

Inhibitory Effects of Carnosic Acid on Melanin Synthesis

Joong Hyun Shim

Department of Cosmetic Science, Semyung University, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea

Corresponding author: Joong Hyun Shim,
Department of Cosmetic Science, Semyung
University, 65 Semyung-ro, Jecheon-si,
Chungcheongbuk-do 27136, Korea
Tel.: +82 43 649 1615
Fax: +82 43 649 1730
Email: jhshim@semyung.ac.kr

Received February 09, 2022

Revised February 24, 2022

Accepted April 13, 2022

Published June 30, 2022



Abstract

Purpose: This research was carried out to ascertain the whitening effects of carnosic acid on a B16F1 mouse melanoma cell line. **Methods:** It involved quantitative assessments based on cell viability and assays of gene expression, tyrosinase enzyme activity, and melanin contents. The effects of carnosic acid on tyrosinase (TYR)/microphthalmia-associated transcription factor (MITF)/ tyrosinase-related protein 1 (TYRP1)/TYRP2 messenger ribonucleic acid expression levels and melanin content were determined. **Results:** Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (real-time qRT-PCR) showed that carnosic acid decreased the expression levels of TYR/MITF/TYRP1/TYRP2 and melanin content compared to alpha-melanocyte-stimulating hormone-treated B16F1 cells. The tyrosinase activity assay also revealed that carnosic acid decreased melanin production in B16F1 cells. **Conclusion:** These data indicate that carnosic acid increases the whitening effects on the B16F1 cells. Therefore, carnosic acid is a potential ingredient that can be used for skin whitening. Additionally, further research on the mechanisms of the action of carnosic acid should be conducted for the development of functional foods, cosmetics, and medicines.

Keywords: Carnosic acid, Whitening, Melanin, Microphthalmia-associated transcription factor, Tyrosinase

Introduction

소득수준이 향상되고 평균수명이 증가됨에 따라 건강에 관한 관심이 증대되고 있는 상황에서 건강기능식품, 천연추출물을 활용한 의약품 및 화장품 원료 발굴을 통해 피부의 노화를 억제하려는 연구가 증대되고 있다(Park *et al.*, 2004; Lintner *et al.*, 2009). 피부노화의 대표적인 원인 중 하나인 외인성 노화(extrinsic aging)는 자외선 (ultraviolet, UV)이 가장 큰 원인이다. UV에 과도하게 노출되거나, 적은 양이라도 지속적으로 노출되면 깊은 주름, 거친 피부, 홍반, 색소침착 등의 피부질환이 유발된다(Imokawa, 2009).

피부의 색은 혈액을 구성하는 헤모글로빈에 의해, 피하조직에 존재하는 β -카로틴 그리고 표피층에 존재하는 멜라닌 색소 등에 의해 결정된다. 그 중에서도 표피층의 멜라닌 색소의 양과 그 분포에 의하여 피부색이 주로 결정되게 된다. 멜라닌 색소는 UV를 받은 각질형성세포(keratinocyte)가 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)를 분비하여 멜라닌형성세포(melanocyte)의 멜라닌 생성(melanogenesis)을 유도하여 주변의 각질형성세포에

게 멜라닌 색소를 나누어 주게 된다. 멜라닌 색소는 표피층의 피부색을 어둡게 하지만 UV가 피부층에 침투하는 것을 막아주는 유익한 기능을 한다. 멜라닌 색소에는 검은색인 유멜라닌(eumelanin)과 검붉은색인 피오멜라닌(pheomelanin)으로 구성되어 있다(Ito & Wakamatus, 2003; Yoon *et al.*, 2013). 멜라닌의 생성과정은 주효소인 tyrosinase (TYR)가 L-tyrosine을 기질로 하여, tyrosinase related protein-1 (TYRP1), 그리고 TYRP2의 도움을 받아 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)라는 중간산물을 거쳐 dopaquinone으로 산화된 후에 추가적인 기전을 통해 최종적으로 피오멜라닌과 유멜라닌이 만들어 진다(Ito & