KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 51, No. 1, pp. 58~63 (2019)
https://doi.org/10.9721/KJFST.2019.51.1.58

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

자소엽(*Perilla frutescens Britton* var. *acuta* Kudo) 조다당의 멜라닌 생성 저해 및 미백효과

조은지[1] · 변의홍[1,2,*]
[1]공주대학교 식품공학과, [2]공주대학교 식품과학연구소

Antimelanogenic effect and whitening of crude polysaccharide fraction extracted from *Perilla frutescens Britton* var. *acuta* Kudo

Eun-Ji Cho[1] and Eui-Hong Byun[1,2,*]
[1]*Department of Food Science and Technology, Kongju National University*
[2]*Food Science Research Institute, Kongju National University*

Abstract In this study, the inhibitory effects of crude polysaccharide fractions separated from *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo (PCP) on melanin synthesis and tyrosinase activity were observed. B16F10 melanoma cells were treated with 125 and 250 μg/mL of PCP for 24 hours. Using these optimal concentrations, inhibition of melanin synthesis inhibition was measured, and PCP treatment significantly reduced melanin synthesis induced by 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX). In addition, western blotting analysis on B16F10 melanoma cells showed that PCP inhibited tyrosinase, microphthalmia-associated transcriptipn factor, tyrosinase related protein-1, and tyrosinase related protein-2 expression. Therefore, these results indicate that PCP may have potential inhibitory activity against melanin synthesis and may be a natural ingredient useful for the development of whitening materials in cosmetics and functional foods.

Keywords: *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo, tyrosinase, tyrosinase related protein-1, tyrosinase related protein-2, microphthalmia-associated transcription factor

서 론

식품소재 및 약용식물 등 천연물에서 분리되는 다당류는 지금까지 식물체의 구조, 성분 및 에너지로 강조되어 왔으나 최근 넓은 범위의 생물, 의학적 분야에서 낮은 독성과 넓은 범위의 치료 특성으로 의약품 및 건강유지 목적의 기능성식품의 소재로서 주목받고 있다(Schepetkin과 Quinn, 2006). 수용성 다당류는 항염, 항바이러스, 항암 치료제 등의 의약품으로 다양하게 이용되어 왔으며, 최근에 항노화, 보습제 등의 화장품원료로 이용되고 있다(Kim 등, 2011c).

피부는 자외선의 노출이 쉽고 영향을 받기 쉬운 기관이며, 자외선으로 활성산소종이 생성되면 피부 세포를 손상시키며 손상된 세포는 식세포에 의해 제거된다(Choi 등, 2013). 과량의 활성산소는 체내에서 존재하는 항산화 물질을 제거시키며 기미, 색소침착 및 검버섯 등의 피부질환이 원인이 되는 멜라닌 생성반응을 증가시킨다(Cho, 2003). Melanin은 표피의 기저층에 존재하며 인간의 피부색을 결정짓는데 가장 중요한 역할을 하며, 태양 광선으로부터 들어오는 자외선을 차단하는 색소이다(Bertolotto 등, 1998). Melanin 합성은 아미노산의 하나인 tyrosine을 기질로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2) 효소에 의해 조절되며, 특히 tyrosinase는 구리를 포함한 효소로 3,4-digydroxyphenylalanine (DOPA)를 산화시켜 DOPA quinone으로 전환되고 자동산화반응과 효소반응으로 DOPA chrome을 거쳐 흑갈색의 melanin이 생성된다(Swan, 1974). 특히 tyrosine 효소는 melanocyte에서 멜라닌 색소의 합성에서 주요 핵심 효소로서 eumelanin과 pheomelanin의 합성에 절대적으로 필요한 것으로 알려져 있다(Hearing and Tukamoto, 1991). Melanin은 햇빛에 포함된 UV의 빛 에너지를 흡수하여 UV에 의한 손상으로부터 진피 이하의 피부 기관을 보호하는 역할을 하며, 피부 생체 내에 생겨난 유해산소 및 유리기 등을 잡아주는 외부 유해인자로부터 피부를 보호해주는 유용한 역할을 한다. 그러나 멜라닌이 과도하게 합성되거나, 노화 등에 의해서 피부의 생리기능이 떨어지고 다양한 색소가 침착되어 기미, 주근깨를 형성하며, 이와 같은 병변으로부터 나아가 피부암의 원인이 되기도 한다(Choung 등, 2013). 그러므로 이러한 색소 침착 현상을 방지하고 미백효과를 얻기 위해서 이와 같은 효소를 억제하여 멜라닌 합성저해를 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Hearing and Tukamoto, 1991).

