J. Soc. Cosmet. Sci. Korea
Vol. 49, No. 4, December 2023, 307-312

pISSN 1226-2587
eISSN 2288-9507
http://dx.doi.org/10.15230/SCSK.2023.49.4.307

Tyrosinase 발현 조절을 통한 마름열매 추출물의 Melanin 생성 억제 효과

김 영 주[*,†]

[*]오산대학교, 뷰티코스메틱계열, 교수

(2023년 9월 4일 접수, 2023년 11월 14일 수정, 2023년 11월 24일 채택)

The Inhibitory Effects of Water Chestnut Extracts on Melanogenesis through Regulation of Tyrosinase Expression

Young Joo Kim[†]

Osan university, Department of Beauty & Cosmetics, Osan University, 45 Cheonghak-ro, Osan, Gyeonggi-do, 18119 Korea

(Received September 4 , 2023; Revised November 14, 2023; Accepted November 24, 2023)

요 약: 본 연구에서는 국내에서 자생하고 있는 *Trapa natans var. bispinosa* 열매인 마름(water chestnut)의 anti-pigmentation 효능을 확인하였다. 마우스 유래 melanocytes인 B16F10세포에 마름 70% 에탄올 추출물을 처리하여 멜라닌의 생성량을 확인한 결과 200 ㎍/mL 추출물을 처리시 100 ng/mL α-MSH를 처리한 대조군(100%) 대비 43.26%로 멜라닌생성억제를 확인하였다. 또한 멜라닌합성에 주요한 단백질인 tyrosinase의 활성 및 발현을 100 ng/mL α-MSH를 처리한 대조군(100%) 대비 tyrosinase의 활성은 23.65%, tyrosinase의 발현은 62.35%로 억제됨을 확인하였다. 본 연구결과를 통해 마름 70% 에탄올 추출물은 α-MSH에 의한 melanin 생성을 방지하여 미백 기능성 소재로써 가치가 있는 것으로 사료된다.

Abstract: Water chestnut is fruits of *Trapa natans var. bispinosa* grown wild in Korea. In this study, water chestnut was investigated for anti-pigmentation. Treatment with ethanolic extracts of water chestnut significantly reduced production of melanin in α-MSH simulated B16F10 cells. At 200 ㎍/mL ethanolic extracts of water chestnut, melanin contents were repressed by 43.26% compared to the control group. Additionally, ethanolic extracts of water chestnut reduced expression and activity of tyrosinase, key enzyme in melanogenesis, in α-MSH simulated B16F10 cells. Ethanolic extracts of water chestnut downregulated tyrosinase activity and expression to 23.65% and 62.35%, respectively. These results suggest that ethanolic extracts of water chestnut might be used as a promising whitening ingredients for inhibition of α-MSH-induced melanin synthesis and pigmentation.

Keywords: *Trapa japonica Flerov, water chestnut, melanin, pigmentation, tyrosinase*

1. 서 론

멜라닌(melanin)은 생명체의 색을 결정하는 중요한 색소로 피부, 눈, 모발 등에 분포하며, 인체내에서는 자외선을 흡수하고 활성산소를 제거함으로써 자외선으로부터 피부를 보호하는 기전의 중추적인 역할을 한다[1-3]. Melanocyte에서 멜라닌을 합성하는데, 외부의 다양한 신호를 받아 melanosome을 세포내에 형성한 후 멜라닌합성단백질인 tyrosinase, TRP1, TRP2와 같은 oxidase와 멜라닌의 재료인 L-tyrosine을 melanosome내부로 이동시켜 반복적인 산화작용을 통해 멜라닌을 합성된다[1,2]. 하지만 내외부의 비정상적인 신호에 따른 과도한 멜라닌 생성은 기미, 주금깨, 검버섯과 같은 병적인 과색소침착증으로 이어지기도 한다. 또한 미용학적으로는 피부를 어둡게 만드는 문제를 야기

† 주 저자 (e-mail: blue@osan.ac.kr)
call: 031-370-2861

하도 한다[4-7]. 때문에 화장품업계에서는 멜라닌 합성 조절을 통해 밝은 피부를 만들려고 노력하고 있다.

