

산딸기 잎 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향

김미경¹ · 김대용^{2,†}

¹서원대학교 바이오코스메틱학과, 조교수

²우석대학교 한의과대학, 조교수

(2021년 6월 6일 접수: 2021년 6월 30일 수정: 2021년 6월 30일 채택)

Effect of *Rubus crataefolius* Leaf Extract on Melanin Synthesis

Mee-Kyung Kim¹ · Dae-Yong Kim^{2,†}

¹Department of Bio-Cosmetic Science, Seowon University

²College of Korean Medicine, Woosuk University

(Received June 6, 2021; Revised June 30, 2021; Accepted June 30, 2021)

요약 : 본 연구는 B16F10 melanoma 세포에서 산딸기 잎 추출물(Rubus crataefolius Leaf Extract, RCLE)의 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하고자 수행되었다. α -MSH로 자극한 B16F10 melanoma 세포에서 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성, 멜라닌 생성관련 효소들인 TRP-1, TRP-2 및 MITF의 단백질 발현 수준을 조사하였고 이에 대한 RCLE의 효과를 검증하였다. RCLE는 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성을 효과적으로 억제하였고 멜라닌 생성 경로에 관여하는 PKA와 CREB의 인산화와 MITF의 발현을 억제하였으며 멜라닌 생성 관련 단백질의 발현을 하향 조절하였다. 이러한 결과는 RCLE가 MITF 발현을 억제하여 α -MSH로 자극된 멜라닌 합성을 억제한다는 것을 보여준다. 따라서 이러한 연구결과는 RCLE가 과도한 멜라닌 생성으로 인한 색소 침착을 완화시킬 수 있는 기능성 화장품 소재로 활용될 수 있음을 시사한다.

주제어 : 멜라닌 생성, 산딸기, α -MSH, tyrosinase, MITF

Abstract : In this study, we investigated the melanogenesis inhibitory effects of *Rubus crataefolius* Leaf Extract (RCLE) in B16F10 melanoma cells. We examined the effects of RCLE on the melanin contents and tyrosinase activity, as well as the protein expression levels of the melanogenic enzymes TRP-1, TRP-2, and MITF in α -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells. RCLE effectively inhibited tyrosinase activity and melanogenesis, suppressed the phosphorylation of PKA and CREB, and expression of MITF involved in the melanogenesis pathway, and down-regulated expression of melanogenesis related proteins. These result suggest that RCLE inhibited α -MSH-stimulated melanin synthesis by suppressing MITF expression. Therefore, our study suggests that RCLE has potential as a safe treatment for excessive pigmentation or as a natural ingredient in cosmetics.

Keywords : Melanogenesis, *Rubus crataefolius*, α -MSH, tyrosinase, MITF

[†]Corresponding author
(E-mail: dykim@woosuk.ac.kr)

1. 서론

정상적인 생리적 조건에서 멜라닌 생성은 UV 방사선의 영향으로부터 DNA와 피부를 보호하는데 필수적이다. 그러나 과도한 멜라닌 생성(과색소 침착)은 기미, 주근깨, 검버섯, 악성 흑색종과 같은 다양한 피부 질환을 유발한다[1].

피부가 자외선 등에 노출되면 멜라닌 세포와 각질 세포는 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)를 분비하여 멜라닌 생합성 경로를 촉진한다[2]. α -MSH는 세포 표면의 MC1R (melanocortin-1 receptor)에 결합하여 adenylate cyclase를 활성화하고 cAMP의 세포 내 수준을 증가시킨다. 멜라닌 세포의 cAMP 수준이 증가함에 따라 멜라닌 생성에 관여하는 단백질의 생성을 촉진하는 cAMP response element-binding protein (CREB) 및 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호 전달 경로가 활성화된다. 이 활성화된 CREB 및 ERK 신호 전달 경로는 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현을 상향 조절하고 이어서 tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2 및 tyrosinase의 발현을 촉진한다. MITF는 tyrosinase 조절을 위한 전사 인자이며 멜라닌 세포의 증식, 분화 및 생존 조절을 포함하여 멜라닌 합성 조절에 중심 역할을 수행한다. 이 단백질은 TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase를 포함한 하위 단백질을 조절하여 멜라닌 생성을 조절할 뿐만 아니라 세포주기 진행 조절에도 관여한다. 즉, UV 방사선과 같은 외부 자극에 의해 야기되는 α -MSH-MC1R 결합은 주로 멜라닌 세포에서 CREB 및 ERK 신호 전달 경로를 활성화하여 MITF, TRP-1, TRP-2 및 tyrosinase 단백질의 발현을 증가시켜 멜라닌 생성을 촉진한다[3]. 따라서 이 과정의 억제는 멜라닌 세포에서 멜라닌 합성을 억제 할 수 있는 중요한 표적이다.

