

## 분갈화 추출물과 분갈화 유래 Tectorigenin류 3종의 미백 효능에 대한 연구

안 영 제<sup>†</sup> · 장 윤 희<sup>†</sup> · 이 소 영 · 진 무 현

LG 생활건강 기술연구원

(2019년 1월 3일 접수, 2019년 2월 28일 수정, 2019년 3월 14일 채택)

### A Study on the Whitening Effects of *Pueraria thomsonii* Extract and its Three Tectorigenin Derivatives

Young Je Ahn<sup>†</sup>, Yun Hee Chang<sup>†</sup>, So Young Lee, and Mu Hyun Jin

Cosmetic Research & Development Center, LG Household & Healthcare Ltd., 70 Magokjungang 10-ro, Gangseo-gu, Seoul 07795, Korea

(Received January 3, 2019; Revised February 28, 2019; Accepted March 14, 2019)

**요 약:** 분갈(*Pueraria thomsonii* Benth)은 전통적으로 중국 의학에서 발열, 급성 이질, 설사, 당뇨병 및 심혈관 질환 치료를 위한 약재로 사용되어 왔다. 이러한 분갈의 꽃인 분갈화의 피부 효능은 아직까지 밝혀진 바 없어, 본 연구에서는 멜라닌세포인 B16F1 세포주와 섬유아세포인 HS68 세포주를 이용하여 분갈화의 피부 효능을 검증하고자 하였다. 분갈화의 에탄올 추출물이 멜라닌세포의 멜라닌 합성을 농도 의존적으로 감소시킴을 확인하고, 분갈화 추출물의 효능 성분을 추적하고자 high performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 분갈화에 함유된 이소플라본류 화합물인 tectorigenin, tectoridin, tectorigenin 7-O-xylosylglucoside 3종 성분을 확인하였다. 3종 성분 모두 독성을 보이지 않는 농도에서 멜라닌세포의 멜라닌 생합성을 농도 의존적으로 감소시켰으며, 이러한 멜라닌 생합성 감소는 tyrosinase와 microphthalmia-associated transcription factor (MITF) 유전자 발현을 감소시키는 것에 기인함을 확인하였다. 멜라닌 합성저해의 또 다른 기전을 확인하기 위하여, 섬유아세포에서 유래되는 멜라닌 합성억제 인자인 DKK-1의 발현에 대한 영향을 측정된 결과, 분갈화 추출물, tectoridin, tectorigenin 7-O-xylosylglucoside는 DKK-1의 발현을 농도 의존적으로 감소시킨 반면, tectorigenin은 DKK-1의 발현을 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인하였다. 이상의 연구 결과를 바탕으로, 분갈화 성분 중 tectorigenin은 멜라닌세포에서의 멜라닌 합성 억제와 섬유아세포에서의 멜라닌 생성 억제 인자 분비를 촉진하는 효과적인 미백 개선제로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

**Abstract:** *Pueraria thomsonii* Benth. as a medicinal ingredient, has been traditionally used in Chinese medicine to treat fever, acute dysentery, diarrhea, diabetes, and cardiovascular disease. The effects of *P. thomsonii* flower on skin have not been reported yet. In this study, the whitening effect of *P. thomsonii* flower was verified using B16F1 melanoma cells and HS68 fibroblasts. *P. thomsonii* flower extract reduced melanin contents of B16F1 cells in a dose-dependent manner. To identify its active components, we analyzed *P. thomsonii* flower extract using high performance liquid chromatography (HPLC). As a result, we identified three major isoflavones of tectorigenin, tectoridin, and tectorigenin 7-O-xylosylglucoside. At a non-cytotoxic concentration, the three components also reduced melanin contents of B16F1 cells in a dose-dependent manner. The depigmentation effects were attributed to the reduced gene expression of tyrosinase and

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: youngje@lghnh.com, yunizzang@lghnh.com  
call: 02)6980-1717

microphthalmia-associated transcription factor (MITF). In order to elucidate another depigmentation mechanism, their effects on DKK-1, a fibroblast-derived depigmentation factor, was determined in HS68 cells. As a result, *P. thomsonii* flower extracts, tectoridin and tectorigenin 7-O-xylosylglucoside, reduced DKK-1 gene expression, while tectorigenin increased DKK-1 gene expression in a dose-dependent manner. These results suggest that tectorigenin can be used as an effective whitening agent that inhibit melanin synthesis in melanocytes and promote the secretion of depigmentation factor from fibroblasts.

**Keywords:** *Pueraria thomsonii* Benth, tectorigenin, tectoridin, tectorigenin 7-O-xylosylglucoside, tyrosinase

## 1. 서 론

멜라닌(melanin)은 표피에 존재하는 멜라닌세포(melanocytes) 내의 멜라노솜(melanosome)에서 생성된 후, 멜라닌세포의 수지상 돌기(dendrite)를 통해 각질세포(keratinocytes)로 전달되어, 피부 각질층으로 이동하게 된다. 멜라닌은 사람의 피부색을 결정하는 중요한 인자로, 자외선을 흡수하거나, 자외선에 의해 발생하는 자유 라디칼(free radical)을 소거함으로써, 피부를 자외선으로부터 보호하는 중요한 방어 시스템의 하나이다[1,2]. 멜라닌은 멜라노솜 내에 있는 tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1)과 dopachrome tautomerase (DCT) 등의 여러 가지 효소의 복합 작용에 의해 생성된다. 특히, tyrosinase는 멜라닌 생합성의 속도 조절 단계(rate-limiting step)인 타이로신(tyrosine)이 도파(3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA)로 hydroxylation된 후, 다시 도파퀴논(dopaquinone)으로 산화되는 과정에 작용하는 주요 조절 효소이다[3-6]. 이러한 멜라닌 합성효소의 발현을 조절하는 대표적인 전사 인자로 알려진 것이 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)이다. MITF는 멜라닌 합성을 조절할 뿐만 아니라 멜라닌세포의 분화와 성장에도 중요한 역할을 하며, 이러한 MITF는 MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases), cAMP/PKA (cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A), PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt), 및 Wnt/ $\beta$ -catenin pathway 등에 의해 조절된다고 알려져 있다[7]. 따라서, 이러한 멜라닌합성과 관련된 pathway들을 조절하여 MITF의 발현을 억제함으로써, 멜라닌합성을 저해하는 다양한 미백 소재 개발이 시도되어 왔다. 한편, 진피 섬유아세포(dermal fibroblasts)는 다양한 측분비인자(paracrine mediators)인 단백질(DKK-1, sFRP, Sema7a, CCN, FAP- $\alpha$ )와 성장인자(KGF, HGF, bFGF, NT-3, NRG-1, TGF- $\beta$ )를 분비하여 멜라닌합성에 영향을 주는 등, 멜라닌 합성은 복잡한 진피-표피 네트워크(dermal-epidermal

network)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다[8]. 이 중 DKK-1은 섬유아세포에서 분비되는 대표적인 멜라닌 합성 억제 인자로, 비손발바닥 피부(nonpalmoplantar skin)에 비해 손발바닥 피부(palmoplantar skin)의 섬유아세포는 DKK-1의 발현이 높으며, DKK-1이 Wnt/ $\beta$ -catenin pathway를 억제함으로써, MITF의 발현을 저해하여 멜라닌 합성을 감소시키는 것으로 알려져 있다[9].

전통의학에서는 콩과(Leguminosae)에 속하는 분갈(*pueraria thomsonii* Benth)의 뿌리가 당뇨나 심혈관 질환에 도움이 된다고 알려져 있다[10]. 분갈화는 분갈의 꽃 또는 꽃봉오리로 중국 남부와 동남아시아에서는 전통적으로 차로 섭취하고 있으며, 항산화, 간보호, 항비만 효과 등이 연구되어 왔으나[11,12], 그 미백효과에 대해서는 알려진 바가 없다. 분갈화는 다수의 이소플라본을 함유하고 있으며, 대표성분으로는 tectorigenin, tectoridin, tectorigenin 7-O-xylosylglucoside (이하 tectorigenin류 3종) 등을 포함하고 있다[13,14]. Tectorigenin 및 tectoridin은 TPA로 유도되는 COX 증가 억제 기전의 항염 효능을 지니고 있으며[15], tectorigenin은 MMP-2, MMP-9 억제 효과가 보고되어 있으나[16], 피부와 관련된 미백 효과에 대해서는 보고된 바가 없다.

따라서, 본 연구에서는 분갈화 및 그 주요성분 tectorigenin류 3종의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하고 그 메커니즘을 조사하여 피부 미백 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

## 2. 재료 및 실험 방법

### 2.1. 재료 및 시약

본 실험에 사용한 분갈화는 분갈의 꽃 또는 꽃봉오리로 중국 호남성에서 10월에 채취하여 건조 후 사용하였다. 건조된 분갈화 1 kg을 70% 에탄올 10 L로 70 °C에서 3회 추출하고 감압 농축하여 에탄올 추출물을 얻었다. 주요 성분의 함량 분석을 위해 사용한 표준품 tectorigenin

7-O-xylosylglucoside는 Tokiwa사(Chiba, Japan)에서 구입하여 사용하였으며, tectoridin과 tectorigenin은 Sigma사(Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. 성분 분석을 위해 사용된 methanol, acetonitrile은 HPLC용으로 Duksan Pure Chemicals (Ansan, Korea)에서 구입하였으며, 증류수는 Milli-Q purification system (Millipore, Billerica, MA)으로 정제하여 사용하였다.

## 2.2. HPLC 분석

분석에 사용된 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) 기기는 Agilent 1260 infinity system (Agilent, Santa Clara, USA)이며, 컬럼은 Phenomenex Kinetex C18 (4.6 mm × 50 mm, 2.6 μm, Phenomenex, Torrance, USA)를 사용하였다. 시료 주입량은 1 μL, 유속은 1 mL/min, 이동상은 0 - 2 min : 10 → 10% acetonitrile, 2 - 10 min : 10 → 65% acetonitrile, 10 - 11 min : 65 → 95% acetonitrile, 11 - 15 min : 95 → 95% acetonitrile 조건으로 기울기 용리하였으며, UV 검출기의 260 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 모든 표준 용액과 검액의 조제는 Milipore membrane filters (PTFE, 0.45 μm)로 여과하여 사용하였다. 데이터의 수집과 처리는 Agilent HPLC Chem station (Agilent, Santa Clara, USA)을 사용하였다.

## 2.3. 세포 배양

B16F1 멜라노마 세포와 HS68 섬유아세포는 ATCC (Manassas, USA)에서 구입하였으며, 10% FBS (Invitrogen, USA)와 1% penicillin (50 U/ml)/streptomycin (50 μg/mL) (Invitrogen, USA)이 추가된 DMEM (Invitrogen, USA)을 이용하여 배양하였으며, 세포가 배양용 플라스크에 약 80% 찼을 때, 0.25% Trypsin-EDTA (Invitrogen, USA)를 이용하여 계대하였다. 모든 세포는 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 세포 배양기(ThermoFisher, USA)에서 배양하였다.

## 2.4. 멜라닌 정량

멜라닌 정량은 J. Hosoi 등의 방법을 변형하여 실시하였다[17]. 5 × 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 6-well plate에 분주하고 24 h 후, 시료를 농도 별로 희석하여 세포에 72 h 동안 처리하였다. 이 때 시료는 48 h 뒤, 한번 교체하였다. 세포를 10,000 rpm에서 10 min 동안 원심 분리하여 얻은 침전물에 1 N NaOH / 10% DMSO 넣고 80 °C에서 1 h 동안 녹였다. 멜라닌 함량은 microplate spectrophotometer (BioTek,

Winooski, USA) 기기를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 계산한 뒤 단백질량으로 보정하였다.

## 2.5. 실시간 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)을 통한 유전자 발현 평가

B16F1 세포 또는 HS68 세포를 6-well cell culture plate에 well 당 2 × 10<sup>5</sup>씩 분주하여 24 h동안 10% FBS DMEM으로 배양하였다. 그 후 FBS free-DMEM으로 교체한 후 시료를 배지에 희석하여 24 h동안 처리하였다. 세포를 회수하여 PBS로 세척한 후, RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 전체 RNA를 추출했다. 정량 후 2.5 μg의 RNA를 cDNA Synthesis Kit (PhileKorea, Seoul, Korea)를 이용하여 역전사하였다(Veriti 96-well Thermal Cycler, Applied Biosystems, USA). 합성된 cDNA는 반응 당 100 ng을 사용하였고, TaqMan Universal Master Mix II (ThermoFisher, USA)를 사용하였다. 프라이머는 TaqMan Gene Expression Assays (ThermoFisher, USA) mTYR, mMITF와 hDKK-1로 구매하였으며, 실시간 중합효소 연쇄 반응 (quantitative real time PCR)을 Step One Plus Real-time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA)을 이용하여 수행하였다. qRT-PCR을 통해 얻은 실험결과는 mTYR과 mMITF는 mouse housekeeping gene인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (mG3PDH)를 기준으로, hDKK-1은 human housekeeping gene인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (hG3PDH)를 기준으로 ΔΔCt 방법으로 계산하여 나타내었다. 또한, 음성 대조군의 mRNA 발현량을 약 1.0으로 기준하여 시료 처리군의 mRNA 발현량을 상대적으로 수치화하였다.