Water chestnut은 마름(*Trapa japonica Flerov.*) 열매이다[8]. 마름은 수생식물로 연못이나 소택지에 번식하는 것으로 알려져 있고, 열매는 식용과일로 한국, 인본, 중국, 인도 및 북미 등에서 상업적으로 재배되었다[9-10]. 이러한 마름의 연구는 대부분 성분, 생태학적 연구가 대부분이다[8-11]. 생물학적으로는 지방대사 및 항염작용을 제외하고 생물학적인 활성에 대한 연구가 진행되고 있지 않고 있다[8-11]. 때문에 본 연구에서는 마름 추출물의 미용학적으로 새로운 효능인 미백활성을 규명하고, 새로운 미백화장품 원료 개발의 근거자료로 활용하고자 한다.

2. 실험방법

2.1. Water Chestnut (마름) 추출

Water chestnut (마름)원물은 그린약초(Korea)에서 국내산 마름을 구매하였다. 마름의 추출을 위해 세척 후 건조하고, 분쇄하였다. 분쇄된 마름은 70% ethanol에 10% 혼합하여, 상온에서 초음파를 처리하면서 2 h 추출하였다. 추출 후에 추출물은 filter paper No.2 (GE Healthcare Life Science, USA)에 여과하여 마름잔해를 제거하고, 회전증발농축기(EYELA, Japan)로 농축 후 -85 ℃에 동결하고 동결건조기(Ilshin, Korea)를 이용하여 완전 건조하였다. 이후 실험에는 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, USA)에 완전히 녹여 사용하였다.

2.2. 세포독성시험

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 세포독성을 측정하였다[12]. 마름추출물을 B16F10 cell에 각각의 실험에 표시된 농도로 처리 후 48 h 노출에 의한 세포의 독성을 확인하였다. 추출물 노출이 끝난 후 배지를 제거하고, PBS로 수세 후 새로운 배지와 500 μg/mL MTT를 처리하여 4 h 반응을 시켰다. 이 후 생성된 MTT formazan을 DMSO 100 μL에 용해하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고, 상대적인 흡광도 차이를 이용하여 세포의 독성을 측정하였다.

2.3. Melanin Contents 측정

흡광도를 이용하여 세포내 멜라닌양을 측정하였다[13]. 세포에 멜라닌생성 자극호르몬인 α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH, Sigma-Aldrich, USA)과 추출물을 동시에 처리하고, 48 h 배양을 하였다. 처리 가 끝난 세포를 수집하여 PBS로 수세 후 1N NaOH에 완전하게 용해시켰다. 용해된 멜라닌을 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 상대적인 흡광도 차이를 이용하여 세포내 멜라닌양를 측정하였다. 멜라닌양을 보정하기 위해 전체 단백질을 BCA법으로 측정한 후 보정에 사용하였다.

2.4. Tyrosinase활성 측정

세포내 tyrosinase활성 측정은 tyrosinase활성을 L-3,4-dihydroxyphenylalanine의 L-3,4-dihydroxyphenylalanine quinone으로 변환되는 활성을 측정하였다[14]. B16F10세포에 α-MSH와 추출물을 동시에 처리하고, 48 h 후에 triton X-100 lysis buffer (1% triton X-100, 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 5 mM EDTA)를 이용하여 세포 용해한다. 용해된 세포의 침전물을 제거 후 2 mM L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA, Sigma-Aldrich, USA)를 넣고 37 ℃에서 30 min 반응한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 상대적인 흡광도 차이를 이용하여 tyrosinase활성을 측정하였다. Tyrosinase을 보정하기 위해 전체 단백질을 BCA법으로 측정한 후 보정에 사용하였다.

2.5. Tyrosinase mRNA 발현 측정

Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR, BioER, China)을 이용하여 tyrosinase mRNA의 발현량을 측정하였다[15]. B16F10세포에 α-MSH와 추출물을 동시에 처리하고, 48 h 후에 세포를 수거하여 total RNA를 추출하였다. Total RNA는 TRIzol (Invitrogen, USA)을 이용하여 매뉴얼에 제공된 방법으로 추출하였다. 추출된 total RNA는 각각 reverse transcriptase (Qiagen, Germany)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 각각 합성된 cDNA에서 tyrosinase의 발현을 확인하기 위해 tyrosinase primer (tyrosinase forward 5'-CAAGTACAGGGATCGGCCAAC-3'; tyrosinase reverse 5'-GGTGCATTGGCTTCTGGGTAA-3')을 이용하여 RT-qPCR을 진행하였고, 모든 결과는 housekeeping gene인 β-actin mRNA으로 normalization한 값을 결과를 도출하였다.

