Melanogenesis Inhibitory Effect of Steamed *Platycodon grandiflorum* on B16F10 Cells

Jeong-Yong Park^{1,2}, Ji Yeon Lee^{1,2}, Dae Young Lee¹, Hyung Don Kim¹, Goum Suk Kim¹, Seung Eun Lee¹, Kyung Hye Seo^{1*}

¹Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Soi-myeon, Eumseong-gun, Chungcheongbuk-do, Korea

²Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Chungju-si, Chungcheongbuk-do, Korea

***Corresponding author:** Kyung Hye Seo,
Department of Herbal Crop Research,
National Institute of Horticultural & Herbal
Science, 92 Bisan-ro, Eumseong-gun,
Chungcheongbuk-do 27709, Korea
Tel.: +82 43 871 5785
Fax: +82 43 871 5759
Email: seokh@korea.kr

Jeong-Yong Park and Ji Yeon Lee
contributed equally to this work.

Received October 31, 2018

Revised January 30, 2019

Accepted January 31, 2019

Published March 30, 2019

Abstract

Purpose: This study aimed to investigate and compare effects of bioactive constituents in ethanol extracts of *Platycodon grandiflorum* (PG) using a three-step steaming process. **Methods:** The cell viability of PG and steamed PG extracts in α -MSH-induced B16F10 melanoma cells was investigated. Melanin content was determined, and western blotting was performed to examine the whitening effect of the steamed PG extracts. **Results:** Treatment of α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH)-induced B16F10 melanoma cells with steamed PG (25–200 μ g/mL) did not affect the cell viability. The steamed PG extracts effectively protected melanin formation. Furthermore, the steamed PG extract inhibited well-known melanin generation-related factors, such as tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) and TRP-2. **Conclusion:** The steamed PG extracts are potentially effective in suppressing melanin generation and related factors in α -MSH-induced B16F10 cells.

Keywords: *Platycodon grandiflorum*, Melanoma cell, Melanin content, Protein expression, Whitening

Introduction

도라지(*Platycodon grandiflorum*)는 초롱꽃과에 속하는 여러해살이풀로 한국, 일본 및 중국에 분포하며 산과 들에서 자생한다. 도라지의 뿌리는 전통약재로 예전부터 거담, 진해, 배농, 해열, 진통, 기관지염, 천식 등에 이용되어 왔으며, 현재는 항염증, 항암, 항균, 항산화, 면역력 증진 등의 다양한 기능성 연구가 진행되고 있다(Lee *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2013a). 도라지 뿌리는 triterpenoid계 saponin인 platycodin A, C 및 D 등 함유하고 있으며(Hwang *et al.*, 2011), 특히, 도라지에서 분리한 platycodin D는 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)인자를 억제하여 멜라닌 생성을 억제, 항고혈압,

항암 등의 기능성이 보고되었다(Jung *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2018). 도라지의 건조방법, 저장방법 및 다양한 가공방법을 이용하여 사포닌의 함량의 변화에 대한 연구도 보고 되었다(Lee *et al.*, 2014a; Lee *et al.*, 2014b; Kim *et al.*, 2015). 흑도라지는 품질평가 연구를 통하여 항산화 활성 및 항균 활성에 대한 연구가 진행되었지만(Lee *et al.*, 2013b), 증숙 횟수에 따른 흑도라지의 미백 효과에 대한 연구가 밝혀진 바가 없다.

피부의 표피는 가장 바깥쪽에 존재하는 층으로 외부의 다양한 자극으로부터 노출되기 쉽다. 피부의 노화는 나이를 먹을수록 피부의 구조가 자연적으로 변하는 내인성 노화와 자외선 노출에 의한 외인성 피부노화인 광노화가 함께 진행된다(Park *et al.*, 2008). 최근 자외선의 농도가 높아지면서 자외선에 노

