 긍정적인 효과를 가지는 천연물질을 발굴 하고자, 약 300여 종의 식물의 메탄올(methanol, MeOH) 추출물을 대상으로 스크리닝을 실시하였고, 이 중에서 추출물 수준에서 효과가 우수하였던, 오이(*Cucumis sativus* L.)를 연구 대상 식물로 선정하여 유효성분인 cucurbitacin B를 분리 정제하였다.

오이(*C. sativus*)는 박과(Cucurbitaceae)의 한해살이 덩굴식물로 한방에서는 호과(胡瓜) 또는 황과(黃瓜)라고 하여, 열을 내리고 소변이 잘 나오게 하며 해독하는 효능이 있어 번갈, 목구멍이 붓고 아픈 증상, 동통, 화상을 치료하는데 사용하였다[13]. 인도 원산의 식물로 아유르베다 전통 의학에서도 일광 화상이나 민감성 피부의 진정 등 다양한 피부 질환에 이용되어 왔다[14]. 특효 묘방 전서에서는 오이(*C. sativus*)를 습진이나 땀띠, 주근깨, 여드름의 치료에 사용했다고 하며[15], 민간에서도 피부 미백과 진정의 목적으로 오이 마사지를 하고 있다. 전통 화장 문화에 대한 기록이 언급되어 있는 한문소설인 여용국전(女容國傳)에서는

백옥과 같은 흰 피부를 만들기 위해 오이꼭지를 문질러 마사지 했다는 기록이 전해지기도 한다. 오이 추출물은 항산화 효과, 항 엘라스타제(anti-elastase) 및 항 히알루로니다아제(anti-hyaluronidase) 활성이 보고된 바 있으며[16], 오이의 에틸아세테이트(ethyl acetate) 추출물의 경우, 항 타이로시나아제(anti-tyrosinase) 활성이 보고된 바 있다[17]. 오이(*C. sativus*)의 성분 에 대해서는 cucurbitacin C가 보고된 바 있으며[18], 오이 모종의 자엽에서 cucurbitacin A, B, C, D, E 및 I가 존재한다고 보고된 바 있다[19]. Cucurbitacin B에 대해서는 항염 효과, 간 보호 효과가 있다고 보고되었다[20,21].

본 연구에서는 오이(*C. sativus*)로부터 cucurbitacin B를 분리정제하고, B16F1 멜라노마 세포에서 cucurbitacin B가 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하고, 그 작용 메커니즘을 조사하여, cucurbitacin B가 피부 흑화 개선을 위한 화장품 소재로서의 가능성을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. Cucurbitacin B의 분리시약 및 기기

본 실험에 사용한 오이(*C. sativus*)는 대전 유성구 유성시장에서 구입하여 사용하였다. NMR은 Avance III 600 (600 MHz) spectrometer (Bruker, Germany)를 사용하여 측정하였으며, EI-MS는 Clarus 600 GC/MS (PerkinElmer, USA)를 사용하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60 (no. 9385, Merck, Germany)을, preparative liquid chromatography (Prep-LC)는 Agilent 1260 infinity preparative scale purification system (Agilent, USA)을 사용하였으며, 칼럼은 Eclipse XDB-C18 (Agilent, USA)을 사용하였다. TLC plate는 Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, Germany) 또는 RP-18_{254S} pre-coated plate (Merck, Germany)를 사용하였다. Cucurbitacin B 표준품은 Chromadex (USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. Cucurbitacin B의 분리

오이(*C. sativus*) 20 kg을 세절하여 건조한 후 건조물을 메탄올 6 L를 가하여 상온에서 3일간 냉침하여 추출하였다. 이를 여과해 얻은 추출액을 감압 농축하여 메탄올 추출물(161 g)을 얻었다. 이를 증류수로 현탁

시켜 동량의 *n*-hexane을 가하여 진탕 방치하여 분획하고, 순차적으로 methylene chloride (CH₂Cl₂), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (BuOH)을 가하여 진탕 방치하여 각각의 분획물을 얻었다. CH₂Cl₂ 분획(20.9 g)을 *n*-hexane/EtOAc (gradient)의 용출용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 10개의 소분획으로 나누었다. 소분획 Fr. 4를 CH₂Cl₂/MeOH (50 : 1)의 용출용매로 silica gel column chromatography를 실시하여 8개의 소분획으로 나누었다. 소분획 fr. 2를 MeOH/H₂O (8 : 2)의 용출용매로 Prep-LC를 실시하여 화합물 1 (2 mg)을 얻었다.

화합물 1 (cucurbitacin B) - 백색 무정형 분말; ¹H-NMR and ¹³C-NMR (600 and 150 MHz, respectively, acetone-*d*₆) data, Table 1; EIMS *m/z* (rel. int., %): 498 [M - AcOH]⁺ (18.5).

2.3. 세포 배양 시약 및 기기

세포 배양에 사용한 배지는 Gibco BRL (Long Island, USA)에서 구입하였다. L-DOPA, mushroom tyrosinase, piceid 및 niacinamide는 Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, alpha glucosyl hesperidine은 TCI (Tokyo Chemical Industry Co., Japan)에서 구입하여 사용하였다. Cell Counting Kit (CCK)-8은 Dojindo Lab. (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Japan)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 모든 항체는 Santa Cruz (Santa Cruz Co. CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.4. 세포 배양

B16F1 멜라노마 세포는 ATCC에서 구입하여 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin 50 U/mL, streptomycin 50 µg/mL를 첨가한 Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM) 배지(Gibco BRL, USA)를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

2.5. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 CCK-8 assay를 실시하여 측정하였다. B16F1 멜라노마 세포에 cucurbitacin B를 24 h 처리한 후 CCK-8 용액을 넣고 1 h 뒤 ELISA reader (Epoch, Bio-tech Instruments Inc., USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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

No.	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	α : 2.11 m	37.1
	β : 1.13 q (12.6)	
2	4.56 m	72.3
3	-	213.7
4	-	51.1
5	-	142.0
6	5.82 m	120.8
7	α : 2.01 m	24.7
	β : 2.40 m	
8	1.96 m	43.6
9	-	49.2
10	3.02 br d (12.6)	34.2
11	-	212.7
12	α : 3.40 d (14.4)	49.5
	β : 2.51 d (14.4)	
13	-	49.0
14	-	51.4
15	α : 1.41 m	46.6
	β : 1.84 dd (12, 9)	
16	4.46 m	71.4
17	2.66 d (7.2)	59.1
18	0.92 s	20.6
19	1.02 s	20.3
20	-	79.6
21	1.40 s	25.1
22	-	203.5
23	6.81 d (15.6)	122.3
24	6.98 d (15.6)	151.0
25	-	80.1
26*	1.52 s	26.5
27*	1.56 s	27.1
28	1.32 s	29.9
29	1.29 s	21.8
30	1.44 s	19.3
OCOCH_3	-	170.3
OCOCH_3	1.97 s	22.0

* Assignments may be interchangeable.

2.6. 멜라닌 정량

멜라닌 정량은 J. Hosoi 등의 방법을 변형하여 실시하였다[22]. 간단히 말하면, 5×10^4 cells/well 농도로 96-well plate에 분주한 후, cucurbitacin B를 72 h 처리하였다. 이때 배양액은 48 h 뒤 한 번 갈아주었다. 세포를 용해한 후 10,000 rpm에서 10 min 동안 원심 분리하여 얻은 침전물에 1 N NaOH / 10% DMSO 넣고 80 °C에서 1 h 동안 녹였다. 멜라닌 함량은 ELISA reader (Epoch, Bio-tech Instruments Inc., USA)를 이용하여 400 nm에서 흡광도를 측정하여 계산한 뒤 단백질 정량으로 보정하였다.

2.7. Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase의 활성도는 S. H. Pomerantz 등의 방법을 변형하여 사용하였다[23]. 간단히 설명하면, 세포 추출액을 96-well plates에 분주한 뒤, pH 7.2의 1 M potassium phosphate buffer에 녹인 1 mM L-DOPA를 넣고 1 h 동안 37 °C에서 반응시켰다. ELISA reader (Epoch, Bio-tech Instruments Inc., USA)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하여 계산한 뒤 단백질 정량으로 보정하였다.

2.8. Western blot

B16F1 멜라노마 세포를 5×10^4 cells/well 농도로 6-well plates에 밤새 키운 뒤 다음날 cucurbitacin B를 처리하고 72 h 동안 더 배양하였다. 세포를 모은 후 protease inhibitor cocktail (Roche Life Science, IL, USA)이 첨가된 cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, USA)로 용출시키고, BCA 방법으로 단백질 농도를 측정하였다. 4 ~ 15% SDS-PAGE gel (Bio-rad Laboratories, Inc., USA)에 동량의 단백질을 loading하고 전기영동으로 전개시킨 뒤 nitrocellulose membranes (Bio-rad Laboratories, Inc., USA)로 이동시켰다. Membranes를 5% nonfat skim milk를 함유한 TBST buffer로 1 h 동안 blocking한 뒤, 특정 1차 항체인 tyrosinase (sc-7833), MITF (sc-56726) WWOX (sc-366157) 및 α -tubulin (sc-8035)로 반응시켰다. Membranes를 1 : 5000으로 희석한 2차 항체, HRP-conjugated anti-goat IgG, anti-rabbit IgG, 및 anti-mouse IgG와 반응시키고, TBST로 씻어준 다음, ECL prime kit (Amersham, UK)를 사용하여 반응시키고, Fusion Fx 5 image system (Vilber Lourmat,

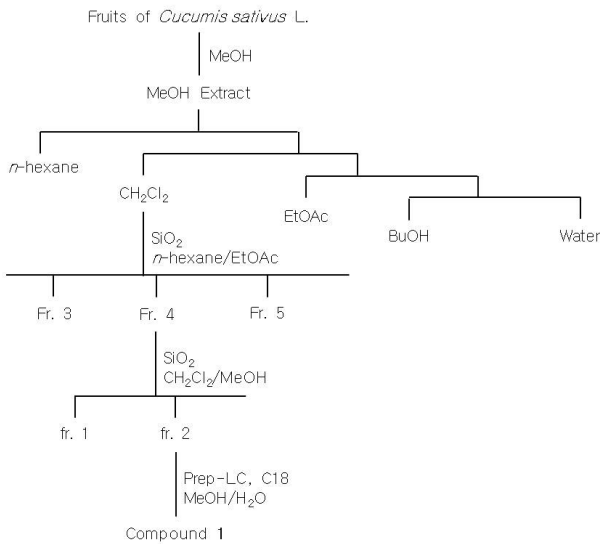


Figure 1. Isolation scheme of compound 1.

France)을 이용하여 immunoreactive band를 탐지하였다.

2.9. 통계적 분석

실험 결과는 3개의 같은 군의 평균값과 표준편차로 나타내었고, Student's *t*-test법을 이용하여 *p*-value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Cucurbitacin B의 분리 및 정제

오이(*C. sativus*)의 메탄올 추출물로부터 유효 성분을 분리하기 위하여 추출물을 *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH로 순차적으로 분획하였다. 각 분획물을 activity guided fractionation을 통해 가장 우수한 미백 효능을 나타내는 성분을 추적하였다. Silica gel column chromatography 및 Prep-LC를 실시하여 Figure 1과 같이 화합물 1을 분리 정제하였다.

화합물 1의 화학구조는 NMR spectrum을 통해 확인하였다. ¹H-NMR에서 8개의 tertiary methyl signals (δ 0.92, 1.02, 1.29, 1.32, 1.40, 1.44, 1.52, 1.56, 3H each, s), 하나의 acetyl signal (δ 1.97, 3H, s)과 δ 5.82 (1H, m), 6.81 및 6.98 (1H each, d, *J* = 15.6 Hz)에서 3개의 olefinic proton signal을 확인하였다. 또한, δ 4.46과 4.56 (1H each, m)에서 2개의 oxygenated proton에

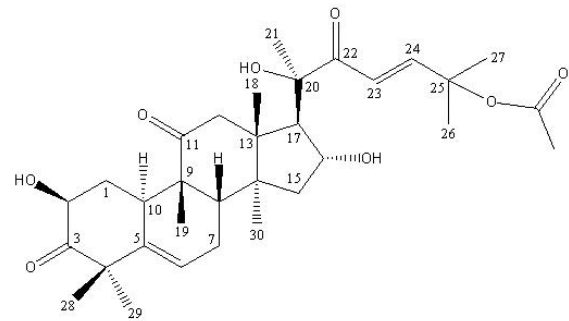


Figure 2. Chemical structure of compound 1.

기인하는 signal이 나타나는 것을 확인하였다. ¹³C-NMR spectrum에서 4개의 carbonyl carbon에 기인하는 signal들과 4개의 olefinic carbon signal들 및 4개의 oxygenated carbon signal들이 나타났으며, 전형적인 cucurbitacin 구조의 특징적인 peak들로부터 cucurbitacin 성분 중의 하나임을 알 수 있었다(Table 1). 이와 같은 spectral data를 종합하여 기존에 알려진 문헌치와[24] 비교해 화합물 1을 cucurbitacin B로 동정하였으며, Chromadex사에서 구입한 cucurbitacin B와 TLC 및 HPLC를 통해 직접적으로 비교하여 확인하였다(Figure 2). 실험에 사용한 오이 20 kg은 오이 115개로, 분리된 cucurbitacin B로부터 오이의 개당 함량을 계산했을 때, 오이 하나에 약 0.017 mg의 cucurbitacin B를 함유하고 있다는 것을 알 수 있었다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 cucurbitacin B의 상업화 효율을 높이기 위해, 추가적으로 cucurbitacin B를 고 함량 함유한 식물인 과체(瓜蒂, *melonis pedicellus*)로부터 cucurbitacin B의 상업화도 진행하였다.

