

봄맞이 추출물의 미백 효능 연구

김보윤[†] · 박성하 · 박병준 · 김진준

한국콜마(주) 소재연구소
(2014년 11월 5일 접수, 2014년 12월 3일 수정, 2015년 3월 19일 채택)

Whitening Effect of *Androsace umbellata* Extract

Bo Yun Kim[†], Sung Ha Park, Byoung Jun Park, and Jin Jun Kim

Bio Materials R&D center, Kolmar Korea, CBTP, Future Convergent Tech Center, Room 406, 76, Yeongudanji, Ochang-eup,
Cheongwon-gu, Cheongju-si, Chungbuk

(Received November 5, 2014; Revised December 3, 2014; Accepted March 19, 2015)

요약: 본 연구의 목적은 봄맞이 추출물의 미백 효능을 밝히는 것에 있다. 그 효능을 검증하기 위하여 tyrosinase 활성 및 B16F1 멜라노마 세포를 이용한 멜라닌 생성 양 억제 정도를 조사하였다. 그 결과 봄맞이 추출물은 우수한 tyrosinase 억제 효능을 가지며 특히, 멜라닌 생합성 저해 효과는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 그 생성 억제율이 32%로 나타났고, B16F1 멜라노마 세포에서 농도 의존적으로 멜라닌 생성 양을 억제하는 것을 확인하였다. 세포 내에서의 미백 메커니즘을 밝히기 위해 western blot 방법을 이용하였으며, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 봄맞이 추출물이 microphthalmia associated transcription factor (MITF), tyrosinase, TRP-1의 발현을 억제함을 확인하였다. 위 결과를 통해, 봄맞이 추출물의 우수한 미백 효능을 확인할 수 있었으며, 향후 미백 화장품 소재로서 개발 가능성이 클 것으로 기대된다. 이 발견을 바탕으로, 봄맞이 추출물의 미백 효능에 대한 유전자 수준 또는 추가적인 메커니즘 연구를 통해 기능성 화장품 뿐 아니라, 의약품, 건강기능식품으로의 활용을 기대한다.

Abstract: The purpose of this study is to identify the whitening effect of *Androsace umbellata* extract. To discover the anti-pigmentation effective, we investigated *Androsace umbellata* extract on tyrosinase and melanogenesis inhibition. As results, it reduced tyrosinase activity and melanin contents in B16F1 melanoma cells in a dose-dependent manner with decreased to about 32% at a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. To reveal how it works in inner-cellular level, we performed Western blot method. We found out that it also inhibited the protein expression in tyrosinase, tyrosinase related protein 1 (TRP-1), and microphthalmia associated transcription factor (MITF) in melanocytes.

Therefore, we successfully identified the whitening effect of *Androsace umbellata* extract, and this finding suggested that *Androsace umbellata* extract is a considerable potent cosmetics ingredient for whitening. Based on this, we anticipated further researches about *Androsace umbellata* extract for gene levels and additional mechanisms to develop not only for functional cosmetics but for medicines or healthcare food.

Keywords: *Androsace umbellata*, whitening, tyrosinase, melanin

[†] 주 저자 (e-mail: 209085@kolmar.co.kr)
call: 043)218-1057

1. 서 론

멜라닌은 피부를 보호하는 역할을 하나 이의 과생성은 기미, 주근깨, 검은반점 등의 피부질환을 일으킨다[1]. 멜라닌의 합성은 피부의 기저층에 존재하는 melanocyte에서 melanosome을 만들어 이루어지며 멜라닌이 합성되는 일련의 과정을 총칭하여 melanogenesis라 한다[2]. 멜라닌 합성은 아미노산의 하나인 tyrosine을 기질로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2)에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 거쳐 DOPA quinone으로 전환된 후 비효소적 반응, 자발적 산화 과정을 거친 후 아미노산 혹은 단백질과의 중합 반응에 의해 멜라닌이 합성된다[3,4]. 멜라닌을 생성하는 첫 단계로 tyrosinase가 가장 중요한 역할을 하는 rate-limiting 효소로 알려져 있으며 최근 과도한 멜라닌의 생성을 억제하려는 목적으로 다양한 tyrosinase 저해제의 개발이 활발히 진행되고 있다[5]. 최근에는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 뿐만 아니라 microphthalmia associated transcription factor (MITF) 등과 같은 단백질을 이용하여 멜라닌 합성 억제에 대한 연구가 이루어지고 있다. 주요한 세포 내 신호전달 경로는 cyclic monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) 경로로서, cAMP는 PKA, cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1)을 경유하여 MITF의 발현을 촉진하며 MITF는 멜라닌 합성 과정에서 중요한 전사 조절 인자로 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진한다[6,7]. 현재 미백제로 가장 많이 사용되는 알부틴은 L-tyrosine과 경쟁적으로 작용하는 저해제이며, 코직산은 tyrosinase 활성 부위를 chelating하여 tyrosine에서 DOPA, DOPA-quinone으로 진행되는 과정을 저해한다[8,9]. 알부틴과 코직산은 강력한 미백효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 일부 부작용으로 인하여 천연의 물질로부터 미백활성을 가지는 물질의 개발에 노력하고 있다[10].