출이 되면 화상, 염증, 면역반응의 억제, 그리고 피부결합조직의 손상을 일으킬 수 있고, 지속적인 자외선 노출은 피부의 구조를 파괴하고 궁극적으로 광노화 및 피부암을 야기한다(Jung *et al.*, 2014). 멜라닌은 이러한 자외선을 일정량 이상 흡수하여 자외선이 인체 내로 침투하는 것을 차단하여 보호하는 역할을 한다(Park, 2015). 멜라닌의 합성은 멜라닌 세포의 세포질 내의 멜라노솜(melanosome)에서 합성되며 자외선, 사이토카인(cytokine), 성장인자(growth factor) 및 호르몬 등에 의해 조절되고 세포내의 다양한 기전을 통해 이루어진다(Jeon *et al.*, 2016). 하지만 비정상적인 멜라닌 생성은 피부에 흑색종 및 색소침착을 일으켜 심할 경우 피부암의 원인이 되기도 한다(Jin *et al.*, 2005). Tyrosinase는 아미노산의 일종인 L-tyrosine이 L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)로 수산화 되고 L-DOPA가 dopaquinone으로 산화되는데 촉매작용을 하고 최종적으로 melanin polymer 중합체를 생성하는데 중요한 역할을 하는 효소이다(Oh *et al.*, 2017). 또한 TRP-1 및 TRP-2는 멜라닌 생성 과정에서 tyrosinase와 함께 멜라닌 생합성 과정에서 많은 관여를 하는 중요한 인자다(Jang & Park, 2017). 현재 화장품 분야에서 사용되는 미백제는 tyrosinase의 활성을 억제하는 arbutin, kojic acid 등이 있고 melanin 합성을 억제하는 L-ascorbic acid, glutathione 등이 있다. 그러나 이러한 물질들은 분해되거나 안정성 문제 등이 있어 첨가제로써 제한된 양만 사용하므로, 천연소재를 이용한 미백소재 개발이 필요하다(Seo *et al.*, 2010).

따라서, 우리는 증숙 횟수에 따른 도라지의 미백 효과에 대한 연구가 밝혀진 바가 없기 때문에 천연소재인 도라지의 증숙 횟수에 따른 미백효능을 비교 및 검증하고 기능성화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 한다.

Methods

1. 추출물 준비

본 연구에서 사용된 도라지는 한국생약협회에서 2016년 이천에서 수집한 것을 구입하여 사용하였다. 생도라지(none steamed-PG, NS-PG)와 증숙 도라지(steamed-PG, once-steamed PG (1S-PG), twice-steamed PG (2S-PG), thrice-steamed PG (3S-PG))는 각 시료 5 kg을 0, 30% 및 70% 에탄올(시료/용매 비율, 1:10)로 실온에서 1일 동안 추출하였다. S-PGs는 도라지를 증기선에서 90–95℃에서 4 h 동안 찌고 1일 동안 30℃의 건조 오븐에서 건조시킨 다음 1–3번 반복하여 제조하였다. 실온에서 NS-PG와 S-PG를 물, 30%와 70% 에탄올(시료/용매 비율, 1:10)로 24 h 교반 추출하였다(Kim *et al.*, 2013). 샘플 추출 후, 추출물을 여과하고, 진공

증발시켰다(Lee *et al.*, 2018). 추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, USA)에 용해되었다.

2. 세포배양

멜라노마(B16F10) 세포는 american type culture collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. B16F10 세포의 생육배지로 1% penicilin/streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS)가 포함된 Dulbecco's modified eagles medium (DMEM; Gibco, Canada)을 사용하였고 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.

3. 세포 생존율

B16F10 세포를 96-well plate에 1×10^4 cell/well로 분주하여 24 h 배양한 후 도라지 추출물(PGs)을 25–200 µg/mL 농도로 처리하고 1 h 후 멜라닌생성호르몬(α -melanocyte-stimulating hormone, α -MSH; Sigma-Aldrich)을 200 nM 농도로 처리하였다. 48 h 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS; Promega, USA) assay를 수행하여 multi plate reader (Biotek, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Melanin contents

멜라닌 함량 측정은 Hosoi 방법(Hosoi *et al.*, 1985)을 변형하여 사용하였다. B16F10 세포를 6-well plate에 1.0×10^5 cell/well로 분주하여, 24 h 배양한 후 PGs를 200 µg/mL 농도로 처리하고 1 h 후 α -MSH를 200 nM 농도로 처리하였다. 48 h 후 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Gibco)로 세포를 회수하여 1N sodium hydroxide (NaOH)로 90℃에서 1 h 동안 가열하여 세포를 용해하였다. Multi plate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Western blot analysis