산딸기(*Rubus crataefolius*)는 장미과(Rosaceae)에 속하며 레드 라즈베리(red raspberry)로도 알려져 있다. 중국, 일본, 한국 및 러시아 지역에서 널리 자라는 라즈베리 종이다[4]. 과거에는 산딸기 열매를 야뇨증(enuresis), 천식(asthma) 등의 치료에 사용하였다. 특히 중국에서는 류마티스 관절염(rheumatic arthritis), 간염(hepatitis) 및 폐암(lung cancer)과 같은 다양한 질병의 치료에 사용되었다[5]. 우리나라에서도 발기 부전, 염증성 질환, 알레르기 질환의 한방 치

료에 광범위하게 사용되었다[6]. 이전 연구에서 산딸기 열매의 추출물에서 폴리페놀 화합물, 항산화제, 비타민과 미네랄을 포함하는 여러 생리 활성 물질이 함유되어 있다고 보고되어 있고, 특히 산딸기 열매에서는 flavonoid, tannin, stillenoid, phenolic acid, lignan, triterpene, sterol 같은 물질들이 함유되어 있는 것으로 나타났다. 또한 UVB 노출에 의한 광손상 피부 모델에서 열매의 에탄올 추출물이 보호 효과가 있다고 밝혀졌다[7]. 다른 연구에서는 산딸기 잎 세포 배양 추출물에서 산화 스트레스로부터 세포를 보호 할 수 있는 강력한 항산화제와 수분 손실로부터 피부를 보호할 수 있는 히알루론산 합성에 관여하는 유전자의 발현을 유도할 수 있는 성분이 함유되어 있다는 것이 알려졌다[8]. 그리고 선행연구를 통하여 산딸기 잎 추출물에서 총폴리페놀의 함량을 tannic acid를 표준물질로 하여 측정하였다. 그 결과, 산딸기 잎 추출물에서 높은 폴리페놀의 함량을 확인하였다. 폴리페놀은 멜라닌세포에 대하여 탈색소작용이 있다는 것이 알려져 있다[9]. 하지만 아직까지 산딸기 잎 추출물이 피부의 멜라닌 합성에 미치는 영향에 대한 연구는 보고되지 않았다.

본 연구에서는 산딸기 잎 추출물의 멜라닌 합성에 대한 활성을 확인하고 그 기전을 밝히기 위하여 연구를 수행하였다. 이를 위하여 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 tyrosinase 활성 억제 효능, 멜라닌 합성 억제 등의 연구를 진행하였고 멜라닌 생성 신호전달 체계에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 이러한 결과들은 산딸기 잎 추출물의 천연물 유래 기능성 화장품 소재로서의 논리적 근거를 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

2. 실험

2.1. 시료 제조

본 실험에 이용한 산딸기 잎은 경북 포항에서 구입하여 저온(4°C) 저장하여 이용하였다. 열수 추출물은 시료 중량의 10배의 증류수를 첨가하여 실온에서 24시간 교반하여 추출하고, 그 후 상층액과 침전물을 분리하였다. 동일한 방법으로 3회 반복하여 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 감압농축기(Rotary Vacuum Evaporator, N-100, EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하여 동결건조하였다. 그 후 냉동실

에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

2.2. 세포 배양

B16F10 melanoma 세포를 ATCC (Manassa, VA, USA)에서 구입하여 연구에 사용하였다. B16F10 melanoma 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone, USA), 1% penicilline/streptomycin (HyClone, USA)를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, HyClone, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기(INCO, Memmert, Germany)에서 배양하였다. 멜라닌 생성을 유도하기 위하여 200 nM α -MSH로 2일간 자극하였다.

