pISSN 1229-1153 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 30, No. 3, pp. 258~264 (2015)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2015.30.3.258

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

윈터체리 추출물의 항산화 및 미백 개선 효과

김대용[1] · 김미경[2] · 김봉우[2]*
[1]서원대학교 제약공학과, [2]서원대학교 화장품과학과

The Antioxidant and Skin Whitening Effect of *Withania somnifera* (Winter Cherry)

Dae Yong Kim[1], Mee Kyung Kim[2], and Bong-Woo Kim[2]*
[1]*Department of Pharmaceutical Science and Engineering,* [2]*Seowon University, Cheongju, Chungbuk 361-742, Korea*
Department of Cosmetic Science & Technology, Seowon University, Cheongju, Chungbuk 361-742, Korea
(Received May 13, 2015/Revised June 21, 2015/Accepted August 18, 2015)

ABSTRACT - *Withania somnifera* has been used in folk medicine to treat various ailments for centuries. In this studies to investigate the whitening effect of *Withania somnifera* extracts as an active ingredient for whitening cosmetics, the antioxidant capacity and the effects of *Withania somnifera* extracts on melanogenesis in B16-F10 melanoma cells were identified. *Withania somnifera* extracts significantly reduced both tyrosinase activity and melanin content in a concentration-dependent manner. Furthermore, it was found that *Withania somnifera* extracts decreased α-MSH (melanocyte-stimulating hormone)-induced tyrosinase activity and MITF(microphthalmia associated transcription factor) protein expression. These data indicate that *Withania somnifera* extracts attenuate α-MSH-stimulated melanin synthesis by modulating MITF expression and that they may be a useful therapeutic agent for treating hyperpigmentation and an ingredient of whitening cosmetics.

Key words: *Withania somnifera*, whitening, melanocyte, tyrosinase

윈터체리로 알려진 *Withania somnifera*는 가짓과(Solanaceae)에 속하는 식물로서 Indian ginseng 혹은 Ashwagandha로도 불리고 있으며, 오래전부터 인도에서 전통 의학인 아유르베다 요법(Ayurveda)에서 사용되어져 왔다. 윈터체리는 생체활성 스테로이드 계열의 withaferin A (WA)을 함유하고 있으며, 항암 및 면역 작용의 조절, 빈혈(ischemia)에 의한 심장보호, 항균효과, 항염증효과 등에 사용되어지고 있다[1]. 또한, 윈터체리 추출물은 말초혈액 단핵구세포(peripheral blood mononuclear cells)에서 LPS (lipopolysaccharide)에 의한 염증성 사이토카인(TNF-α, IL-1, IL-12 등)의 생성과 NF-κB 활성을 억제한다[2]. 전립선암세포에서 윈터체리의 처치는 proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8, chemokine IL-8, Hsp70 등)의 발현을 상당히 감소시켰으며, 또한 JAK-STAT pathway 조절을 통해 암세포의 세포사멸(apoptosis) 기작을 조절하였다[3]. 최근 *Withania somnifera*와 같이 항산화물질이 풍부한 천연식물이 피부 내 멜라노사이트의 멜라닌 색소침작을 억제한다는 것이 보고되었다[4]. 이러한 멜라닌 생성 억제 효과는 *Withania somnifera* 추출물이 EDN-1 혹은 SCF에 의해 활성화된 신호전달 물질인 MAPK kinase (MEK)와 PKC (protein kinase C)를 억제함으로써 일어나게 된다[5,6].

멜라닌(melanin)은 멜라노사이트에 의해 생성되는 유색의 생물고분자(biopolymer)로서 멜라닌을 함유하고 있는 멜라노좀(melanosome)의 형태로 세포로부터 분비되어 표피를 구성하는 주변의 각질세포(keratinocyte)로 이동하여 들어가게 된다[7,8]. Melanogenesis라 불리는 멜라닌 생합성은 멜라노사이트의 특이적으로 발현되는 티로시나아제(tyrosinase), Tyrp-1(tyrosinase-related protein-1), Tyrp-2 (tyrosinase-related protein-2, dopachrome tautomerase) 효소들에 의해 조절되는 복잡한 생리적 과정을 통해 일어난다[9]. 이 중 티로시나아제는 타이로신(tyrosine)을 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 바꾸는 수산화반응과 DOPA를 다시 DOPAquinone으로 바꾸는 산화과정에서 작용하며, Tyrp-2는 DOPAchrome을 다시 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 변환시키는 반응을 촉매한다[4]. 반면, Tyrp-1은 DHICA를 다시 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 변환하는 산화과정을 촉매하는 것으로 알려져 있다[10,11].