B16F10 세포를 6-well plate에 1.0×10^5 cell/well로 분주하여, 24 h 배양한 후 PGs를 200 µg/mL로 처리하고 1 h 후 α -MSH 200 nM 농도로 각각 처리하였다. 시료 처리 48 h 후 PBS로 두 번 세척한 후, radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Cell Signaling Technology, USA)로 용해한 후 얼음에서 30 min 반응시켰다. 세포 용해용매를 4℃, 13,000 rpm에서 20 min 동안 원심분리하고, 상층액을 bradford 시약(Bio-Rad, USA)을 이용하여 단백질 정량을 하였다. 세포 용해용매를 5X laemmli buffer (iNtRON, Korea)와 혼합하여 95℃에서 5 min 가열 후 각 20 µg 단백질량에 해당하는 시료를 10% SDS-PAGE에서 전기영동 하여 분리하였다. 전

Figure 1. Cell viability of S-PG on α-MSH-treated B16F10 cells.

(A) NS-PG, (B) 1S-PG, (C) 2S-PG, and (D) 3S-PG. The B16F10 cells were incubated with cell viability was examined using MTS assay. Result are means±SD of three independent experiments. Significance was determined using ANOVA. S-PG, steamed *Platycodon grandiflorum*; NS-PG, non-steamed PG; 1S-PG, once-steamed PG; 2S-PG, twice-steamed PG; 3S-PG, thrice-steamed PG; α-MSH, α-melanocyte-stimulating hormone; ANOVA, analysis of variance; SD, standard deviation.

기영동 된 단백질은 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF; Millipore, Germany) 막에 옮겨 상온에서 30 min 동안 blocking (5% skim milk in TBST) 하였다. 1차 항체 (tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2; Cell signaling, Santa-Cruz, USA)를 1:1,000으로 희석하여 4% 에서 overnight 처리하였다. 이후 TBST로 10 min씩 3회 세척하고, 2차 항체(cell signaling technology) 1:2,000으로 희석하여 1 h 동안 반응시켰다. 이후 10 min 간격으로 TBST로 3회 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection kit (Bio-Rad)로 반응하였다. 단백질 발현은 chemiluminescence imaging systems (CAS-400MF; Davinch-K, Korea)로 확인하였다.

6. 통계학적 분석

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며, 평균(mean)±표준편차 (standard deviation, SD)로 표기하였다. One-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시하였고, Tukey Multiple Comparison test로 사후검증을 실시하였다. $p < 0.05$ 일 때, 통

계적으로 유의하다고 분석하였다.

Results and Discussion

1. PGs의 세포독성

PGs에 의한 B16F10 세포에 독성을 확인하기 위하여 B16F10 세포에 추출물을 각각 25, 50, 100 및 200 μg/mL의 농도로 처리한 후 MTS assay를 실시하였다. 본 실험결과, NS-PG는 95–108%, 1S-PG는 95–112%, 2S-PG는 93–106% 그리고 3S-PG는 96–104%의 세포 생존율로 확인되었다 (Figure 1). 모든 PGs 추출물은 200 μg/mL에서도 세포의 독성이 없는 것이 확인되었으며, 이러한 결과를 바탕으로 세포생존율에 영향을 주지 않는 농도인 200 μg/mL를 최종 농도로 사용하여 이후 연구를 진행하였다.

2. PGs의 멜라닌 생성 저해 효과

B16F10 세포에서 PGs의 미백 효과를 확인하기 위해 세포 내

Figure 2. Inhibitory effect of S-PG on melanin synthesis on α-MSH-treated B16F10 cells.

(A) NS-PG, (B) 1S-PG, (C) 2S-PG, and (D) 3S-PG. The B16F10 cells were incubated with α-MSH (200 nM) and PG extracts (200 μg/mL) for 48 h. Result are means±SD of three independent experiments. Significance was determined using ANOVA. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. α-MSH-treated control; ### $p < 0.001$ vs. non-treated control; S-PG, steamed *Platycodon grandiflorum*; NS-PG, non-steamed PG; 1S-PG, once-steamed PG; 2S-PG, twice-steamed PG; α-MSH, α-melanocyte-stimulating hormone; 3S-PG, thrice-steamed PG; ANOVA, analysis of variance; SD, standard deviation.

