

## 울금(鬱金) 추출물의 미백 활성 및 진피 섬유구조 단백질에 미치는 효과

김혜옥<sup>\*#</sup>

경남대학교 간호학과

### Effect of *Curcuma longa* L. Extract on the Melanin Accumulation and Expression of Skin Fibril Proteins

Hae Ok Kim<sup>\*#</sup>

Department of Nursing, Kyungnam University

#### ABSTRACT

**Objectives** : In this study, various biological effects of *Curcuma longa* L. have been studied, however, beneficial effect of *Curcuma longa* L. in skin health remain still unclear. In this study, *Curcuma longa* L. water extract (CLE) was prepared. Inhibitory effect of CLE on melanin accumulation of B16F10 cells and expression levels of skin fibril-related proteins of human skin fibroblasts (HSF) were evaluated.

**Methods** : The cytotoxic effect of CLE in B16F10 cells and HSF were examined by MTT assay. Inhibitory effect of CLE on the  $\alpha$ -MSH- and IBMX-induced melanin accumulation and tyrosinase activity were evaluated in B16F10 cells. The expression levels of connective tissue growth factor (CCN2), Smad2, procollagen 1 $\alpha$ 2, collagen 1 $\alpha$ 2, and fibronectin in CLE-treated HSF were analyzed by western blotting.

**Results** : The CLE treatment (concentrations 10 to 400  $\mu$ g/ml) for 72 h did not affect to the B16F10 viability. However, 200 and 400  $\mu$ g/ml of CLE treatment for 24 h showed cytotoxic effect in HSF. Therefore, the concentrations 10, 50, and 100  $\mu$ g/ml of CLE were chosen in this study. The CLE treatment for 72 h dose dependently and significantly suppressed melanin accumulation and tyrosinase activity of B16F10 cells. In addition, the CLE treatment up-regulated expression levels of skin fibril-related proteins such as CCN2, Smad2, procollagen 1 $\alpha$ 2, collagen 1 $\alpha$ 2, and fibronectin.

**Conclusions** : In conclusion, these results suggest that the CLE could be used as a natural material for skin health.

**Key words** : *Curcuma longa* L., melanin, tyrosinase, skin, skin fibril

## I. 서론

피부는 인체의 가장 외곽에 존재하는 기관으로 크게 표피, 진피, 그리고 피하지방으로 구성되어 있다<sup>1)</sup>. 피부의 주요 기능은 신체 내부와 외부환경 사이에서의 보호층으로서 외부로부터의 손상, 미생물의 침입, 그리고 자외선 등 외적 요인들로부터 신체를 보호하고 피부의 두께와 주름을 결정하며 체온을 조절함으로써 체내 항상성을 유지한다<sup>2)</sup>. 사람의 피부는 노화, 외부의 자극, 정신적 스트레스, 불규칙적인 식습관 및 수면 부족 등의 요인들로부터 과도한 스트레스가 유도됨으로써

피부의 정상적인 기능이 저하된다.

피부의 최외곽 층인 표피는 약 28일간의 세포주기를 통해 새로운 피부를 형성한다. 표피의 기저층에 존재하는 melanocytes는 tyrosine의 단계적 산화과정을 통해 melanin을 형성한다. 피부에 적정수준으로 존재하는 멜라닌은 자외선 흡수 및 산란 등을 통해 피부의 손상을 보호하는 이로운 측면이 있지만, 과도하게 축적된 melanin은 기미, 주근깨, 그리고 검버섯 등의 색소침착의 원인이 된다<sup>3, 4)</sup>. 또한 melanin은 형성되는 양과 종류에 따라 피부, 머리카락, 그리고 눈동자 등의 색을 결정짓는 요인이기도 하다.

\*#Corresponding and First author : Hae Ok Kim, Department of nursing, Kyungnam University, 449, Wallyeong-dong, Masan-hapo-gu, Changwon-si, Republic of Korea.

· Tel : +82-55-249-6346. · E-mail : hok503@kyungnam.ac.kr

· Received : 04 January 2019 · Revised : 14 March 2019 · Accepted : 25 March 2019

진피는 피부의 구조와 탄력을 유지하는 데 있어 중요한 역할을 한다. 한편, 진피에 다량 존재하는 collagen은 피부 세포 외 기질의 주요 구성요소로서 피부의 형태를 유지하는 역할을 하는데, 최근 연구에서는 외부자극에 의해 감소된 procollagen에 의해 콜라겐의 분해가 증가되어 탄력이 감소되고 주름형성이 촉진된다고 보고하였다<sup>5)</sup>. 피부 섬유구조를 구성하는 collagen을 생성하고 탄력을 유지하는 데 있어 fibronectin의 역할 또한 중요하다. Fibronectin은 세포 외 기질 성분 중 하나로 피부의 탄력 유지, 밀착성 및 조직 복구 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>.

Connective tissue growth factor (CCN2) 단백질은 세포의 부착, 이동, 상처회복, extracellular matrix (ECM)을 형성하고 유지하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>1)</sup>. 최근 연구에서는 피부세포의 성장과 증식이 ECM의 형성과 밀접하게 관련되어 있음이 보고되었고<sup>7)</sup>, CCN2 단백질은 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 신호전달체계 활성화를 통해 ECM의 합성에 관여하고 있으며, 상처를 회복하는 작용에도 밀접하게 관련되어 있음이 알려 졌다<sup>8)</sup>. 앞서 보고된 연구결과는 피부 건강을 유지하는데 CCN2 단백질의 활성화는 피부세포의 성장, 분화, 그리고 상처회복 등에 도움이 될 수 있음을 시사한다.

울금(*Curcuma longa* L.)은 생강과에 속하며 인도, 미얀마 그리고 우리나라에서는 진도군에서 재배되고 있다. 울금은 덩이뿌리 또는 주피를 제거한 형태로 찌거나 말려 사용하며, 현재 한약재, 향신료, 음료, 그리고 차 등으로 여러 산업에서 다양하게 활용되고 있다. 울금의 주요한 생리활성 성분은 커큐민(curcumin)으로 알려져 있으며 이들의 항산화<sup>9)</sup>, 항암<sup>10)</sup>, 그리고 항비만 활성<sup>11)</sup> 등이 보고된 바 있으나, 피부 건강과 관련한 울금의 연구는 상대적으로 부족한 실정이다.

본 연구에서는 울금 물 추출물(CLE)을 제조하여 B16F10 세포에서 melanin 축적 억제 활성과 tyrosinase 저해 활성을 분석하였다. 더 나아가 CLE 처리가 human skin fibroblasts (HSF)에서 피부 섬유 단백질인 CCN2, Smad2, procollagen 1 $\alpha$ 2, collagen 1 $\alpha$ 2, 그리고 fibronectin, collagen, 그리고 fibronectin의 발현에 영향을 미치는지 알아보려고 하였으며, 이를 통해 피부미용 소재로서의 이용 가능성에 대해 고찰하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

본 연구에 사용된 울금은 대한민국 진도에서 재배된 것으로 인그린(주)(Pochun, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), antibiotics (penicillin-streptomycin cocktail), phosphate-buffered saline (PBS)는 Welgene Inc. (Daegu, Korea)에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS)은 GE Healthcare Bio-Sciences Co. (Piscataway, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), chloroform은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Isopropanol과 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 항체 CCN2 (SC-101586), Smad2 (SC-133098), Pro-collagen 1 $\alpha$ 2 (SC-166572), collagen (SC-376350), fibronectin (SC-69681), 그리고  $\beta$ -actin (SC-517582)는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 공급받아 사용하였다.

#### 2) 울금 물 추출물(CLE)의 제조

건조 후 분쇄한 울금 1.0 kg에 10.0 L의 증류수를 가하여 잘 섞어준 뒤 autoclave에서 121 $^{\circ}$ C로 15분간 열수 추출하였다. 울금 물 추출물은 여과지(Whatman No.1)로 여과한 뒤 동결건조하여 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하며 이후 분석에 사용하였다. 울금 물 추출물(CLE)의 수율은 17.6%(w/w-dry basis)였다.

## 2. 방법

#### 1) 세포배양

B16F10 세포와 human skin fibroblasts (HSF)는 American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD USA)에서 분양받아 사용하였다. B16F10과 HSF 세포는 10%(v/v) FBS와 100 unit/ml의 penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 2~3일 주기로 배지를 교체해주면서 배양하였다.

#### 2) B16F10 및 HSF에서 세포독성 평가

B16F10 및 HSF에서 CLE의 세포독성은 MTT assay를 이용하여 분석하였다. B16F10 세포와 HSF가 confluent 상태가 된 후, 두 세포에 CLE를 10, 50, 100, 200, 그리고 400  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하였다(B16F10 세포 72시간, HSF는 24시간). CLE를 처리한 후 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 5 mg/mL의 농도로 용해시킨 MTT 용액을 1시간 동안 추가로 처리하였다. 처리 후 DMEM 배지를 제거하고 37 $^{\circ}$ C에 미리 데워진 1 mL의 PBS로 세포를 1회 씻어 주었다. 400  $\mu$ L의 DMSO를 이용하여 세포내의 MTT formazan을 녹인 후, DMSO에 용해된 MTT formazan을 96-well plate에 200  $\mu$ L/well 씩 옮겨 microplate reader (VersaMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. CLE를 처리하지 않은 B16F10 및 HSF 세포를 대조군으로 하여 세포생존률(cell viability, % of control)을 계산하였다.

#### 3) B16F10 세포에서 melanin 축적 억제 활성

B16F10 세포의 melanin 축적은 1  $\mu$ M의 alpha melanocytes stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) 및 100  $\mu$ M IBMX를 72시간 동안 처리하여 유도하였다. CLE를 10, 50, 그리고 100  $\mu$ g/mL 농도로  $\alpha$ -MSH 및 IBMX와 병행 처리하여 B16F10 세포에서 melanin 축적 억제 활성을 평가하였다. CLE를 처

리한 후, B16F10 세포는 200  $\mu$ L의 trypsin-EDTA 용액을 첨가하여 부착된 세포를 떼어 주었다. 떨어진 B16F10 세포는 18,472xg에서 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리한 B16F10 세포는 200  $\mu$ L의 1 N NaOH와 10%(v/v) DMSO를 첨가하여 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하여 세포내 축적된 melanin을 추출하였다. 그 후 다시 18,472xg에서 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 96-well plate에 200  $\mu$ l/well 씩 옮겨 microplate reader (VersaMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. CLE의 melanin 축적 억제 활성은 CLE를 처리하지 않은 B16F10 세포를 대조군으로 하여 melanin 축적 억제 활성을 평가하였다.

4) B16F10 세포에서 tyrosinase 저해 활성

B16F10 세포에서 tyrosinase의 억제 활성은 1  $\mu$ M의  $\alpha$ -MSH, 100  $\mu$ M IBMX, 그리고 농도별 CLE를 72시간 동안 처리하였다. 그 후 배지를 제거한 뒤 PBS로 세척하고 1%의 Triton X-100이 함유된 PBS를 넣어준 뒤 cell scraper로 세포를 떼어내어 1.5 ml tube에 모아 10분간 sonication을 통해 세포막을 파괴하였다. 그 후 18,000xg에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 tyrosinase 활성 분석에 이용하였다. Tyrosinase 활성 측정은 200  $\mu$ l의 L-DOPA (10 mM)와 500  $\mu$ L의 0.1M PBS 및 상층액 300  $\mu$ L를 잘 혼합한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. CLE를 처리하지 않은 B16F10 세포를 대조군으로 하여 tyrosinase 저해 활성을 평가하였다.

5) Western blot

HSF에서 RIPA lysis buffer (1 mM PMSF, 50 mM Tris-HCl, NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, phosphatase inhibitor cocktail)를 이용하여 cell extract를 모은 뒤 SDS/PAGE를 통해 단백질을 분리하고 이를 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 transfer 하였다. 1%(w/v) bovine serum albumin (BSA) 용액으로

PVDF membrane을 blocking하고 표적 단백질에 관한 특정 항체를 반응시켰다. 이를 TBST (10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 그리고 0.05% NP-40)로 여러 번 세척한 다음 horse radish peroxidase (HRP)와 결합한 2차 항체와 반응시키고 ECL을 이용하여 목적 단백질을 ChemiDoc Molecular Imager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 확인하였다.

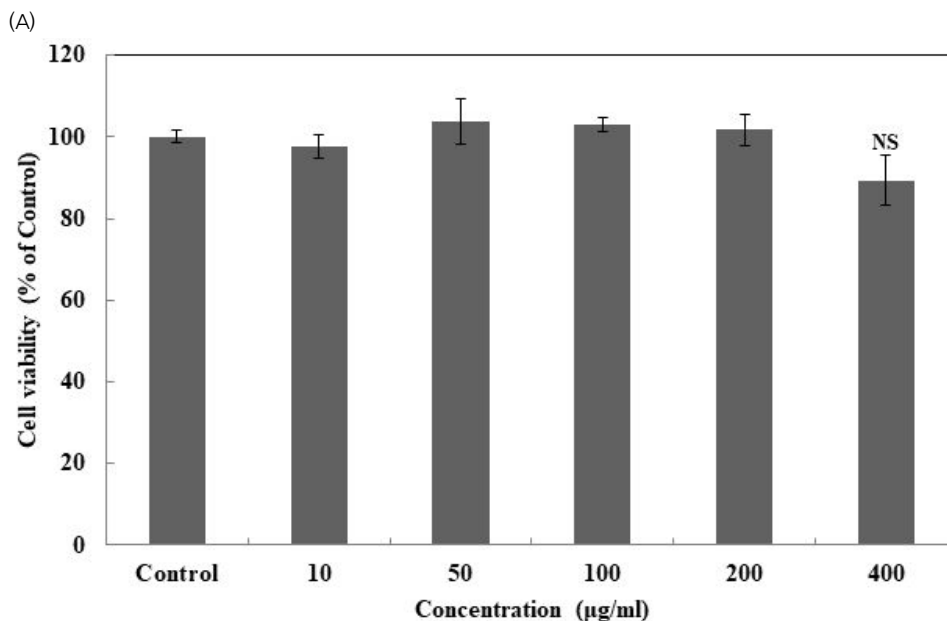
6) 통계분석

모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표현하였으며, 데이터의 통계처리는 Statistical Package for Social Science (SPSS, Chicago, USA)을 이용하여 분석하였다. 신뢰수준  $p < .05$ 에서 평균값들에 대한 유의성을 검증하였다. 각 항목은 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 시행하였으며, Student  $t$ -test 방법에 의하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다 (\*  $< 0.05$ , \*\*  $< 0.01$ , \*\*\*  $< 0.001$ ).