자소엽은 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 일년생 식물로서 전체가 자색을 띄고 있으며, 꽃은 8-9월에 피며, 잎은 자루가 길고 잎 끝이 쐐기 모양이며 끝이 날가로운 특징을 가지고 있다(Byun, 2017). 예로부터 발한, 발열, 기관지염, 위장염 등에 사용되어 왔다. 자

*Corresponding author: Eui-Hong Byun, Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 32439, Republic of Korea
Tel: +82-41-330-1481
Fax: +82-41-330-1489
E-mail: ehbyun80@kongju.ac.kr
Received October 17, 2018; revised December 17, 2018; accepted January 22, 2019

소엽은 항염증, 항알르레기, 항균활성, 항종양 효과 등에 대해 보고 되어졌으며, 특히 항산화 활성이 우수한 것으로 알려져 있다. 이러한 약리활성은 자소엽이 가지고 있는 phenolic compounds, romarinic acid, anthocyanin, caffeic acid, luteolin 등 때문으로 보고되었다(Park and Lee, 2017). 최근 자소엽에 함유되어 있는 페테노이드(terpenoids), 페놀화합물(phenolic compound) 등이 항염증 및 항알레르기 작용, 항균작용, 항산화 등의 약리 작용이 뛰어나다고 보고되고 있다(Kim 등, 2011b).

식물체로부터 유래된 조다당(polysaccharides)은 면역 증강 인자로 잘 알려져 있으며, 넓은 범위의 생물, 의학적 분야에서 낮은 독성으로 인해 주목받고 있다. 이러한 다당류는 sulfate 함량과 분자량, 당골격의 sulfate 위치, 당성분에 의존적으로 각 세포의 수용기를 촉진시켜 항산화 및 세포 재생 효과 등의 기능성 및 생리활성물질로서의 연구가 널리 진행되고 있다(Wang 등, 2010). 식물의 조다당은 보체 및 큰포식세포 등의 활성을 통해 세포분화, 정보전달, 면역증진 및 항암효과를 높게 증가시키는 것으로 보고되어지며, 또한 선천면역계의 조절을 통해 인체 내로 침투한 병원균을 강력하게 제거하는데 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Cho 등, 2018). 그러나 자소엽에서 분리된 다당류에 관한 미백 활성에 관한 연구는 아직 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 자소엽에서 분리된 다당류의 미백 활성에 관하여 알아보기 위하여 tyrosinase 억제 활성 및 B16F10 melanoma를 이용하여 melanin 합성 저해효과, tyrosinase 억제활성, 멜라닌 생성 억제에 대한 메커니즘(TRP-1, -2, MITF 및 tyrosine)을 조사하여 기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

자소엽 조다당의 분리

본 실험에 사용된 자소엽(*Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo)은 2016년 8월 충남 예산지역에서 채취하였고, 실험을 위해서 7일 동안 음건하여 수분을 완전히 제거하고, 밀봉하여 실온에서 보관하며 실험에 사용하였다. Jeddou 등(2016)의 방법을 일부 변형하여 분리하였다. 건조된 자소엽을 실험용 분쇄기(NSG-1002SS, Hanil, Seoul, Korea)로 분쇄하여, 건조분말 100 g에 900 mL의 distilled water (DW)를 가하여 100°C에서 2시간 동안 열수추출 하였다. 추출물을 거름종이(filter paper, No. 4, Whatman, Maidstone, Kent, UK)로 여과 후, 여과액에 70% 에탄올을 가하여 4°C에서 12시간 동안 방치한 후, 3200 rpm으로 30분 동안 원심분리(Combi 514R, Hanil, Seoul, Korea)하여 침지된 조다당(*Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo crude polysaccharide; PCP)을 분리하고, 이를 동결 건조하여 자소엽 조다당으로 실험에 사용하였고, 이때 얻어진 조다당의 수율은 5.79% (w/w) 였다.

Tyrosinase inhibition assay

Tyrosinase 억제 활성은 tyrosinase와 L-DOPA의 작용결과 생성되는 dopachrome을 비색법을 이용하여 정량하는 방법으로 측정하였다(Flurkey, 1991). Mushroom tyrosinase (100 unit/mL, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 0.2 mL와 기질로서 L-dihydroxyphenylalanine (DOPA, Sigma-Aldrich Co.) 0.4 mL, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 0.2 mL의 혼합액에 농도별(1, 2, 5, 10 mg/mL) 자소엽 조다당 추출물과 Kojic acid (Sigma-Aldrich Co.) 2 mg/mL의 농도로 각각 0.2 mL를 혼합한 후 37°C에서 15분간 반응시켜 475 nm에서 흡광도를 측정하고, 생성된 dopachrome의 색을 저해능으로 환산하였다. Tyrosinase 저해능은 다음의 환산식에 의하여 계산되었다.

$$\text{저해능}(\%)=\left(1-\frac{A-B}{C-D}\right)\times 100$$

A: 시료와 효소 흡광도, B: 시료와 완충액 흡광도
C: 공시료와 효소 흡광도, D: 공시료와 완충액 흡광도

Melanoma 세포배양

B16F10 melanoma cell (KCLB No. 80008)은 한국세포주은행(KCLB, Korea cell line bank, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 세포배양을 위해 100 unit/mL 페니실린 및 100 unit/mL 스트렙토마이신과 10% 소태아혈청을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technology, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였으며, 세포는 37°C, 5% 이산화탄소 배양기(Thermo, Carlsbad, CA, USA)에서 배양하였다.