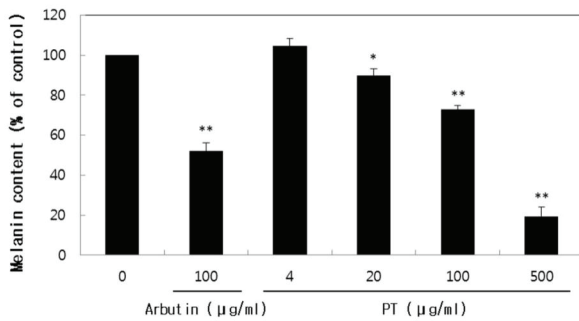
## 2.6. 통계 분석

본 연구에서 시행된 실험은 총 3회 이상 반복하였으며, 실험 군에 따른 데이터 사이의 통계적 유의성 검정은 Paired samples t-tests (SPSS ver. 20, IBM, USA)로 시행하였다. 결과 값들을 mean ± standard deviation (S.D.)으로 나타내었다. P 값이 0.05 이하일 경우 \*, 0.01 이하일 경우 \*\*로 통계적 유의성을 표시하였다.

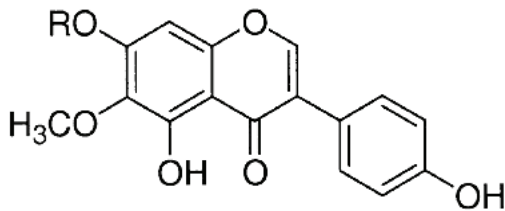
## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 분갈화의 멜라닌 생성 억제 효과

분갈화 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보



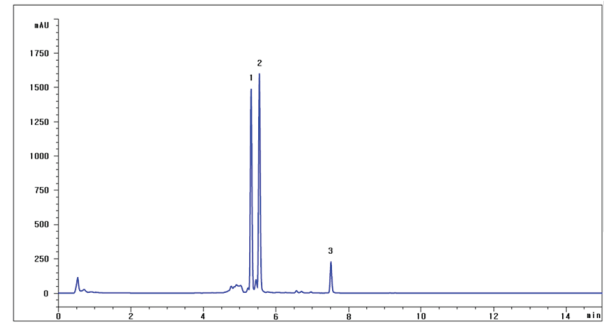
**Figure 1.** Inhibitory effect of *P. thomsonii* flower extract on melanin formation in B16F1 cells. Cells were incubated with various concentration of *P. thomsonii* flower extract (PT) for 72 h. Arbutin was used as a positive control. Melanin contents were measured by absorbance values at the wavelength 405 nm. Data are shown as a percentage of control from the three independent experiments in triplicate and values represent as the mean  $\pm$  SD \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with the control.



Tectorigenin	R = H
Tectoridin	R = -Glc
Tectorigenin 7-O-xylosylglucoside	R = -Glc-Xyl

**Figure 3.** Structures of three major compounds from *P. thomsonii* flower extract.

기 위해, B16F1 세포에 세포독성이 없는(data not shown) 500 ppm 이하의 다양한 농도의 분갈화 추출물을 72 h 동안 처리한 뒤 멜라닌 양을 측정하였다. 대조군의 멜라닌 생성량을 100%로 나타내었고 실험군의 멜라닌 생성량을 상대적인 퍼센트로 수치화하였다. Figure 1에서 보는 바와 같이, 분갈화 추출물을 100 ppm 농도로 처리하였을 때 멜라닌 생성량이 27% 감소하였고, 500 ppm 처리하였을 때 80% 감소하여 분갈화 추출물은 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 저해함을 확인하였다.