2.3. 세포 독성 측정

B16F10 melanoma 세포를 96-well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하고 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, RCLE를 농도별(0, 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 μ g/mL)로 처리한 후 다시 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation assay kit (Promega, USA)를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다. 96-well plate에 AQueous One Solution을 20 μ L 씩 분주하여 37°C, 5% CO₂에서 4시간 반응시킨 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. 멜라닌 생성 억제능 측정

세포 내에서 멜라닌 생성 억제능을 측정하기 위하여 B16F10 melanoma 세포를 6-well plate에 1×10^5 cells/well로 각각 분주하여 24시간 동안 배양 후, RCLE를 농도 별로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양한 후 1 N NaOH 450 μ L를 처리하여 60°C에서 1시간 동안 반응시켜 멜라닌을 완전히 용해시킨 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. Tyrosinase 활성 억제 측정

멜라닌 생성 억제를 측정하기 위하여 멜라닌 합성에 필요한 tyrosinase의 활성 억제 효과를 확인하였다. 96-well plate에 0.1 M 인산염 완충액 (phosphate buffer, pH 6.5)에 농도별로 희석된 RCLE 170 μ L와 1,000 U/mL mushroom tyrosinase 10 μ L, 1.5 mM L-tyrosine 20 μ L

를 넣고 37°C에서 10분 간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 내에서 tyrosinase의 활성을 측정하기 위해 B16F10 melanoma 세포를 6-well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 배양한 후 RCLE를 농도별로 처리하였다. 그 후 α -MSH 200 nM을 처리하여 48시간 동안 배양한 다음 PBS로 두 번 세척한 후 1% Triton X-100과 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma, USA)가 첨가된 0.1 M 인산염 완충액 500 μ L를 넣고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 반응물을 15,000 rpm, 4°C에서 30분 동안 원심분리한 후, 상층액 300 μ L에 1.5 mM L-tyrosine 300 μ L를 첨가하여 1시간 동안 37°C에서 반응한 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. 멜라닌 생성 관련 단백질 발현 측정

B16F10 세포 내에서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA, CREB, MITF, ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, p38, p-p38의 발현양은 western blot analysis로 확인하였다. B16F10 melanoma 세포를 6-well plate에 1×10^5 cells/well로 각각 분주하여 24시간 배양하였다. α -MSH (200 nM)와 RCLE를 처리한 다음 48시간 배양한 후, PBS로 2번 세척하였다. 세포를 RIPA (radioimmunoprecipitation assay) 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 원심분리 하여 상층액만을 취한 후 단백질 정량하여 샘플을 조제하였다. 각 농도별 샘플을 SDS-polyacrylamide gels에서 분리시킨 후, PVDF membrane으로 단백질을 옮긴 후, 각 단백질에 대한 1차 항체와 반응시켰다. 반응 후, HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체와 반응시킨 다음, chemiluminescence substrate kit로 단백질 발현 양상을 확인하였다.

2.7. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 진행하였고 결과는 SPSS 18.0 (SPSS Inc., USA)으로 분석하였다. 통계학적인 유의성 검증은 one-way ANOVA test를 이용하였고, p=0.05에서 Dunnett 다중검증법에 의해 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포독성

산딸기 잎 추출물이 B16F10 melanoma 세포의 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 농도별 (5, 10, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 다음 proliferation kit를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다. 산딸기 잎 추출물 1000 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하였을 때, 세포 생존율이 $83 \pm 2.7\%$ 로 세포 독성이 확인되었다(Fig. 1A). 이 결과를 바탕으로 추후 진행된 실험은 독성이 없는 농도인 100, 300, 500 $\mu\text{g/mL}$ 으로 진행하였다.

3.2. 멜라닌 생성 억제

외부 환경, cytokine, 호르몬 등에 노출되면 표피층에 존재하는 멜라닌 세포가 멜라닌 생성 인자를 생성하여 멜라닌을 합성한다. 멜라닌은 자외선으로부터 피부 세포를 보호하는 데 중요한 역할을 한다. 그러나 자외선에 의한 과도한 멜라닌 생성은 기미, 주근깨 및 피부암을 유발하는 것으로 알려져 있다[10].

따라서 본 연구에서는 RCLE의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 B16F10 melanoma 세포에서 멜라닌의 생성을 측정하였다. 그 결과, RCLE의 멜라닌 생성에 대한 저해 효과가 농도 의존적으로 나타남을 확인하였다(Fig. 1B).

표피의 멜라닌 세포에서 생성되는 멜라닌 색소는 자유 라디칼을 흡수하고 들어오는 자외선을 분산시켜 유해한 방사선으로부터 피부를 보호하고 체온을 유지한다. 피부가 UV에 노출되면 멜라닌 세포와 각질 세포는 α -MSH를 분비하여 멜라닌 생합성 경로를 촉진한다. 증가된 α -MSH는 MC1R에 결합하고 다음 단계의 신호를 전달하여 adenylate cyclase를 활성화하여 cAMP 수준을 증가시킨다. 증가된 cAMP는 PKA 및 CREB를 인산화하여 MITF의 발현을 증가시킨다[11].

본 연구를 통하여 산딸기 잎 추출물이 멜라닌 생성 억제 효과가 있음이 확인되었다. 이후 멜라닌 생성과 관련된 신호분자들을 확인하기 위하여 실험을 진행하였다.

3.3. tyrosinase 활성 억제

Tyrosinase는 멜라닌 생성을 조절하는 중요한 역할을 수행한다. Tyrosinase의 활성을 억제하는 소재는 많은 미백 화장품에 사용되고 있다[12]. Tyrosinase는 멜라닌 생성의 속도 제한(rate limiting) 효소로 tyrosine이 L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)로 hydroxylation되고, tyrosinase에 의해 DOPA가 DOPAquinone으로 추가 산화되는 것을 촉매하여 멜라닌 생성을 조절하는데 중추적인 역할을 수행한다[13].

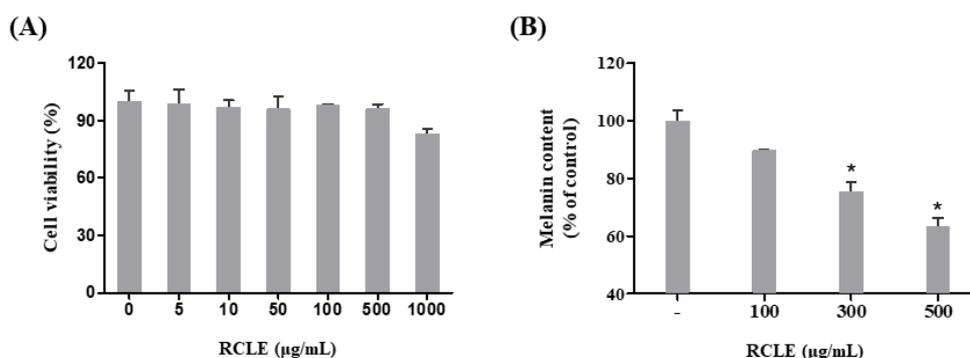


Fig. 1. The effect of RCLE on cell viability and melanin biosynthesis in B16F10 melanoma cells. (A) Effect of RCLE on cell viability of B16F10 melanoma cell. After incubation of B16F10 melanoma cells with various concentration of the extract in a 96-well plate for 24 h, cell viability was measured by MTT assay. (B) 16F10 melanoma cells were cultured with α -MSH (200nM) with or without RCLE. Data are mean \pm S.E.M of three independent experiments. Values are significantly different by ANOVA test (*p < 0.05).

본 연구에서는 산딸기 잎 추출물에 의한 tyrosinase 저해 활성을 측정하기 위하여 mushroom tyrosinase에 의한 L-tyrosine의 산화 정도를 측정하였다. 그 결과 산딸기 잎 추출물에 의하여 tyrosinase의 활성이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 2A). 그리고 세포 내에 존재하는 tyrosinase의 활성에 대한 저해 효과를 확인하기 위하여 B16F10 melanoma 세포에 산딸기 잎 추출물을 농도별로 처리한 후, α -MSH (200 nM)가 첨가된 배지에서 48시간 배양하였다. 그 결과 α -MSH에 의해 증가된 tyrosinase 활성이 산딸기 잎 추출물에 의하여 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 2B). 본 연구에서 산딸기 잎 추출물이 멜라닌 생성 과정에서 tyrosinase 활성을 억제하여 멜라닌 생성을 감소시키는 것으로 밝혀졌고 이는 산딸기 잎 추출물이 미백 소재로서 활용될 수 있는 가능성을 보여준다.