봄맞이는 쌍떡잎식물 합판화군 앵초목 앵초과의 한 두해 살이 풀로 잎은 길이가 1 ~ 4 cm이며 잎새는 둥글어 거의 반원형이며 촘촘히 모여 있고 심장형으로 가장자리에는 둔한 이 모양의 톱니가 있다. 꽃자루는 1 ~ 3 cm이며, 열매는 6 cm까지 자란다. 과실은 약용으로 쓰이는데 약효로는 소염과 통증 등 진통제 효과가

있다고 알려져 있다[11,12]. 봄맞이는 현재까지 미백 효능과 관련된 연구가 진행되지 않았으나, 본 연구를 통하여 봄맞이 전초가 tyrosinase, TRP-1, MITF를 억제하여 미백 효능이 있음을 밝혔고 더 나아가 미백 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 기기 및 시약

본 연구를 위한 실험에 사용된 시약은 Tyrosinase mushroom (Sigma, USA), α -Melanocyte stimulating hormone (α -MSH) (Sigma, USA), Neutral red (Sigma, USA), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Thermo scientific, USA), Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA), Antibiotic-antimycotic (100X) (Gibco, USA) 및 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, β -actin은 Santacruz biotechnology (USA)에서 구입하여 사용하였으며, 기기는 Microplate reader (Bio-rad, USA), Chemi-Doc (ATTO, Japan)을 사용하였다.

2.2. 시료 추출물의 구매

본 실험에 사용된 봄맞이(*Androsace umbellata*)는 분쇄 후 99% 메탄올로 추출하여 감압농축 된 것으로 분량 번호는 302-044이며, 한국생명공학연구원 한국식물추출은행에서 구입하였다.

2.3. 미백효능 평가

2.3.1. 세포배양

ATCC에서 구매한 mouse melanoma (B16F1) 세포를 10% fetal bovine serum (FBS), 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)으로 배양기에서 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

2.3.2. 세포독성측정

본 연구의 목적인 봄맞이 추출물의 미백효능 평가에 앞서 mouse melanoma 세포에 대한 봄맞이 추출물의 유효농도를 결정하기 위해 세포독성측정(Neutral red uptake assay)을 진행하였다. 10% FBS, 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM으로 배양기에서 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 배양시킨 B16F1 세포를 96 well

plate에 각각 5×10^4 cell/wells로 접종하고 24 h 배양하였다. 동일한 배지로 교체한 후 봄맞이 시료를 농도별로 배지로 희석하여 처리한 후 72 h 동안 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포가 배양된 각 well에 5 mg/mL neutral red 용액과 10% FBS, 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM을 혼합하여 200 μ L씩 처리한 후 2 h 배양하였다. 1% CaCl₂와 1% formaldehyde 용액을 넣은 후 1 min 교반 후 1% Acetic acid와 50% EtOH 용액을 넣고 15 min 교반 시킨 후 microplate reader (Bio-rad, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3.3. 멜라닌 생성률 측정