3.2. Cucurbitacin B가 B16F1 멜라노마 세포의 생존율에 미치는 영향

Cucurbitacin B의 안전성을 확인하기 위해 B16F1 멜라노마 세포에 다양한 농도의 cucurbitacin B (1.25 nM ~ 20 nM)를 72 h 동안 처리한 뒤 CCK-8 assay를 실시하였다. 실험 결과는 대조군의 세포 생존율을 100% 기준으로 잡아 상대적인 퍼센트로 나타내었다. Cucurbitacin B를 1.25 nM에서 5 nM까지 처리한 것은 오차 범위 내에서 대조군과 같은 100%의 생존율을 보였고, 10 nM 처리하였을 때 94%의 생존율을 보여 세포의 독성을 나타내지 않았다(Figure 3). 그러나, 20

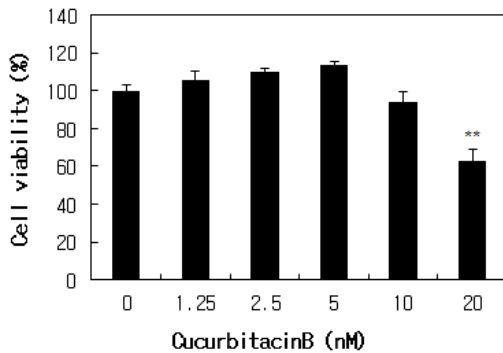


Figure 3. Effect of cucurbitacin B on B16F1 melanoma cell viability. After B16F1 cells were treated with various concentration of cucurbitacin B for 72 h, the CCK-8 assay was performed. Data are shown as a percentage of control from the three independent experiments in triplicate and values represent as the mean \pm S.D. ** $p < 0.01$ compared with the control.

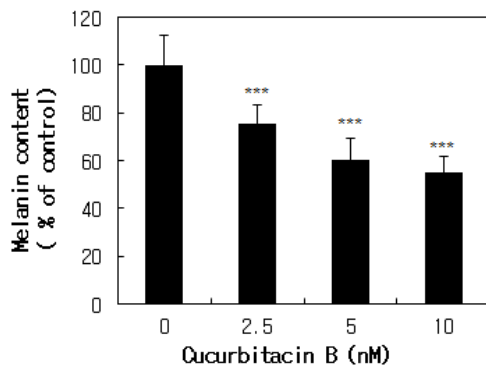


Figure 4. Inhibitory effect of cucurbitacin B on melanin formation in B16F1 melanoma cells. Cells were incubated with various concentration of cucurbitacin B for 72 h. Melanin contents were measured by absorbance values at the wavelength 405 nm. Data are shown as a percentage of control from the three independent experiments in triplicate and values represent as the mean \pm S.D. *** $p < 0.001$ compared with the control.

nM을 처리하였을 때는 62%의 생존율을 보여 세포에 독성을 나타내어, 최대 10 nM의 농도 범위에서 cucurbitacin B를 이용하여 다음 실험을 실시하였다.

3.3. Cucurbitacin B가 멜라닌 생성에 미치는 영향

Cucurbitacin B가 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 B16F1 멜라노마 세포에 다양한 농도의 cu-

curbitacin B를 72 h 동안 처리한 뒤 멜라닌 양을 측정하였다. 대조군의 멜라닌 생성량을 100%로 나타내었고 실험군의 멜라닌 생성량을 상대적인 퍼센트로 수치화하였다. Figure 4에서 보는 바와 같이, cucurbitacin B 2.5 nM을 처리하였을 때 멜라닌 생성량이 25% 감소하였고, 10 nM을 처리하였을 때 46% 감소하여 cucurbitacin B는 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 저해하였다.