Melanoma 세포독성 평가

자소엽 조다당 추출물의 세포독성에 관하여 알아보기 위하여 마우스 유래의 melanocyte인 B16F10 cell line을 한국세포주은행으로부터 구입하여 사용하였다. 세포주에 대한 세포독성은 각각의 세포주를 1×10^4 cells/well씩 96 well plate (SPL, Pocheon, Gyeonggi-do, Korea)에 90 μL씩 분주하여 농도별(31.25, 62.5, 125 및 500 μg/mL) 자소엽 조다당 추출물을 10 μL씩 처리하고, 37°C, 5% CO_2 조건 하에서 72시간 동안 배양하여 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Co.) 분석을 통해 세포독성을 산출하였다. MTT assay는 MTT 용액(5 mg/mL)을 30 μL씩 각각 well에 첨가하여 2시간 동안 배양한 후 배양 상층액를 제거하고 생성된 formazan crystal을 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co.)에 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Melanin 함량평가

B16F10 세포를 이용한 melanin 합성 생성 억제능을 평가하기 위하여 phenol red가 없는 DMEM 배지를 사용하여 6 well plate (SPL)에 3×10^4 cells/mL로 분주하고 2시간이 지난 후 세포가 plate에 완전히 부착된 것을 확인한 다음 자소엽 조다당 추출물을 농도별(125 및 250 μg/mL)로 처리하였다. 12시간 후 melanin 생성을 촉진하기 위하여 200 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma-Aldrich Co.)을 처리하여 melanin 생성 반응을 촉진시켰다. 72시간 배양 후 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co.)을 함유한 10 mM phosphate buffer (pH 6.8)를 100 μL 가하고 5분간 교반한 후 원심분리 하여 cell pellet을 멜라닌 정량에 사용하였다. 물에 불용성을 나타내는 멜라닌의 액화를 일으키기 위하여 10% DMSO가 함유된 1 N NaOH를 적정량을 넣고 65°C에서 1시간 동안 반응을 시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 함량은 멜라닌 표준정량곡선을 이용하여 산출하였다.

세포내 tyrosinase inhibition assay

B16F10 세포를 이용한 tyrosinase 억제 활성을 평가하기 위하여 phenol red가 없는 DMEM 배지를 사용하여 6 well plate (SPL)에 3×10^4 cells/mL로 분주하고 2시간이 지난 후 세포가 plate에 완전히 부착된 것을 확인한 다음 자소엽 조다당 추출물을 농도별(125 및 250 μg/mL)로 처리하였다. 12시간 후 melanin 생성을 촉진하기 위하여 200 μM IBMX을 처리하여 melanin 생성 반

응을 촉진시켰다. 72시간 배양 후 세포를 수거하여 lysis buffer (1% Triton X-100, 0.1 M PMSF)를 첨가하여 4°C에서 1시간 반응 시켜 세포들을 용해 시킨 후 원심 분리하여 상층액을 수집하였다. 수집한 단백질을 정량한 후 L-ihydroxyphenylanin (DOPA, mg/mL)을 첨가한 뒤 37°C에서 반응 시키고 흡광도의 변화를 1시간 동안 관찰하면서 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot analysis

B16F10 melanoma 세포를 6-well plate에 2×10^5 cells/well의 농도로 분주하여 12시간 동안 완전히 부착시키고 IBMX (200 μM)와 자소엽 조다당 추출물을 125 및 250 μg/mL의 농도로 병용 처리하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 PBS로 3회 세척한 후 NP40 cell lysis buffer (Biosource, Seoul, Korea)를 첨가한 후 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 하 여 cell lysate를 분리하였다. 핵 내의 단백질을 분리하기 위하여 상기 수집된 세포에 저장성 완충액[10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM magnesium chloride, 10 mM potassium chloride, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 1 μM leupeptin과 0.2 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)]을 20분 간 처리한 후 12,000×*g*에서 1분간 원심분리 하여 세포질과 핵을 분리하였으며, 분리된 핵에 고장성 완충 용액[20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM ethylene diamine tetra acetic acid, 0.5 mM DTT, 1 μM leupeptin, 0.2 mM PMSF] 을 처리하여 10,000×*g*에서 20분 간 원심분리 하여 핵단백질을 추출하였다. 분리된 cell lysate는 BCA protein detection kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)을 사용하여 단백질 정량을 실시하였고, well 당 20 μg의 cell lysate를 10% polyacrylamide gel에 각각 loading 하여 SDS-PAGE로 변성분리 하였다. 이를 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Germany)으로 transfer 하였고, membrane은 antibody의 비특이적 결합을 방지하기 위해 blocking solution (skim milk 5%) 20 mL에서 1시간 방치하였다. 이후 TBST (20 nM tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5)로 10분씩 3회 세척하였으며, TRP-1, TRP-2, MITF 및 Tyrosine의 발현량을 측정하기 위해 1차 항체(Cell Signaling, Danvers, MN, USA)를 1:2,000으로 희석하여 4시간 동안 반응시키고, TBST로 5분 간 3회 세척하였다. 이후 2차 항체(goat-anti rabbit lgG, Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 1:5,000으로 희석하여 2시간 동안 반응시키고, 현상을 위하여 Electrochemiluminescence (ECL, Millipore Merck KGaA) reagent를 사용하여 인화하였다.

통계 분석

이상의 실험에서 얻어진 결과는 Statistical Package for Social Sciences (SPSS, 10.0, IBM, Chicago, IL, USA) software를 이용하여 One Way ANOVA test로 분석하였으며, 시료 간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 $p<0.05$ 수준에서 비교하였고, Student's t-tests로 $^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

Tyrosinase 저해 능력

멜라닌 합성을 저해시키는 tyrosinase 저해활성에 관하여 평가하였다(Fig. 1). 양성대조군은 kojic acid (2 mg/mL)를 사용하였다. 자소엽 조다당 추출물을 농도별로 처리하여 tyrosinase의 억제 활성을 평가한 결과 농도가 증가함에 따라 유의적으로 tyrosinase를 억제시키는 것으로 관찰 되었다. 따라서 자소엽 조다당 추출물의 처리는 melanin 형성에 직접적으로 관여하는 tyrosinase 효소 활성을 억제함으로써 미백 활성에 기여하는 것으로 판단된다.

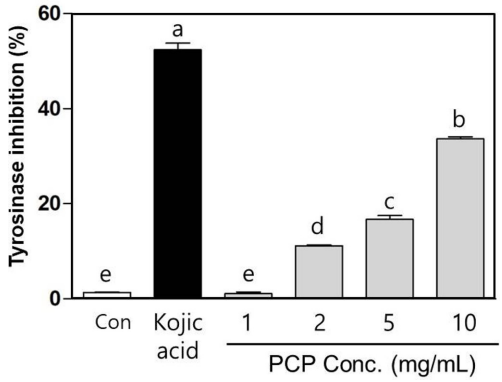

Fig. 1. Tyrosinase inhibition activity of crude polysaccharide fraction separated from *Perilla frutescens Britton* var. *acuta* Kudo (PCP). Each experiment was conducted in triplicates, and the results are expressed as means±SD (n=4). Statistical analysis was performed using Duncan's multiple range test with a significance level of $p<0.05$. Different letters (a-e) above the bars indicate a significant difference.

자소엽 조다당 처리에 따른 B16F10 세포 생존율평가

자소엽 조다당 추출물의 처리가 melanoma 세포인 B16F10 세포의 세포증식능에 미치는 영향에 관하여 평가하였다. 세포 생존율을 측정하는 MTT assay 는 노란색을 띄는 수용성 물질로서 미토콘드리아의 reductase에 의해 물에 녹지 않는 보라색의 formazan의 형태로 변형되어진다. 미토콘드리아의 reductase는 살아있는 세포에 존재하므로 세포에 MTT 시약을 처리할 경우 formazan이 형성되고 이를 다시 DMSO로 재수화 시키면 보라색이 나타나는 비색법으로 측정하였다(Gross과 Lapiere, 1962; Park 등, 1987). 먼저 IBMX가 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT를 하였으며 25, 50, 100, 200 μM의 농도에서 세포 사멸에 영향을 미치지 않는 것을 확인 하였다(Fig. 2). 자소엽 조다당 추출물을 31.25, 62.5, 125, 250 μg/mL의 농도로 처리 하였을 때 모두 100% 이상 생존율을 보여 독성을 나타내지 않은 것을 확인하였다. 따라서 자소엽 조다당 추출물은 B16F10 세포에 세포독성에 영향을 미치지 않았으므로 125 및 250 μg/mL 농도에서 melanin 생합성 저해 및 단백질 발현정도 실험을 진행하였다.

멜라닌 색소 침착의 육안적 관찰

자소엽 조다당 추출물과 IBMX를 함께 처리하였을 때, 육안적으로 멜라닌 생성에 미치는 현상을 관찰한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 먼저 아무것도 처리 하지 않은 비처리 그룹과 IBMX 단독 처리 그룹의 사진을 비교 하였을 때 짙은 검은색으로 변화하는 것으로 보아 IBMX에 의하여 melanogenesis가 성공적으로 유도되었음을 확인하였다. 또한 상기 세포 독성 실험에서 세포 독성이 나타나지 않은 농도인 125 및 250 μg/mL의 자소엽 조다당 추출물과 IBMX를 같이 처리한 그룹에서 색이 옅어지는 것으로 관찰 되는 것으로 보아 두드러진 미백효과를 확인 할 수 있었다.

자소엽 조다당 처리에 따른 멜라닌 생성 억제효과

멜라닌은 세포 내 소기관인 ribosome에서 tyrosinase라는 효소의 생합성에서 활성이 시작한다. 이 효소의 작용으로 아미노산

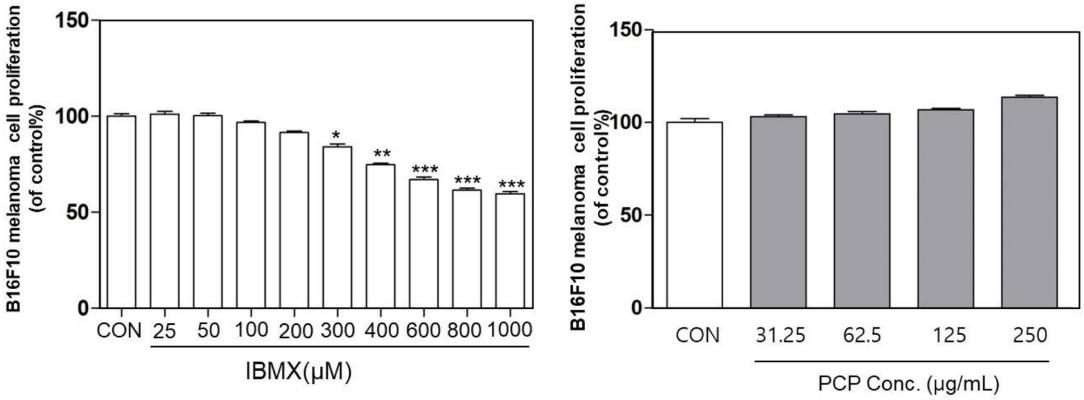

Fig. 2. Cell viability of IBMX and crude polysaccharide fraction separated from *Perilla frutescens Britton* var. *acuta* Kudo (PCP) in B16F10 melanoma cells. Each experiment was conducted in triplicates, and the results are expressed as means±SD (n=4). Statistical significance (*p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001) is indicated for treatments versus control (CON) group.

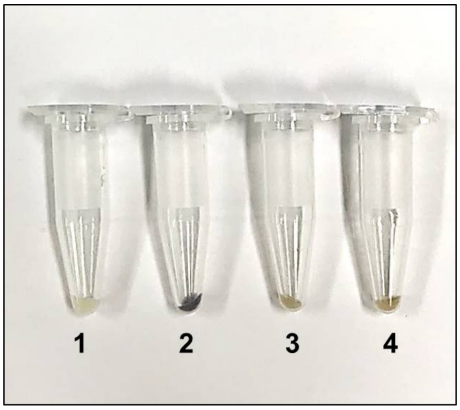

Fig. 3. The difference of melanin octents in B16F10 mouse melanoma cells treated with crude polysaccharide fraction separated from *Perilla frutescens Britton* var. *acuta* Kudo (PCP). 1: control, 2: IBMX, 3: IBMX+PCP (125 μg/mL), 4: IBMX+PCP (250 μg/mL)

일종인 tyrosine에서 몇 단계의 합성을 거쳐, 기저층의 melanin 세포 melanoma site라는 흑색소포 표면에 침착하여 검고 갈색의 작은 melanin 입자가 생성된다(Park 등, 1987). IBMX에 의해 유도된 melanoma 세포에서 자소엽 조다당 추출물을 농도별로 처리하여 자소엽 조다당 추출물의 처리가 멜라닌 생성과정에 미치는 변화를 관찰하였다(Fig. 4). 합성된 멜라닌 농도를 측정 한 결과, IBMX 단독 처리 그룹의 멜라닌의 형성이 증가한 것으로 보아 melanogenesis가 유도되었음을 확인 할 수 있었다. 또한 자소엽 조다당 추출물을 처리한 그룹에서 멜라닌 함량이 농도 의존적으로 34.33, 50.64% 감소하였으며 양성대조군인 albutin은 64.11% 감소하는 것으로 나타났다. 또한, IBMX에 의해 유도된 B16F10 세포에 자소엽 조다당 추출물을 처리하였을 때, IBMX에 의해 유도된 세포 내 tyrosinase활성이 37.79, 39.23% 억제효과를 나타내었으며, albutin 처리 시 39.23% 억제하는 것으로 보아 자소엽 조다당 추출물은 세포내 melanin 및 tyrosinase를 효과적으로 감소시키는 것으로 평가된다.

