

Dendrobium speciosum 에탄올 추출물의 melanin 생성 억제 효능 및 주름개선 효과

심미옥¹, 이효은¹, 장지훈¹, 정호경¹, 김태묵¹, 김민석^{1,2}, 정원석^{1*}

¹한약진흥재단 한약자원본부, ²원광대학교 한의학과 병리학교실

Anti-melanogenesis and Anti-wrinkle Properties of Korean Native *Dendrobium speciosum* Ethanol Extract

Mi-Ok Sim¹, Hyo-Eun Lee¹, Ji-Hun Jang¹, Ho-Kyung Jung¹, Tae-Muk Kim¹,
Min-Suk Kim^{1,2} and Won Seok Jung^{1*}

¹National Development Institute of Korean Medicine, Jangheung 59338, Korea

²Department of Pathology, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea

Abstract - Melanin is produced by melanocytes of the melanoepidermic unit and other cell types. These cells secrete and distribute the melanin pigment, which provides protection from ultraviolet radiation. In this study, the inhibitory activity against tyrosinase and melanin biosynthesis in B16F10 melanoma cells and anti-wrinkling effects on human dermal fibroblasts of *Dendrobium speciosum* ethanol extract were investigated. The *Dendrobium speciosum* extract inhibited melanin biosynthesis and tyrosinase activity in a dose-dependent manner in comparison with an untreated control group. Treatment with the *Dendrobium speciosum* extract suppressed α -MSH-stimulated melanogenesis in B16F10 cells and the dendrite outgrowth of melanocyte/melanoma cells. The α -MSH-induced mRNA expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), tyrosinase-related protein-2 (TRP-2) and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) was significantly attenuated in a concentration-dependent manner by *Dendrobium speciosum* treatment. In addition, *Dendrobium speciosum* treatment increased production of type I procollagen synthesis in human dermal fibroblasts. *Dendrobium speciosum* ethanol extract exhibited a potent inhibitory effect on melanin biosynthesis, tyrosinase activity and increased procollagen synthesis. These results indicate that *Dendrobium speciosum* shows promise as an ingredient in cosmeceutical products due to its whitening and anti-wrinkle effects.

Key words - *Dendrobium speciosum*, Melanin, Tyrosinase, Whitening

서 언

Melanin은 생물에 널리 분포되어 있으며, 사람의 피부색 및 머리카락, 눈동자의 색을 결정하는 주요 인자 중 하나로서 피부의 표피층에 존재하는 melanocyte에서 합성된다(Seiberg, 2001; Ando *et al.*, 2012). Melanin 합성은 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TYRP-1), tyrosinase related protein-2 (TYRP-2)와 같은 효소들에 의해 이루어지며 이들은 tyrosine 을 3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA)를 거쳐 DOPA quinone

으로 전환하고 붉은 계열의 eumelanin과 갈색계열의 pheomelanin 이 합성시킨다. microphthalmia-associated transcription factor (MITF)는 TYRP-1, TYRP-2, tyrosinase 등 효소들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 이유로 MITF 및 melanin 형성 관련 효소들을 저해하는 것은 미백기능성을 증명하는데 주요한 요인이다(Bentley *et al.*, 1994; Hemesath *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2009; Olivares and Solano, 2009; Ahn *et al.*, 2015).

피부 탄력성은 진피조직의 두께로 결정되며, 이는 진피조직을 형성하는 collagen 형성과 밀접한 관계가 있다. 이러한 collagen의 억제와 파괴증가는 탄력성을 저하시켜 주름 형성의

*교신저자: i0823@nate.com

Tel. +82-61-860-2812

주요한 요인으로 작용한다(Lee *et al.*, 2003). 따라서, collagen 생성을 촉진 하는 것은 주름생성을 억제할 수 있다(Fisher *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2015).

현재 arbutin, kojic acid, linoleic acid를 포함하는 많은 tyrosinase 저해제가 의약부외품과 기능성 화장품의 미백 원료로 광범위하게 사용되고 있으나, 의학계나 화장품업계에서는 피부 안정성, 제형 안정성 등의 문제로 제한된 양만 사용되고 있다(Chun *et al.*, 2002; Seo *et al.*, 2003). 따라서 안전성이 높은 천연물질을 이용한 기능성 제품 개발이 필요하다(Park *et al.*, 2013).

*Dendrobium speciosum*은 난초과의 여러해살이풀로, 호주 동부에서 자생하는 대형종 난이다. 가인경(假鱗莖)은 45 cm 정도까지 달하며, 각각의 가인경 끝에 2~5개의 두툼한 잎이 달린다. 이러한 *Dendrobium speciosum*의 약리작용에 대한 연구는 동속에 속하는 식곡(*Dendrobium moniliforme*)과 달리 항산화 또는 항유전독성 효능에 대해서 보고되어져 있으며(Moretti *et al.*, 2013), 대부분 관상용으로 판매 유통되고 있어 산업화와 관련된 기능성 연구가 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 *Dendrobium speciosum*의 추출물을 활용하여 미백효능 및 주름개선을 평가하여 향후에 제품화 소재로 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

*Dendrobium speciosum*는 경남 거제 일운 화훼작목반에서 구입하여 전남한방산업진흥원 유리온실에서 생육시켜 정선, 수세 후 건조하여 분쇄기를 이용하여 균일하게 분쇄한 후 70% EtOH를 칭량한 시료무게의 10배를 넣고 환류냉각으로 3시간, 3회 반복하여 추출물을 제조하였다. 이 추출물을 감압농축기(NE-10001V, Eyela, Japan)로 농축하여 완전히 용매를 제거한 시료를 실험 목적에 맞춰서 용매에 녹여 실험에 사용하였다.

시약

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, Medium 106, Low Serum Growth Supplement는 Gibco/BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS, CellTiter 96Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay)는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. α -

MSH와 L-DOPA는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Procollagen type I C-prptide EIA kit는 Takara (Shiga, Japan)에서 protein 정량에 사용하는 Bradford 시약은 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)에서 구입을 하였다.

세포주 및 세포배양

B16F10 melanin 세포주는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)을 사용하였고, Human Dermal Fibroblasts, neonatal (HDFn) 세포는 Gibco에서 구입하여 Medium 106 배지에 Low Serum Growth Supplement (LSGS)를 넣고 CO₂배양기(MCO-17A1, Sanyo, Japan)에서 온도 37°C, 5% CO₂조건에서 배양하였다

세포 독성 측정

B16F10와 HDFn 세포를 96well plate에 5×10^3 cells/well로 세포를 분주하여 24시간동안 세포를 안정화 시킨 뒤에 *Dendrobium speciosum*시료를 농도별로 처리를 하였다. 24시간 배양을 한 뒤에 MTS 용해액을 세포배양액 용액의 1/10을 첨가한 후 37°C에서 2시간 배양하였다. ELISA microplate reader (Infinite 200 pro, TECAN, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포내 tyrosinase activity 측정

B16F10 세포를 6well plate에 5×10^4 cells/well로 세포를 분주하여 24시간동안 세포를 안정화 시킨 뒤에 *Dendrobium speciosum*시료를 농도별로 0, 31, 25, 62, 5, 125, 250 μ g/ml 처리를 하였고 1시간 뒤에 α -MSH를 100 nM이 되게 처리를 한 뒤에 72시간 동안 배양을 하였다. PBS로 2회 세척을 하고 RIPA protein lysis buffer을 처리를 한 후에 4°C에서 30분 동안 incubation을 하였다. 그 후에 4°C 13,000 rpm 30분 원심분리를 통해 단백질을 든 상층액만을 가지고 tyrosinase activity를 측정하였다. 단백질 양을 Bradford 정량법을 통해 595 nm로 ELISA를 측정을 하고 동일한 단백질을 이용해서 L-DOPA를 처리를 하여 540 nm 흡광도로 세포내 tyrosinase activity를 측정하였다(Jung *et al.*, 2014).

Melanin 측정 및 관찰

B16F10 세포에 60 mm 세포배양접시에 5×10^4 cells/well로 세

포를 분주하여 *Dendrobium speciosum*추출물을 a-MSH (100 nM)보다 1시간이전에 처리를 하고 72시간동안 배양을 하였다. 그 후에 PBS로 2회 wash를 하고 Trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 수확한 뒤 3000 rpm에 5분동안 세포를 모으고 상층액을 제거한 후 10% dimethylsulfoxide (DMSO)가 첨가된 1N NaOH 용액을 처리하여 80°C에서 1시간 동안 반응시켰다. melanin 정량은 합성melanin을 이용하여 ELISA microplate reader로 410 nm에서 각각의 흡광도를 측정하였다.

미백관련 유전자 발현 Real-time PCR

미백관련 유전자 발현을 확인하기 위해서 B16F10 세포를 60 mm 세포배양접시에 1 × 10⁵ cells/well로 세포를 분주한 후 24시간 배양한다. *Dendrobium speciosum*추출물을 다양한 농도로 1시간 동안 처리 한 뒤 a-MSH (100 nM)로 melanin 생성을 유도하여 24시간동안 배양을 하고 PBS로 2회 세척 후 세포를 수확하였다.

수확한 세포는 Tripure Isolation Reagent (Roche, Switzerland)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 5 µg의 mRNA를 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystem, USA)를 이용하여 cDNA로 합성을 하였다. 실험은 제조사 매뉴얼에 따라 수행하였다. 합성된 cDNA 1 µl, taqman primer 1 µl, Taqman Universal Master Mix II (Applied biosystem, USA) 10 µl, 3차 증류수 8 µl를 넣고 Real-time PCR기기(ABI7500, Applied biosystem, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 정량 증합 효소 반응에 쓰인 유전자 특이적 gene의 정보는 Table 1에서 나타내었다. 또한 Real-time PCR 반응 조건은 50°C에서 2분 95°C에서 10분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95°C에서 15초 어닐링 온도 60°C에서 15초인 사이클을 40회 반복 수행하였다.

Procollagen type I C-peptide 생합성 측정

Collagen 생합성량 측정은 procollagen type I C-peptide EIA kit (Takara, Japan)를 이용하여 kit 매뉴얼에 따라 실험하였다. Human Dermal Fibroblasts, neonatal (HDFn) 세포를 Medium 106 배지에 LSGS를 넣고 배양한뒤, 24 well plate에 2 × 10⁵개로 분주하여 24시간 후에 배양액을 교환하여 석곡 시료 용액을 농도 별로 처리한 뒤 24시간 뒤에 세포배양액을 채취하여 procollagen type I C-peptide EIA kit를 이용하여 collagen 생합성량을 측정하였다. 먼저 1차 collagen 항체가 균일하게 도포된 96 well plate에 채취한 세포 배양액 20 µl과 2'항체 100 µl를 섞어 넣고, 37°C 항온조에서 3시간 반응 시킨 뒤 PBS로 4회 세척한 다음 발색시켜 ELISA reader (Infinite 200 pro, TECAN, Austria)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균치 ± 표준편차(mean ± S.D.)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균 차이는 Student's t-test로 분석하여 p-value 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

***Dendrobium speciosum* 에탄올 추출물의 B16F10 세포주에 대한 세포독성평가**

B16F10 세포주에서 *Dendrobium speciosum* 에탄올 추출물의 독성을 조사하기 위해, MTS 실험을 수행하였다. 각각 B16F10 세포에 농도별(62.5, 125, 250, 500, 1,000 µg/ml)로 *Dendrobium speciosum* 추출물을 처리하고 24시간 후에 MTS를 처리한 결과(Fig. 1) 고농도인 500 µg/ml와 1,000 µg/ml에서

Table 1. Taqman gene-specific probes

Experimental purposes	Gene symbol	Gene description	TaqMan gene expression assay number	Reference sequence
Whitening	MITF	microphthalmia-associated transcription factor	Mm00434954_m1	nm_001113198.1
	TYRP1	tyrosinase-related protein 1	Mm00453201_m1	nm_001282014.1
	DCT (TYRP2)	dopachrome tautomerase	Mm01225584_m1	nm_010024.3
	HPRT	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (reference gene)	Mm01545399_m1	nm_013556.2

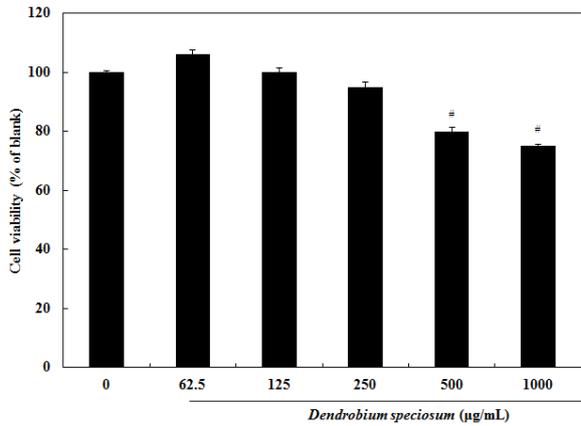


Fig. 1. Effect of *Dendrobium speciosum* on cell viability in melanoma (B16F10) cells. Cell viability was evaluated with the MTS assay. Data represent the mean \pm S.D. of triplicate determinations from three separate experiments. ([#] $p < 0.05$ versus control).

독성이 나타났으며, 나머지 농도에서는 독성이 없는 것으로 나타났다.

***Dendrobium speciosum* 에탄올 추출물의 B16F10 세포주에 대한 melanin 합성 저해효과**

Dendrobium speciosum 추출물이 B16F10 세포주에서 melanin 생합성에 미치는 영향을 확인하기 위해, *Dendrobium speciosum* 추출물(31.3, 62.5, 125, 250 µg/ml)과 대조군인 Arbutin 100 µg/ml 을 처리한 후 1시간 뒤에 α -MSH를 처리하여 melanin 생성을 유도한 후 72시간 배양하여 전체 melanin 함량을 비교하였다. 그 결과, α -MSH를 단독으로 처리한 세포군에 비해 *Dendrobium speciosum* 추출물시료를 처리한 군에서 농도 의존적으로 melanin 함량이 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 또한 *Dendrobium speciosum* 추출물 시료 62.5, 125, 250 µg/ml 처리한 그룹에서는 유의성 있게 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

***Dendrobium speciosum* 에탄올 추출물이 B16F10 세포내 tyrosinase 활성도 저해**

Dendrobium speciosum 추출물이 α -MSH의해 증가된 tyrosinase 활성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 세포 내 tyrosinase 활성도를 확인하여 보았다. 그 결과, α -MSH에 의해 tyrosinase 활성도가 증가한 것을 확인할 수 있었고 이를 *Dendrobium speciosum* 추출물에 의해 α -MSH에 의해 증가된 tyrosinase 활성을 낮출 수 있는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이는 *Dendrobium speciosum* 추출물 시료가 tyrosinase 활성을 낮춤

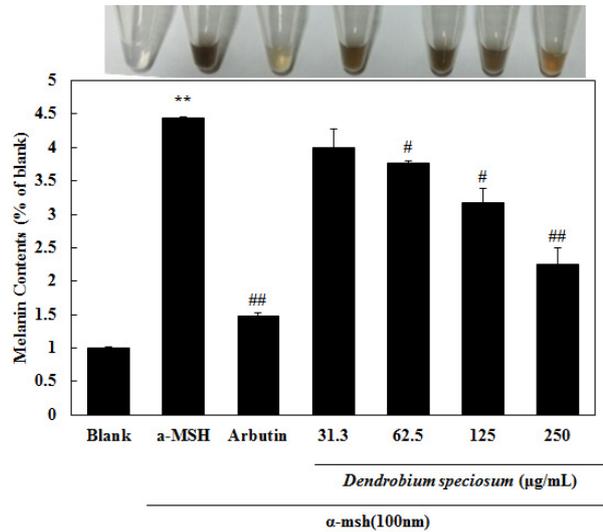


Fig. 2. The effect of *Dendrobium speciosum* on melanin contents in melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of *Dendrobium speciosum* and α -MSH (100 nM) cultured for 72 hours. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.D. of three experiments performed in triplicate. (^{**} $p < 0.01$ versus control, [#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$ versus α -MSH treatment alone).

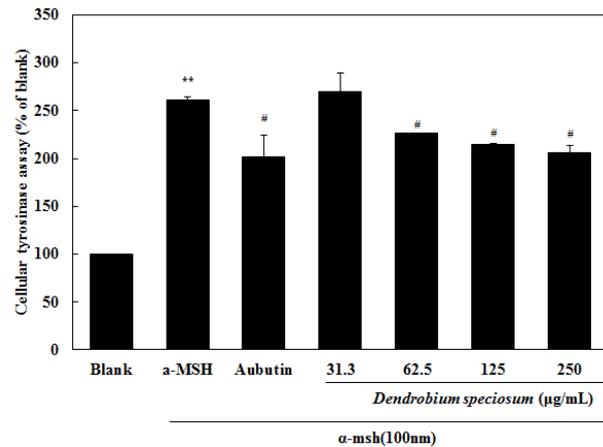


Fig. 3. Effect of *Dendrobium speciosum* and α -MSH on tyrosinase activity in melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of *Dendrobium speciosum*, arbutin 100 ng/ml and α -MSH (100 nM) cultured for 72 hours. Then, tyrosinase activity were measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.D. of three experiments performed in triplicate. (^{**} $p < 0.01$ versus control, [#] $p < 0.05$ versus α -MSH treatment alone).

으로써 미백기능을 할 수 있음을 시사한다.