3.4. Cucurbitacin B가 tyrosinase 활성에 미치는 영향

멜라노사이트에서 일어나는 멜라닌 합성은 여러 단계를 거치면서 일어나는데 그중 속도조절 단계는 tyrosinase에 의한 산화 반응이다. 우리는 cucurbitacin B가 직접적으로 작용하여 tyrosinase의 활성을 억제하는지 cell-free system을 이용하여 알아보았다. Mushroom tyrosinase와 기질인 L-DOPA가 포함된 용액에 2.5 nM에서 100 nM의 다양한 농도의 cucurbitacin B를 처리하여 mushroom tyrosinase의 활성을 측정하였다. Figure 5a에서 보는 바와 같이, cucurbitacin B를 처리한 실험군의 mushroom tyrosinase 활성은 대조군과 차이가 없는 것으로 나타나, cucurbitacin B가 tyrosinase의 활성을 직접적으로 저해하지 않는 것을 알 수 있었다. 앞서 살펴 본 cucurbitacin B의 멜라닌 생성 억제 효과를 생각해볼 때, 우리는 cucurbitacin B가 직접적으로 tyrosinase의 활성을 저해하진 않아도 간접적으로 작용할 것이라 예상하였다. Cucurbitacin B를 처리한 B16F1 멜라노마 세포의 용출액과 기질인 L-DOPA를 이용하여 cucurbitacin B가 tyrosinase 활성에 어떤 영향을 미치는지 살펴보았다. Cucurbitacin B를 처리한 B16F1 멜라노마 세포의 용출액에서는 tyrosinase 활성이 농도 의존적으로 감소하였다(Figure 5b). 따라서, cucurbitacin B는 tyrosinase의 직접적인 저해제는 아니지만, 세포 내의 tyrosinase 활성을 간접적으로 저해한다는 것을 알 수 있었다.

3.5. Cucurbitacin B가 tyrosinase 및 MITF의 발현에 미치는 영향

우리는 cucurbitacin B가 tyrosinase의 발현에 영향을 주어 tyrosinase의 활성을 저해할 것이라고 가정하고 Western blot을 실시하여 tyrosinase의 단백질 발현을 살펴보았다. B16F1 멜라노마 세포에 cucurbitacin B를 2.5 nM ~ 10 nM 농도로 72 h 처리한 후 tyrosinase의

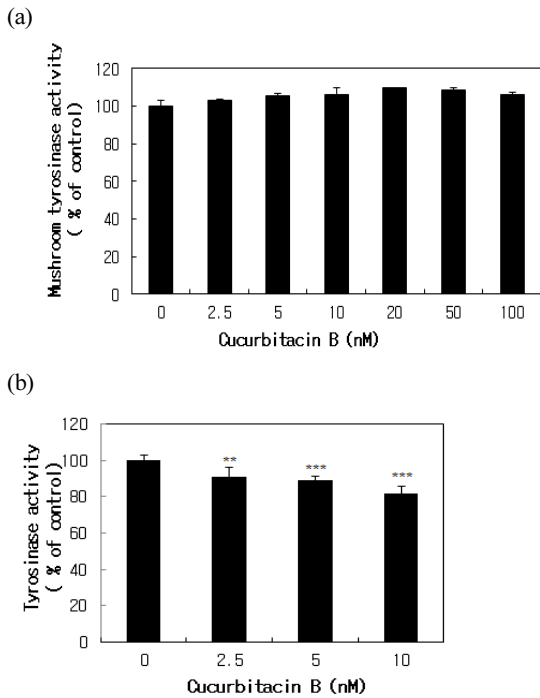


Figure 5. Effect of cucurbitacin B on tyrosinase activities in cell-free system (a) and in B16F1 melanoma cells (b). In cell-free system, mushroom tyrosinase and L-DOPA were used as enzyme and substrate, respectively to detect the direct effect of cucurbitacin B on tyrosinase activity. The cellular tyrosinase activity was measured after B16F1 melanoma cells were incubated with various concentration of cucurbitacin B for 72 h. Data are expressed as a percentage of control from the three independent experiments in triplicate and values represent as the mean \pm S.D. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the control.

단백질 발현 양상을 살펴보았다. Cucurbitacin B를 처리한 실험군에서 대조군 대비 tyrosinase의 발현이 농도 의존적으로 감소하였다(Figure 6a). 멜라닌 합성에는 성장인자, 사이토카인을 비롯한 많은 인자들이 영향을 줄 수 있으며[25], 이러한 인자들 중에는 MITF의 발현을 조절하여 멜라닌 합성에 영향을 줄 수 있는 것이 있다. MITF는 tyrosinase, TRP1, TRP2 등 멜라닌 생성에 중요한 유전자의 promoter에 dimer로 결합하여 이들의 발현을 조절하는 중요한 전사인자(transcription factor)이다[26,27]. 우리는 cucurbitacin B가 이 MITF의 발현에도 영향을 줄 수 있을 것이라 생각하여 MITF의 단백질 발현 양상도 살펴보았다. Figure 6b에서 보는 바와 같이, cucurbitacin B는 MITF의 발현을 농도 의존