III. 결 과

1. CLE의 세포독성

B16F10 세포에 각각 1, 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/mL의 CLE를 72시간 처리한 후 B16F10 세포의 생존률을 MTT 분석법을 통해 알아보았다. B16F10 세포에 1, 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/mL의 농도로 CLE를 처리한 결과, B16F10 세포의 생존률은 각각 97.64%, 103.79%, 102.94%, 101.66%로 유의적인 세포독성은 관찰되지 않았다(Fig. 1A). HSF에 CLE를 1, 50, 100  $\mu$ g/mL의 농도로 처리한 결과, HSF의 세포 생존률은 95.18%, 96.01%, 97.70%로 세포의 성장에 영향을 미치지 않았으나 200, 400  $\mu$ g/mL의 농도로 CLE를 처리하였을 때 세포 생존률은 89.54%, 그리고 78.47%로 유의적으로 감소하였다(Fig. 1B). 따라서 이후 실험은 두 세포에서 독성이 나타나지 않은 100  $\mu$ g/mL 이하의 CLE를 사용하였다.



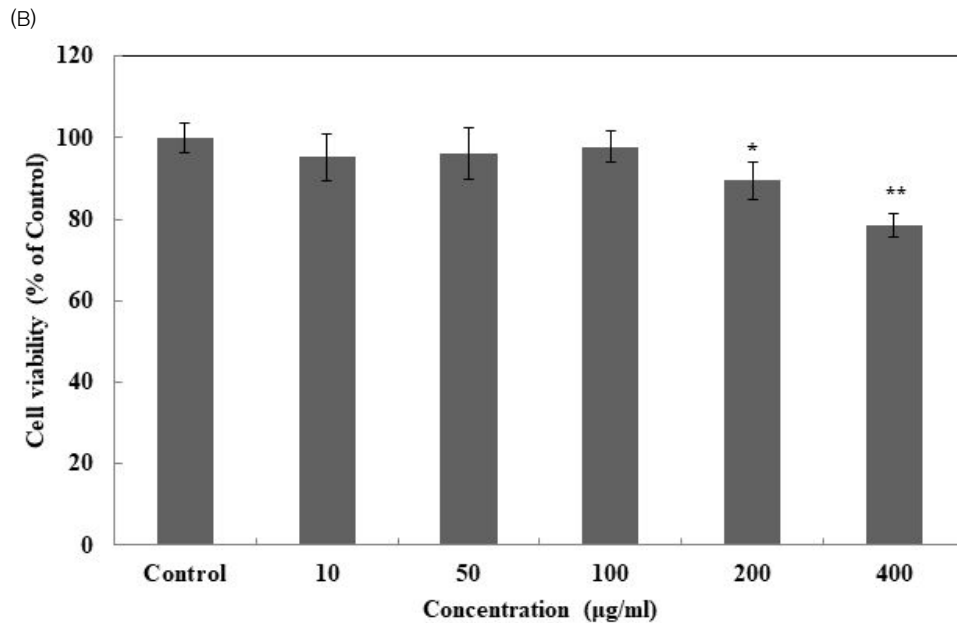


Fig. 1. Cytotoxic effect of CLE treatment in B16F10 and HSF. (A) B16F10 cells were exposed to 1, 50, 100, 200, and 400 µg/mL of CLE treatment for 72 h (B) HSF were treated with 1, 50, 100, 200, and 400 µg/mL CLE for 24 h. Significant differences were analyzed by one-way ANOVA followed by *t*-test (\* $<0.05$ , \*\* $<0.01$  vs control, untreated cells).

## 2. Melanin 축적 억제 활성

B16F10 세포에 1 µM의  $\alpha$ -MSH 및 100 µM IBMX를 72 시간 동안 처리하여 melanin 형성을 유도하였으며, melanin 형성 유도 기간에 각각 10, 50, 100 µg/mL의 CLE를 처리하여 melanin 축적 억제 활성을 분석하였다. CLE를 각각 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 대조군 대비 melanin 축적 억제활성은 각각 52.34%, 44.33%, 8.32%로 나타났다. CLE 처리는 B16F10 세포에서 농도 의존적으로 melanin 축적을 억제하였으며, 전 처리 농도에서 CLE는 B16F10 세포의 melanin 축적을 유의적으로 감소시켰다(Fig. 2).

## 3. Tyrosinase 저해 활성

B16F10 세포에 1 µM의  $\alpha$ -MSH, 100 µM IBMX와 CLE를 각각 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하여 72시간 후 tyrosinase 저해 활성을 평가하였다. CLE를 각각 10, 50, 그리고 100 µg/mL의 농도로 각각 처리하였을 때 대조군 대비 tyrosinase 활성은 각각 85.92%, 48.70%, 17.07%로 나타났다. 즉 CLE를 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 tyrosinase 저해율은 14.08%, 51.30%, 82.93%였으며, 50, 그리고 100 µg/mL의 농도의 CLE는 B1610 세포에서 유의적인 tyrosinase의 활성을 저해했다(Fig. 3).