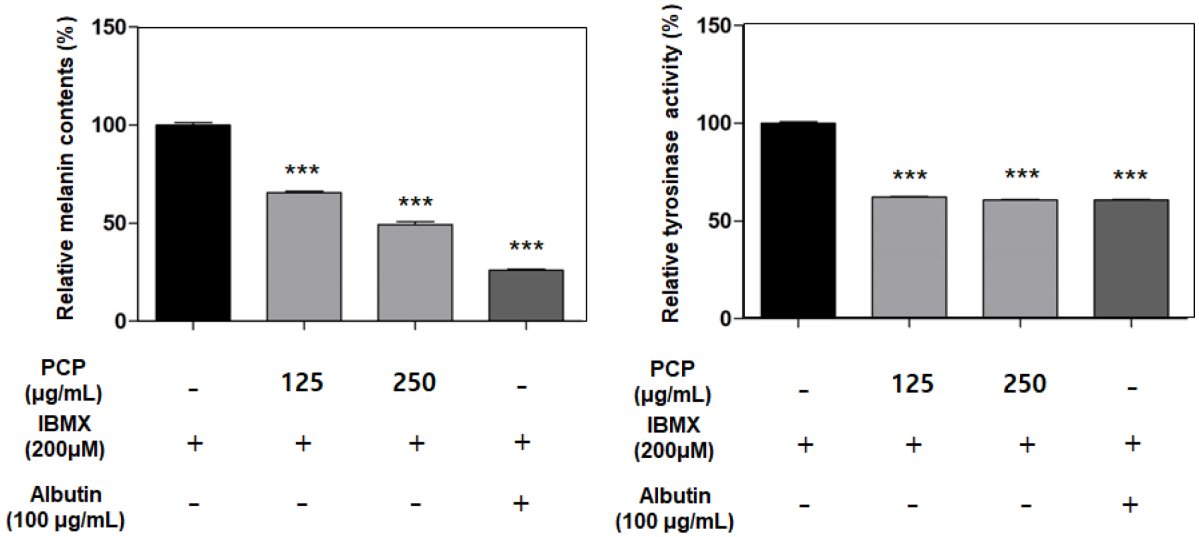

Fig. 4. Effect of crude polysaccharide fraction separated from *Perilla frutescens Britton* var. *acuta* Kudo (PCP) on cellular melanin contents and tyrosinase activity in B16F10 cells. Cells were treated with 200 μM IBMX and polysaccharide fraction crude polysaccharide fraction separated from *Perilla frutescens Britton* var. *acuta* Kudo (PCP). The results are expressed as means±SD (n=3). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of ***p<0.001, compared to control (CON) group.