에서 생성되는 멜라닌 생합성 억제능을 확인하였다(Figure 2). 멜라닌의 생성을 촉진하기 위해 α-MSH 200 nM을 처리하였을 때, α-MSH 무처리군(27.2%)에 비해 처리군(100%)에서 멜라닌 양이 유의성 있게 증가하였으며, NS-PG 물 추출물, 30%, 70% 에탄올 추출물 순서로 각각 103.2%, 98.4%, 77.1%, 1S-PG 105.0%, 106.0%, 77.5%, 2S-PG 87.1% 98.2%, 80.8% 그리고 3S-PG 92.9%, 100.5%, 53.4%의 발현양을 확인하였다. 특히, 3S-PG 70% 에탄올 추출물에서 46.6%의 가장 높은 멜라닌 생성 억제를 하였다. NS-PG에 비해 증속 횟수가 늘어날수록 멜라닌 저해 활성이 높아지는 것을 확인할 수 있고 물 추출물에 비해 70% 에탄올 추출물에서 멜라닌 생성을 더 효과적으로 억제하였다. 3S-PG의 70% 에탄올 추출물이 양성대조군인 kojic acid 100 μg/mL (21.1%)에 비해 높은 저해 활성을 보였다(Ahn & Min, 2014). 3S-PG 70% 에탄올 추출물은 흑색 종 및 색소침착을 일으키는 멜라닌 합성을 억제하는데 효과적인 것으로 판단된다.

3. B16F10 cells에서 PGs의 멜라닌 관련 단백질 발현 억제 효과

멜라닌의 생성은 멜라노솜에서 형성되는 과정과 멜라닌 생성에 관련된 효소의 발현에 의해서도 조절되며(Choe & Choe, 2014), 멜라닌 생성 초기반응에서 작용하는 효소는 tyrosinase로 L-tyrosine을 L-DOPA로 하이드록실화 하고 L-DOPA는 TRP-1, TRP-2 등의 효소가 관여하여 최종적으로 멜라닌이 합성된다(Yoon *et al.*, 2013). 따라서 본 연구에서는 PGs 처리시 멜라닌 생합성 과정에서 중요한 역할을 하는 효소인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현양의 변화를 확인하기 위해 western blot을 통해 단백질 발현양을 확인하였다(Figure 3). 200 μg/mL의 농도에서 PGs 처리시 멜라닌 생성에 필수적인 인자인 tyrosinase의 발현은 NS-PG, 1S-PG 그리고 2S-PG 추출물은 억제활성이 없는 것으로 보였다. NS-PG 추출물은 에탄올 농도가 증가하여도 오히려 발현양이 증가하였다. 2S-PG의 추출물은 에탄올 농도가 증가할수록 tyrosinase의 발현이 줄어드는 경향을 보이긴 하였으나 70% 에탄올 추출물에서 발현양이 약 113%로 억제활성이 없는 것으로 나타났다. 3S-PG의 30%

Figure 3. Inhibitory effect of S-PG on the protein expression related melanin synthesis on α-MSH-treated B16F10 cells.

(A) Western blot tests denoting the related protein expression levels of tyrosinase, TRP-1, and TRP-2. (B-D) The graphs of the respective densitometric quantification of protein expression have been normalized against β-actin. The B16F10 cells were incubated with α-MSH (200 nM) and PG extracts (200 μg/mL) for 48 h. The cells were lysed with RIPA buffer. All the extract concentrations were 200 μg/mL. Results are given as mean±SD of three independent experiments. The significance was determined using ANOVA; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. α-MSH-treated control; ### $p < 0.001$ vs. non-treated control; S-PG, steamed *Platycodon grandiflorum*; NS-PG, non-steamed PG; 1S-PG, once-steamed PG; 2S-PG, twice-steamed PG; 3S-PG, thrice-steamed PG; TRP-1, tyrosinase-related protein-1; TRP-2, tyrosinase-related protein-2; α-MSH, α-melanocyte-stimulating hormone; ANOVA, analysis of variance; SD, standard deviation.