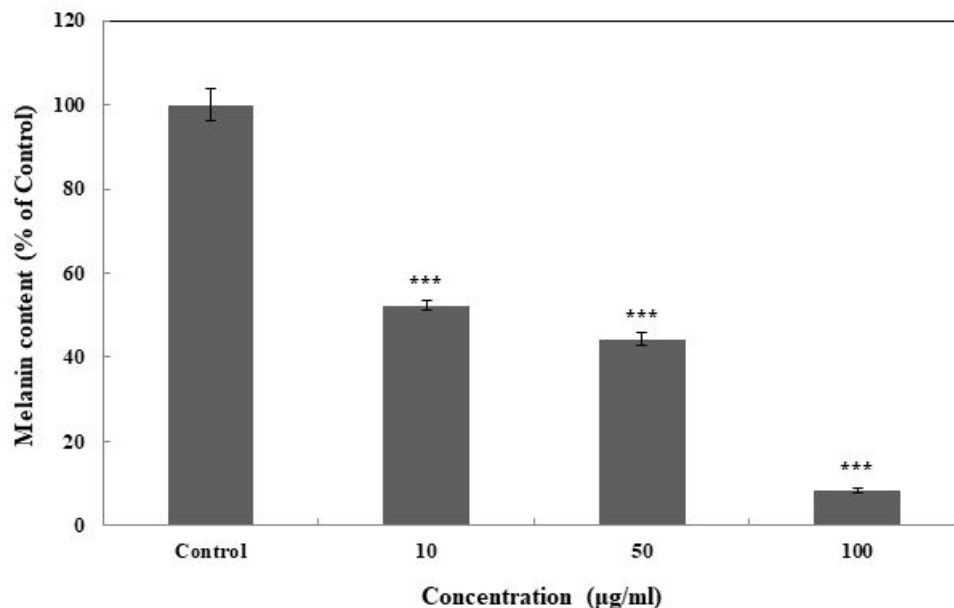


Fig. 2. Inhibitory effect of CLE treatment on the melanin accumulation in B16F10 cells. Significant differences were analyzed by one-way ANOVA followed by *t*-test (\*\*\*) $<0.001$  vs control, untreated cells).

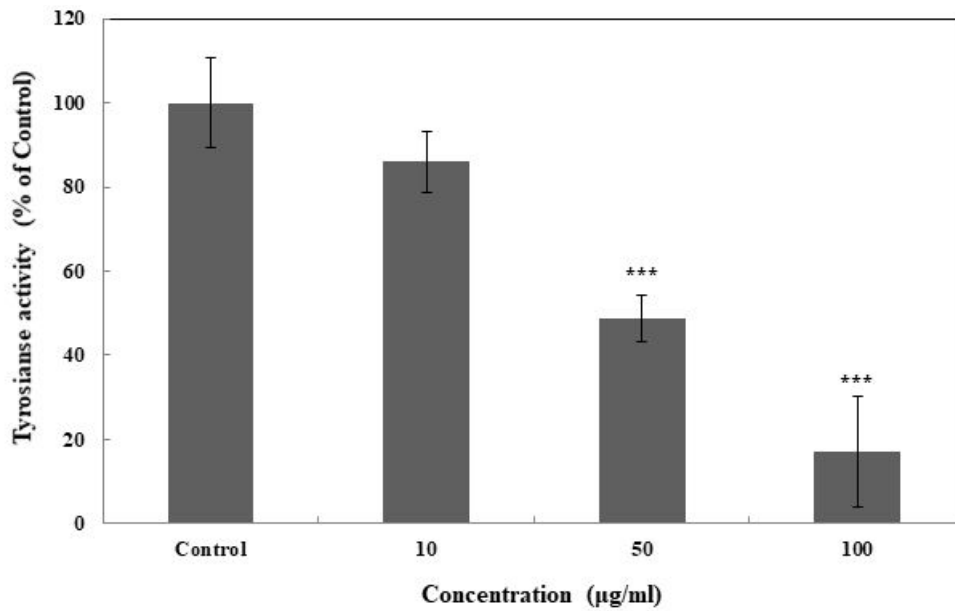


Fig. 3. Inhibitory effect of CLE treatment on the tyrosinase activity in B16F10 cells. Significant differences were analyzed by one-way ANOVA followed by *t*-test (\*\*\*(0.001 vs control, untreated cells).

#### 4. HSF 세포의 피부 섬유구조 관련 단백질 발현에 미치는 영향

진피의 피부 섬유구조 관련 단백질의 발현은 피부의 탄력 및 세부구조를 결정하는데 중요하게 작용한다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 CLE 처리가 fibroblast 세포의 피부 섬유구조 단백질의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 분석하고자 하였다. HSF에 독성을 나타내지 않은 10, 500, 100 µg/mL의 CLE를 24시간 동안 처리하고 피부 섬유구조 단백질인 CCN2, 이의 하위 신호전달체계인 Smad2, procollagen Iα2, collagen Iα2, fibronectin의 단백질 발현수준을 분석하였다. 각각 10, 500, 100 µg/mL의 CLE 처리는 피부 CCN2 및 섬유구조 단백질의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰

다(Fig. 4). 이는 CLE 처리가 CCN2를 통해 collagen 및 fibronectin 등의 피부 섬유구조 단백질을 활성화 시키는 것으로 생각된다.