10% FBS, 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM으로 배양기에서 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 배양시킨 B16F1 세포를 6-well plate에 각각 5×10^4 cell/wells로 접종하고 24 h 배양하였다. 200 nM α -MSH가 포함되어있는 배지로 시료를 농도별로 제조하여 처리한 후 72 h 배양하였다. 이때, 양성 대조군은 알부틴으로 사용하였다. 배양된 세포의 배지를 제거하고 1X PBS로 세척한 후 trypsin을 처리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 1,000 rpm, 5 min 원심분리한 후 상등액을 제거하였다. 이때 회수된 pellet을 70 °C, 1 h 동안 건조한 후 10% DMSO가 함유된 1 M NaOH 용액 400 μ L을 넣어 멜라닌을 용해시킨 후, microplate reader (Bio-rad, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.3.4. Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해 활성은 L-tyrosine을 기질로 하여 mushroom tyrosinase를 이용하여 측정하였다. L-tyrosine (Sigma, USA), mushroom tyrosinase (Sigma, USA)를 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5)에 녹인 후 시료와 혼합하여 37°C에서 1 h 반응시킨 후 microplate reader (Bio-rad, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 대조군으로 arbutin을 사용하였으며 tyrosinase 저해 활성은 tyrosinase를 넣지 않은 대조군과 비교하여 상대적인 활성으로 나타내었다.

2.3.5. Western Blot Analysis

10% FBS, 5% antibiotic-antimycotic을 첨가한 DMEM으로 배양기에서 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 배양시킨 B16F1 세포를 6-well plate에 접종하고 24 h 배양하였

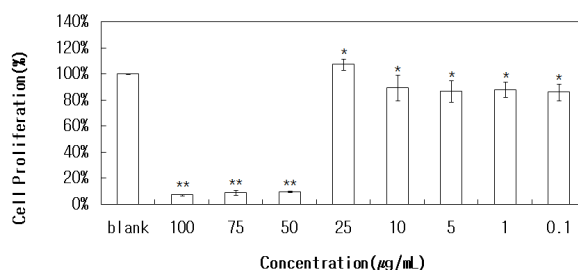


Figure 1. Cell viability of *Androsace umbellata* extract on B16F1 melanoma cells by NRU assay. The cells were treated various concentrations of samples. The results were expressed as the average of triplicate samples. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 compared with control.

다. 200 nM α -MSH가 포함 되어있는 배지로 시료를 농도별로 제조하여 처리한 후 72 h 배양하였다. 세포를 PRO-PREP protein extraction solution (Intron biotechnology, Korea)으로 용해하고 원심분리 하였다. 여기서 얻은 상층액을 8 ~ 10% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동을 수행하고 PVDF membrane으로 이전시켰다. 5% skim milk가 함유된 tris 완충용액으로 1 h blocking 수행한 후, tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF, β -actin 1차, 2차 항체와 각각 반응시켰다. Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, USA)를 이용하여 2 min 반응시킨 후 Chemi-Doc (ATTO, Japan)을 사용하여 현상하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 미백 효능 평가

3.1.1. 세포독성 결과

Mouse melanoma 세포에 대한 봄맞이 추출물의 세포독성 측정과 실험에 사용될 유효농도 범위를 결정하기 위해 NRU assay를 시행하였다. B16F1 melanoma 세포에 대한 세포독성을 측정한 결과, 25 μ g/mL 이하의 농도에서 세포생존율이 90% 이상으로 나타났다 (Figure 1).

3.1.2. 멜라닌 생성률 측정 결과

봄맞이 추출물의 미백효능을 평가하기 위하여 mouse melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 생성률을 측정하였다. 봄맞이 추출물을 6.25, 12.5, 25 μ g/mL 농도

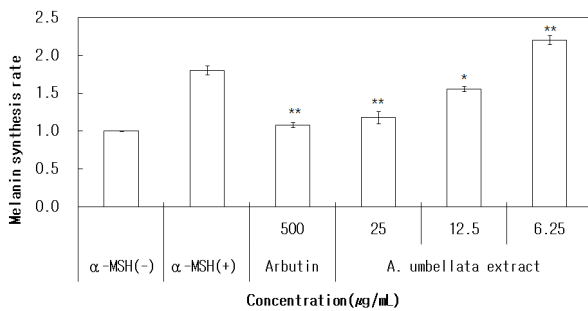


Figure 2. Melanin synthesis inhibition of *Androsace umbellata* extract on B16F1 melanoma cells. The treated cells were lysed with 1 N NaOH and 10% DMSO and the absorbance was measured at 490 nm. The results were expressed as the average of triplicate samples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control.