2.6. Tyrosinase 단백질 발현 측정

Western blot을 이용하여 tyrosinase 단백질의 발현량을 측정하였다. B16F10세포에 α-MSH와 추출물을 동시에 처리하고, 48 h 후에 세포를 수거하여 PBS로 2 회 수세하고, RIPA buffer (50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1%

NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, protease inhibitor)로 용해하였다. Bradford-용액(Bio-Rad, USA)를 이용하여 단백질 정량을 하였고, 동량의 단백질을 10% SDS-PAGE gel을 이용하여 분리하였다. 전기영동을 통해 분리된 단백질은 nitroellulose membrane (Whatman, UK)으로 transfer후 5% skim milk buffer에서 1 h blocking을 하였다. Anti-tyrosinase (Santacruz, USA), β-actin (Sigma, USA)을 1 차 항체로 사용하고, 2 차 항체로 goat anti-mouse (Cell Signaling)을 사용하였다. 항체처리가 끝난 후에는 TBS/T 용액으로 수세 후 supersignal westpico (Pierce, USA)을 이용하여 발광시키고 chemidoc C280(Azure biosystem, USA)을 통해 발광정도를 이미지화 시켰다.

2.7. 통계분석

통계분석은 student`s *t*-test를 통해진행되었고, 3 회 반복 실험 결과가 $p < 0.05$일 때 통계적인 유의성이 있다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. B16F10에서 Water Chestnut (마름)추출물의 세포독성확인

우선 마름추출물의 처리농도를 결정하기 위해서 추출물에 의한 B16F10 cell의 세포생존율은 MTT assay를 통해 확인하였다(Figure 1). 마름 70% ethanol 추출물은 50, 100, 200, 400, 800 μg/mL농도별로 측정한 결과 400, 800 μg/mL에서 83.64, 52.26%로 10%이상의 세포독성을 확인하였고, 200 μg/mL이하에서는 10%미만의 세포독성을 보였다. 때문에 이후 실험에서는 마름추출물의 독성이 낮은 50, 100, 200 μg/mL 농도 구간으로 설정하여 진행하였다.

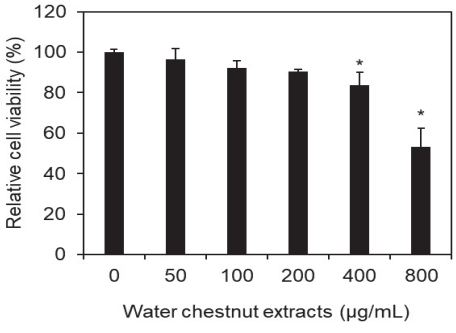

Figure 1. The cytotoxicity of water chestnut extracts. B16F10 cells were treated with 70% ethanol extracts of water chestnut (concentration is μg/mL) for 48 h, 37 ℃. The result is presented as the mean ± SD of the experiment (N = 3). $^{*}p < 0.05$ (vs. control).

3.2. Melanin Contents 확인

α-MSH에 의해 멜라닌합성 유도된 B16F10세포에서 마름 70% ethanol 추출물의 melanin 합성 억제 효과를 확인하기 위해 α-MSH와 마름 70% ethanol을 동시에 처리 후 48 h 동안 배양하여 melanin contents를 확인하였다. 실험결과 α-MSH에 의해 유도되는 멜라닌합성이 마름 70% ethanol 추출물 50, 100, 200 μg/mL에 의해 72.36, 63.35, 43.26%으로 농도 의존적인 경향을 보이며 멜라닌합성이 억제되는 것을 확인하였다(Figure 2A, B). 본 실험에서는 α-MSH와 추출물을 동시에 처리하였기 때문에 마름 70% ethanol 추출물에 의한 멜라닌 감소는 합성된 멜라닌의 함량이 낮아지는 것이 아닌, 멜라닌합성의 저해가 일어난 것을 의미한다. 또한 자외선에 노출이 되었을 때 α-MSH가 발생하고 이로 인해 melanocyte에서 멜라닌을 합성하기 때문에 마름 70% ethanol 추출물은 자외선 노출 환경에서 발생되는 멜라닌생성을 저해할 수 있을 것으로 판단할 수 있다[6].

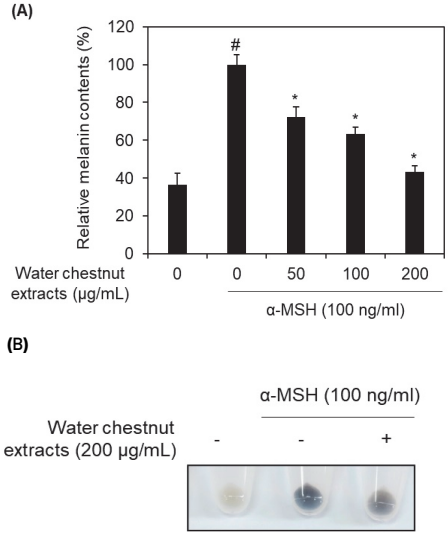

Figure 2. The effect of water chestnut extracts on melanin contents. B16F10 cells were treated with 70% ethanol extracts of water chestnut (concentration is μg/mL) for 48 h, 37 ℃. (A) relative melanin contents, (B) pallet. The result is presented as the mean ± SD of the experiment (N = 3). $^{\#}p < 0.05$ (vs. control), $^{*}p < 0.05$ (vs. α-MSH treated B16F10 cells).

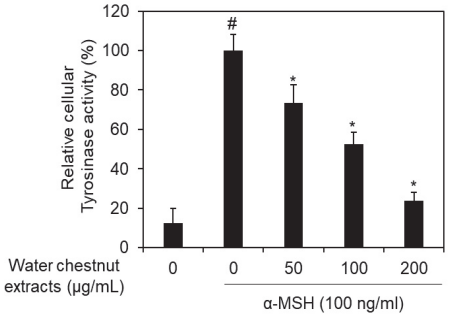

Figure 3. The effect of water chestnut extracts on tyrosinase activity. B16F10 cells were treated with 70% ethanol extracts of water chestnut (concentration is μg/mL) for 48 h, 37 ℃. The result is presented as the mean ± SD of the experiment (N = 3). $^{\#}p < 0.05$ (vs. control), $^{*}p < 0.05$ (vs. α-MSH treated B16F10 cells).

3.3. Tyrosinase 활성 및 발현 확인

마름 70% ethanol 추출물의 멜라닌합성 기전 조절을 확인하기 위해 멜라닌합성에 주요한 단백질인 tyrosinase의 활성 및 발현을 확인하였다[16-20].

세포내 tyrosinase의 활성은 마름 70% ethanol 추출물 50, 100, 200 μg/mL에 의해 73.26, 52.36, 23.65%으로 농도의존적인 경향을 보이며 tyrosinase의 활성이 억제되는 것을 확인하였다(Figure 3). 하지만 마름 70% ethanol 추출물이 직접적인 tyrosinase 활성 조절을 하는지 mushroom tyrosinase를 이용하여 확인하였을 때 마름 70% ethanol 추출물에 의해서 tyrosinase 활성이 조절되지 않았다(Data not shown). 때문에 발현조절을 확인한 결과 tyrosinase mRNA의 발현량도 마름 70% ethanol 추출물 50, 100, 200 μg/mL에 의해 82.37, 73.34, 62.35%으로 농도의존적인 경향을 보이며 감소되는 것을 확인하였고, tyrosinase의 단백질 발현 변화도 확인할 수 있었다(Figure 4A, B). 하지만 TRP-1, TRP-2의 발현변화를 확인한 결과 발현변화가 미비하게 나타나는 것으로 확인되었다(Data not shown).

때문에 본 논문의 결과를 통해 마름 70% ethanol 추출물은 자외선 노출에 의해 과도하게 생성되는 멜라닌을 조절하여 피부를 밝게 만들고, 자외선에 의한 과색소침착증을 완화시키는 개선원료로 사용할 수 있는 가능성을 보여주었다[19-21].

4. 결 론

본 연구에서 마름 70% ethanol 추출물의 미백효과를 규명하기 위해서 B16F10 cell에서 세포독성을 확인하고,

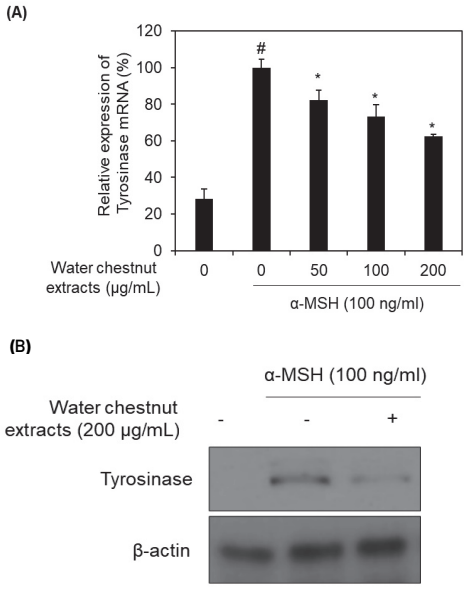

Figure 4. The effect of water chestnut extracts on tyrosinase mRNA and protein expression.
B16F10 cells were treated with 70% ethanol extracts of water chestnut (concentration is μg/mL) for 48 h, 37 ℃. (A) mRNA expression of tyrosinase, (B) protein expression of tyrosinase. The result is presented as the mean ± SD of the experiment (N = 3). $^{\#}p < 0.05$ (vs. control), $^{*}p < 0.05$ (vs. α-MSH treated B16F10 cells).

melanin contents와 tyrosinase 활성 및 발현 변화를 측정하였다. 연구결과 마름 70% ethanol 추출물의 세포독성은 200 μg/mL이하의 농도에서 B16F10 cell에 영향을 미치지 않았으며, α-MSH에 의해 유도된 멜라닌합성은 200 μg/mL 마름 70% ethanol 추출물에 의해서 대조군(100%) 대비 56.74%의 억제됨을 확인하였다. 또한 멜라닌합성에 중요 단백질인 tyrosinase mRNA 발현과 활성은 200 μg/mL 마름 70% ethanol 추출물에 의해서 각각 37.65, 76.35% 감소하는 것을 마름 70% ethanol 추출물의 tyrosinase 발현 조절을 통한 anti-pigmentation 기능을 할 수 있을 것으로 기대된다. 하지만 마름 70% ethanol 추출물에 의한 발현변화가 상위 signal인 MITF 발현 및 CREB 활성변화에는 영향을 주지 않는 것으로 보아(Data not shown) α-MSH에 의한 일반적인 신호전달체계를 조절하는 것이 아닌, tyrosinase를 직접 target하는 miRNA의 조절[22-24]또는 MAPK, p38, ribosomal S6 kinase (RSK), and GSK3β 등에 의해서 MITF의 활성을 변화시키는 전사 후 조절과정[25-30]을 통해 마름 70% ethanol 추출물이 melanin contents감소에 영향을 주었을 것

으로 판단된다. 추후 연구를 통해 water chestnut 추출물의 세부적인 미백기전에 대한 과학적인 제시가 필요할 것으로 판단된다.

Acknowledgement

이 연구는 2023학년도 오산대학교 LINC 3.0 사업 지원에 의하여 이루어졌음.

References

1. M. Rinnerthaler, J. Bischof, M. K. Streubel, A. Trost, and K. Richter, Oxidative stress in aging human skin, *Biomolecules*, **5**(2), 545 (2015).
2. K. Tief, M. Hahne, A. Schmidt, and F. Beermann, Tyrosinase, the key enzyme in melanin synthesis, is expressed in murine brain, *Eur. J. Biochem.,* **241**(1), 12 (1996).
3. M. A. Farage, K. W. Miller, P. Elsner, and H. I. Maibach, Characteristics of the aging skin, *Adv Wound Care (New Rochelle)*, **2**(1), 5 (2013).
4. S. Zhang, and E. Duan, Fighting against skin aging: The way from bench to bedside, *Cell Transplant*, **27**(5), 729 (2018).
5. R. Pandel, B. Poljšak, A. Godic, and R. Dahmane, Skin photoaging and the role of antioxidants in its prevention, *ISRN Dermatol*, **2013**(11), 930164 (2013).
6. M. Brenner and V. J. Hearing, The protective role of melanin against UV damage in human skin, *Photochem Photobiol*, **84**(3), 539 (2008).
7. J. D'Orazio, S. Jarrett, A. Amaro-Ortiz, and T. Scott, UV radiation and the skin, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**(6), 12222 (2013).
8. B. Kim, J. E. Kim, B. Choi, and H. Kim, Anti-inflammatory effects of water chestnut extract on cytokine responses via nuclear factor-κB-signaling pathway, *Biomol Ther (Seoul)*, **23**(1), 90 (2015).
9. S. Park, M. Lee, K. Kim, S. Shin, M. Choi, E. Hong, and J. Lee, *Trapa japonica Flerov* extract prevents obesity by regulating adipogenesis and lipolysis in differentiated 3T3-L1 cells, *Appl Sci*, **12**(1), 290 (2022).
10. M. Yasuda, K. Yasutake, M. Hino, H. Ohwatari, N. Ohmagari, K. Takedomi, T. Tanaka, and G. Nonaka, Inhibitory effects of polyphenols from water chestnut (*Trapa japonica*) husk on glycolytic enzymes and postprandial blood glucose elevation in mice, *Food Chem.*, **165**(1), 42 (2014).
11. H. G. Kang, K. M. I. Bashir, K. Y. Kim, S. Shin, M. W. Choi, E. J. Hong, S. H. Choi, J. W. Kim, J. S. Choi, and S. K. Ku, Evaluation of dose-dependent obesity and diabetes-related complications of water chestnut (fruit of *Trapa japonica*) extracts in type II obese diabetic mice induced by 45% kcal high-fat diet, *Medicina (Kaunas)*, **58**(2), 189 (2022).
12. J. H. Kim and H. J. Cha, *Lactobacillus* Kimchicus-fermented *Ficus caria* fruits and leaves extract as an inhibitor of α-MSH-mediated melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells, *Trop J Pharm Res*, **21**(6), 1535 (2022).
13. E. J. Lee and H. J. Cha, *Inonotus obliquus* extract as an inhibitor of α-MSH-induced melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells, *Cosmetics*, **6**(1),9 (2019).
14. H. Lee and H. J. Cha, *Poria cocos* Wolf extracts represses pigmentation *in vitro* and *in vivo*, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **64**(5), 80 (2018).
15. D. H. Joo, H. J. Cha, K. Kim, M. Jung, J. M. Ko, I. S. An, S. N. Lee, H. H. Jang, S. Bae, N. K. Roh, K. J. Ahn, and S. An, Benzo(a)pyrene represses melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells, *Mol Cell Toxicol*, **11**(3), 349 (2015).
16. X. H. Yuan and Z. H. Jin, Paracrine regulation of melanogenesis, *Br. J. Dermatol.*, **178**(3), 632 (2018).
17. Z. Rzepka, E. Buszman, A. Beberok, and D. Wrześniok, From tyrosine to melanin: Signaling pathways and factors regulating melanogenesis, *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, **70**(0), 695 (2016).
18. S. A. D'Mello, G. J Finlay, B. C. Baguley, and M. E. Askarian-Amiri, Signaling pathways in melanogenesis, *Int J Mol Sci*, **17**(7), 1144 (2016).
19. N. Smit, J. Vicanova, and S. Pavel, The hunt for natural skin whitening agents, *Int J Mol Sci*, **10**(12), 5326 (2009).