#### IV. 고찰

피부는 우리 몸의 항상성을 저해하는 외부 요인의 위해를 막아주는 최외곽의 보호기관으로 화학적, 물리적, 생물학적 장벽기능을 수행하고 있으나 쉽게 손상을 받을 수 있다<sup>12)</sup>. 자외선, 스트레스, 그리고 오염물질 등은 피부 세포의 손상과 사멸을 유도하고 피부의 탄력 저하, 주름생성 등의 피부노화를 가속화 시킨다<sup>13)</sup>. Melanin은 동물의 피부, 눈동자 및 머리

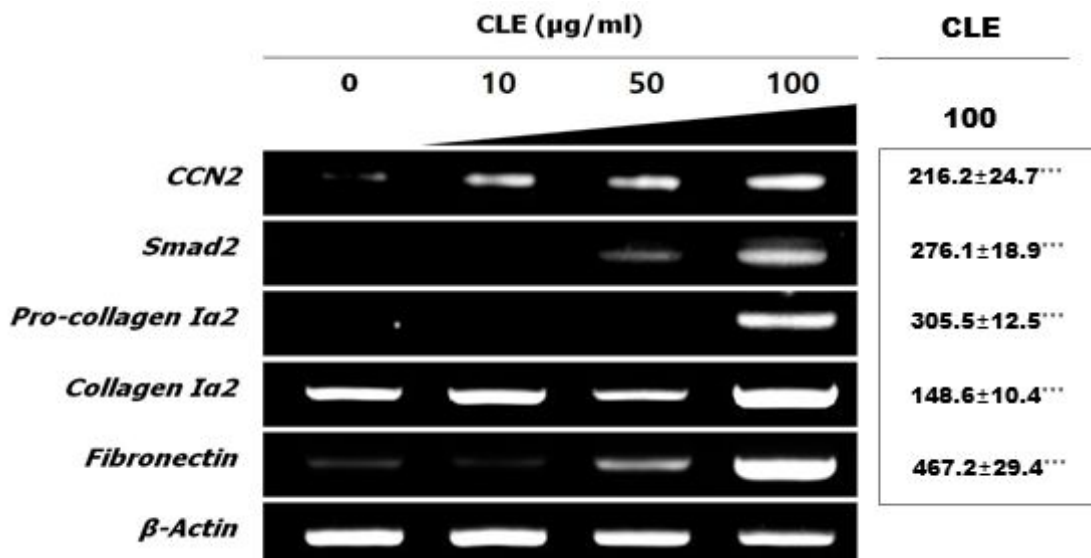


Fig. 4. The effect of CLE treatment on the expression levels of skin fibril-related proteins in HSF. β-Actin was used as a control.

카라 등에 존재하는 색소로써 사람의 피부에서는 자외선 조사 등에 의한 피부 손상에 대항하는 기작으로 생합성이 촉진된다<sup>14)</sup>. Melanin의 적절한 형성은 피부를 보호하는 긍정적인 면을 갖고 있으나 과도하게 생성된 melanin은 피부의 기미, 검버섯, 주근깨, 그리고 피부 반점 등을 유발하며 더 나아가 피부세포의 사멸 및 피부암 생성이 촉진되기도 한다<sup>15)</sup>.

Melanin은 세포 내의 소기관인 리보솜에서 tyrosinase에 의해 생합성된다. 표피의 기저층에 존재하는 melanocytes에서 tyrosine이 tyrosinase 효소의 작용으로 여러 단계를 거쳐 melanin이 합성된다. 생성된 melanin은 각질세포로 이동되어 피부의 색소침착 및 멜라닌 전구물질들에 의한 독성을 유발한다<sup>16)</sup>. 최근 한류열풍과 마스크의 발달 등으로 인해 밝고 깨끗한 피부에 대한 관심이 증가 되고 이에 대한 수요가 급격히 증가하고 있으며 피부와 관련된 연구가 활발히 수행되고 있다<sup>17)</sup>. 미백 기능성 물질과 관련해서는 현재 알부틴이 산업에서 가장 폭넓게 사용되고 있으나 과도하게 사용할 경우 일부 사용자들에게서 알레르기 반응 및 백반증 등의 증상이 보고되고 있어<sup>18)</sup>, 안전성이 우수한 천연물 유래의 미백 소재에 대한 심도 있는 탐색이 요구된다.