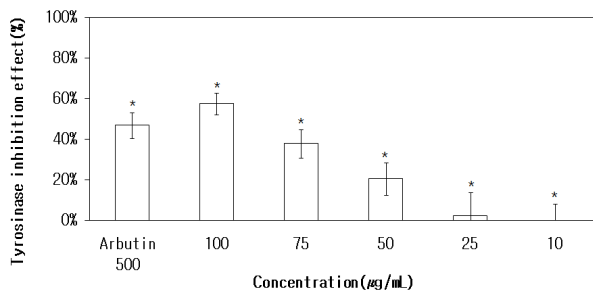


Figure 3. Tyrosinase activity inhibition of *Androsace umbellata* extract sample treated various concentrations of samples. The results were expressed as the average of triplicate samples. * $p < 0.01$ compared with control.

로 처리한 세포를 수집하여 멜라닌 양을 측정한 결과 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 저해됨을 확인하였다 (Figure 2). 최고 유효농도 25 µg/mL 농도에서 약 32% 멜라닌 합성이 저해되었고, 양성대조군으로 사용한 arbutin은 500 µg/mL 농도에서 약 39%로 억제 되었다. 봄맞이 추출물은 양성대조군인 arbutin보다 현저히 낮은 농도에서 우수한 멜라닌 합성 저해 효과를 나타냄으로써 우수한 미백 효과를 입증하였다.

3.1.3. Tyrosinase 저해 활성 결과

봄맞이 추출물의 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과, 100 µg/mL 농도에서 50% 이상의 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다(Figure 3). 양성대조군으로 사용한

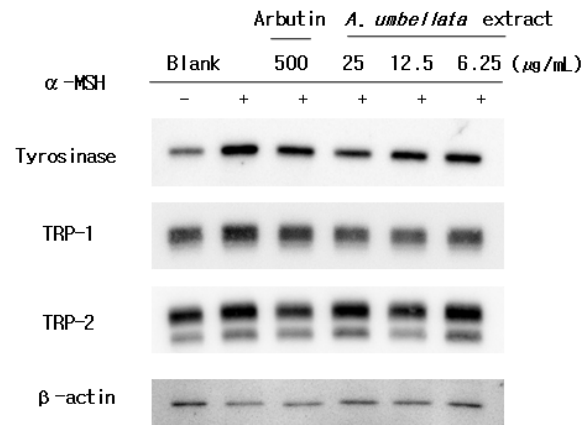


Figure 4. The effect of *Androsace umbellata* extract on tyrosinase, TRP-1 protein expression in melanoma cells. The cells were treated with various concentration of *Androsace umbellata* (25, 12.5, 6.25 µg/mL).

arbutin은 500 µg/mL 농도에서 약 47%의 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다. 봄맞이 추출물은 양성대조군인 arbutin보다 현저히 낮은 농도에서 tyrosinase 저해 활성을 나타냄으로써 우수한 미백 효과를 입증하였다.

3.1.4. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF의 단백질 발현 저해 결과

봄맞이 추출물의 멜라닌 합성 억제 효과가 멜라닌 합성 효소인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 멜라닌 형성에 중요한 transcription factor인 MITF의 발현과 관련된 효과인지 알아보기 위하여 western blotting을 수행하였다. 그 결과, 봄맞이 추출물은 최고 유효농도 25 µg/mL의 농도에서 멜라닌 합성 효소인 tyrosinase, TRP-1의 발현도를 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났으며, transcription factor인 MITF의 발현을 억제함을 확인하였다(Figure 4, 5).

Melanin 합성 아미노산의 하나인 tyrosine은 tyrosinase, TRP-1, TRP-2에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 거쳐 DOPA quinone으로 전환되고 자동산화반응과 효소반응으로 DOPA chrome을 거쳐 멜라닌을 생성한다. 이와 같은 단백질은 멜라닌 생성 합성의 중요한 전사 조절 인자인 MITF에 의해 축진이 조절된다. 따라서 실험 결과 봄맞이 추출물은 MITF의 발현이 억제됨에 따라 tyrosinase, TRP-1의 단백질 발현이 감소되어 멜라닌 생성 억제로 이어지는 것이라 판단된다.

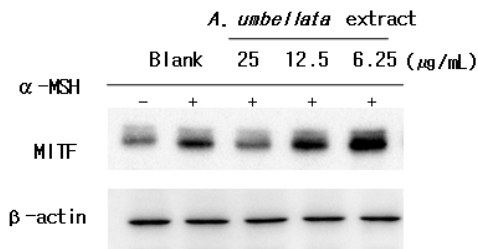


Figure 5. The effect of *Androsace umbellata* extract on MITF protein expression in melanoma cells. The cells were treated with various concentration of *Androsace umbellata* (25, 12.5, 6.25 µg/mL).

