

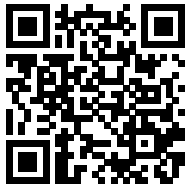
Cnidium officinale Makino Extracts Inhibit α -MSH-induced Melanogenesis in B16F10 Mouse Melanoma Cells

Hwa Jun Cha

Department of Beauty Care and Cosmetics, Osan University, Osan-si, Gyeonggi-do, Korea

Corresponding author: Hwa Jun Cha,
Department of Beauty Care and Cosmetics, Osan
University, 45 Cheonghak-ro, Osan-si, Gyeonggi-
do 18119, Korea
Tel.: +82 31 370 2564
Fax: +82 31 370 2719
Email: hjcha@osan.ac.kr

Received October 30, 2017
Revised November 13, 2017
Accepted November 22, 2017
Published March 30, 2018



Abstract

Purpose: Skin color is determined by melanin distributed in skin, hair, eye, heart, and brain. The melanin protects skin against ultraviolet (UV) and scavenges cellular reactive oxygen species (ROS). However, the abnormal accumulation of melanin induces hyperpigmentation diseases such as melisma, freckle etc.. *Cnidium officinale* Makino commonly used to natural medicine in East Asia such as Korea, Japan and China, is called "Chun-kung" in Korea. In present study, we identified the anti-melanogenic effect of *Cnidium officinale* Makino in B16F10 cells. **Methods:** *Cnidium officinale* Makino extracts were prepared by leaching in 70% ethanol. Comparing with control and *Cnidium officinale* Makino extracts treated B16F10, we identified melanin contents measured by optical density at 450 nm, tyrosinase activity, tyrosinase mRNA and protein expression, MITF activity using MITF. **Results:** As shown results, we demonstrated that *Cnidium officinale* Makino extracts down-regulated melanin synthesis using down-regulating activity and expression of tyrosinase which is key enzyme to produce melanin. In addition, we revealed expression of tyrosinase is regulated by MITF through repressing MITF transcriptional activity. **Conclusion:** *Cnidium officinale* Makino extracts has potential to repress melanogenesis and decreased of hyperpigmetation and to use as a cosmetic ingredient.

Keywords: *Cnidium officinale* Makino, Melanogenesis, B16F10, Tyrosinase, MITF

Introduction

Melanin은 대부분 동물의 피부, 모발, 눈, 내이, 뼈, 심장, 뇌 등에 분포되어 있는 물질로 피부색을 결정한다(Alaluf *et al.*, 2002; D'Mello *et al.*, 2016). 이러한 melanin은 자외선으로부터 피부를 보호하고, 활성산소를 제거하는 역할을 하는 필수적인 생체 물질이다(Brożyna *et al.*, 2016; Herrling *et al.*, 2008). 하지만 비정상적인 melanin 축적은 기미, 주근깨, 모반, 검버섯과 같은 색소이상증을 일으킨다(Slominski *et al.*, 2004). 때문에 melanogenesis 조절을 통해서 색소이상증을 조절할 필요가 있다. Melanogenesis는 기저층에 있는 melanocyte에서 일어나며 주로 tyrosinase에 의해서 조절된다(Hearing, 2011). Tyrosinase (EC 1.14.18.1)은 polyphenol oxidase (PPO)로 알려져 있으며 copper-containing monooxygenase enzyme으로 melanin 합성에 매우 중요하다(Parveen *et al.*, 2010). 이러한 enzyme은

fungi, plant, animal 등에 다양하게 분포하고 있으며(van Gelder *et al.*, 1997), L-tyrosine으로부터 melanin이 합성되는 초기과정인 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), dopaquinone이 합성되는 과정에서 중요하게 작용한다(Hearing, 2011; Slominski *et al.*, 2005; Slominski *et al.*, 2012). 이러한 tyrosinase는 melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 등과 같은 호르몬에 의한 신호전달기전에 의해서 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 전사활성을 높이고, 이를 통해 tyrosinase를 발현하게 된다(Brenner & Hearing, 2008; Costin & Hearing, 2007; Ha & You, 2016; Slominski *et al.*, 2004). 때문에 melanogenesis의 조절은 관련 신호전달기전을 조절함으로써 가능하다.