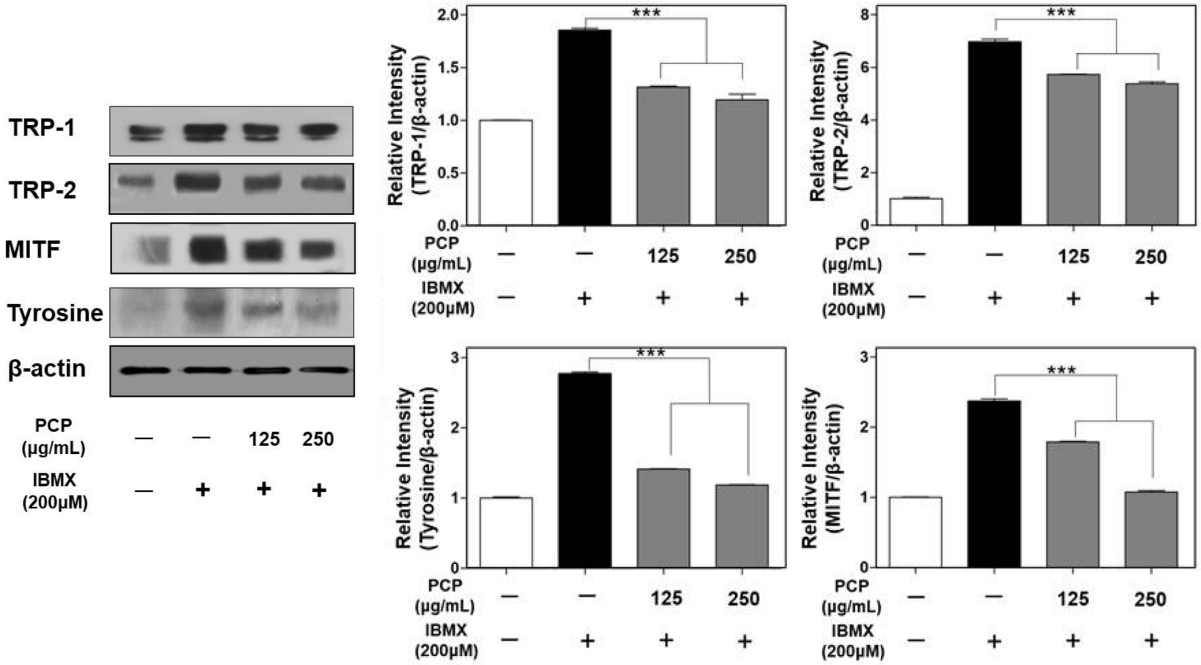

Fig. 5. Inhibitory effect of fractions from crude polysaccharide fraction separated from *Perilla frutescens Britton* var. *acuta* Kudo (PCP) on TRP-1, TRP-2, MITF, Tyrosine. Fractions were treated with IBMX. Cell lystates were examined by western blotting analysis using TRP-1, TRP-2, MITF and Tyrosine. The results are expressed as means±SD (n=4). Statistical analysis was performed using Student's two tails *t*-test with a significant level of ***p<0.001, compared to control (CON) group.

MITF, Tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 단백질 발현

멜라닌생합성 신호 전달체계에서 melanocyte의 세포막에 존재하는 melanocortin 1 receptor (Mc1R)을 통해 멜라닌 합성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 그 중 cAMP/PKA 경로가 멜라닌 합성의 주요 경로로서 UV에 피부가 노출 되었을 때 멜라닌 세포의 cAMP가 증가되고 연속적으로 protein kinase A (PKA)를 활성화 시키며 CREB를 거쳐 microphthalmia-associated transcriptipn factor (MITF)의 발현을 증가 시킨다. MITF는 멜라닌 합성과정에서 중요한 전사 조절 인자로 TRP-1, TPP-2 및 tyrosinae의 전사를 촉진한다(Busca과 Ballotti, 2013; Saha 등, 2006). TRP-1과 TRP-2는 tyrosinase related protein으로 알려져 있는 단백질로서 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)를 흑갈색을 나타내는 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화하는 효소이며 TRP-2는 DCT라고도 하며 DOPA chrome을 DHICA로 이성화하는 효소로서, MITF의 억제는 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 발현 억제를 통하여 멜라닌 색소 생성을 억제할 수 있다(Jimenez 등, 2001; Lin 등, 2008). 본 연구에서는 자소엽 조다당 추출물의 멜라닌 생성 억제효과를 분석하기 위해 TRP-1, TRP-2, tyrosinase 및 MITF의 유전자 발현 양상을 관찰하였을 때, 멜라닌 형성에 관여하는 단백질 발현을 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 5). 이러한 효과는 MITF 발현 억제를 통한 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현을 억제함으로써 미백 작용을 하는 것으로 생각된다. Ye 등 (2010)의 연구에 따르면 백출, 토복령, 작약 1:1:1 혼합추출물이 미백 관련 단백질 발현정도를 보면 본 연구와 같은 양상으로 MITF와 tyrosinase의 발현을 감소시킴으로써 멜라닌 색소 생성을 억제 할 수 있으며, MITF의 발현이 억제되면 색소생성이 억제될 수 있다고 보고하였다. 또한 Yoon 등 (2009)은 제주조릿대 잎 열수추출물이 ERK활성화를 저해함으로써 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 저해하는 활성을 가지고 있음을 보고하였고, Kim 등 (2011a)은 곰취, 미역취, 삼나물 복합 추출물 및 *bifidobacterium bifidum*을 이용한 이들 발효 추출물은 멜라닌 합성에 직접적으로 관여하는 효소인 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 발현을 억제하여 멜라닌 합성을 억제한다고 보고하였다. 이상의 결과를 보아 자소엽 조다당 추출물은 멜라닌 생합성에 관여하는 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 의 단백질 발현을 억제하므로 향후 천연 미백 소재로서의 활용이 가능 할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서 자소엽 조다당 추출물의 미백 활성을 평가하기 위하여 tyrosinase 억제활성과 melanocyte 세포에서 멜라닌 함량 및 멜라닌 관련 단백질 발현 억제능을 수행하였다. 자소엽 조다당 추출물은 tyrosinase 억제능을 관찰한 결과 자소엽 조다당 추출물의 농도가 증가할수록 활성이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 미백 효과가 melanoma 세포인 B16F10 세포 내에서도 일어나는지 확인하기 위하여 세포내 멜라닌 함량 및 tyrosinase 억제능을 살펴보았다. 자소엽 조다당 추출물은 B16F10 세포에 대하여 세포독성이 없는 농도에서 진행 하였으며, 세포내 멜라닌 함량 및 tyrosinase 활성 저해를 보여주었다. 이는 자소엽 조다당 추출물이 세포 내 MITF 발현을 억제시킴으로서 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2 단백질 발현을 억제함에 따라 미백효과를 확인하였다. 이러한 결과로 자소엽 조다당 추출물의 미백 활성을 확인 할 수 있었으며, 미백 산업 분야 및 식품의 기능성 소재로 이용한다면 천연 미백 소재로써 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