자외선(Ultraviolet)는 주요한 멜라신 생성 인자로 표피와 진피에서 일광화상, 피부노화를 야기할 뿐만 아니라 기

*Correspondence to: Bong-Woo Kim, Department of Cosmetic Science & Technology, Seowon University, Cheongju, Chungbuk, 361-742, Korea
Tel: 82-43-299-8493, Fax: 82-43-299-8470
E-mail: kbw@seowon.ac.kr

미(melasma), 흑자(lentigine), 검버섯(age spot)과 같은 색소성 질환을 일으킬 수 있다. 피부의 각질세포가 자외선에 노출되었을 때, α-MSH 호르몬이 생성되어 주변 지역으로 분비되고, α-MSH는 멜라노사이트의 melanocortin-1 수용체에 결합하여 세포 내 cAMP의 양을 증가시키는 adenylate cyclase의 활성을 유도한다[12]. cAMP는 연속적으로 신호전달 단백질인 protein kinasee C (PKC)를 활성화시켜 최종적으로 MITF (microphthalmia-associated transcription factor) 전사인자의 발현을 증가시킨다. 세포 내 MITF에 의하여 멜라닌 생성, 세포 증식, 세포 이동과 같은 세포 반응을 유도하는 다양한 유전자들이 활성화된다[13-15]. 비록 멜라닌 생성이 피부에서 자외선에 의한 손상을 방지하는 중요한 역할을 하지만, 과도한 멜라닌 생합성은 오히려 기미, 흑자, 모반(점, nevus), 검버섯과 같은 피부 색소침착 질환을 유발시킨다[16]. 색소침착 완화를 위하여 코직산(kojic acid), 알부틴(arbutin), 리놀레산(linoleic acid)와 같은 많은 티로시나아제 억제제들이 알려져 있으며, 이러한 티로시나아제의 활성 억제는 주로 멜라닌 생합성을 억제하는 것과 관련되어 있다. 하지만 최근 사용되고 있는 이러한 합성 미백제들은 멜라노사이트에서 세포독성을 보이고 있으며, 다양한 부작용을 야기하고 있어 새로운 미백 활성제에 대한 개발이 요구되어 지고 있다[17]. 천연 미백 활성제는 주로 기능성 화장품 원료로 개발되어지는 것이 대부분이지만, 최근 이러한 천연 소재를 피부미용식품으로 개발하려는 노력들이 많이 이루어지고 있다[18]. Inner Beauty용 식품들은 기존의 피부를 통해 영양이나 기능성 성분을 공급하는 화장품과 달리, 경구섭취를 통해서 미백, 노화 방지 등 피부미용 효과를 나타내는 것으로 그 효용성이 증대되고 있다. 본 연구에서는 피부 미백을 위한 화장품, 식품 기능성 소재로서의 윈터체리 효능을 확인하고자 추출물의 항산화 효과, 티로시나아제 활성 저해 효과, 세포 독성, α-MSH에 의해 유도된 멜라닌 생성 억제 연구를 수행하고 분석하였다. 또한, 윈터체리 추출물이 α-MSH에 의한 MTIF 전사인자의 발현과 멜라닌 생합성과 관련된 효소 발현에 어떠한 영향을 미치는 지 확인함으로써 새로운 천연 미백 소재로 활용될 수 있음을 규명하고 있다.

Materials and Methods

시약

윈터체리 추출물(*Withania somnifera* extract)은 Indo World Trading Corporation (New Delhi, Indo)으로부터 메탄올에 추출되어 건조되어 있는 것을 구입하여 4°C에 보관하여 실험에 사용되었다. 티로시나아제(mushroom tyrosinase), L-DOPA(L-3,4-dihydroxyphenylalanine), DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide), α-MSH(melancyte stimulating hormone), 알부틴(arbutin)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)사의 것을 구입하여 사용하였다. MIFT 항체, Tyrosinase 항체, Tyrp-1 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)사의 것을 사용하였다.

세포 배양

B16-F10 마우스 멜라노마 세포는 ATCC (Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 세포를 10% FBS, 1% penicillin streptomycin이 첨가된 DMEM (Gibco, USA) 배지에서 5% CO_2, 37°C로 배양하여 실험에 사용하였다. 멜라닌 생성을 더 자극시키기 위해서 200 nM의 α-MSH를 2일간 처리하였다.

세포 독성 측정(MTT assay)

배양된 B16-F10 멜라노마 세포를 96well plate에 각각 1×10^4 cells/well로 분주하고 24시간 배양하였다. 배양 후, 윈터체리 추출물을 농도별로 배지에 희석하여 처리한 후 12시간 동안 CO_2, incubator에서 배양하였다. DPBS에 용해한 MTT stock (5 mg/mL)용액 을 배양 배지에 1/10되게 첨가하여 1시간 반응시킨 후, 배양 상등액을 제거하고 각각의 well에 DMSO 200 μL를 첨가하여 생존 세포에서 생성된 MTT-formazan 결정체를 용해시켰다. 흡수분광강도계(spectrometer)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항산화효과 측정(DPPH 라디칼 소거능)

윈터체리 추출물의 항산화 효과를 측정하기 위하여 DPPH 라디칼을 이용하여 측정하였다[19]. 메탄올과 증류수의 혼합용매(6:4, v/v)에 녹인 0.1 mM DPPH와 농도별로 희석된 각각의 추출물을 2:1 비율로 균일하게 혼합한 다음 상온에서 1시간 반응시켰다. 대조군으로 시료 대신 메탄올을 첨가하였으며 흡수분광광도계를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

티로시나아제 활성 저해효과 측정

멜라닌 합성에 필요한 티로시나아제의 활성을 특정하여 미백효과를 측정하였다. 96 well plate에 0.1 M 인산염완충액(phosphate buffer, pH 6.5)에 농도별로 희석된 추출물 170 μL와 1,000 U/mL mushroom tyrosinase 10 μL, 1.5 mM L-tyrosine 20 μL를 넣고 37°C에서 10 min 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. B16-F10 세포 내 티로시나아제의 활성을 측정하기 위하여 B16-F10 세포를 6 well dish에 1×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 배양 후 시료를 농도별로 처리하였다. 2일 배양 후 배지를 버리고 PBS로 두 번 washing 후 1% Triton X-100과 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma, USA)이 첨가된 0.1 M 인산염완충액 500 μL를 넣고 1시간 동안 37°C에서 배양하였다. Cell lysates를 15,000 rpm, 4°C에서 30 min 동

안 원심분리하고, 상층액 300 μL에 1.5 mM L-tyrosine 300 μL를 첨가하여 37°C에서 다시 1시간 반응 후, 490 mm에서 흡광도를 측정하였다.

B16-F10 멜라노마 세포를 이용한 멜라닌 생합성 억제 효과 측정

B16-F10 세포를 이용한 멜라닌 생합성 저해 효과를 측정하기 위하여 세포를 6 well dish에 1×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 후, 윈터체리 추출물을 농도별로 well에 처리하여 2일 동안 더 배양하였다. 배양 후 1 N NaOH 450 μL를 처리하여 1시간 동안 60°C 항온조에서 반응시켜 멜라닌을 완전히 용해시킨 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 농도에 따른 well 수는 3배수로 준비하였다.

MITF, Tyrosinase, Tyrp1 단백질 발현양 측정

B16-F10 세포 내 MITF, Tyrosinase, Tyrp-1의 발현양은 Western blotting으로 확인하였다. B16-F10 세포를 6 well dish에 1×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 배양하였다. α-MSH(200 nM)와 윈터체리 추출물을 처리한 다음 48시간 더 배양한 후, 배지를 버리고 cold PBS로 2번 세척하였다. 세포를 RIPA buffer (25 mM Tris-HCL, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 2 mM EDTA, protease inhibitor mixture)에 녹인 후, 14,000 rpm에서 원심분리하였다. 상층액을 SDS-polyacrylamide gels에서 분리시킨 후, PVDF membrane에서 단백질을 옮겨 각 단백질에 대한 항체로 반응시켰다. HRP가 결합된 2차 항체로 반응시킨 다음, chemiluminescence substrate kit으로 단백질 발현양을 확인하였다.

통계분석

모든 실험은 3반복으로 측정하여 측정치를 평균값 ± 표준편차로 나타내었으며 실험 결과의 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

Results

윈터체리 추출물의 항산화 효과 측정

멜라닌의 생성은 티로시나아제에 의한 타이로신의 연속적 산화과정에 의한 일어나게 되므로, 항산화 효과가 있는 성분은 멜라닌 생성 과정을 저해할 가능성이 높다. 윈터체리 추출물의 항산화 효과를 측정하기 위하여 DPPH 라디칼 소거능 측정법을 수행하였다. DPPH는 안정한 자

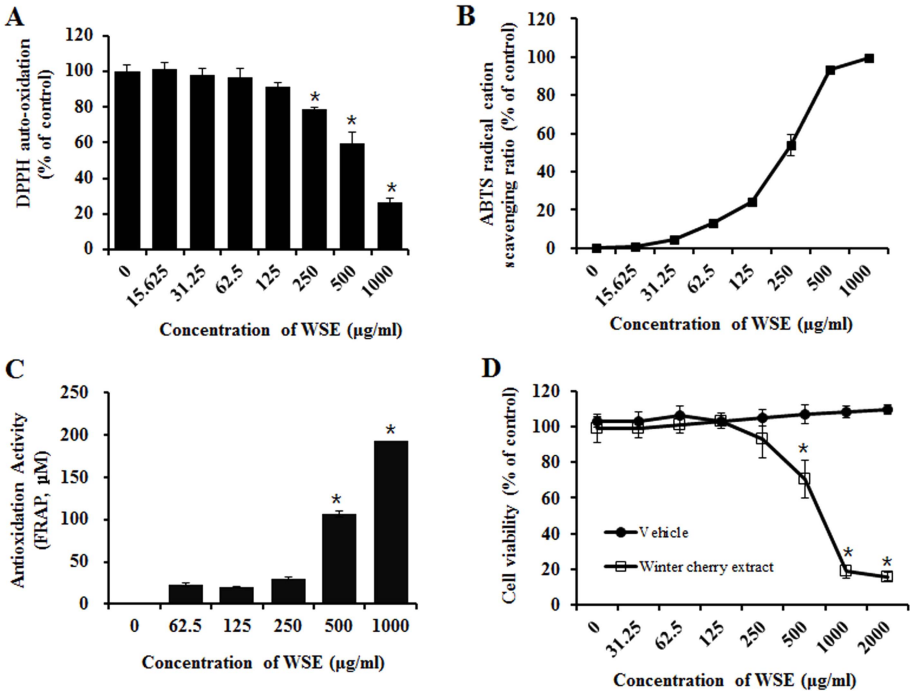

Fig. 1. Total antioxidant activities of *Withania somnifera* extract (WSE) and cell viability test on B16-F10 melanoma cell. (A) Scavenging effect of WSE on DPPH radical (B) ABTS radical scavenging activity of the extract. (C) Antioxidant activity of the extracts on FRAP activity. FRAP value is expressed as Fe^{2+} μM concentration, obtained from $FeSO_4$ solution having an antioxidant capacity equivalent to that of the dilution of the extracts. (D) Effect of the extracts on cell viability of mouse B16-F10 melanoma cell. After incubation of B16-F10 melanoma cells with various concentration of the extract in a 96-well plate for 24 h, cell viability was determined by MTT assay. All data are expressed as mean ± S.D. of data obtained from three independent experiments (*$p < 0.01$).