Cnidium officinale Makino은 산형과 다년생 식물로 한국에서 천궁으로 불린다(Choi *et al.*, 2002). 이러한 *Cnidium*

officinale Makino은 아시아를 중심으로 오랜기간 동안 진통제, 항염제, 생리불순치료 등의 목적으로 전통의약제로 사용하고 있다(Hong *et al.*, 2017). 또한 *Cnidium officinale* Makino의 주요성분인 phthalide 유도체들은 진정제, 항빈혈제, 항진균제, 이완제, 항보체 활성화와 같은 다양한 효능을 가지고 있고, *Cnidium officinale* Makino 추출물 역시 혈액순환개선 및 염증성질환 억제에 효능이 있는 것으로 알려져 있다(Jang, 2017; Tahara *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1989). 특히, Higashi (1996)의 연구에서는 *Cnidium officinale* Makino가 이완작용에 효과적이고, 율혈과 염증을 억제하여 염증성질환으로 인한 가려움증을 완화할 수 있다고 알려져 있다. 또한 간암모델에서 *Cnidium officinale* Makino 추출물이 항암과 항전이 활성을 가진다는 것이 입증되었다(Haranaka *et al.*, 1985; Hong *et al.*, 2017; Onishi *et al.*, 1998). 하지만 아직까지도 *Cnidium officinale* Makino가 피부에 존재하는 세포들에 대한 연구는 미비한 편이다. 때문에 본 논문에서는 *Cnidium officinale* Makino 추출물이 melanocyte에서 melanogenesis에 미치는 영향을 밝히고자 한다.

Methods

1. B16F10 mouse melanoma 세포배양

B16F10 mouse melanoma 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Korea)에서 구매하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA)와 10% penicillin (Gibco, 100 units/mL), 10% streptomycin (Gibco, 100 µg/mL)이 포함된 배지에 배양하였다.

2. *Cnidium officinale* Makino 추출물 제조

Cnidium officinale Makino을 1차 세척 후 60°C 건조기(ON-50; Deahan Science, Korea)에서 완전히 건조를 한다. 건조된 *Cnidium officinale* Makino을 분쇄기(SMX-5800LM; Shinil, Korea)에 넣고 분말화하고, *Cnidium officinale* Makino 분말에 70% ethanol를 첨가하여, 60°C에서 30 min동안 추출한다. 추출하는 동안 20 kHz이상의 초음파(Ultrasonic cleaner 8891; Cole-Parmer, USA)를 주어서 추출효율을 높였다. 추출 후 남은 고형분을 여과지(Whatman No.2; GE Healthcare Life Sciences, USA)로 분리하고, 여과액을 감압농축기(EYELA N-3010; Tokyo Rikakikai, Japan)와 동결건조기(LP 10-30; Ilshin,

Korea)로 건조하였다. 건조된 *Cnidium officinale* Makino 추출물은 다시 농도에 맞춰 dimethyl sulfoxide (DMSO; Biopure, Canada)로 녹였다.

3. 세포독성 측정

세포독성을 측정하기 위해서 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 진행하였다. 96 well plate에 3×10^3 개의 B16F10 mouse melanoma 세포를 접종하고, 48 hr 후 추출물을 0-200 µg/mL로 처리하였다. 추출물이 처리된 세포를 48 hr 배양 후 0.5 mg/mL MTT (Sigma-Aldrich)로 처리하고 37°C에 1 hr 배양하였다. 1 hr 후 배지를 제거하고 생성된 MTT formazan을 DMSO로 녹여 595 nm에서 microplate reader (SpectraMax® i3x; Molecular Devices, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 비교하여 세포독성을 표현하였다.

4. Melanin 생성량 측정

B16F10 mouse melanoma 세포에서의 melanin 함량 측정은 세포내의 melanin을 추출하여 흡광도를 측정하는 방법을 사용하였다. 60-mm cell culture dish에 2×10^5 개의 B16F10 mouse melanoma 세포를 접종하고 48 hr 배양하였다. 배양 후 세포에 melanin 생성 유도 물질인 α -MSH와 *Cnidium officinale* Makino 추출물을 처리하고 48 hr 배양하였다. 배양이 끝난 후 세포를 수확하여 PBS로 1회 세척하고 세포 수를 개수하였다. 각각의 샘플당 동일량의 세포로 분주하고 1 N sodium hydroxide (NaOH; Sigma-Aldrich) 100 µL를 첨가하여 95°C에서 15 min 세포를 용해하였다. 그 후 450 nm 파장에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 melanin 함량을 확인하였다.

5. Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성 측정은 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 2 mM L-Dopa (Sigma-Aldrich)와 100 unit mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich) 또는 cell lysate 넣고 반응하여 측정하였다. Tyrosinase의 직접적인 저해효과를 보기 위해서 mushroom tyrosinase를 이용하였고, 간접적인 저해효과를 보기 위해서 cell lysate를 이용하였다. Cell lysate는 추출물을 처리한 세포를 1% Triton X-100 (Biopure), 150 mM sodium chloride (Biopure), 50 mM HEPES (pH 7.5, Biopure), 5 mM EDTA (Biopure)가 첨가된 lysis buffer를 이용하여 세포를 용해하였다. 반응은 37°C에서 30 min 반응하였으며, 반응을 통해서 합성된 melanin은 450 nm 파장에서 microplate reader를 이용하여 흡광도

를 측정하여 확인하였다. Cell lysate를 이용하는 경우 측정값의 보정을 위해서 Bradford protein assay (Thermo Fisher Scientific)로 전체 단백질량 측정 후 차이 값을 보정해주었다.

6. Tyrosinase mRNA 발현량 측정

Tyrosinase mRNA의 발현을 확인하기 위해서 total RNA는 TRIzol™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 추출하였다. 추출된 total RNA를 MaestroNano Pro Micro-Volume spectrophotometer (Maestrogen Inc., USA)를 이용하여 정량하고, 동일량을 Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase (Invitrogen)로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 tyrosinase의 발현량을 알아보는 quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)은 StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific)에서 진행하였다. PCR 반응액은 HOT FIREPol EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Estonia), 0.5 pmoles/ μ L forward primer, 0.5 pmoles/ μ L reverse primer, cDNA를 혼합하여 제조하였고, tyrosinase와 보정을 위해서 사용된 β -actin의 primer 정보는 Table 1과 같다. qRT-PCR 결과는 Ct값을 측정하여 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 의 계산 방법을 이용하여 상대정량하였고, 모든 값은 β -actin을 이용하여 샘플간의 차이를 보정하였다.

7. Tyrosinase protein 발현측정

Tyrosinase protein의 발현을 확인하기 위해서 western blot을 사용하여 발현을 분석하였다. 수확된 세포를 1% SDS lysis buffer (Promega, USA)로 95°C에서 20 min 용해시킨 후 5X sample buffer [10% SDS, 1M Tris-HCl (pH 6.8), 50% glycerol, 25% β -mercaptoethanol, 1% bromophenol blue] (Sigma-Aldrich)에 용해하고 Bradford protein assay kit로 전체 단백질량을 확인하여 동량의 단백질을 5X sample buffer에 섞어 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) 전기영동하여 크기별로 분리하였다. 이 후 단백질을 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, USA)으로 옮겨 tyrosinase

(M-19; Santa Cruz, USA)와 β -actin (Santa Cruz)를 각각의 target 단백질에 붙이고, secondary antibody를 추가로 붙여준 후 Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, USA)를 도포하여 단백질이 발생되게 하고, 이를 Fusion FX7 imaging system (Vilber Lourmat, France)에서 촬영하여 단백질량을 확인하였으며 확인된 tyrosinase 단백질량은 β -actin을 이용하여 보정하였다.

8. MITF 전사활성 측정

MITF의 전사활성을 측정하기 위해서 MITF의 binding site가 들어있는 luciferase assay plasmid인 pGL3 (Invitrogen)를 사용하였다. Report plasmid인 pGL3-MITF와 normalization plasmid인 pCMV- β -gal을 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용하여 형질 전환하였고, 24 hr의 안정화 시간을 거친 후 *Cnidium officinale* Makino 추출물로 처리하였다. 처리 후 수확된 세포는 $\times 1$ luciferase lysis buffer (Promega, USA)를 이용하여 cell lysate를 얻고, luciferase 기질인 Luciferase Reporter 1000 Assay System (Promega)에 넣어주어 발광을 유도하고, 발광 정도는 Veritas™ Microplate Luminometer (Veritas, USA)로 측정하여 MITF의 전사활성을 확인하였다. 또한 O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside assays (β -Gal Assay Kit, Invitrogen)를 이용하여 실험에서 나올 수 있는 오차값을 보정하였다.

9. 통계처리

본 실험의 모든 실험은 3회 반복하여 진행하였고, 조건간의 차이에 대한 유의성을 입증하는 방법으로 Student's *t*-test을 이용하였다. Student's *t*-test 결과 $p < 0.05$ 의 값을 유의성 있다고 판단하고, 유의적인 값에는 별표(*)를 하였다.

Results and Discussion

1. B16F10 mouse melanoma 세포에서 *Cnidium officinale* Makino 추출물의 세포독성

B16F10 mouse melanoma 세포에 *Cnidium officinale*

Table 1. Sequence of primers

| Primers | Sequence |
|------------------------|---------------------------|
| Tyrosinase forward | 5'CAAGTACAGGGATCGGCCAAC3' |
| Tyrosinase reverse | 5'GGTGCATTGGCTTCTGGGTAA3' |
| β -actin forward | 5'CCCTGTATGCCTCTGGTC3' |
| β -actin reverse | 5'GCTTTACGGATGTCAACG3' |

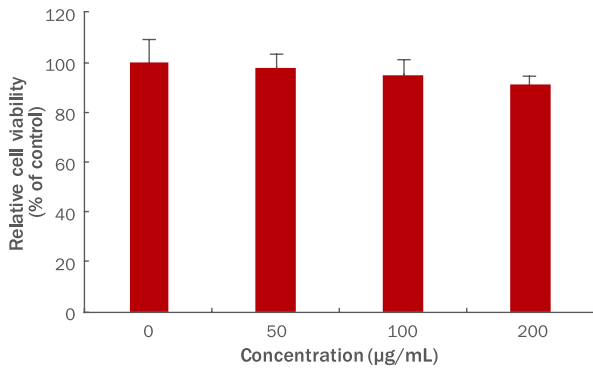


Figure 1. Cytotoxicity of extracts of *Cnidium officinale* Makino in B16F10 mouse melanoma cells.

Effects of *Cnidium officinale* Makino extracts on the cell viability. There is no significant difference between control and *Cnidium officinale* Makino extracts treated cells. Cytotoxicity was exhibited as a percentage of control at the indicated concentrations. Values are M±S.D. from triplicate experiments. M±S.D., mean±standard deviation.

Makino 추출물에 의한 세포독성을 확인하기 위해서, *Cnidium officinale* Makino 추출물을 0-200 µg/mL로 B16F10 mouse melanoma 세포에 24 h 처리 후 세포 생존율을 측정하였다. 200 µg/mL 농도까지 세포의 성장 억제가 일어나지 않는 것을 확인하였고, 이에 따라 *Cnidium officinale* Makino 추출물의 독성이 없는 농도로 확인된 200 µg/mL 이하에서 melanin 합성 저해실험을 진행하였다(Figure 1).

2. B16F10 mouse melanoma 세포에서 *Cnidium officinale* Makino 추출물에 의한 melanin 함량변화

Cnidium officinale Makino 추출물에 의한 melanin 함량변화를 확인하기 위해서 200 ng/mL α-MSH를 처리하고 동시에 *Cnidium officinale* Makino 추출물을 0, 100, 200 µg/mL 농도로 처리하였다. 48 h 배양한 후 세포를 파쇄하여 melanin 함량을 측정하였다. α-MSH 처리군에서는 melanin 함량이 196.24%까지 증가였고, *Cnidium officinale* Makino 추출물 100, 200 µg/mL로 처리시 다시 153.24%, 105.24%까지 감소하였다(Figure 2). Melanin 합성은 melanosome에서 tyrosinase에 의해서 생성되기 때문에 이후 실험에서 tyrosinase 활성을 측정하였다(Pillaiyar *et al.*, 2017).

3. B16F10 mouse melanoma 세포에서 *Cnidium officinale* Makino 추출물에 의한 tyrosinase 활성 변화

Cnidium officinale Makino 추출물에 의한 melanin 생성감소가 tyrosinase에 의해서 일어나는지 확인하기 위해서 200 ng/mL α-MSH를 처리하고 동시에 *Cnidium officinale* Makino 추출물을 0, 100, 200 µg/mL 농도로 처리한 후 세

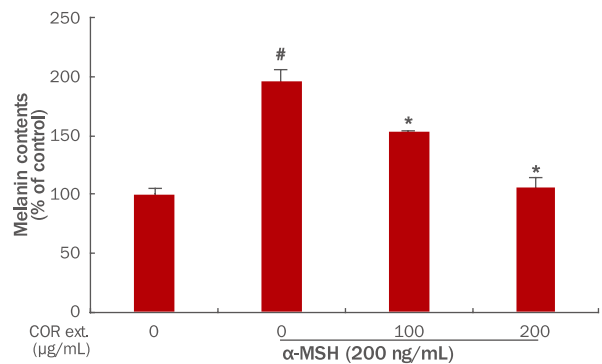


Figure 2. Effects of *Cnidium officinale* Makino extracts on melanin contents in B16F10 mouse melanoma cells.