3.4. PKA, CREB, MITF 발현 억제

UV는 각질세포에서 α -MSH의 분비를 자극한다. α -MSH는 멜라닌 세포에서 MC1R에 결합하여 cAMP 생성과 PKA 활성화를 일으킨다[12]. PKA 신호 전달은 멜라닌 생성과 관련이 있다. PKA는 세포 내 cAMP의 상승에 의해 활성화 될 수 있으며, CREB의 활성화를 통해 MITF 전사 활성을 유도하여 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2

유전자의 발현을 일으킨다[13]. 본 연구에서는 산딸기 잎 추출물이 B16F10 melanoma 세포 내에서 PKA 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 western blot analysis를 수행하였다. α -MSH에 의해 증가된 PKA 활성이 산딸기 잎 추출물에 의해 감소됨을 확인하였다(Fig. 3).

α -MSH로 자극된 MC1R은 cAMP-PKA 경로를 통하여 CREB를 활성화한다. CREB은 멜라닌 생성의 주요 전사인자인 MITF를 자극하여 멜라닌 생성 효소인 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 발현을 유도한다[14]. 본 연구에서 CREB의 인산화 수준은 산딸기 잎 추출물을 처리함으로써 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 3).

MITF는 멜라닌 세포의 생존, 증식 및 분화를 조절하는 수많은 전사 인자와 신호 전달 경로로 구성된 멜라닌 합성 조절 네트워크의 중심 허브 역할을 한다[15]. MITF는 핵으로 이동하여 tyrosinase 및 TRP 프로모터에 결합하여 각 유전자의 발현을 증가시킨다. 이 과정을 통해 생산되는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등의 효소는 대표적인 멜라닌 합성 관련 효소이다[11]. 산딸기 잎 추출물에 의해서 MITF 발현이 감소됨을 확인하였다(Fig. 3). 따라서 산딸기 잎 추출물에 의한 멜라닌 생성 효소 및 멜라닌 생성의 억제는 PKA와 CREB 인산화 및 MITF 발현의 억제에 의해서 나타난다고 할 수 있다.

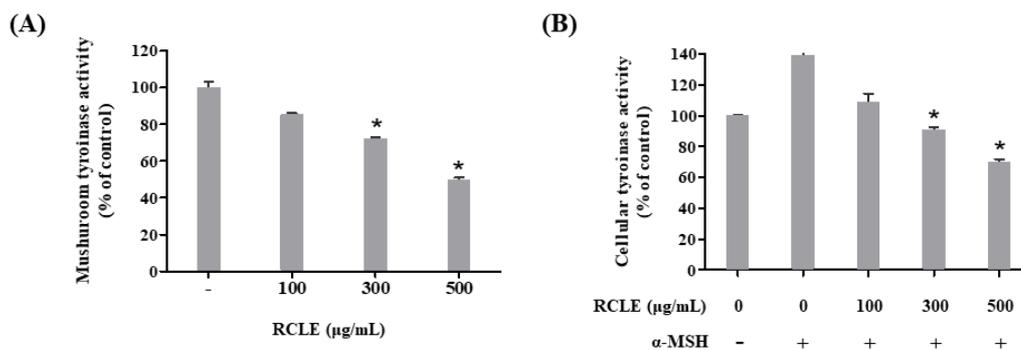


Fig. 2. Inhibitory effect of RCLE against mushroom tyrosinase activity and cellular tyrosinase activity. (A) Mushroom tyrosinase activity was measured by the change in absorption at 490 nm after incubation with various concentration of RCLE. (B) Cellular tyrosinase activity was inhibited by co-incubation of RCLE with α -MSH. Data are mean \pm S.E.M of three independent experiments. Values are significantly different by ANOVA test (* $p < 0.05$).

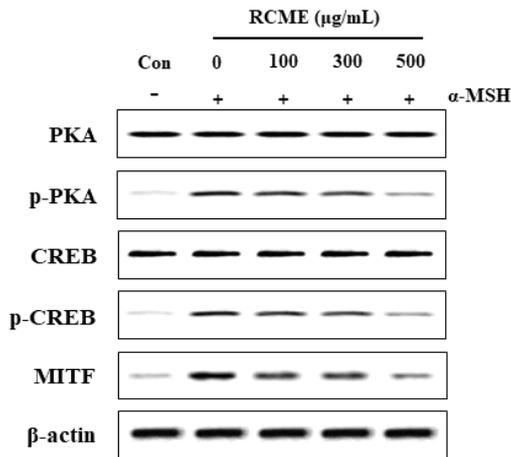


Fig. 3. The effect of RCLE on α -MSH-induced expression of p-PKA, p-CREB and MITF in B16F10 melanoma cells. Western blot analysis of cellular proteins in B16F10 melanoma cells.

3.5. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 발현 조절

MITF는 높은 친화도로 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 M-box 서열에 결합하는 것으로 나타났다. MITF가 M-box 서열에 결합함으로써 tyrosinase 유전자군이 발현된다[16]. 포유류에서 멜라닌 생성은 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 세 가지 효소에 의해 직접 조절된다[13]. TRP-1 및 TRP-2는 멜라노좀(melanosome) 막에 걸쳐있는 막단백질이며 공동으로 작용하여 tyrosinase의 활성을 조절할 수 있다. TRP-1은 복합체를 형성하거나 안정화함으로써 tyrosinase의 활성에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. TRP-2는 멜라닌 생성 경로에서 tyrosinase의 아래 단계에서 dopachrome tautomerase로 작용한다[17]. 본 연구에서는 MITF에 의하여 발현이 조절 받는 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과, 산딸기 잎 추출물에 의하여 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 단백질 발현이 감소됨을 확인하였다(Fig. 4). 결국 산딸기 잎 추출물에 의한 멜라닌 생성 억제는 PKA-CREB-MITF 경로 억제로 인하여 tyrosinase와 그와 관련된 단백질 발현의 감소로 나타나는 것으로 확인되었다.

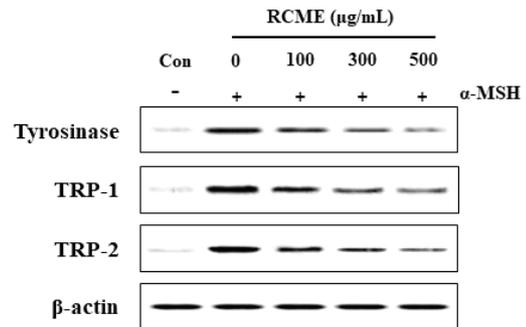


Fig. 4. The effect of RCLE on α -MSH-induced expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in B16F10 melanoma cells. Western blot analysis of cellular proteins in B16F10 melanoma cells.

3.6. MAPKs 활성 조절

Extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) 및 p38로 구성된 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 패밀리는 MITF 발현 조절을 통해 멜라닌 생성에 연관되어 있다고 알려져 있다[18].

본 연구에서는 멜라닌 합성에서 산딸기 잎 추출물의 MAPK 경로에 대한 활성을 밝히기 위하여 실험을 진행하였다. B16F10 melanoma 세포에서 ERK의 인산화는 α -MSH의 자극에 의하여 감소하였고 이는 산딸기 잎 추출물에 의하여 증가하였다. 반면에 JNK와 p38의 인산화는 α -MSH의 자극에 의하여 증가하였고 이는 산딸기 잎 추출물에 의하여 감소하였다(Fig. 5).

이전 연구에 의하면, ERK의 인산화 증가는 멜라닌 합성을 억제하는 tyrosinase 활성과 MITF의 전사를 감소시키고, JNK 및 p38의 감소된 인산화는 MITF의 발현을 감소시켜 멜라닌 생성을 억제한다고 보고되고 있다[19]. 따라서 MAPK 신호 전달 경로는 멜라닌 생성 조절을 위한 전략적 표적이 될 수 있다. p38 및 JNK는 MITF를 인산화하여 특정 환경 자극에 대한 반응으로 전사 활성을 조절한다. 따라서 p38 및 JNK 인산화의 억제는 MITF 발현 감소를 통해 멜라닌 생성을 억제한다. 대조적으로, ERK 인산화의 활성화는 멜라닌 생성을 억제한다. ERK의 인산화가 MITF의 serine 73을 인산화하여 ubiquitin-dependent proteasome 경로를 통해 MITF 분해를 유도하여 tyrosinase의 전사를 억제한다는 것이 밝혀졌다

[12]. 본 연구에서 산딸기 잎 추출물이 MAPK의 활성을 조절할 수 있음을 확인하였다. 이 작용은 ERK의 활성을 증가시키는 반면 JNK와 p38의 활성을 감소시킴으로서 나타나는 것으로 이러한 MAPK 경로의 조절로 인하여 멜라닌 생성을 억제하는 것임을 확인하였다.

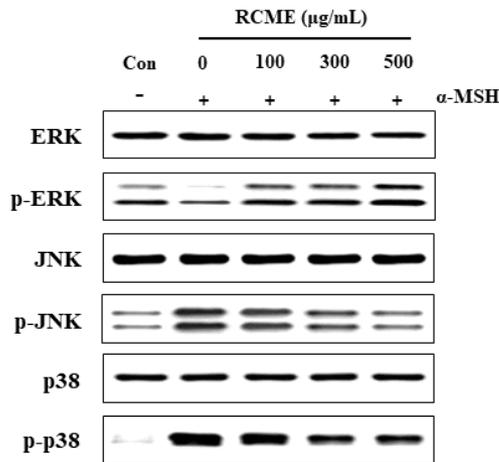


Fig. 5. The effect of RCLE on α -MSH-induced expression of MAPKs in B16F10 melanoma cells. Western blot analysis of cellular proteins in B16F10 melanoma cells.

4. 결론

산딸기는 다양한 효능을 가진 소재로 연구되고 있다. 그 중에서 잎 추출물은 항산화와 보습력 등이 다양한 연구를 통하여 확인되었다. 하지만 멜라닌 생성에서의 효능은 알려지지 않았다. 따라서 본 연구는 산딸기 잎 추출물의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해, B16F40 melanoma 세포에 α -MSH로 자극한 다음, 산딸기 잎 추출물을 처리하고 멜라닌 생성과 관련된 PKA, CREB, MITF의 활성을 측정하였다. 또한 신호전달 분자인 tyrosinase, TRP-1/2, MAPKs의 발현을 측정하였다.

본 연구를 통해, 산딸기 잎 추출물이 B16F40 melanoma 세포에서 멜라닌 생성을 억제하고, 이는 PKA/CREB/MITF 경로를 저해하여 tyrosinase 활성을 억제하여 멜라닌의 생성을 억제하는 것

로 확인되었다. 이러한 결과는 산딸기 잎 추출물이 멜라닌 생성 억제 효과를 가지고 있음을 보여주며, 특히, MITF 경로를 억제하는 기전을 규명했다는 것에 의의가 있다. 또한, 산딸기 잎 추출물이 기능성 미백 화장품 소재로서 활용될 수 있는 과학적 근거를 제시하였다고 사료된다.

References

1. S. C. Ko, S. H. Lee, "Protocatechuic Aldehyde Inhibits α -MSH-Induced Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells via PKA/CREB-Associated MITF Downregulation", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.22, No.8, pp. 3861, (2021).
2. J. H. Ko, N. Lee, H. K. Kang, B. S. Kim, J. N. Lee, C. G. Hyun, "Anti-melanogenic effects of hot-water extracts from *Torreya nucifera* via MAPKs and cAMP signaling pathway on B16F10 cells", *Die Pharmazie*, Vol. 75, No.11, pp. 565-570, (2020).
3. J. H. Lee, B. Lee, Y. D. Jeon, H. W. Song, Y. M. Lee, B. J. Song, D. K. Kim, "Inhibitory Effect of *Elaeagnus umbellata* Fractions on Melanogenesis in α -MSH-Stimulated B16-F10 Melanoma Cells", *Molecules*, Vol.26, No.5, pp. 1308, (2021).
4. W. Ni, X. Zhang, H. Bi, J. Iteku, L. Ji, C. Sun, J. Fang, G. Tai, Y. Zhou, J. Zhao, "Preparation of a glucan from the roots of *Rubus crataegifolius* Bge. and its immunological activity", *Carbohydrate Research*, Vol.344, No.18 pp. 2512-2518, (2009).
5. Jung MS, Lee SJ, Song Y, Jang SH, Min W, Won CK, Kim HD, Kim TH, Cho JH. *Rubus crataegifolius* Bunge regulates adipogenesis through Akt and inhibits high-fat diet-induced obesity in rats. *Nutrition & Metabolism*, 13:29. 2016.
6. J. U. Park, J. S. Cho, J. S. Kim, H. K. Kim, Y. H. Jo, M. A. A. Rahman, Y. I. Lee, "Synergistic Effect of *Rubus crataegifolius* and *Ulmus macrocarpa*