유라디칼을 가지고 있는 화합물로 항산화력이 있는 물질의 환원작용에 의해 라디칼이 소거되어 탈색되어 진다. 윈터체리 추출물의 라디칼 소거능을 측정한 결과, 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능이 증가하였으며, 추출물 농도 250 μg/ml에서 22.2%, 500 μg/ml에서 41.4%, 1,000 μg/ml에서 73.3%의 소거 능력이 있음을 확인하였다(Fig. 1A).

다음으로 윈터체리 추출물의 항산화 활성을 더 검증하기 위하여 ABTS 라디칼 소거능 측정법을 수행하였다. FIg. 1B에서 보여 지는 것처럼, 추출물의 ABTS 라디칼 소거능이 농도 의존적으로 증가하였으며, 추출물 농도 250 μg/ml에서 54.1%, 500 μg/ml에서 93.3%로 높은 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 또한, FRAP (ferric reducing ability of plasma) assay에서도 윈터체리 추출물은 농도 의존적으로 항산화 효과를 보이고 있음을 확인하였다(Fig. 1C).

윈터체리 추출물의 세포독성 측정

윈터체리 추출물이 B16-F10 멜라노마 세포에서 세포독성을 보이는지 확인하기 위하여, 추출물을 농도별로 세포에 처리하여 MTT assay를 수행하였다. B16-F10 멜라노마 세포에 대하여 윈터체리 추출물의 농도 변화에 따른 세포의 생존율을 확인한 결과, 250 μg/mL 농도까지 93% 이상의 세포 생존율을 확인하였으나 그 이상의 농도에서 세포독성을 보임을 확인하였다(Fig. 1D). 1,000 μg/ml의 농도에서 세포의 생존율이 약 18%까지 감소하여 세포에 독성을 보이므로, 세포를 이용한 추가 실험에서는 윈터체리 추출물이 독성을 보이지 않는 250 μg/mL 이하 농도에서 실험을 수행하였다.

버섯 티로시나아제(mushroom tyrosinase) 및 세포질 티로시나아제 활성 저해 효과 측정

윈터체리 추출물에 의한 티로시나아제 활성 저해 효과를 측정하기 위하여 버섯 티로시나아제에 의한 L-tyrosine의 산화 정도를 측정하였다. 실험 결과 윈터체리 추출물의 티로시나아제 억제 효과는 농도 의존적으로 증가하였으며, 200 μg/ml 농도에서 38.3%의 억제를 보이고 있음을 확인하였다(Fig. 2A).

윈터체리 추출물이 실제 세포질에 존재하는 티로시나아제의 활성을 억제하는지 확인하기 위해 B16-F10 세포에 윈터체리 추출물을 농도별로 전 처리 후, α-MSH(200 nM)가 포함된 배지로 48 시간 배양하여 티로시나아제의 발현을 더욱 유도하였다. 그 다음 세포를 용해하여 얻은 세포질 용해물이 세포 내 티로시나아제 활성 측정을 위해 사용되었다. Fig. 2B에서 보이는 바와 같이 α-MSH에 의해 증가된 티로시나아제의 활성은 윈터체리 추출물에 의해 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. 이러한 결과들은 윈터체리 추출물이 멜라닌 생합성 과정의 upstream에 작용하는 티로시나아제 효소의 활성을 감소시키기 때문에

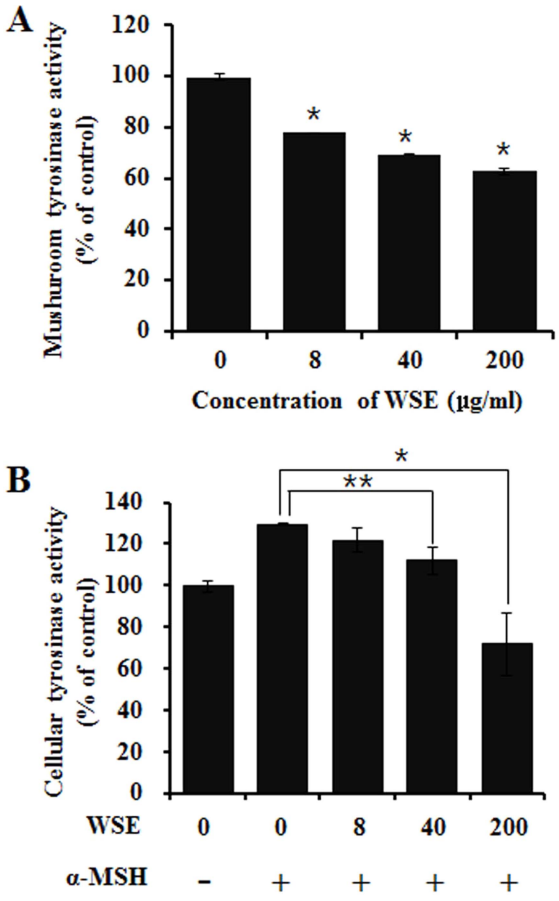

Fig. 2. Inhibitory effect of *Withania somnifera* extract(WSE) against mushroom tyrosinase activity and cellular tyrosinase activity. (A) Mushroome tyrosinase activity was measured by the change in absorption at 490 nm after incubation with various concentration of WSE. (B) After incubation of B16-F10 melanoma cells with various concentrations of the extract for 48 h, cellular tyrosinase activity was assessed as described in "Materials and Methods". Results are expressed as percentages of control and data are presented as mean ± S.D. for independent triplicate experiments (*$p < 0.01$, **$p < 0.05$).

멜라닌 생성 억제에 직접적으로 관여하는 미백 기능성 소재로 사용 가능 될 수 있음을 보여주고 있다.

B16-F10 멜라노사이트의 멜라닌 생성에서 윈터체리 추출물의 억제 효과

티로시나아제의 활성 저해 효과가 있는 윈터체리 추출물이 멜라닌 생성에 어떠한 영향을 미치는 가에 대해 확인하기 위해, 마우스 유래의 B16-F10 세포에 추출물을 농도별로 48시간 처리한 후, 세포 내 생성된 멜라닌의 함량을 측정하였다. Fig. 3A에서 보여지는 것처럼 윈터체리 추출물은 농도 의존적인 멜라닌 생성 억제 효과를 나타냈으며, 최고 농도 200 μg/mL에서 63.5%의 억제 효과를 보였다. α-MSH는 잘 알려진 멜라닌 생성 호르몬의 일종으로 멜라노사이트의 수용체에 결합하여 멜라닌 생성을 촉진시

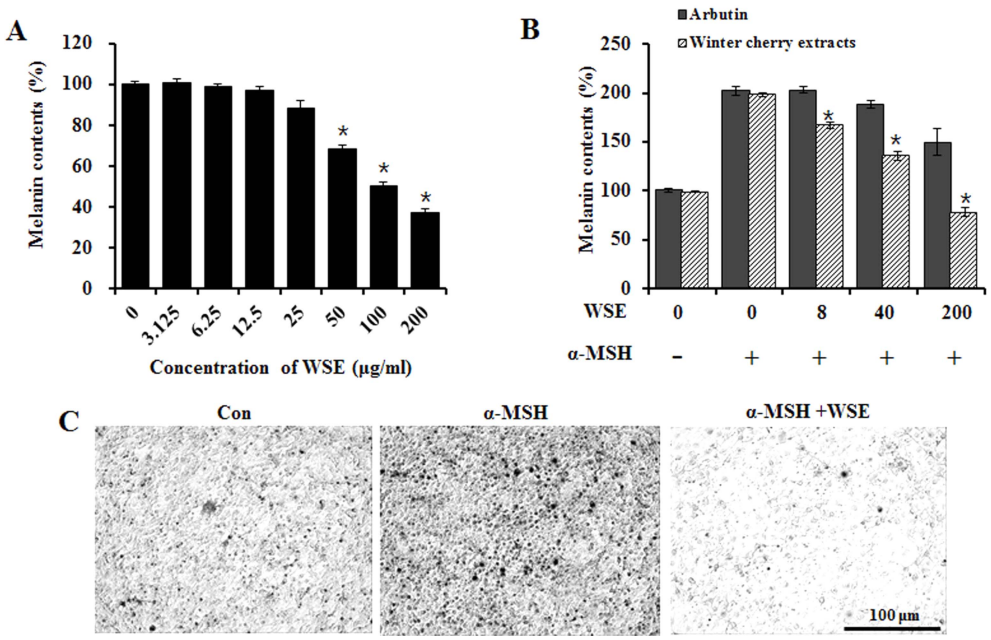

Fig. 3. Inhibitory effect of *Withania somnifera* extract(WSE) on α-MSH-stimulated melanogenesis of mouse B16-F10 melanoma cells. (A, B) Melanin content in WSE-treated B16-F10 cells at day 2. Cells were cultured at 37°C for 48 h in DMEM supplemented with α-MSH(200 nM) with or without the extract in a concentration dependent manner. Data were expressed as percentages relative to control, and are presented as mean ± S.D. for three independent experiments (*$p < 0.01$). (C) Bright-field microscopy image of α-MSH-stimulated B16-F10 melanoma cell with or without WSE (× 400).

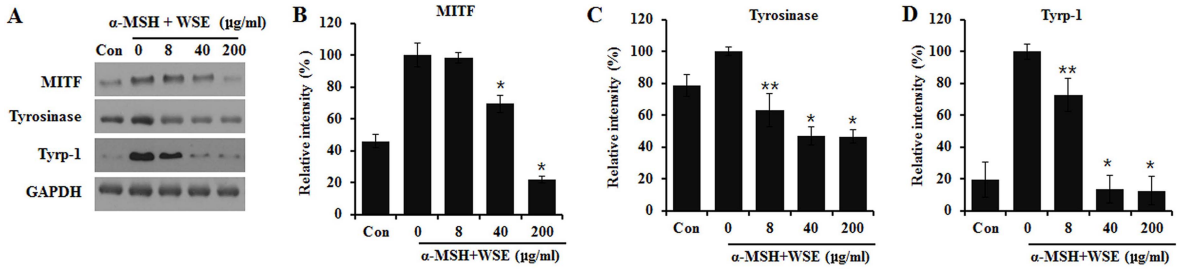

Fig. 4. Effect of *Withania somnifera* extract(WSE) on MITF, tyrosinase, and Tyrp-1 protein expression in α-MSH-stimulated B16-F10 melanoma cells. (A) B16-F10 melanoma cells were treated with the indicated concentrations of the extract for 48 h after α-MSH(200 nM) treatment. Cell lysates were subjected to Western blotting using antibodies against MITF, tyrosinase, and Tyrp-1. The loading control was assessed using GAPDH antibody. The relative intensities of MITF (B), tyrosinase (C), and Tyrp-1 (D) expression compared with GAPDH expression were determined using densitometric analysis (NIH ImageJ software). Values represent the mean ± S.D. for three independent experiments (*$p < 0.01$, **$p < 0.05$).

킨다. 윈터체리 추출물의 α-MSH에 의한 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하기 위하여 B16-F10 세포에 추출물을 농도 의존적으로 전 처리한 후, α-MSH에 의해 생성 유도된 멜라닌 양을 측정하였다. 그 결과 B16-F10 세포에서 α-MSH에 의한 멜라닌 생성은 200% 이상 증가하였지만, 윈터체리 추출물을 세포에 처리하였을 때 그 생성량이 농도 의존적으로 감소하고 있음을 확인하였다(Fig. 3B). 현재 미백 소재로 많이 사용되는 대조물질인 알부틴은 200 μM에서 51%의 억제 효과를 보이는 반면, 윈터체리 추출물은 최고 농도 200 μM에서 122%의 멜라닌 생합성 억제 효과를 보이고 있어, 윈터체리는 우수한 천연 미백제의 기능을 가지고 있음을 확인하였다. 또한, 광학 현미경 상에서 멜라노마 세포의 멜라닌 생성을 관찰하였는데, 윈터체리 추출물을 세포에 처리하였을 때, 세포 내에 생성된 멜라닌 양이 처리하지 않은 세포에 비해 상당히 감소되어 있음을 관찰하였다(Fig. 3C).

MITF 전사인자의 발현에서 윈터체리 추출물의 효과

윈터체리 추출물의 세포 내 티로시나아제의 활성 억제가 MITF의 단백질 발현 감소에 의한 것인지 확인하기 위해 MITF 발현양을 western blotting으로 확인하였다. Fig. 4에서 보이는 바와 같이 B16-F10 세포에서 α-MSH에 의

해 증가된 MITF 단백질 발현은 윈터체리 추출물에 의해 억제되고 있음을 확인하였다. 또한 MITF에 의해 단백질 발현이 조절되는 티로시나아제와 Tyrp-1 발현양 역시 윈터체리 추출물에 의해 상당히 감소되어 있음을 확인하였다(Fig. 4C and D). 이러한 결과들은 윈터체리 추출물이 멜라노마 세포에서 MITF 전사인자의 발현을 감소시킴으로써 결과적으로 티로시나아제와 Tryp1 등 멜라닌 생성에 관여하는 효소들의 발현을 감소시키고 결국 멜라닌 생성을 억제하고 있음을 말해준다.

Discussion

본 연구는 윈터체리 추출물이 B16-F10 멜라노마 세포에서 멜라닌 생성 억제를 통한 미백 효능이 있는지 검증하기 위한 실험들을 수행하였다. 흥미롭게도 윈터체리 추출물은 강력한 항산화 효능을 지니고 있으며, 또한 이 추출물에 의해 티로시나아제 효소 활성과 멜라닌 생성이 강력히 억제되었다. 멜라닌 생성은 멜라노사이트의 리소좀(lysosome)과 비슷한 구조의 멜라노좀(melanosome)에서 대부분 생성되며, 생성된 멜라닌은 주변의 각질세포로 이동되어 진다[20]. 멜라닌 생합성(melanogenesis)은 티로시나아제를 포함한 Tyrp-1, TRP-2 등 tyrosinase gene family에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있다[21]. 티로시나아제는 멜라닌 생성 과정 중 티로신을 DOPA로, DOPA를 다시 DOPA quinone으로 산화시키는 두 단계에서 기능을 하고 있으며[10], 티로시나아제의 촉매 활성 및 단백질 발현양은 모두 멜라닌 생성과 연관되어 있다.

윈터체리는 다양한 페놀성 화합물(phenolic compounds), 안토시아닌(anthocyanin), 비타민C(ascorbic acid)와 같은 식물성 성분(phytoconstituents)이 매우 풍부한 것으로 알려져 있다[1-3]. 이러한 강한 항산화력을 보이는 성분들 때문에 윈터체리는 전통적으로 항암, 고혈압, 동맥경화증, 설사 및 복통, 관절염, 산화적스트레스(oxidative stress)를 치료하는 목적으로 복용되어져 왔다. 또한, 윈터체리 추출물의 항산화력은 피부 멜라닌 생성에서도 매우 중요한데, 티로시나아제의 산화・환원 반응을 억제함으로써 타이로신으로부터 멜라닌이 생성되는 것을 억제시킨다. 본 연구에서는 윈터체리 추출물의 항산화력을 다양한 방법으로 검증하여 윈터체리가 실제 기능성 식품 및 화장품 원료로 사용되었을 때, 멜라닌 생성을 억제할 수 있음을 확인하였다(Fig. 1). 다음으로 윈터체리 추출물이 어떠한 기작으로 멜라닌 생성을 억제하는지 확인하기 위해, 먼저 윈터체리 추출물이 직접 티로시나아제 효소 활성을 억제하는지 실험하였다. 버섯 티로시나아제를 사용한 실험에서 윈터체리 추출물은 티로시나아제의 활성을 직접 억제하고 있음을 확인하였다(Fig. 2A). 또한 α-MSH에 의해 세포 내 발현이 증가된 B16-F10 세포에서 세포질의 티로시나아제 활성이 윈터체리 추출물에 의해 상당히 억제되고 있음을 밝혀냈다(Fig. 2B). 윈터체리 추출물은 B16-F10 멜라노마 세포에서 α-MSH에 의해 유도된 멜라닌 생합성 역시 감소시켰는데(Fig. 3), 흥미로운 점은 이러한 감소 효과가 α-MSH가 처리된 B16-F10 멜라노마 세포의 세포질에 존재하는 티로시나아제의 활성이 억제되는 것과 연관되어 있다는 점이다.

MITF 전사인자는 멜라노사이트의 발달과 분화에서 매우 중요한 조절 유전자로 알려져 있다. MITF 단백질은 다양한 타겟 유전의 특이적 DNA 서열에 결합하여 분화, 증식, 세포이동, 종양 형성(tumorigenesis)와 같은 세포 반응을 유도한다[22]. 게다가 티로시나아제를 비롯하여 Tyrp-1, Tyrp-2 Pmel17 등 멜라닌 생성 세포에서 특이적으로 발현하는 단백질들은 모두 MITF 전사인자에 의해 발현이 조절되는 것으로 잘 알려져 있다[23]. 우리는 윈터체리 추출물이 세포 내 MITF의 발현양에 미치는 영향을 확인하기 위해 α-MSH에 의해 MTIF의 발현이 증가된 B16-F10 세포에서 윈터체리 추출물을 처리한 후, 단백질 발현 정도를 확인하였다. Fig. 4는 윈터체리 추출물이 세포 내에서 MITF 단백질 발현을 감소시키고 있음을 보여주고 있다. 또한 티로시나아제와 Tryp1 단백질의 발현양 역시 감소되고 있음을 확인하였다. 이러한 결과들은 윈터체리에 의한 세포 내 티로시나아제의 활성 감소와 이로 인한 멜라닌 생성 억제가 MITF 단백질 발현의 감소로 인한 티로시나아제의 단백질 발현 억제에 의하여 일어나게 되었음을 알 수 있다. 따라서 윈터체리 추출물은 자체적으로 지니고 있는 높은 항산화 효능으로 티로시나아제의 활성을 억제할 뿐만 아니라, MITF의 발현양을 감소시킴으로써 결과적으로 티로시나아제의 발현양과 멜라닌 생성을 억제한다.

최근 피부에 대한 사람들의 관심이 높아지면서 피부 미백과 주름 개선을 도와주는 다양한 천연 기능성 소재들이 식품과 화장품 원료로 연구되고 있다. 뷰티푸드(Beauty Food) 또는 이너뷰티(Inner Beauty)라고 불리는 이러한 피부 개선 천연 소재들은 피부주름, 피부보습 개선, 미백, 여드름 케어, 아토피 치료 및 항노화 등 다양한 피부 보호 효과를 가지는 성분을 함유하는 제품으로 개발되어 세계적으로 그 시장이 확대되고 있다[18]. 이번 연구에서 우리는 윈터체리 추출물이 강력한 항산화능과 티로시나아제 억제, MITF 전사인자의 단백질 발현 조절을 통하여 멜라닌 생성을 억제하고 있음을 밝혀냈다. 그러므로 윈터체리는 피부 멜라닌 색소침착의 방지와 개선에 효과 있는 원료로서 미백 기능성 천연 식품 및 화장품 개발에 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