Cnidium officinale Makino extracts decreased melanin contents in B16F10 mouse melanoma cells. Melanin contents were exhibited as a percentage of control at the indicated concentrations. Values are M±S.D. from triplicate experiments. #*p*<0.05 compared with non-treated cells; **p*<0.05 compared with α-MSH-treated cells; COR ext., *Cnidium officinale* Makino extracts; α-MSH, melanocyte-stimulating hormone; M±S.D., mean±standard deviation.

포 내 tyrosinase 활성을 확인하였다. Figure 3A에서와 같이 세포 내 tyrosinase 활성이 농도의존적으로 감소됨을 확인하였다. 하지만 *Cnidium officinale* Makino 추출물이 mushroom tyrosinase에 의한 melanin 생성은 억제하지 못함을 확인하였다(Figure 3B). 때문에 *Cnidium officinale* Makino 추출물은 간접적으로 tyrosinase 발현 또는 활성 조절을 통해서 melanin합성을 저해함을 확인하였다.

4. B16F10 mouse melanoma 세포에서 *Cnidium officinale* Makino 추출물에 의한 tyrosinase 발현변화

Cnidium officinale Makino 추출물에 의해 tyrosinase 발현이 조절되는지 알아보기 위해 mRNA와 단백질 발현량을 확인하였다. Tyrosinase의 단백질량을 확인결과 *Cnidium officinale* Makino 추출물에 의해서 발현이 의존적으로 감소됨을 확인하였다. 이러한 tyrosinase 발현 감소가 mRNA 억제에 의해서 일어나는지 확인하기 위해서 *Cnidium officinale* Makino 추출물을 처리하고 tyrosinase의 mRNA 발현량을 확인하였다. Figure 4B에서와 같이 tyrosinase mRNA는 *Cnidium officinale* Makino 추출물에 의해서 감소됨을 확인할 수 있었다.

5. B16F10 mouse melanoma 세포에서 *Cnidium officinale* Makino 추출물에 의한 MITF 전사활성변화

α-MSH에 의한 melanin 합성에서 tyrosinase의 발현은 MITF에 의해서 발현이 조절된다(D'Mello *et al.*, 2016;

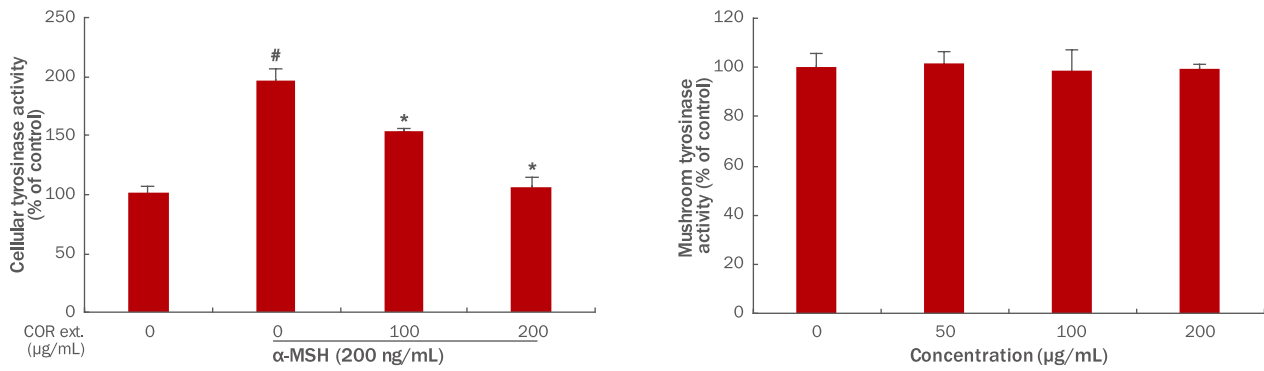


Figure 3. Effects of *Cnidium officinale* Makino extracts on tyrosinase activity. *Cnidium officinale* Makino extracts decreased tyrosinase activity in B16F10 mouse melanoma cells. (A) Cellular tyrosinase activity, (B) mushroom tyrosinase activity. Melanin contents were exhibited as a percentage of control at the indicated concentrations. Values are M±S.D. from triplicate experiments. [#]*p*<0.05 compared with non-treated cells; ^{*}*p*<0.05 compared with α -MSH-treated cells; COR ext., *Cnidium officinale* Makino extracts; α -MSH, melanocyte-stimulating hormone; M±S.D., mean±standard deviation.