4. 결 론

본 연구에서는 봄맞이 추출물의 미백 화장품 원료로서의 가능성을 알아보기 위하여 tyrosinase 활성 저해율을 측정하고 B16F1 멜라노마 세포를 이용하여 농도 의존적으로 멜라닌 생성 양을 억제하는 것을 확인하였다. Western blotting을 수행하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF와 같은 멜라닌 생성관련 단백질에서의 저해 효과를 알아본 결과, tyrosinase, TRP-1, MITF의 발현이 모두 억제됨을 확인할 수 있었다. 따라서 멜라닌 합성 조절 전사 인자인 MITF의 발현이 억제됨에 따라 tyrosinase, TRP-1의 발현도 억제되어진 것으로 판단된다. 이로써 봄맞이 추출물의 미백 효능을 입증하였고, 추후 미백 화장품료로서의 적용과 그에 따른 피부에서의 안전성 및 피부 미백 효능 평가를 진행하여 미백 화장품료로서 적용할 예정이다.

Acknowledgement

본 연구는 지식경제부 월드 클래스 300 R&D 지원 사업(한국콜마, 국내 자생식물 대량 정제 기술을 이용한 기능성 한방화장품 개발) 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Reference

1. S. Y. Choi, N. N. Kim, Y. E. Kim, Y. Lee, S. J. Kim, and J. H. Kim, Inhibitory effects of cultured *Tricholoma matsutake* mycelia on melanin biosyn-

- thesis, *Korean J. FOOD SCI. TECHNOL.*, **43**(2), 240 (2011).
2. K. J. Kwon, Master's Thesis Dissertation, Graduate School of Konkuk University (2013).
3. Y. J. Sin, D. Han, S. J. Kim, and I. H. Kim, Lipophilic extract obtained from plants to Inhibit tyrosinase activity in reverse micelles, *Korean J. FOOD SCI. TECHNOL.*, **32**(3), 736 (2000).
4. S. Y. Lee, H. J. Jun, I. C. Lee, and J. Y. Lee, Down-regulation of tyrosinase, MITF, TRP-1, and TRP-2 expressions by *Juniperus rigida sieb.* in murine B16F10 melanoma, *Journal of Life Science*, **23**(12), 1445 (2013).
5. S. H. Kim, J. H. Ahn, J. Y. Jeong, S. B. Kim, Y. H. Jo, B. Y. Hwang, and M. K. Lee, Tyrosinase inhibitory phenolic constituents of *Smilax china* leaves, *Kor. J. Pharmacogn.*, **44**(3), 220 (2013).
6. S. H. Park, A. H. Kim, B. J. Park, and J. J. Kim, Whitening effect of Biochanin A, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **39**(4), 289 (2013).
7. G. S. Han, D. S. Kim, W. H. Woo, and Y. J. Mun, Inhibitory effect of *Fructus ligustri lucidi* on tyrosinase and MITF expressions, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **24**(2), 296 (2010).
8. Y. S. Jeon, Y. J. Jung, J. K. Youm, Y. K. Kim, and S. N. Kim, Inhibitory effect of *Endarachne binghamiae* extract on melanin synthesis, *Korean J. Plant Res.*, **26**(5), 526 (2013).
9. K. H. Kim, D. M. Kim, S. R. Yu, and H. S. Yook, Antioxidant and whitening activities of various cultivars of korean unripe peaches (*Prunus persica* L. Batsch), *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **41**(2), 156 (2012).
10. H. U. Son, S. H. Lee, M. A. Kim, H. J. Parl, and S. H. Lee, Comparison of Melanogenesis-Inhibiting Activity by Extracts of *Prunus persica* Flower and Calyx, *Korean J. Food Preserv.*, **19**(6), 946 (2012).
11. J. H. Park, J. H. Kwak, J. H. Khoo, S. H. Park, D. U. Kim, D. M. Ha, S. U. Choi, S. C. Kang, and O. P. Zee, Cytotoxic effects of triterpenoid saponins from *Androsace umbellata* against multidrug resist-

ance (MDR) and non-MDR cells, *Arch. Pharm. Res.*,
33(8), 1175 (2010).

12. C. M. Lee, Master's Thesis Dissertation, Graduate
School of Sungkyunkwan University (2007).