본 연구에서 울금 물 추출물 CLE를 B16F10 세포에 각각 10, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 72시간 처리한 후 B16F10 세포의 생존율을 분석한 결과 10–400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 CLE는 B16F10 세포에 독성을 유발하지 않았다. 또한 HSF에 동일한 농도의 CLE를 24시간 동안 처리하였을 때 10–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 CLE 처리는 HSF에 유의적인 독성을 보이지 않았다. 따라서 본 연구에서는 B16F10과 HSF 세포에서 모두 독성이 나타나지 않은 농도인 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하의 CLE를 실험에 이용하였다. B16F10 세포에 CLE를 처리하였을 때 melanin 축적은 유의적이며 농도 의존적으로 감소하였다. 이전 연구에 따르면 사과, 양파, 그리고 딸기 등에 존재하는 플라보노이드로 알려진 fisetin이 B16F10 세포에서 CCN2 발현을 통해 melanin 형성을 유의적으로 억제하였음을 보고 하였고<sup>1)</sup>, 상업 추출물이 B16F10 세포에서 CCN2 단백질 발현을 통해 melanin 축적을 억제한다고 보고된 바 있다<sup>18)</sup>. 이는 CCN2 단백질의 발현이 melanin의 형성 및 조절과 관계가 있음을 보여주는 결과로 생각되며, 향후 CCN2 단백질과 dopachrome tautomerase 효소의 활성, microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), 그리고 tyrosinase related protein-2 (TRP-2) 단백질의 상호작용에 대해 추가적으로 분석되어 울금 추출물의 미백 활성에 대한 기전이 규명되어야 할 것으로 생각된다. 본 연구에서 울금 추출물 CLE는 B16F10 세포에서 tyrosinase 저해를 통해 melanin 형성을 효과적으로 억제하여 미백 미용소재로서의 가능성을 나타냈다.

본 연구에서 CLE 처리가 피부 진피층의 섬유구조 단백질 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 HSF를 이용하여 CLE를 처리하고 CCN2, procollagen 1 $\alpha$ 2, collagen 1 $\alpha$ 2, 그리고 fibronectin 등의 섬유구조 단백질의 발현 변화를 분석하였다. Collagen 단백질은 현재까지 type I, II, III, IV, 그리고 XI의 5가지 형태의 collagen이 잘 알려져 있으며 피부의 진피, 힘줄, 치아, 그리고 뼈 등에 존재하여 조직의 탄력을 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다<sup>1)</sup>. Collagen

은 전구체인 procollagen으로부터 형성되며 진피의 fibroblast에서 주로 생성된다

Fibronectin은 세포 외 matrix 사이의 주성분인 고분자 당 단백질이다. Fibronectin은 extracellular matrix (ECM)에서 collagen과 fibrin의 결합에 중요한 구성요소로 작용한다. 특히 fibronectin은 피부의 구조를 유지하여 주름형성을 예방하고 상처회복에 밀접하게 관련되어 있다. 따라서 collagen 및 fibronectin 단백질의 보유량을 유지하는 것은 건강한 피부를 유지하는데 있어 중요한 요소이며<sup>18)</sup>, 본 연구에서 CLE 처리에 의한 collagen 및 fibronectin 단백질의 발현 증가는 CLE가 피부의 탄력 및 구조를 유지하는데 기여할 수 있음을 의미한다. 그러나 최근 연구결과에 따르면 비대흉터 (hypertrophic scar) 및 keloids의 상처 치유반응에서 과량의 fibronectin이 발현된다는 보고가 있어<sup>19)</sup>, 향후 normal skin fibroblasts와 hypertrophic scar 두 모델에서 CLE 처리에 따른 fibronectin 과발현에 대한 비교 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 울금 추출물의 억제 효능만을 평가하여 울금 추출물 자체의 회복 효능을 측정하지 못한 한계점을 가지고 있다. 추후 연구에서 이 부분에 대한 추가적인 실험결과가 요구된다. 이상의 연구는 울금 추출물이 미백 활성 및 진피 섬유구조 단백질의 발현증가를 통해 기능성 미용소재로 활용될 수 있다는 가능성을 제시하였다. 또한, 울금 추출물에 의한 피부탄력 및 섬유구조 단백질의 발현증가는 CCN2의 연관성에 대한 가능성을 제시하였다. 향후 본 연구의 결과는 울금이 피부관련 의약품 보조제, 치료제, 화장품 및 미용기능식품 개발에 있어 유용한 자료로 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

## V. 결 론

울금 물 추출물(CLE)의 미백활성 및 진피 섬유구조에 미치는 영향에 관한 실험을 진행한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. B16F10 세포에서 CLE를 72시간 처리하였을 때 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도까지 유의적인 세포독성이 관찰되지 않았으며, HSF 세포에 CLE를 24시간 처리하였을 때 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도까지 유의적인 세포독성이 관찰되지 않았다.
2. 세포독성이 나타나지 않은 농도범위의 CLE를 1  $\mu\text{M}$ 의  $\alpha$ -MSH 및 100  $\mu\text{M}$  IBMX를 72시간 동안 처리하여 melanin 형성을 유도한 후, 각각 10, 50, 그리고 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 CLE를 처리한 결과 CLE는 유의적으로 melanin 축적을 억제하였으며, 같은 농도에서 CLE는 또한 B16F10 세포의 tyrosinase를 유의적이며 농도 의존적으로 억제하였다.
3. HSF에 CLE를 10, 50, 그리고 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 결과, CLE는 진피의 섬유구조 단백질인 CCN2, Smad2, procollagen 1 $\alpha$ 2, collagen 1 $\alpha$ 2, 그리고 fibronectin 단백질의 발현을 증가시켰다. 그러나 비대흉터(hypertrophic scar) 및 keloids의 상처 치유반응에서 과량의 fibronectin

이 발현된다는 보고가 있어 향후 CLE에 의한 fibronectin 과발현 부작용에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구는 울금 물 추출물(CLE)이 미백 활성 및 진피의 섬유구조 단백질 발현 증가에 의한 탄력 증진용 미용소재로서 효과적으로 사용될 수 있음을 제시하였다. 추후 체계적인 기전분석 및 임상실험을 통해 CLE의 효능과 기전이 확보된다면 피부관련 의약품 보조제, 치료제, 화장품 및 미용기능식품 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것이라 생각된다.