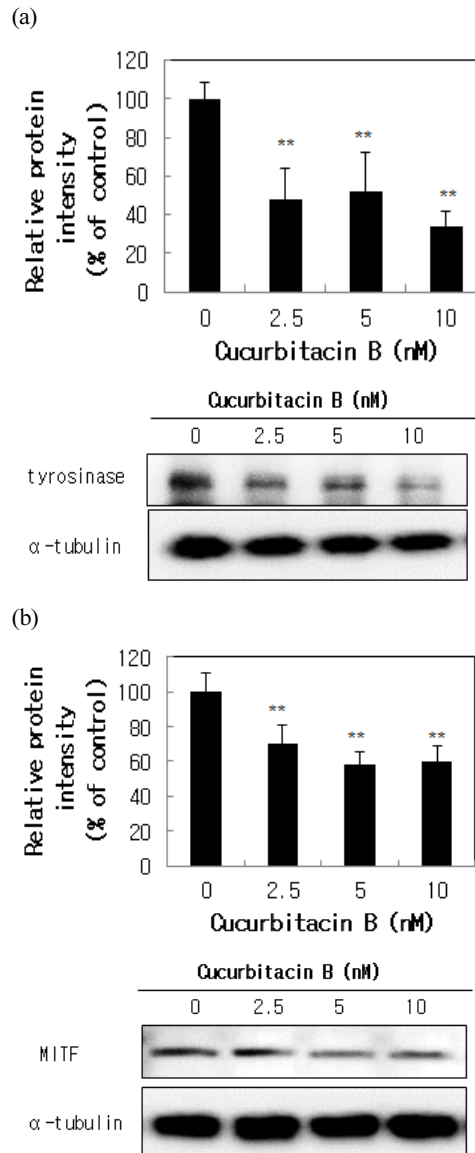


Figure 6. Effect of cucurbitacin B on protein expression of tyrosinase (a) and MITF (b). B16F1 melanoma cells were incubated with 2.5~10 nM of cucurbitacin B for 72 h. Total protein was extracted from cells and was subjected to Western blotting with antibodies against tyrosinase and MITF. The relative protein intensity was normalized by α -tubulin signal. Data are shown as a percentage of control from the three independent experiments and values represent as the mean \pm S.D. ** $p < 0.01$ compared with the control.

적으로 감소시켰다. 그러므로, cucurbitacin B는 멜라닌 합성에 중요한 단백질인 tyrosinase와 MITF의 발현을 감소시켜 멜라닌 합성을 저해한다는 것을 알 수 있었다.