국문요약

본 연구는 윈터체리 추출물의 미백 활성을 검증하여 기능성 미백 소재로서의 가능성을 확인하였다. 먼저, DPPH,

ABTS, FRAP를 이용한 항산화 활성 검증에서 윈터체리 추출물은 매우 높은 항산화 효과를 보였으며, 티로시나아제의 활성에도 농도 의존적인 억제 효과를 보여주었다. 마우스 유래 B16-F10 멜라노마 세포를 이용한 멜라닌 생성에서 윈터체리 추출물이 미치는 영향을 확인한 결과, 세포 내에서 생합성 되는 멜라닌의 양이 상당히 감소하고 있음을 확인하였다. 또한, 멜라닌 생성을 더욱 유도하는 α-MSH를 세포에 처리하였을 때, 윈터체리 추출물은 농도 의존적인 억제 효능을 보여주었다. 이러한 윈터체리 추출물의 멜라닌 생성 억제는 MITF 전사인자의 발현을 억제함으로써 일어나고, 결과적으로 멜라닌 생합성과 관련된 티로시나아제와 Tyrp-1 등의 단백질 발현을 감소시킴으로써 일어나게 됨을 확인하였다. 이러한 결과들로 볼 때, 윈터체리 추출물은 기존의 미백 원료들을 대체할 수 있을 뿐만 아니라 함께 사용할 경우 상승 효과를 낼 수 있는 새로운 미백 소재로 활용될 수 있을 것이다.

References

1. Agarwal, R., Diwanay, S., Patki, P., Patwardhan, B.: Studies on immunomodulatory activity of Withania somnifera (Ashwagandha) extracts in experimental immune inflammation. *J. Ethnopharmacol.*, **67**, 27-35 (1999).
2. Singh, D., Aggarwal, A., Maurya, R., Naik, S.: Withania somnifera inhibits NF-kB and AP-1 transcription factors in human peripheral blood and synovial fluid mononuclear cells. *Phytother Res*., **21**, 905-913 (2007).
3. Aalinkeel, R., Hu, Z., Nair, B. B., Sykes, D. E., Reynolds J. L., Mahajan, S. D., Schwartz, S. A.: Genomic analysis highlights the role of the JAC-STAT signaling in the anti-proliferative effects of dietary flavonoid-'Ashwagandha' in prostate cancer cells. *Evid Based Complement Altemat. Med.*, **7**, 177-187 (2010).
4. Nakajima, H., Wakabayashi, Y., Wakamatsu, K., Imokawa, G. An extract of Withania somnifera attenuates endothelin-1stimulated pigmentation in human epidermal equivalents through the interruption of PKC activity within melanocytes. *Phytother Res.*, **25**, 1398-1411 (2011).
5. Nakajima, H., Fukazawa, K., Wakabayashi, Y., Wakamatsu, K., Imokawa, G.: Withania somnifera extract attenuates stem cell factor-stimulated pigmentation in human epidermal equivalents through interruption of ERK phosphorylation within melanocytes. *J. Nat. Med*., **66**, 435-446 (2012).
6. Nakajima, H., Fukazawa, K., Wakabayashi, Y., Wakamatsu, K., Senda, K., Imokawa, G.: Abrogating effect of a xanthophyll carotenoid zstaxanthin on the stem cel factor-induced stimulation of human epidermal pigmentation. *Arch. Dermaltol. Res*., **304**, 803-816 (2012).
7. Lim, J. Y., Fisher, D. E.: Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, **445**, 843-850 (2007).
8. Spritz, R. A., Hearing V. J.: Genetic disorders of pigmentation. *Adv. Hum. Gent*., **22**, 1-45 (1994).
9. Prota, G.: Some new aspects of eumelanin chemistry. *Prog. Clin. Biol. Res*., **256**, 101-124 (1998).
10. Hearing V. J., Jimenez, M.: Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem,*. **19**, 1141-1147 (1987).
11. Jackson, I. J., Chanmbers, D. M., Tsukamoto, K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Hearing, V. J.: A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *EMBO J.*, **11**, 527-535 (1992).
12. Kobayashi, T., Urabe, K., Winder, A. J., Jimnez-Cervantes, C., Imokawa, G., Brewington, T., Solano, F., Garcia-Borron, J. C., Hearing V. J.: Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J.*, **13**, 5818-5825 (1994).
13. Costin, G. E., Hearing, V. J.: Human skin pigmentation : melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.*, **21**, 976-994 (2007).
14. Hodgkinson, C. A., Moore, K. J., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Arnheiter, H.: Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*, **74**, 395-404 (1993).
15. Yasumoto, K., Yokoyama, K., Takahashi, K., Tomita, Y., Shibahara, S. Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *J. Biol. Chem.*, **272**, 503-509 (1997).
16. Briganti, S., Camera, E., Picardo, M.: Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.*, **16**, 101-110 (2003).
17. Maeda, K., Fukuda, M.: Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 765-769 (1996).
18. Jeong, S. C., Park, J. H., Kim, J. H.: The development trend of skin beauty food with skin protection effects from natural source. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **11**(2), 203-212 (2013).
19. Choi J.H., Park Y.H., Lee S.G., Lee S.H., Yu M.H., Lee M.S., Park S.H., Lee I.S., Kim H.J.: Antioxidant activities and α-Glucosidase inhibition effects of chicories grown in hydroponics added with Cr^{3+} or selenium. *J. Fd Hyg. Safety*, **29**, 53-59 (2014).
20. Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A.: Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu. Rev. Genet.*, **38**, 365-411 (2004).
21. Yamaguchi, Y., Hearing, V. J.: Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors.* **35**, 193-199 (2009).
22. Goding, C. R.: Melanocytes: the new Black. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 275-279 (2007).
23. Bentley, N. J., Eisen, T., Goding, C. R.: 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 (1994).