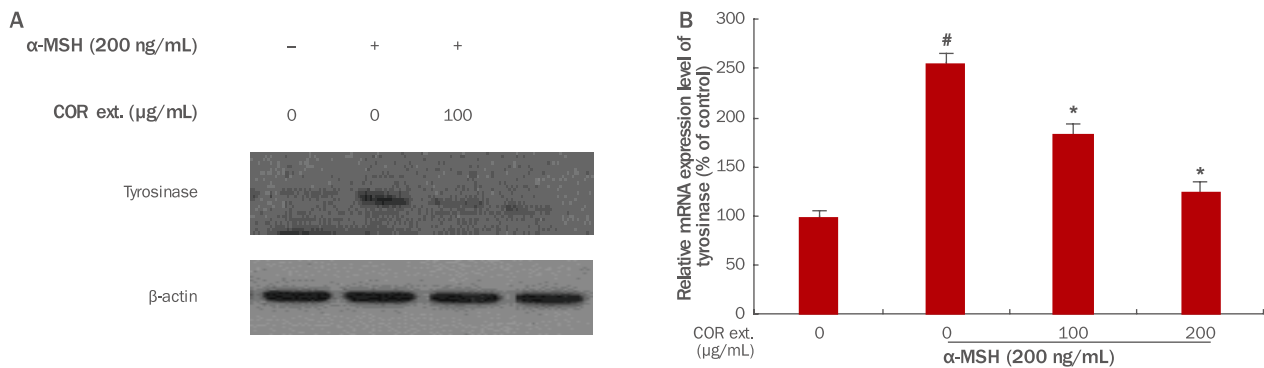


Figure 4. Effects of *Cnidium officinale* Makino extracts on tyrosinase expression. *Cnidium officinale* Makino extracts decreased tyrosinase expression in B16F10 mouse melanoma cells. (A) Protein level of tyrosinase, (B) mRNA level of tyrosinase. mRNA level of tyrosinase were exhibited as a percentage of control at the indicated concentrations. Values are M±S.D. from triplicate experiments. [#]*p*<0.05 compared with non-treated cells; ^{*}*p*<0.05 compared with α -MSH-treated cells; COR ext., *Cnidium officinale* Makino extracts; α -MSH, melanocyte-stimulating hormone; M±S.D., mean±standard deviation.

Hsiao & Fisher, 2014). 따라서 MITF의 전사활성이 *Cnidium officinale* Makino 추출물에 의해서 조절되는지 확인하였다. Figure 5에 보는 것과 같이 MITF의 전사활성은 α -MSH에서 증가되었다가, *Cnidium officinale* Makino 추출물에 의해서 감소함을 확인할 수 있었다. 때문에 *Cnidium officinale* Makino 추출물은 MITF의 전사활성을 감소시킴으로써 tyrosinase의 발현 및 활성을 억제하고, 이를 통해서 melanin합성이 저해됨을 확인할 수 있었다.

Conclusion

본 연구에서는 B16F10 mouse melanoma 세포주 실험모델 활용을 통해 *Cnidium officinale* Makino 추출물이 피부

미백원료로서의 효능이 있음을 *in vitro*에서 알아보고, 화장품 소재로서 *Cnidium officinale* Makino 추출물의 효용성을 확인하고자 하였다. 첫째, α -MSH가 처리된 B16F10 mouse melanoma 세포에서 *Cnidium officinale* Makino 추출물이 melanin 합성을 감소시킴을 확인하였다. 둘째, *Cnidium officinale* Makino 추출물이 melanin 합성에 가장 중요한 tyrosinase 발현 및 활성을 억제하는지 분석한 결과 α -MSH에 의해서 증가된 tyrosinase 발현 및 활성이 *Cnidium officinale* Makino 추출물에 의해서 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 tyrosinase의 발현 감소는 MITF의 전사활성 변화에 의해서 일어남을 확인할 수 있었다. 이러한 내용을 종합하여 보았을 때 *Cnidium officinale* Makino 추출물은 피부의 색소침착을 저해하는 미백 기능성 화장품 소재로서 가능성이 있을 것으로 판단된다.

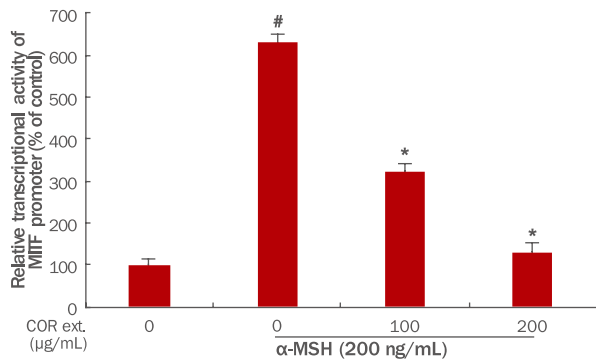


Figure 5. Effects of *Cnidium officinale* Makino extracts on transcriptional activity of MITF.

Cnidium officinale Makino extracts decreased MITF transcriptional activity in B16F10 mouse melanoma cells. Transcriptional activity of MITF was exhibited as a percentage of control at the indicated concentrations. Values are M±S.D. from triplicate experiments. [#]*p*<0.05 compared with non-treated cells; ^{*}*p*<0.05 compared with α-MSH-treated cells; MITF, microphthalmia-associated transcription factor; COR ext., *Cnidium officinale* Makino extracts; α-MSH, melanocyte-stimulating hormone; M±S.D., mean±standard deviation.

Acknowledgements

이 논문은 2017년도 오산대학교 교내 학술비 지원에 의해서 수행됨.

References

Alaluf S, Atkins D, Barrett K, Blount M, Carter N, Heath A. The impact of epidermal melanin on objective measurements of human skin colour. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 15: 119-126, 2002.

Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and Photobiology*, 84: 539-549, 2008.

Brożyna AA, Józwicki W, Roszkowski K, Filipiak J, Slominski AT. Melanin content in melanoma metastases affects the outcome of radiotherapy. *Oncotarget*, 7: 17844-17853, 2016.

Choi HS, Kim MSL, Sawamura M. Constituents of the essential oil of *Cnidium officinale* Makino, a Korean medicinal plant. *Flavour and Fragrance Journal*, 17: 49-53, 2002.

Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress.

The FASEB Journal, 21: 976-994, 2007.

D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling pathways in melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17: E1144, 2016.

Ha MJ, You SH. Bioactive characteristics of extracts of *Opuntia humifusa* fruit as functional cosmetic ingredients. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 14: 463-472, 2016.

Haranaka K, Satomi N, Sakurai A, Haranaka R, Okada N, Kobayashi M. Antitumor activities and tumor necrosis factor producibility of traditional Chinese medicines and crude drugs. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 20: 1-5, 1985.

Hearing VJ. Determination of melanin synthetic pathways. *Journal of Investigative Dermatology*, 131: 8-11, 2011.

Herrling T, Jung K, Fuchs J. The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 69: 1429-1435, 2008.

Higashi K. The therapeutic effect of Unsei-in on facial redness (inflammatory congestion) in atopic dermatitis. *The Japanese Journal of Oriental Medicine*, 46: 753-759, 1996.

Hong H, An JC, de La Cruz JF, Hwang SG. *Cnidium officinale* Makino extract induces apoptosis through activation of caspase-3 and p53 in human liver cancer HepG2 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14: 3191-3197, 2017.

Hsiao JJ, Fisher DE. The roles of microphthalmia-associated transcription factor and pigmentation in melanoma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 563: 28-34, 2014.

Jang YA. Efficacy of a cosmetic material from complex extracts of *Vaccinium spp.*, *Phellinus linteus*, *Castanea crenata*, and *Cimicifuga heracleifolia*. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 15: 281-290, 2017.

Onishi Y, Yamaura T, Tauchi K, Sakamoto T, Tsukada K, Nunome S, Komatsu Y, Saiki I. Expression of the anti-metastatic effect induced by Juzen-taiho-to is based on the content of Shimotsu-to constituents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21: 761-765, 1998.

Parveen I, Threadgill MD, Moorby JM, Winters A. Oxidative phenols in forage crops containing polyphenol oxidase

- enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 1371-1382, 2010.
- Pillaiyar T, Manickam M, Jung SH. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cellular Signalling*, 40: 99-115, 2017.
- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews*, 84: 1155-1228, 2004.
- Slominski A, Wortsman J, Plonka PM, Schallreuter KU, Paus R, Tobin DJ. Hair follicle pigmentation. *Journal of Investigative Dermatology*, 124: 13-21, 2005.
- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews*, 84: 1155-1228, 2004.
- Slominski A, Zmijewski MA, Pawelek J. L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 25: 14-27, 2012.
- Tahara E, Satoh T, Toriizuka K, Nagai H, Nunome S, Shimada Y, Itoh T, Terasawa K, Saiki I. Effect of Shimotsu-to (a Kampo medicine, Si-Wu-Tang) and its constituents on triphasic skin reaction in passively sensitized mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 68: 219-228, 1999.
- van Gelder CW, Flurkey WH, Wichers HJ. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 45: 1309-1323, 1997.
- Wang JD, Narui T, Kurata H, Takeuchi K, Hashimoto T, Okuyama T. Hematological studies on naturally occurring substances. II. effects of animal crude drugs on blood coagulation and fibrinolysis systems. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37: 2236-2238, 1989.