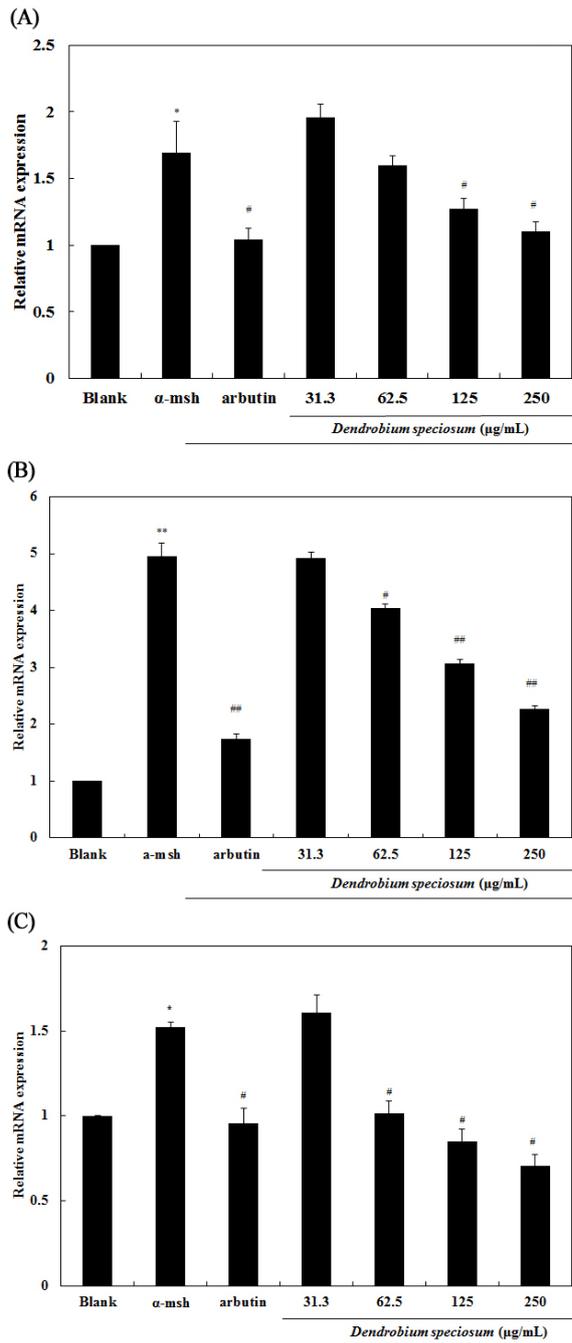


Fig. 4. Effect of *Dendrobium speciosum* on expression of MITF (A), TYRP-1 (B) and TYRP-2 (C) mRNA in melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of *Dendrobium speciosum* and α -MSH (100 nM) cultured for 24 hours. Then, expression of MITF, TRP-1 and TRP-2 mRNA were measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.D. of three experiments performed in triplicate (* $p < 0.05$ versus saline treatment, ** $p < 0.01$ versus control, # $p < 0.05$ versus α -MSH treatment alone, ### $p < 0.01$ versus α -MSH treatment alone).

Dendrobium speciosum 에탄올 추출물이 B16F10 세포주에서 melanin 합성 관련 유전자인 MITF, TYRP1, TYRP2 발현 저해

Dendrobium speciosum 에탄올 추출물이 melanin 합성 관련 유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 B16F10 세포주에 α -MSH와 *Dendrobium speciosum* 시료를 처리하여 24시간 후에 Realtime-PCR로 유전자발현을 확인하였다. 그 결과 *Dendrobium speciosum* 에탄올 추출물은 α -MSH에 의해 증가된 MITF, TYRP1, TYRP2의 mRNA 발현을 농도의존적으로 저해시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

Dendrobium speciosum 에탄올 추출물이 HDFn 세포주에서 한국 자생 석곡 메탄올 추출물에 의한 Procollagen 생합성 증대

Dendrobium speciosum 시료가 인체 진피 섬유아세포의 procollagen 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대명 석곡 시료가 인체 진피 섬유아세포의 procollagen 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대명 석곡시료를 독성이 없는 농도에서 처리하고 24시간 배양 후 procollagen 양을 조사하였다. 그 결과 자생 석곡 추출물은 처리하지 않은 대조군에 비하여 procollagen 합성을 농도 의존적으로 증대시켰으며, 처리한 가장 고농도인 500 μ g/ml 농도에서 비처리군에 비해 procollagen 합성이 약 50% 증가하였다(Fig. 5).

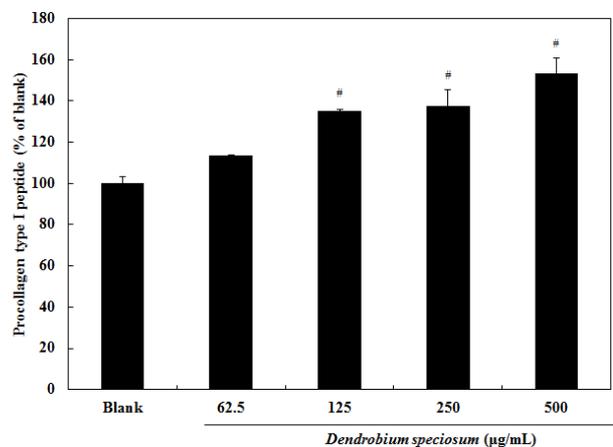


Fig. 5. Effect of *Dendrobium speciosum* on procollagen synthesis of human dermal fibroblast. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of *Dendrobium speciosum* cultured for 24 hours. Data are means \pm S.D. of three experiments performed in triplicate. (# $p < 0.05$ versus control).

고 찰

Melanin은 melanocyte에 의해 생성되며 피부색을 결정하는 색소이며, 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할을 한다(Yoon and Han, 2014). 하지만 과량으로 생성되어 제거되지 못하면 기미, 주근깨, 검버섯, 피부암 등의 질환과 같은 문제를 유발한다(Berneburg *et al.*, 2000). 본 연구에서는 *Dendrobium speciosum*의 melanin 합성 억제 효과와 collagen 생합성 효과를 조사하여 미백기능성 및 주름개선 화장품으로서 적합한가를 조사하였다. 먼저, 세포생존능 실험 결과를 토대로 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 250 $\mu\text{g/ml}$ 의 melanin 생성 저해 효과 및 tyrosinase 활성 역시 수행하였다. Tyrosinase는 melanin 생성 과정에 있어서 중요한 단백질로서, 이 효소는 아미노산인 tyrosine을 DOPA로 전환시키며 향후 DOPA quinone 그리고 dihydroxyindole (DHI)로 부터 DOPACHROME 거쳐 흑갈색의 melanin을 형성한다(Miyamura *et al.*, 2006; Schiaffino *et al.*, 2010). 본 연구에서에서는 *Dendrobium speciosum* 처리 시, melanin합성 및 tyrosinase의 활성이 농도 의존적으로 감소하였다. 특히, *Dendrobium speciosum*을 처리한 군중에서도 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서부터 유의적으로 melanin합성 및 tyrosinase 활성이 감소되었다. 이는 *Dendrobium speciosum*이 tyrosinase 활성을 저해시켜 $\alpha\text{-msh}$ 에 유도된 melanin 합성을 억제시킨 것으로 사료된다.

*Dendrobium speciosum*의 melanin 합성 억제 효과를 보다 자세히 조사하기 위해 Real-time PCR을 이용하여 미백관련 유전자 발현 수준을 조사하였다. Tyrosinase 활성에 관여한다고 알려진 대표적인 전사인자는 MITF로서, $\alpha\text{-MSH}$ 가 MC1R에 결합함으로써, GPCR-cAMP-MITF 신호전달을 통해 melanin 합성이 이루어진다(Yang *et al.*, 2011). 이 신호전달을 통해 MITF 발현이 증가하게 되고 번역반응을 통해 단백질로 생성 되고, 이러한 MITF 단백질이 핵안으로 translocation 되어 전사인자로서 melanin 합성과 관련된 key 효소인 tyrosinase, TYRP1, TYRP2의 유전자 발현을 증가시키게 된다(Liu and Fisher, 2010; Kim *et al.*, 2011). *Dendrobium speciosum* 에탄올 추출물은 이러한 key효소들의 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었고, *Dendrobium speciosum* 에탄올 추출물이 MITF와 관련된 신호전달을 억제하여 melanin 합성 관련물질들인 Tyrosinase, TYRP1, TYRP2를 저해하여 최종적으로 melanin 생합성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

Collagen은 피부를 구성하는 진피층을 구성하고 있는 주요

구조 단백질로 피부, 골, 인대, 연골 및 치아 등에 높은 농도로 존재하고 있으며, 섬유아세포에서 세포외기질을 구성하는 중요한 구성요소이다(Yoo *et al.*, 2010). 특히, collagen은 수분 균형을 유지하고, 자외선과 같은 외부자극으로부터 피부 손상을 막아주는 역할을 하여 주름 예방 및 탄력적인 피부를 유지하는데 밀접한 연관이 있으며, 이러한 collagen의 감소는 피부노화 및 주름생성의 원인으로 작용한다(Yang *et al.*, 2013). 그러므로 collagen 합성을 촉진하는 소재의 발견은 화장품 원료로서의 이용이 매우 크다고 볼 수 있다.

Procollagen은 collagen의 전구체로서 propeptide라 불리는 peptide sequence를 가지고 있다. Propeptide는 소포체내에서 collagen 생성을 관여하며 동시에 collagen 분자로부터 분리된다(Dumont *et al.*, 2010). 따라서, collagen 생합성의 양은 propeptide의 양을 측정함으로써 그 생합성 효과를 유추할 수 있다. Fig. 5의 결과처럼 대명 석곡은 농도 의존적으로 procollagen 합성을 유도하는 것으로 나타났으며, 이에따라 *Dendrobium speciosum*는 주름개선에 효과가 있을것으로 사료된다.

위 연구결과들을 토대로 *Dendrobium speciosum* 에탄올추출물은 효과적인 미백 및 주름개선 기능성 화장품 소재로 사용 가능할 것으로 보이며, 효율적인 추출법, 전임상 동물실험 그리고 유효성분의 개발과정이 수반되어야 한다고 사료된다.

적 요

본 연구에서는 *Dendrobium speciosum* 에탄올추출물의 티로시나아제 억제를 통한 멜라닌형성 저해 효과 및 주름개선 효과에 대해 연구하였다. *Dendrobium speciosum*추출물은 $\alpha\text{-MSH}$ 만 처리한 군에 비해 티로시나아제 활성을 농도 의존적으로 저해시킴으로서 멜라닌 함량을 감소시켰다. 더 자세한 메커니즘을 알아보기 위하여 멜라닌 합성 관련 유전자인 Tyrosinase-related protein-1, tyrosinase-related protein-2, Microphthalmia-associated transcription factor 발현을 확인하였을 때 *Dendrobium speciosum*처리군에서 유전자 발현이 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 *Dendrobium speciosum*처리 시 type I procollagen 합성이 증가함으로써 *Dendrobium speciosum*처리가 collagen 생합성을 증대시킬 것으로 사료된다. 이 결과를 바탕으로 *Dendrobium speciosum*에탄올 추출물 처리 시 멜라닌합성 관련 유전자의 발현 및 티로시나아제 활성을 저해시켜 멜라닌 합성이 감소됨에 따라 효과적인 미백활성을 가지며 collagen합성을 증대시킴으로서 주름개선에 탁월한 효과를 가

지는 것으로 사료되며 이는 기능성 화장품 소재로 사용가능할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ009470)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