### 감사의 글

이 연구 결과물은 2016학년도 경남대학교 학술진흥연구비 지원에 의한 것이며, 이에 진심으로 감사드립니다.

### References

- Shon MS, Kim RH, Kwon OJ, Roh SS, Kim GN. Beneficial role and function of fisetin in skin health via regulation of the CCN2/TGF- $\beta$  signaling pathway. *Food Sci Biotechnol*. 2016 ; 25 : 133-41.
- Esther B, Henk FJH, Len R. Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids. *Am J Clin Nutr*. 2001 ; 73 : 853-64.
- Bae JS, Han MR, Yao C, Chung JH. Chaetocin inhibits IBMX-induced melanogenesis in B16F10 melanoma cells through activation of ERK. *Chem. Biol. Interact*. 2016 ; 245 : 66-71.
- Sallam A, Mira A, Ashour A, Shimizu K. Acetylcholine esterase inhibitors and melanin synthesis inhibitors from *Salvia officinalis*. *Phytomedicine*. 2016 ; 23 : 1005-1011.
- Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann NY Acad Sci*. 2002 ; 973 : 31-43.
- Ana PCS, Carissa AG, Eduardo AGR, Renan FT, Ludmila FV, Tuania SC, Maria CTC, Antonio LBP, Jean NS. Infrared LED light therapy influences the expression of fibronectin and tenascin in skin wounds of malnourished rats-A preliminary study. *Acta Histochem*. 2014 ; 116 : 1185-91.
- Mariana D, Argirova, Beryl JO. Activation of protein-bound copper ions during early glycation: study on two proteins. *Arch Biochem Biophys*. 2003 ; 420 : 176-84.
- Samad F, Yamamoto K, Pandey M, Loskutoff DJ. Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. *Mol Med*. 1997 ; 3 : 37-48.
- Barry J, Fritz M, Brender JR, Smith PE, Lee DK, Ramamoorthy A. Determining the effects of lipophilic drugs on membrane structure by solid-state NMR spectroscopy: the case of the antioxidant curcumin. *J Am Chem Soc*. 2009 ; 131 : 4490-98.
- Mudduluru G, George-William JN, Muppala S, Asangani IA, Kumarswamy R, Nelson LD, Allgayer H. Curcumin regulates miR-21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer. *Biosci Rep*. 2011 ; 31 : 185-97.
- Kim HO, Hwang YI, Kim GN. Anti-obese function of demethoxycurcumin through suppression of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Asian J Beauty Cosmetol*. 2013 ; 11 : 29-34.
- Kim J, Lee CW, Kim EK, Lee SJ, Park NH, Kim HS, Kim HK, Char K, Jang YP, Kim JW. Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts. *J Ethnopharmacol*. 2011 ; 137 : 427-33.
- Yoneta A, Yamashita T, Jin YH, Kondo S, Jimbow K. Ectopic expression of tyrosinase increases melanin synthesis and cell death following UVB irradiation in fibroblasts from familial atypical multiple mole and melanoma (FAMMM) patients. *Melanoma Res*. 2004 ; 14 : 387-94.
- Urabe K, Aroca P, Tsukamoto K, Mascagna D, Paulumbo A, Prata G, Hearing VJ. The inherent cytotoxicity of melanin precursors. *Biochim Biophys Acta*. 1994 ; 1221 : 272-8.
- Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S, Nishi-yama S. Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPAchrome tautomerase (TRP2) and a melanogenic inhibitor. *J Invest Dermatol*. 1993 ; 100 : 126-32.
- Kim MJ, Ryu MJ. Inhibition of melanogenesis and anti-UV properties *Reynoutria elliptica*. *Kor J Aesthet Cosmetol*. 2012 ; 10 : 961-8.
- Royer M, Prado M, García-Pérez ME, Diouf PN, Stevanovic T. Study of nutraceutical, nutricosmetics and cosmeceutical potentials of polyphenolic bark extracts from Canadian forest species. *Pharm Nutr*. 2013 ; 1 : 158-67.
- Kim MK, Kim BW. The skin whitening effect of *Atemisa annua* L. extracts and artemisinin through modulation of MITF expression. *Korean Soc. Beauty and Arts*. 2015 ; 16 : 59-71.
- Kwon OJ. Effect of *Mori Follium* Extract on the Melanogenesis and Skin Fibril Matrix. *Kor J Herbol*. 2016 ; 31 : 41-6.

19. Kim RH, Song JH, Shon MS, Chun KS, Choi SU, Kim GN. Evaluation of water extract prepared from *Chrysanthemum indicum* Linne as nutri-cosmetic and cosmetic material in vitro model. *Asian J Beauty Cosmetol*. 2016 ; 14 : 78-88.