20. T. Pillaiyar, M Manickam, and S. H. Jung, Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis, *Cell Signal*, **40**(1), 99 (2017).
21. M. Cichorek, M. Wachulska, A. Stasiewicz, and A. Tymińska, Skin melanocytes: biology and development, *Postepy Dermatol Alergol*, **30**(1), 30 (2013).
22. D. T. Wu, J. S. Chen, D.C. Chang, and S. L. Lin, Mir-434-5p mediates skin whitening and lightening, *Clin Cosmet Investig Dermatol.*, **1**, 19 (2008).
23. X. Liu, B. Du, P. Zhang, J. Zhang, Z. Zhu, B. Liu, and R. Fan, MiR-380-3p regulates melanogenesis by targeting SOX6 in melanocytes from alpacas (*Vicugna pacos*), *BMC Genom*, **20**, 962 (2019).
24. A. Lo Cicero, C. Delevoye, F. Gilles-Marsens, D. Loew, F. Dingli, C. Guéré, N. André, K. Vié, G. van Niel, and G. Raposo, Exosomes released by keratinocytes modulate melanocyte pigmentation, *Nat. Commun,* **6**(1), 7506 (2015).
25. J. J. Hsiao, and D. E. Fisher, The roles of microphthalmia-associated transcription factor and pigmentation in melanoma, *Arch Biochem Biophys*, **563**(1), 28 (2014).
26. T. illaiyar, M. Manickam, and S. H. Jung, Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis, *Cell Signal.*, **40**(1), 99 (2017).
27. C. Serre, V. Busuttil, and J. M. Botto, Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation, *Int J Cosmet Sci*, **40**(4), 328 (2018).
28. M. Khaled, L. Larribere, K. Bille, E. Aberdam, J. P. Ortonne, R. Ballotti, and C. Bertolotto, Glycogen synthase kinase 3beta is activated by CAMP and plays an active role in the regulation of melanogenesis, *J Biol Chem.*, **277**(37), 33690 (2002).
29. B. Saha, S. K. Singh, C. Sarkar, R. Bera, J. Ratha, D. J. Tobin, and R. Bhadra, Activation of the Mitf promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB, *Pigment Cell Res.*, **19**(6), 595 (2006).
30. J. Vachtenheim and J. Borovanský, Transcription physiology of pigment formation in melanocytes: central role of MITF, *Exp Dermatol.*, **19**(7), 617 (2010).