- Against *Helicobacter pylori* Clinical Isolates and Gastritis”, *Frontiers in Pharmacology*, Vol.11, No.4, (2020).
7. P. W. Wang, Y. C. Cheng, Y. C. Hung, C. H. Lee, J. Y. Fang, W. T. Li, Y. R. Wu, T. L. Pan, “Red Raspberry Extract Protects the Skin against UVB-Induced Damage with Antioxidative and Anti-inflammatory Properties”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol.2019 pp. 9529676. (2019).
 8. P. Rattanawiwatpong, R. Wanitphakdee-decha, A. Bumrungpert, M. Maiprasert, “Anti-aging and brightening effects of a topical treatment containing vitamin C, vitamin E, and raspberry leaf cell culture extract: A split-face, randomized controlled trial”, *Journal of Cosmetic Dermatology*, Vol.19, No.3, pp. 671-676, (2020).
 9. Y. C. Hseu, Y. Vudhya Gowrisankar, L. W. Wang, Y. Z. Zhang, X. Z. Chen, P. J. Huang, H. R. Yen, H. L. Yang, “The in vitro and in vivo depigmenting activity of pterostilbene through induction of autophagy in melanocytes and inhibition of UVA-irradiated α -MSH in keratinocytes via Nrf2-mediated antioxidant pathways”, *Redox Biology*, Vol.44 (2021).
 10. H. Y. Kim, G. Agraphari, M. J. Lee, L. J. Tak, W. K. Ham, T. Y. Kim, “Low-Temperature Argon Plasma Regulates Skin Moisturizing and Melanogenesis-Regulating Markers through Yes-Associated Protein”. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.22, No.4, pp. 189, (2021).
 11. J. H. Ko, N. Lee, H. K. Kang, B. S. Kim, J. N. Lee, C. G. Hyun, “Anti-melanogenic effects of hot-water extracts from *Torreya nucifera* via MAPKs and cAMP signaling pathway on B16F10 cells”, *Die Pharmazie*, Vol.75, No.11, pp. 565-570, (2020).
 12. Y. H. Kuo, C. C. Chen, P. Y. Wu, C. S. Wu, P. J. Sung, C. Y. Lin, H. M. Chiang, “N-(4-methoxyphenyl) caffeamide-induced melanogenesis inhibition mechanisms”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, Vol.17, No.1, pp. 71, (2017).
 13. T. F. Tsang, B. Chan, W. C. Tai, G. Huang, J. Wang, X. Li, Z. H. Jiang, W. L. W. Hsiao, “Gynostemma pentaphyllum saponins induce melanogenesis and activate cAMP/PKA and Wnt/ β -catenin signaling pathways”, *Phytomedicine*, Vol.60 pp. 153008, (2019).
 14. S. Y. Won, J. J. Park, E. Y. Shin, E. G. Kim, “PAK4 signaling in health and disease: defining the PAK4-CREB axis”, *Experimental & Molecular Medicine*, Vol.51, No.2, pp. 1-9, (2019).
 15. W. Qian, W. Liu, D. Zhu, Y. Cao, A. Tang, G. Gong, H. Su, “Natural skin-whitening compounds for the treatment of melanogenesis (Review)”, *Experimental and Therapeutic Medicine*, Vol.20, No.1, pp. 173-185, (2020).
 16. D. Fang, T. Kute, V. Setaluri, “Regulation of tyrosinase-related protein-2 (TYRP2) in human melanocytes: relationship to growth and morphology”, *Pigment Cell Research*, Vol.14, No.2, pp.132-139, (2001).
 17. A. Tuerxuntayi, Y. Q. Liu, A. Tulake, M. Kabas, A. Eblimit, H. A. Aisa, “Kaliziri extract upregulates tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expression in murine B16 melanoma cells”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, Vol.14, No.166, (2014).
 18. Y. C. Chung, C. G. Hyun, “Inhibitory Effects of Pinostilbene Hydrate on Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells via ERK and p38 Signaling Pathways”, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.21, No.13, pp.4732, (2020).
 19. H. H. Ko, Y. T. Chang, Y. H. Kuo, C. H. Lin, Y. F. Chen, “*Oenothera laciniata* Hill Extracts Exhibits Antioxidant Effects and Attenuates Melanogenesis in B16-F10 Cells via Downregulating CREB/MITF/Tyrosinase and Upregulating p-ERK and p-JNK”, *Plants (Basel)*, Vol.10, No.4, pp. 727, (2021).