References

- Ahn, J.J., T.Y. Hwang and H.S. Kim. 2015. Study on the physiological activities of *Cleyera japonica* extract. Korean J. Plant Res. 28:153-157 (in Korean).
- Ando, H.Y., M. Niki, K. Ito, M.S. Akiyama, D.B. Matsui, M. Yarosh and M. Ichihashi. 2012. Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. J. Invest. Dermatol. 132:1222-1229.
- Bentley, N.J., T. Eisen and C.R. Goding. 1994. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. Mol. Cell Biol. 14:7996-8006.
- Berneburg, M., H. Plettenberg and J. Krutmann. 2000. Photoaging of human skin. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 16:239-244.
- Chun, H.J., W.H. Choi, S.H. Baek and W.H. Woo. 2002. Effect of quercetin on melanogenesis in melan-a melanocyte cells. Korean J. Pharmacogn. 33:245-251 (in Korean).
- Dumont, S., L. Cattuzzato, G. Trouvé, N. Chevrot and C. Stoltz. 2010. Two new lipoaminoacids with complementary modes of action: new prospects to fight out against skin aging. Int. J. Cosmet. Sci. 32:9-27.
- Fisher, G.J., H.S. Talwar, J. Lin and J.J. Voorhees. 1999. Molecular mechanisms of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid. Photochem. Photobiol. 69:154-157.
- Hemesath, T.J., E.R. Price, C. Takemoto, T. Badalian and D.E. Fisher. 1998. MAP kinase links the transcription factor microphthalmia to C-Kit signalling in melanocytes. Nature 391:298-301.
- Jung, H.K., J.H. Jang, J.H. Ko, B.M. Kang, J.H. Yeo, J.H. Cho, H.W. Cho, C.G. Bean, S.C. Kim and W.S. Jung. 2014. Whitening and anti-wrinkle effects of Korean native *Dendrobium moniliforme* methanol extract. Korean J. Medicinal Crop. Sci. 22:331-338 (in Korean).
- Kim, N.Y., D.S. Park and H.Y. Lee. 2015. Effect of anti-skin wrinkle and antioxidant of *Agastache rugosa* Kentz through fermentation process of the lactic acid. Korean J. Medicinal Crop. Sci. 23:37-42 (in Korean).
- Kim, T.H., M.J. Kim, J.M. Baek, T.W. Kim, D.J. Kim, J.H. Park and M. Choe. 2011. Antioxidant and whitening effects of *Agrimonia pilosa* Ledeb water extract. Korean J. Medicinal Crop. Sci. 19:177-184 (in Korean).
- Lee, S.Y., J.H. An and H.Y. Cho. 2003. Isolation and characterization of MMP-1 inhibitor peptide from *Crataegus pinnatifida* bunge in fibroblast cell line HS68 cells. J. Korean. Soc. Appl. Biol. Chem. 46:60-65 (in Korean).
- Liu, J.J. and D.E. Fisher. 2010. Lighting a path to pigmentation: mechanisms of MITF induction by UV. Pigment Cell Melanoma Res. 23:741-745.
- Miyamura, Y., S.G. Coelho, R. Wolber, S.A. Miller, K. Wankamatsu, B.Z. Zmudzka, S. Ito, C. Smuda, T. Passeron, W. Choi, J. Batzer, Y. Yamaguchi, J.Z. Beer and V.J. Hearing. 2007. Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. Pigment Cell Res. 20:2-13.
- Moretti, M., L. Cossignani, F. Messina, L. Dominici, M. Villarini, M. Curini and M.C. Marcotullio. 2013. Antigenotoxic effect, composition and antioxidant activity of *Dendrobium speciosum*. Food Chem. 140:660-665.
- Olivares, C. and F. Solano. 2009. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. Pigment Cell Melanoma Res. 22:750-760.
- Park, E.Y., S.H. Lee and Y.C. Kim. 2013. Whitening efficacy of water-soluble extracts from *Prunophora salicina*'s (Daeseokjosaeng, Purplekin, Formosa) Peel. J. Invest. Cosmetology 9:27-32 (in Korean).
- Park, H.Y., M. Kosmadaki, M. Yaar and B.A. Gilchrist. 2009. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. Cell. Mol. Life Sci. 66:1493-1506.
- Schiaffino, M.V. 2010. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. Int. J. Biochem. Cell Biol. 42:1094-1104.
- Seiberg, M. 2001. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. Pigment Cell Res. 14:236-242.
- Seo, S.Y., V.K. Sharma and N. Sharma. 2003. Mushroom tyrosinase: recent prospects. J. Agric. Food Chem. 51:2837-2853.
- Wu, M., T.J. Hemesath, C.M. Takemoto, M.A. Horstmann, A.G. Wells, E.R. Price, D.Z. Fisher and D.E. Fisher. 2000. C-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation

- and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev.* 14:301-312.
- Yang, S.Y. and H.O. Boo. 2013. Phenolic compounds, antimicrobial effects and tyrosinase inhibition activities of cucumber grown greenhouse according to cultivars and growth stages. *Korean J. Plant Res.* 26:645-651 (in Korean).
- Yang, Y.M., Y.O. Son, S.A. Lee, Y.M. Jeon and J.C. Lee. 2011. Quercetin inhibits α -MSH-stimulated melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *Phytother. Res.* 25:1166-1173.
- Yoo, J.M., Y.J. Kang, H.B. Pyo, E.S. Choung, S.Y. Park, J.H. Choi, G.J. Han, C.H. Lee and T.J. Kim. 2010. Anti-wrinkle effects of Korean rice wine cake on human fibroblast. *J. Life Sci.* 20: 1838-1843 (in Korean).
- Yoon, M.Y. and Y.S. Han. 2014. Effect of anti-oxidant activity and the skin whitening action on *Plantago asiatica* L. root extract. *KSBB J.* 29:199-204 (in Korean).

(Received 7 December 2015 ; Revised 22 March 2016 ; Accepted 27 March 2016)