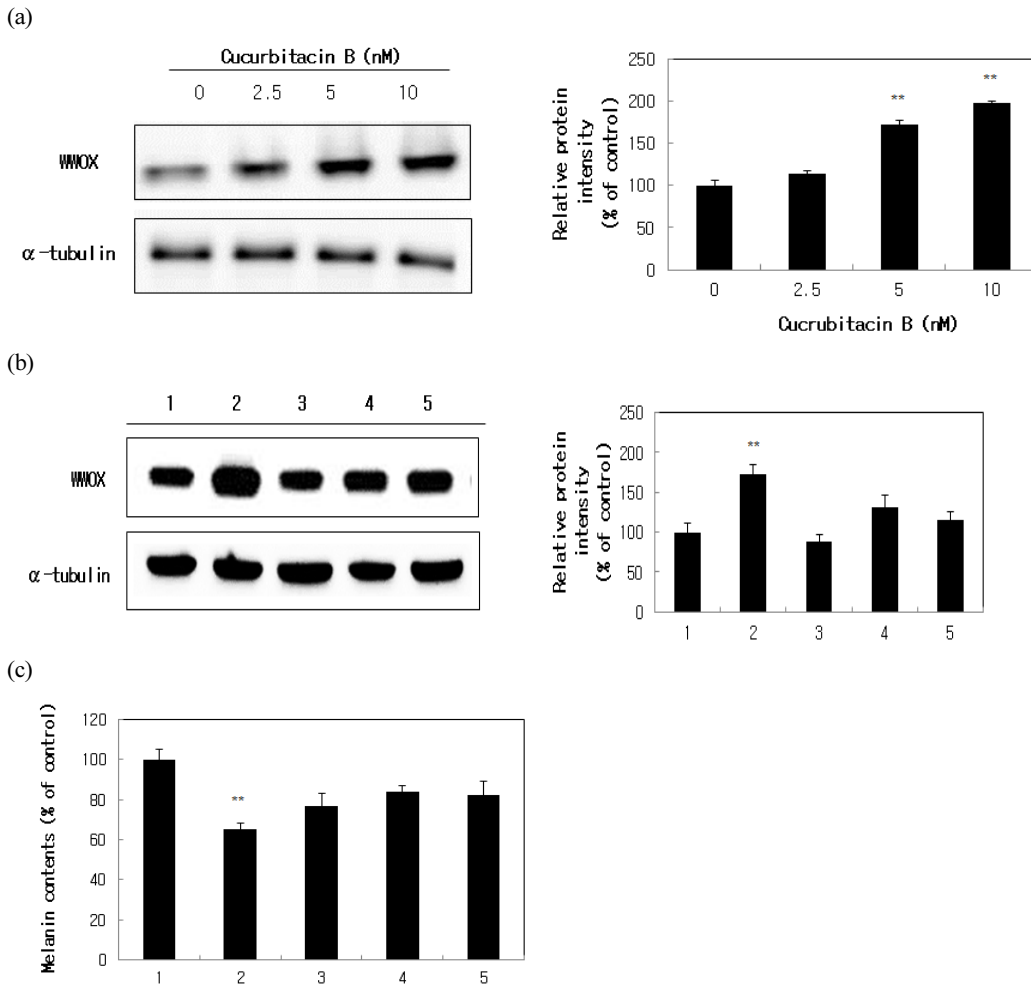


Figure 7. Effect of cucurbitacin B on protein expression of WWOX. B16F1 melanoma cells were incubated with cucurbitacin (a) or test materials (b) (1; control, 2; 20 mg/mL piceid, 3; 20 mg/mL niacinamide, 4; 20 mg/mL ascorbic glucoside acid, 5; 100 mg/mL alpha glucosyl hesperidine) for 72 h. Total protein was extracted from cells and was subjected to Western blotting with antibodies against WWOX and α -tubulin, an internal control. Inhibitory effect of test materials on melanin formation in B16F1 melanoma cells (c). Melanin contents were measured by absorbance values at the wavelength 405 nm. Data are shown as a percentage of control from the three independent experiments in triplicate and values represent as the mean \pm S.D. ** $p < 0.01$ compared with the control.

3.6. Cucurbitacin B가 WWOX 발현에 미치는 영향

이상의 연구를 통해, 미백효능이 확인된 cucurbitacin B가 UVB에 의해 유도되는 apoptosis에 관여하는 종양억제 인자인 WWOX의 발현에 어떤 영향을 미치는지 Western blot을 실시하였다. 그 결과, cucurbitacin B가 대조군 대비 WWOX의 발현을 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인하였다(Figure 7a). 추가적으로 기존의 알려진 미백 성분(Figure 7c) 중에서도 WWOX의 발현을 증가시켜서 미백 효능을 기대할 수 있는지

확인하였다. 실험에 사용한 미백 기능성 성분 중에서 piceid [28]가 대조군에 비해 WWOX의 발현을 현저히 증가시키는 것을 확인하였다(Figure 7b). 향후, 이러한 미백 효능을 가지는 물질에 의한 WWOX 발현의 증가가 Wnt/ β -catenin 신호전달 과정을 어떠한 영향을 미치며, 이것이 Wnt/ β -catenin의 MITF 조절에도 어떠한 영향을 미치는지 추가적으로 연구할 필요가 있다고 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 민방 및 고대 미백 처방에 사용되어 온 오이로부터 cucurbitacin B를 분리 정제하고, 그 미백 효과를 알아봄으로써 미백화장품 원료로서의 가능성을 알아보았다. B16F1 멜라노마 세포에서 cucurbitacin B는 농도 의존적으로 멜라닌 생성량을 억제하였으며, tyrosinase의 직접적인 저해 기능은 없었다. 멜라닌 생합성 저해 기전을 알아보기 위해, tyrosinase, MITF의 발현양을 Western blot으로 알아본 결과 tyrosinase, MITF의 발현이 모두 억제됨을 확인할 수 있었다. 이는 멜라닌 합성 조절 전사 인자인 MITF의 발현이 억제되어 tyrosinase의 발현도 억제되었던 것으로 판단된다. 또한, Wnt/ β -catenin 신호전달 과정과의 연관성이 제시되어 온 WWOX의 발현을 촉진시킴을 확인하였다. 따라서 cucurbitacin B는 미백 기능성 원료로서의 가능성을 가지고 있는 것으로 판단되며, 향후 인체실험을 진행함으로써 피부 미백 효능 및 피부 안정성 여부를 평가할 예정이다.

Acknowledgement

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 HN10C0013).