References

Bertolotto C, Abbe P, Hemeasath TJ, Bille K, Fisher DE, Ortonne JP

Ballotti R. Microphthalmia gene product an a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. J. Cell Biol. 142: 827-835 (1998)

Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. Pigm. Cell Res. 13: 60-69 (2013)

Byun EH. Immunomodulatory activities of crude polysaccharide fraction separated from *Perilla frutecens Britton* var. *acruta* Kudo. Korean J. Food Sci. Technol. 49: 559-566 (2017)

Cho EJ, Kim YE, Byun EH. Immunomodulatory activities of polysaccharides extracted from Cudrania tricuspidata fruits in macrophage. Korean J. Food Sci. Technol. 50: 511-516 (2018)

Cho EJ, Yokozawa T, Rhyu DY, Kim SC, Shibahara N, Park JC. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Phytomedicine 10: 544-551 (2003)

Choi WS, Kwon HS, Lim HW, No RW and Lee HY. Whitening effects of *Lactobacillus rahamnosus* associated with its antioxidative activities. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 41: 183-189 (2013)

Choung MG, Hwang YS, Kim GP, Ahn KG, Shim HS, Hong SB, Choi JH, Yu CY, Chong IM, Kim SH, Lim JD. Antimelanogenic effect and whitening of anthocyanin rich fraction from seeds of *Liriope platyphylla.* Korean J. Medicinal Crop Sci. 21: 361-371 (2013)

Flurkey WH. Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. J. Food Sci. 56: 93-95 (1991)

Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissue: a tissu culture assay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54: 1197-1204 (1962)

Hearing VJ, K Tukamoto. Enzymatic control of pigmentation in mammals. FASEB J. 5: 2902-2909 (1991)

Jeddou KB, Chaari F, Maktouf S, Nouri-Ellouz O, Helbert CB, Ghorbel RE. Structural, functional, and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from potatoes peels. Food Chem. 205. 97-105 (2016)

Jimnez-Cervantes C, Martnez-Esparza M, Prez C, Daum N, Solano F, Garca-Borrn JC. Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: Transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of micro phthalmia trascription factor. J. Cell Sci. 114: 2335-2344 (2001)

Kim DH, An BJ, Kim S, Park TS, Park GH. Son JH. Antimelanogenic effect of Ligularia fischeri, Solidago virga-aurea, Aruncus dioicus extracts from Ullung Island in murine melanoma cells. J. Life Sci. 21: 279-28 (2011a)

Kim DH, Kim YC, Choi UK. Optimization of antibacterial activity of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf against staphylococcus using evolutionary operation factorial design technique. Int. J. Mol. Sci. 12: 2395-2407 (2011b)

Kim DM, Kim KH, Sung NY, Jung PM, Kim JS, Kim JK, Kim JH, Choi JI, Song BS, Lee JW, Kim JK, Yook HS. Effect of gamma irradiation on the extraction yield and whitening activity of polysaccharides from Undaria pinnatifida sporopyll. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 40: 712-716 (2011c)

Lin JH, Chiang HM, Lin YC, Wen KC. Natural products with skin-whitening effects. J. Food Drug Anal. 16: 1-10 (2008)

Park DY, Lee KY. Evaluation of the cosmeceutical activity of ethanol extracts from *Perilla frutescens* var. *acuta*. J. Korea Acad. Industr. 18: 513-517 (2017)

Park JG, Karmer BS, Steinberg SM, Carmichael J. Collins JM, Minna JD, Gazdar AF. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. Cancer Res. 47: 5875-5879 (1987)

Saha B, Singh SK, Sarkar C, Bera R, Ratha J, Tobin DJ, Bhadra R. Activation of the MITF promotoer by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB. Pigm. Cell Res. 29: 595-605 (2006)

Schepetkin IA, Quinn MT. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. Int. Immunopharmacol 6: 317-333 (2006)

Swan GA. Structure, chemistry, and biosynthesis of the melanins. Fort. Chem. Org. Nat. 31: 521-582 (1974)

Wang X, Wang J, Zhang J, Zhao B, Yao J, Wang Y. Structure - antioxidant relationships of sulfated galactomannan from guar gum. Int. J. Biol. Macromol. 46: 59-66 (2010)

Ye Y, Chu JH, Wang H, Xu H, Chou GX, Leung AK. Involvement of p38 MAPK signaling pathway in the anti-melanogenic effect of San-bai-tang, a Chinese herbal formula, in B16 cells. J. Ethnopharmacol. 132: 533-535 (2010)

Yoon HS, Koh WB, Oh YS, Kim IJ. The anti-melanogenic effects of Petalonia binghamia extracts in α melanocyte stimulating hormone-induced B16/F10 murine melanoma cells. J. Korean Soc. Appl. Bi. 52: 564-567 (2009)