와 70% 에탄올 추출물에서는 tyrosinase의 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 특히 3S-PG 70% 에탄올 추출물에서 14.9%의 억제활성을 보였다. DHICA oxidase로 작용하는 멜라닌 합성 관여 인자인 TRP-1은 NS-PG와 1S-PG 추출물에서는 억제 활성이 없는 것으로 보였다. 2S-PG는 30%와 70% 에탄올 추출물이 각각 18.4%와 33.0%의 억제 활성을 나타냈다. 특히, 3S-PG의 30%와 70% 에탄올 추출물에서 66.7%와 65.1%로 가장 높은 억제 활성을 보였다. Dopachrome tautomerase로 작용하는 TRP-2는 NS-PG에서 물 추출물, 30% 에탄올 추출물 순으로 각각 11.9%, 9.7%의 억제활성을 보였지만 에탄올 농도가 증가할수록 발현양이 오히려 증가하였다. 1S-PG 에탄올 추출물에서는 발현양이 줄어들었으나 효과는 미미하였다. 2S-PG 물 추출물에서는 발현양이 증가하였지만 30% 에탄올 추출물과 70% 에탄올 추출물에서 각각 2.2%, 26%의 억제활성을 보였으며, 특히 3S-PG 추출물은 각각 35.9%, 43.0%, 46.5%로 가장 높은 억제활성을 보였다. 2S-PG와 3S-PG 추출물에서

는 에탄올의 농도가 증가할수록 효과적으로 발현양이 줄어들었다. TRP-2는 TRP-1과 유사하게 30%와 70% 에탄올 추출물에서 46.5%의 가장 높은 억제 활성을 보였다. 멜라닌 합성 단백질의 발현 활성의 결과를 정리하면, 3S-PG의 에탄올 추출물이 tyrosinase, TRP-1, TRP-2를 가장 높게 억제하는 것을 알 수 있었다. 이는 생도라지에 비해 증숙 도라지의 활성이 좋은 이유는 열처리를 하게 되면 다양한 화학적 변화가 일어나 생리활성 물질이 증가한다는 연구결과(Song *et al.*, 2018)와 증숙에 의하여 추출 효율이 증가하여 조사포닌 함량이 증가한다는 연구결과에 의해 유추할 수 있다(Lee *et al.*, 2013b). 또한 70% 에탄올 추출물의 활성이 좋은 이유는 에탄올의 농도가 증가할수록 조사포닌의 추출 수율 또한 증가했기 때문이라고 판단된다(Sung & Yang, 1985). 이에 따라 도라지를 증숙 할수록 증가된 사포닌 함량에 의해 미백 효과를 포함한 다양한 생리활성 효과가 증가한 것으로 생각된다(Jung *et al.*, 2011).

Conclusion

본 연구에서는 생도라지와 증숙 횟수에 따른 도라지 추출물의 미백활성을 비교하기 위하여 B16F10 cells에서의 세포독성평가, 멜라닌 생성 저해 효과 및 멜라닌 생성 관련 인자의 발현을 확인하였다. PGs는 200 µg/mL까지 세포독성을 나타내지 않았으며, 멜라닌 생성 저해능 측정결과, 3S-PG 70% 에탄올 추출물에서 멜라닌 생성을 약 46.6% 억제하여 미백제로 알려진 kojic acid 100 µg/mL (21.1%)에 비해 높은 저해 활성을 보였다. 또한 3S-PG 70% 에탄올 추출물 처리시 멜라닌 생성 관련 인자인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2를 각각 14.9%, 65.2%, 그리고 46.5%의 억제하였다.

결과를 종합하면 증숙 도라지 추출물은 멜라닌 형성을 억제할 뿐만 아니라 멜라닌 생성 관련 인자들의 발현 또한 조절하여 미백효과를 가지는 것으로 판단되며 이는 미백 기능성 화장품의 원료로써 이용 가능할 것이라고 예측된다.

Acknowledgements

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01273003)의 지원에 의해 이루어진 것임을 밝힙니다.

References

- Ahn JH, Min YH. Inhibitory effects of apricot seed essential oil on melanogenesis. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 12: 677-683, 2014.
- Choe Y, Choe TB. Melanogenesis inhibitory effects of *Allium hookeri* extract in B16F10 mouse melanoma cell. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 12: 163-168, 2014.
- Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Research*, 45: 1474-1478, 1985.
- Hwang CR, Oh SH, Kim HY, Lee SH, Hwang IG, Shin YS, Lee JS, Jeong HS. Chemical composition and antioxidant activity of Deoduk (*Codonopsis lanceolata*) and Doragi (*Platycodon grandiflorum*) according to temperature. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 40: 798-803, 2011.
- Jang TW, Park JH. Evaluation of whitening activities of flower and fruit of *Sophora japonica* L. *Korean Journal of Plant Resources*, 30: 22-28, 2017.
- Jeon S, Hwang W, Hong Y, Kim M, Ahn E, Park S. Inhibitory effects of *Hericium erinaceus* extracts on melanin synthesis and oxidative stress. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 14: 427-435, 2016.
- Jin Y, Ahn SY, Hong ES, Li GH, Kim EK, Row KH. Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect. *Applied Chemistry for Engineering*, 16: 348-353, 2005.
- Jung E, Hwang W, Kim S, Kim YS, Kim YS, Lee J, Park D. Depigmenting action of platycodin D depends on the cAMP/Rho-dependent signalling pathway. *Experimental Dermatology*, 20: 986-991, 2011.
- Jung YR, Kim DH, Kim SR, An HJ, Lee EK, Tanaka T, Kim ND, Yokozawa T, Park JN, Chung HY. Anti-wrinkle effect of magnesium lithospermate B from *Salvia miltiorrhiza* BUNGE: inhibition of MMPs via NF-kB signaling. *PLoS One*, 9: e102689, 2014.
- Kim GS, Lee DY, Lee SE, Noh HJ, Choi JH, Park CG, Choi SI, Hong SJ, Kim SY. Evaluation on extraction conditions and HPLC analysis method for bioactive compounds of *Astragali Radix*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 21: 486-492, 2013.
- Kim SY, Lee YJ, Park DS, Kim HR, Cho YS. Comparison of quality characteristics of *Platycodon grandiflorum* according to steaming and fermentation. *Korean Journal of Food Preservation*, 22: 851-858, 2015.
- Lee BJ, Jeon SH, Lee SW, Chun HS, Cho YS. Effect of drying methods on the saponin and mineral contents of *Platycodon grandiflorum* Radix. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 46: 636-640, 2014a.
- Lee BJ, Shin YY, Lee SW, Chun HS, Cho YS. Effects of storage methods and periods on root hardness and content of saponin in *Platycodon grandiflorum* Radix. *Korean Journal of Crop Science*, 59: 134-138, 2014b.
- Lee IS, Choi MC, Moon HY. Effect of *Platycodon grandiflorum* A. DC extract on the Bronchus diseases bacteria. *KSBB Journal*, 15: 162-166, 2000.
- Lee SJ, Bang WS, Hong JY, Kwon OJ, Shin SR, Yoon KY. Antioxidant and antimicrobial activities of black Doraji (*Platycodon grandiflorum*). *Korean Journal of Food Preservation*, 20: 510-517, 2013a.
- Lee SJ, Shin SR and Yoon KY. Physicochemical properties of

- black doraji (*Platycodon grandiflorum*). *Korean Journal of Food Science and Technology*, 45: 422-427, 2013b.
- Lee JY, Park JY, Lee DY, Kim HD, Kim GS, Lee SE, Seo KH. Anti-inflammatory effects of streamed *Platycodon grandiflorum* against UVB radiation-induced oxidative stress in human primary dermal fibroblast. *The Korean Journal of Food and Nutrition*, 31: 495-501, 2018.
- Lin YC, Lin YC, Kuo WW, Shen CY, Cheng YC, Lin YM, Chang RL, Padma VV, Huang CY, Huang CY. Platycodin D reverses pathological cardiac hypertrophy and fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *The American Journal of Chinese Medicine*, 46: 537-549, 2018.
- Oh TI, Yun JM, Park EJ, Kim YS, Lee YM, Lim JH. Plumbagin suppresses α -MSH-induced melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells by inhibiting tyrosinase activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 18: 320, 2017.
- Park JA. Melanin inhibitory activity and skin effect of *Rumex crispus* L. leaf extracts in B16F10 melanoma cellse. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 13: 509-515, 2015.
- Park SH, Hong Y, Choi YJ, Choi JH, Kim BK. Antiwrinkle effects of Mugwort (*Artemisia vulgaris*) extracts on UVB-irradiated hairless mouse skin. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 37: 1136-1141, 2008.
- Seo EJ, Hong ES, Choi MH, Kim KS, Lee SJ. Antioxidant and skin whitening effects of *Rhamnus yoshinoi* extracts. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 42: 750-754, 2010.
- Song MS, Kim MY, Jang GY, Lee YJ, Li M, Oh H, Lee J, Jeong HS. Changes in quality characteristics in the normal and etteum Doraji (*Platycodon grandiflorum*) by heat treatment. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 47: 462-467, 2018.
- Sung HS, Yang CB. Effect of ethanol concentration on saponin composition of red ginseng extract. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 17: 227-231, 1985.
- Yoon YM, Bae S, An S, Choe YB, Ahn KJ, An IS. Effects of ultraviolet radiation on the skin and skin cell signaling pathways. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 11: 417-426, 2013.

국문초록

B16F10 세포에서 증숙도라지 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과

박정용^{1,2}, 이지연^{1,2}, 이대영¹, 김형돈¹, 김금숙¹, 이승은¹, 서경혜^{1*}¹국립원예특작과학원 인삼특작부, 충청북도 음성군, 한국²충북대학교 식품공학과, 충청북도 청주시, 한국

목적: 본 연구의 목적은 생도라지에 비해 증숙 공정을 거친 도라지를 여러 농도의 에탄올로 추출하여 생리활성 효과를 비교 및 조사하여 미백 기능성화장품 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 한다. **방법:** B16F10 멜라노마 세포에서 도라지 추출물의 세포독성평가를 확인하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay를 수행하였다. 또한, 미백효과를 확인하기 위하여 멜라닌 생합성 함량 측정과 western blot을 통한 멜라닌 생성 관련 인자들의 단백질 발현을 측정하였다. **결과:** 도라지 추출물은 B16F10 멜라노마 세포에서 추출물에 의한 독성을 나타내지 않았다. 멜라닌 생합성 함량 측정 결과 생도라지에 비해 증숙 도라지 70% 에탄올 추출물에서 더 효과적으로 멜라닌 합성을 억제하였다. Tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), TRP-2, tyrosinase 또한 증숙 도라지 70% 에탄올 추출물에서 효과적으로 멜라닌 생성 관련 인자들의 발현을 억제하였다. **결론:** 이러한 결과는 증숙 공정을 거친 도라지 추출물은 α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH)에 의해 자극을 받은 B16F10 멜라노마 세포에서 멜라닌 생성을 억제하고, 이에 관련된 인자들의 발현을 억제함으로써 잠재적으로 미백효과에 효과적일 수 있음을 시사한다.

핵심어: 도라지, 멜라노마 세포, 멜라닌 함량, 단백질 발현, 미백

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01273003)의 지원에 의해 이루어진 것임을 밝힙니다.

참고문헌

- 김금숙, 이대영, 이승은, 노형준, 최재훈, 박춘근, 최수임, 홍승재, 김승유. 향기의 추출조건 및 유효성분의 HPLC 분석법 평가. *한국약용작물학회지*, 21: 486-492, 2013.
- 김소영, 이예진, 박동식, 김행란, 조용식. 증숙 및 발효에 따른 도라지의 품질특성 비교. *한국식품저장유통학회지*, 22: 851-858, 2015.
- 김은철, 안소영, 홍은숙, 이광화, 김은기, 노경호. 천연물에 포함된 미백성분의 추출 및 미백효과. *공업화학*, 16: 348-353, 2005.
- 박시향, 홍유미, 최영준, 최진호, 김병관. 자외선 조사 무모취 피부조직에 도포한 애엽(Mugwort) 추출물의 주름개선 효과. *한국식품영양과학회지*, 37: 1136-1141, 2008.
- 박주아. 소리쟁이 잎 추출물이 B16F10 세포의 멜라닌 형성 억제와 피부에 미치는 영향. *아시아뷰티화장품학술지*, 13: 509-515, 2015.
- 서은중, 홍은숙, 최민희, 김기선, 이성준. 짝자래나무 추출물의 항산화 및 미백 효과. *한국식품과학회지*, 42: 750-754, 2010.
- 성현순, 양차범. 추출 용매 에탄올의 농도가 홍삼 엑기스의 사포닌조성에 미치는 영향. *한국식품과학회지*, 17: 227-231, 1985.
- 송명섭, 김민영, 장귀영, 이윤정, Li Meishan, 오현아, 이준수, 정현상. 열처리법에 따른 일반도라지와 으뜸도라지의 품질 특성. *한국식품영양과학회지*, 47: 462-467, 2018.
- 안정현, 민유홍. 행인 정유의 멜라닌 생합성 저해 효과. *아시아뷰티화장품학술지*, 12: 677-683, 2014.

- 윤영민, 배승희, 안성관, 최용범, 안규중, 안인숙. 자외선(Ultraviolet)이 피부 및 피부세포 내 신호전달체계에 미치는 영향. *아시안뷰티화장품학술지*, 11: 417-426, 2013.
- 이병진, 신용옥, 이신우, 전현식, 조영손. 저장방법과 기간이 도라지 뿌리의 정도와 사포닌함량 미치는 영향. *한국작물학회지*, 59: 134-138, 2014b.
- 이병진, 전승호, 이신우, 전현식, 조영손. 도라지 뿌리의 건조방법에 따른 무기 성분 및 사포닌 함량의 변화. *한국식품과학회지*, 46: 636-640, 2014a.
- 이수진, 방우석, 홍주연, 권오준, 신승렬, 윤경영. 흑도라지의 항산화 및 항균 활성. *한국식품저장유통학회지*, 20: 510-517, 2013a.
- 이수진, 신승렬, 윤경영. 흑도라지의 이화학적 품질특성. *한국식품과학회지*, 45: 422-427, 2013b.
- 이인순, 최명철, 문혜연. 도라지(*Platycodon grandiflorum* A.DC) 추출액에 따른 기관지 질환 세균에 미치는 효과. *KSBB Journal*, 15: 162-166, 2000.
- 장태원, 박재호. 회화나무(*Sophora japonica* L.) 꽃(괴화)과 열매(괴각)의 미백활성 평가. *한국자원식물학회지*, 30: 22-28, 2017.
- 전세은, 황원정, 홍윤희, 김미정, 안은숙, 박세연. 노루궁뎅이 버섯 추출물의 멜라닌 생성 억제 및 항산화 효과. *아시안뷰티화장품학술지*, 14: 427-435, 2016.
- 최연선, 최태부. B16F10 mouse melanoma 세포에서 삼채(*Allium hookeri*) 추출물의 멜라닌 형성 억제 효과에 관한 연구. *아시안뷰티화장품학술지*, 12: 163-168, 2014.
- 황초롱, 오승희, 김현영, 이상훈, 황인국, 신유수, 이준수, 정현상. 열처리 온도에 따른 더덕과 도라지의 화학성분과 항산화활성. *한국식품영양과학회지*, 40: 798-803, 2011.

中文摘要

蒸桔梗提取物对B16F10细胞的黑素生成抑制作用

朴正龍^{1,2}, 李知娟^{1,2}, 李大永¹, 金炯敦¹, 金錦淑¹, 李承恩¹, 舒慇惠^{1*}

¹国立园艺和草药科学院人参作物研究部, 忠清北道阴城郡, 韩国

²忠北大学食品工学科, 忠清北道青州市, 韩国

目的: 本研究旨在通过三步蒸汽过程研究和比较生物活性成分在桔梗 (*Platycodon grandiflorum*, PG) 乙醇提取物中的作用。**方法:** 研究了在 α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) 诱导的B16F10黑色素瘤细胞中, PG和蒸汽PG提取物的细胞活力, 测定黑色素含量, 并利用蛋白质印迹法来检查蒸制的PG提取物的增白效果。**结果:** 用蒸汽PG (25-200 μ g/ mL) 处理 α -MSH诱导的B16F10黑色素瘤细胞时, 显示不影响细胞活力。蒸汽PG提取物有效地保护了黑色素的形成。此外, 蒸汽PG提取物抑制了众所周知的黑色素生成相关因子, 如酪氨酸酶和酪氨酸酶相关蛋白1和2。**结论:** 蒸汽PG提取物可能有效抑制 α -MSH诱导的B16F10黑色素瘤细胞的黑素生成和相关因子的表达, 从而具有潜在的美白功效。

关键词: 桔梗, 黑色素细胞, 黑色素含量, 蛋白质表达, 美白