Reference

1. B. A. Gilchrist and M. S. Eller, DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **4**(1), 35 (1999).
2. S. C. Taylor, Skin of color : biology, structure, function, and implications for dermatologic disease, *Am. Acad. Dermatol.*, **46**(2), S41 (2002).
3. U. Leiter and C. Garbe, Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer—The role of sunlight, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **624**, 89 (2008).
4. V. J. Hearing and M. Jimenez, Mammalian tyrosinase-The critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *Int. J. Biochem.*, **19**(12), 1141 (1987).
5. T. Kuzumaki, A. Matsuda, K. Wakamatsu, S. Ito, and K. Ishikawa, Eumelanin biosynthesis is regulated by coordinate expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 genes, *Exp. Cell Res.*, **207**(1), 33 (1993).
6. V. del Marmol and F. Beermann, Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation, *FEBS Lett.*, **381**(3), 165 (1996).
7. J. Y. Lin and D. E. Fisher, Melanocyte biology and skin pigmentation, *Nature*, **445**(7130), 843 (2007).
8. S. Briganti, E. Camera, and M. Picardo, Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment. Cell Res.*, **16**(2), 101 (2003).
9. F. Solano, S. Briganti, M. Picardo, and G. Ghanem, Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects, *Pigment. Cell Res.*, **19**(6), 550 (2006).
10. R. I. Aqeilan, F. Trapasso, S. Hussain, S. Costinean, D. Marshall, and Y. Pekarsky. Targeted deletion of Wwox reveals a tumor suppressor function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**(10), 3949 (2007).
11. F. J. Lai, C. L. Cheng, S. T. Chen, C. H. Wu, L. J. Hsu, J. Y. Lee, S. C. Chao, M. C. Sheen, C. L. Shen, N. S. Chang, and H. M. Sheu, WOX1 is essential for UVB irradiation-induced apoptosis and down-regulated via translational blockade in UVB-induced cutaneous squamous cell carcinoma *in vivo*, *Clin. Cancer Res.*, **11**(16), 5769 (2005).
12. N. Bouteille, K. Driouch, P. E. Hage, S. Sin, E. Formstecher, J. Camonis, R. Lidereau, and F. Lallemand, Inhibition of the Wnt/beta-catenin pathway by the WWOX tumor suppressor protein, *Oncogene*, **28**(28), 2569 (2009).
13. K. H. Bae, The medicinal plants of Korea, 345, Kyo-Hak Sa, Seoul (2000).
14. G. Patri, V. Silano, and R. Anton, Plants in cosmetics. Council of Europe Publishing, Strasbourg (2002).
15. H. N. Won, Tukhyo myobang chonso, 9, 33, 82, 85, Hakmins, Seoul (1994).
16. N. K. Nema, N. Maity, B. Sarkar, and P. K. Mukherjee, *Cucumis sativus* fruit-potential anti-

- oxidant, anti-hyaluronidase, and anti-elastase agent, *Arch. Dermatol. Res.*, **303**(4), 247 (2011).
17. N. Kamkaen, N. Mulsri, and C. Treesak, Screening of some tropical vegetables for anti-tyrosinase activity, *Thai Pharm. Health Sci. J.*, **2**(1), 15 (2007).
 18. P. R. Enslin, J. M. Hugo, K. B. Norton, and D. E. A. Rivertt, Bitter principles of the cucurbitaceae. Part X. Cucurbitacin C, *J. Chem. Soc.*, 4787 (1960).
 19. C. A. Rice, K. S. Rymal, O. L. Chambliss, and F. A. Johnson, Chromatographic and mass spectral analysis of cucurbitacins of three *Cucumis sativus* cultivars, *J. Agric. Food Chem.*, **29**(1), 194 (1981).
 20. E. Yesilada, S. Tanaka, E. Sezik, and M. Tabata, Isolation of an anti-inflammatory principle from the fruit juice of *Ecballium elaterium*, *J. Nat. Prod.*, **51**(3), 504 (1988).
 21. S. H. Choi, S. Y. Lee, and T. S. Cho, Effects of the constituents of *melonis pedicellus* in the animal models of hepatic diseases, *Yakhak Hoeji*, **44**(1), 87 (2000).
 22. J. Hosoi, E. Abe, T. Suda, and T. Kuroki, Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid, *Cancer Res.*, **45**(4), 1474 (1985).
 23. S. H. Pomerantz, Tyrosine hydroxylation catalyzed by mammalian tyrosinase: An improved method of assay, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**(2), 188 (1964).
 24. P. L. Wu, F. W. Lin, T. S. Wu, C. S. Kuoh, K. H. Lee, and S. J. Lee, Cytotoxic and anti-HIV principles from the rhizomes of *Begonia nantoensis*, *Chem. Pharm. Bull.*, **52**(3), 345 (2004).
 25. Y. Yamaguchi and V. J. Hearing, Physiological factors that regulated skin pigmentation, *Biofactors.*, **35**(2), 193 (2009).
 26. 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**(12), 6930 (1998).
 27. M Tachibana, MITF : a stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell*, **13**(4), 230 (2000).
 28. E. T. Jeong, M. H. Jin, M. S. Kim, Y. H. Chang, and S. G. Park, Inhibition of Melanogenesis by Piceid Isolated from *cuspidatum*, *Arch. Pharm. Res.*, **33**(9), 1331 (2010).