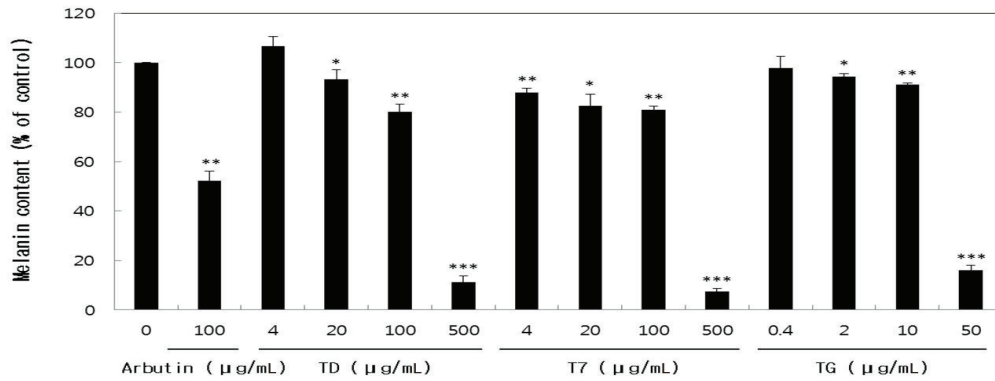
**Figure 2.** HPLC profiles of *P. thomsonii* flower extract. 1: tectorigenin 7-O-xylosylglucoside, 2: tectoridin, 3: tectorigenin.

### 3.2. 분갈화의 유효성분 3종 확인

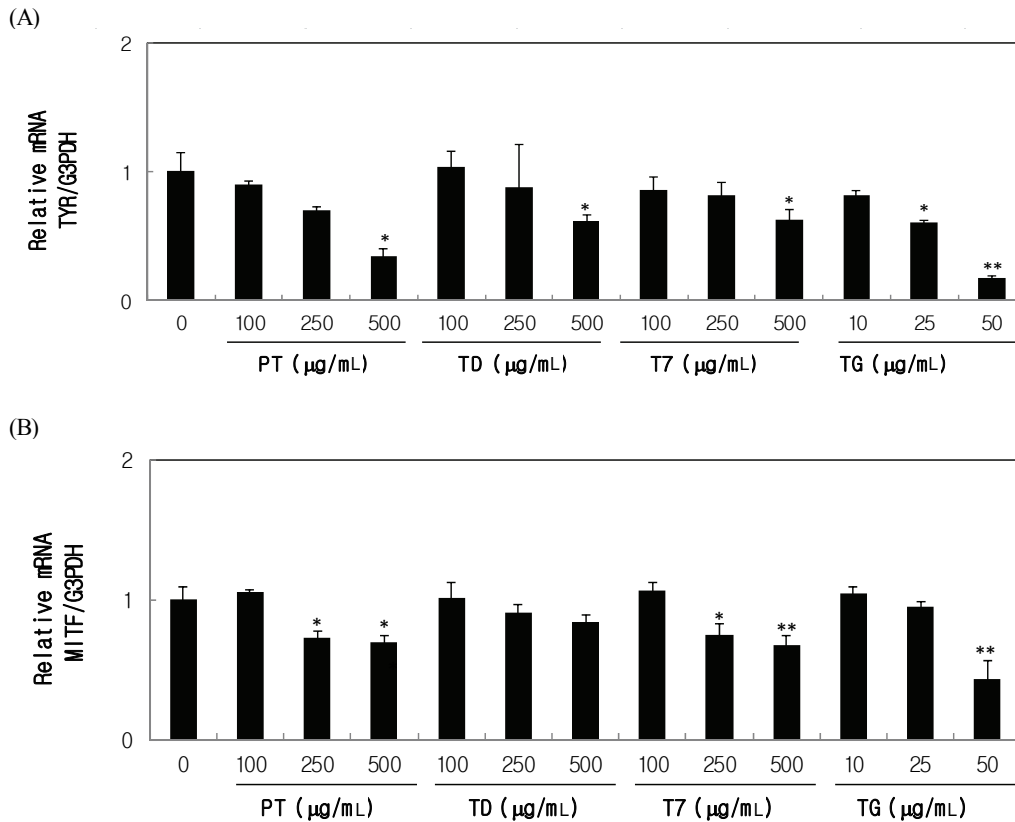
분갈추출물의 멜라닌 감소효과를 나타내게 하는 미백 효능 성분을 규명하기 위하여 HPLC를 통해 함유 성분들을 확인하였고, 그 결과를 Figure 2에 나타내었다. 참고문헌과 유사하게 isoflavone류를 함유하고 있음을 확인하였으며[13,14], 추출물 내 tectorigenin이 0.32%, tectoridin이 3.09%, tectorigenin 7-O-xylosylglucoside가 2.78% 함유되어 있음을 확인하였다(data not shown). Tectoridin과 tectorigenin 7-O-xylosylglucoside는 tectorigenin의 배당체 성분으로 3종 성분의 구조는 Figure 3에 나타내었다.

### 3.3. 분갈화 추출물에 포함된 tectorigenin류 3종의 멜라닌 생성 억제 효과

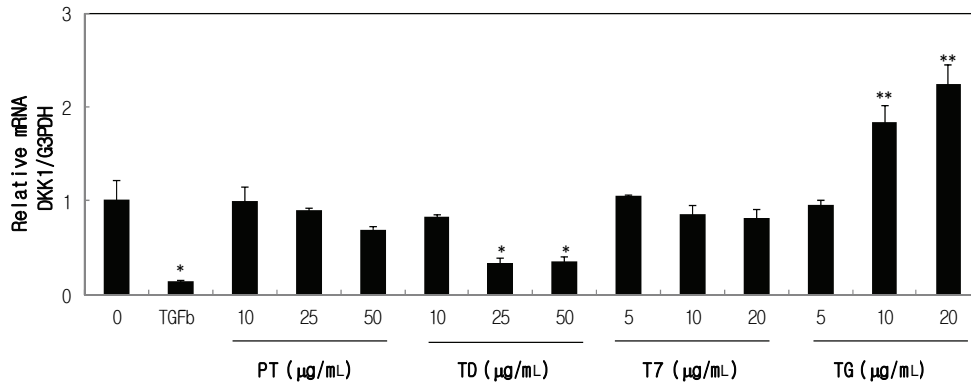
분갈화 추출물의 주요한 유효성분인 tectorigenin류 3종의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 B16F1 세포에 독성이 없는(data not shown) 다양한 농도의 tectorigenin류 3종을 72 h 동안 처리한 뒤 멜라닌 생성량을 측정하였다. 대조군의 멜라닌 생성량을 100%로 나타내었고 실험군의 멜라닌 생성량을 상대적인 퍼센트로 수치화하였다. Figure 4에서 보는 바와 같이, tectorigenin 3종을 처리하였을 때 tectoridin 500 µg/mL, tectorigenin 7-O-xylosylglucoside 500 µg/mL, tectorigenin 50 µg/mL 농도에서 멜라닌 생성량이 각각 88%, 92%, 84% 감소하였다. 따라서, 분갈화 추출물의 멜라닌 합성 감소 효과는 tectorigenin류 3종의 멜라닌 합성 감소 효능에 기인한다고 예상할 수 있었다.



**Figure 4.** Inhibitory effects of three tectorigenin derivatives from *P. thomsonii* flower extract on melanin formation in B16F1 cells. Cells were incubated with tectoridin (TD), tectorigenin 7-*O*-xylosylglucoside (T7), and tectorigenin (TG) for 72 h. Arbutin was used as a positive control. 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  $\pm$  SD \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared with the control.



**Figure 5.** Decrease of transcriptional expression of TYR and MITF after treatment of *P. thomsonii* flower extract and its three tectorigenin derivatives. B16F1 cells were incubated with *P. thomsonii* flower extract (PT), tectoridin (TD), tectorigenin 7-*O*-xylosylglucoside (T7), and tectorigenin (TG) for 24 h. Total RNA was extracted and quantitative real time PCR was performed for mTYR (A) and mMITF (B). mG3PDH was used as an internal control. Results are the mean  $\pm$  SD of experiments using data are shown as fold increase from the three independent experiments in triplicate. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with the untreated control.



**Figure 6.** Transcriptional expression profile of DKK-1 after treatment of *P. thomsonii* flower extract and its three tectorigenin derivatives. HS68 cells were incubated with *P. thomsonii* flower extract (PT), tectoridin (TD), tectorigenin 7-O-xylosylglucoside (T7), and tectorigenin (TG) for 24 h. Total RNA was extracted and quantitative real time PCR was performed for DKK-1. hG3PDH was used as an internal control. Results are the mean  $\pm$  SD of experiments using data are shown as fold increase from the three independent experiments in triplicate. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  compared with the untreated control.

### 3.4. 분갈화추출물 및 tectorigenin류 3종의 tyrosinase 및 MITF의 발현 억제 효과

분갈화 추출물과 tectorigenin류 3종의 멜라닌 합성감소에 대한 기전을 확인하기 위해, 멜라닌 합성의 주요 효소인 tyrosinase와 멜라닌 합성 관련 유전자의 promotor에 결합하여 이들의 발현을 조절하는 전사인자인 MITF의 유전자 발현을 확인하였다. B16F1 세포에 분갈화 추출물과 tectorigenin류 3종을 세포 독성이 관찰되지 않은 농도(data not shown)로 24 h 처리한 후 tyrosinase와 MITF의 유전자 발현 양상을 살펴보았다. Figure 5에서 보는 바와 같이, 분갈화 추출물과 tectorigenin류 3종은 tyrosinase와 MITF의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다. 따라서, 분갈화 추출물과 tectorigenin류 3종은 멜라닌 합성에 중요한 단백질인 tyrosinase와 MITF의 발현을 감소시켜 멜라닌 합성을 저해한다는 것을 확인할 수 있었다.

### 3.5. Tectorigenin의 DKK-1 발현 증진

멜라닌 합성에 있어, 진피와 표피 사이의 cross-talk 역할이 중요하다는 것이 알려지면서, 피부 미백을 위해서는 멜라닌세포에서 멜라닌 형성을 억제하는 것 외에, 진피에서 오는 멜라닌 생성 신호를 조절하는 것도 필요하다고 알려져 있다. 따라서, 멜라닌세포에서 멜라닌 합성 억제효과를 보였던 분갈화 추출물과 tectorigenin류 3종이 진피세포 유래 측분비인자 중 멜라닌 합성 억제 인자로 알려진 DKK-1의 유전자 발현에 대한 영향을 확인하였다. TGF-β는 DKK-1의 발현을 감소시키며, Wnt pathway를 활성화시키

는 것으로 알려져 있어, DKK-1 유전자 발현에 대한 음성 대조군(negative control)로 사용하였다[18]. Figure 5에서 보는 바와 같이, 분갈화 추출물, tectoridin, tectorigenin 7-O-xylosylglucoside는 DKK-1의 발현을 농도 의존적으로 감소시킨 반면, tectorigenin은 DKK-1의 발현을 농도 의존적으로 증가시킨다는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해, 효능 유효성분이 멜라닌세포의 멜라닌 생성을 억제하더라도 진피 섬유아세포에서 유래하는 멜라닌 조절인자에는 상반된 효능을 보일 수 있어, 실제 피부 미백 효능이 우수한 물질을 개발하기 위해서는 멜라닌세포를 이용한 평가 외에, 진피 섬유아세포에서 유래하는 멜라닌 조절 주요인자에 대한 영향을 확인하는 과정이 필요하다는 것을 알 수 있었다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 분갈화의 미백 화장품 원료로서의 가능성을 알아보았다. 분갈화 추출물은 B16F1 cells에서 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 억제하였다. 분갈화의 대표 성분인 tectorigenin, tectoridin, tectorigenin 7-O-xylosylglucoside를 HPLC를 통해 확인하였고, 3종 성분 모두 B16F1 cell에서 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 억제하였다. 멜라닌 생합성 저해 기전을 확인하기 위해 tyrosinase와 MITF의 유전자 발현 양상을 확인하였으며, 분갈화추출물과 tectorigenin류 3종은 tyrosinase와 MITF의 발현을 농도 의존적으로 감

소시켰다. 또한 섬유아세포에서 유래되는 DKK-1의 발현에 대한 영향을 측정한 결과, 분갈화 추출물, tectoridin과 tectorigenin 7-O-xylosylglucoside는 DKK-1의 발현을 농도 의존적으로 감소시킨 반면, tectorigenin은 DKK-1의 발현을 농도 의존적으로 증가시킨다는 것을 확인하였다. 배당체 성분인 tectoridin과 tectorigenin 7-O-xylosylglucoside는 산 가수분해 반응을 통해 tectorigenin으로 전환된다고 알려져 있어[19], 산 가수분해 등의 방법으로 tectorigenin의 함량을 높인 분갈화 추출물은 멜라닌세포의 멜라닌 생성을 억제 할 뿐만 아니라, 섬유아세포에서 분비되는 멜라닌합성 억제 인자인 DKK-1의 발현을 높여, 더욱 효과적인 미백 화장품 원료로서 가능성을 가지고 있는 것으로 판단된다. 향후, 분갈화 추출물의 원료화 연구와 인체실험을 진행하여 피부 미백 효능 및 피부 안전성 여부를 평가할 예정이다