국문초록

B16F10 mouse melanoma 세포에서 *Cnidium officinale* Makino 추출물의 α -MSH에 의해 유도된 melanogenesis 억제효과

차화준

오산대학교 뷰티케어코스메틱과, 경기도 오산시, 한국

목적: 피부의 색을 결정하는 것은 피부, 모발, 눈, 심장, 뇌 등에 널리 퍼져있는 melanin 이라는 색소이다. Melanin은 자외선을 차단하고, 활성산소를 제거하여 피부를 보호하는 역할을 한다. 그러나 비이상적인 melanin의 축적은 과색소침착증이라는 질환을 일으키고, 대표적인 예로는 기미, 주근깨 등이 있다. *Cnidium officinale* Makino는 한국, 일본, 중국 등의 동아시아에서 많이 사용되는 생약성분으로 한국에서는 천궁으로 불린다. 본 연구에서는 *Cnidium officinale* Makino 추출물의 melanin 생성 억제효과를 B16F10 mouse melanoma 세포에서 확인하고자 한다. **방법:** *Cnidium officinale* Makino를 70% ethanol에 침지하여 유효성분을 추출하고, 이를 B16F10에 처리하여 대조군에 비해서 melanin생성량이 감소하는지를 확인한다. 또한 tyrosinase 활성, tyrosinase mRNA와 단백질 발현, MITF의 전사활성을 확인하여 *Cnidium officinale* Makino 추출물의 효능을 평가한다. **결과:** *Cnidium officinale* Makino 추출물은 melanin합성을 감소시키는 것으로 확인되었고, 이러한 melanin의 감소는 melanin을 합성하는 효소인 tyrosinase의 mRNA와 단백질의 발현 감소로 인한 활성감소로 인해 일어나는 것을 확인하였다. 또한 tyrosinase 전사인자인 MITF의 전사활성을 확인한 결과 *Cnidium officinale* Makino 추출물에 의해서 감소함을 확인하였다. **결론:** 본 연구결과를 통해서 *Cnidium officinale* Makino 추출물의 melanin 합성 저해능력을 확인하였고, 과색소침착증을 감소시킬 수 있는 미백원료로 가능성을 보여주었다.

핵심어: *Cnidium officinale* Makino, Melanogenesis, B16F10, Tyrosinase, MITF

이 논문은 2017년도 오산대학교 교내 학술비지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

- 장영아. 블루베리, 상황, 울피, 승마 복합추출물의 화장품 소재로서의 효능. *아시아뷰티화장품학술지*, 15: 281-290, 2017.
- 하민정, 유선희. 천년초 열매 추출물의 기능성 화장품 소재로서의 생리활성 특성. *아시아뷰티화장품학술지*, 14: 463-472, 2016.

中文摘要

***Cnidium officinale* Makino提取物对 α -MSH诱导黑色素形成的B16F10 mouse melanoma细胞的抑制作用**

車和竣

乌山大学美容化妆品学科, 京畿道乌山市, 韩国

目的: 皮肤颜色由分布在皮肤, 头发, 眼睛, 心脏和大脑中的黑色素决定。黑色素保护皮肤免受紫外线并清除活性氧。然而, 黑色素的异常蓄积导致色素沉着性疾病如色素沉着过度症, 祛斑等。*Cnidium officinale* Makino在韩国、日本和中国等东亚地区常用于天然药物, 在韩国被称为“Chun-kung”。本研究探索*Cnidium officinale* Makino在B16F10细胞中的抗黑素生成作用。**方法:** *Cnidium officinale* Makino提取物通过浸提在70%乙醇中制备。在*Cnidium officinale* Makino提取物处理的B16F10中, 鉴定黑色素生成量与对照群相比。此外, 还评价酪氨酸酶活性、酪氨酸酶mRNA和蛋白质表达以及MITF活性来确认*Cnidium officinale* Makino的效能。**结果:** 通过以上研究, 确认了*Cnidium officinale* Makino提取物降低黑色素合成, 这些黑色素合成量的减少由酪氨酸酶mRNA和蛋白质表达的减少而形成的。此外, 还确认了*Cnidium officinale* Makino提取物减少酪氨酸酶转录因子microphthalmia-associated transcription factor (MITF)的转录水平。**结论:** *Cnidium officinale* Makino提取物具有抑制黑色素生成和色素沉着过度症, 作为美白化妆品原料充分具有可行性。

关键词: *Cnidium officinale* Makino, 黑色素生成, B16F10, 酪氨酸酶, MITF