## 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, *J. 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. del Marmol V 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. Y. Wang, C. Viennet, S. Robin, J. Y. Berthon, L. He, and P. Humbert, Precise role of dermal fibroblasts on melanocyte pigmentation, *J. Dermatol. Sci.*, **88**(2), 159 (2017).
9. Y. Yamaguchi, A. Morita, A. Maeda, and V. J. Hearing, Regulation of skin pigmentation and thickness by Dickkopf 1 (DKK1), *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **14**(1), 73 (2009).
10. Q. Wang, X. L. Cheng, D. Y. Zhang, X. J. Gao, L. Zhou, X. Y. Qin, G. Y. Xie, K. Liu, Y. Qin, B. L. Liu, and M. J. Qin, Tectorigenin Attenuates Palmitate-Induced Endothelial Insulin Resistance via Targeting ROS-Associated Inflammation and IRS-1 Pathway, *PLoS one*, **8**(6), e66417 (2013).
11. T. Kamiya, A. Takano, Y. Matsuzuka, N. Kusaba, M. Ikeguchi, K. Takagaki, and K. Kondo, Consumption of *Pueraria* flower extract reduces body mass index via a decrease in the visceral fat area in obese humans, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**(8), 1511 (2012).
12. N. R. Han, S. Y. Nam, S. Hong, H. Y. Kim, P. D. Moon, H. J. Kim, H. Cho, B. Lee, H. M. Kim, and H. J. Jeong, Improvement effects of a mixed extract of flowers of *Pueraria thomsonii* Benth. and peels of *Citrus unshiu* Markovich on postmenopausal symptoms of ovariectomized mice, *Biomed. Pharmacother.*, **103**, 524 (2018).
13. Y. Niiho, Y. Nakajima, T. Yamazaki, M. Okamoto, R. Tsuchihashi, M. Kodera, J. Kinjo, and T. Nohara, Simultaneous analysis of isoflavones and saponins in *Pueraria* flowers using HPLC coupled to an evaporative light scattering detector and isolation of a new isoflavone diglucoside. *J Nat Med*, **64**(3), (2010).
14. J. Lu, Y. Xie, Y. Tan, J. Qu, H. Matsuda, M. Yoshikawa, and D. Yuan, Simultaneous determination of isoflavones, saponins and flavones in *Flos Puerariae* by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Chem. Pharm. Bull.*, **61**(9), 941 (2013).
15. Y. P. Kim, M. Yamada, S. S. Lim, S. H. Lee, N. Ryu, K. H. Shin, and K. Ohuchi, Inhibition by tectorigenin and tectoridin of prostaglandin E2 production

- and cyclooxygenase-2 induction in rat peritoneal macrophages, *Biochim. Biophys. Acta*, **1438**(3), 399 (1999).
16. Y. Guo, Y. H. Chen, Z. H. Cheng, H. N. Ou-Yang, C. Luo, and Z. L. Guo, Tectorigenin inhibits osteosarcoma cell migration through downregulation of matrix metalloproteinases *in vitro*, *Anticancer Drugs*, **27**(6), 540 (2016).
17. 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).
18. A. Akhmetshina, K. Palumbo, C. Dees, C. Bergmann, P. Venalis, P. Zerr, A. Horn, T. Kireva, C. Beyer, J. Zwerina, H. Schneider, A. Sadowski, M. O. Riener, O.A. MacDougald, O. Distler, G. Schett, and J. H. Distler, Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- $\beta$ -mediated fibrosis, *Nat Commun*, **13**(3), 735 (2012).
19. M. Y. Kim, Y. M. Yoo, I. M. Chung, J. H. Nam, and H. J. Park, Quantitative analysis of the isoflavone content in the flower and the root of *Pueraria thunbergiana* before and after acid hydrolysis, *Natural Product Sciences*, **14**(3), 187 (2008).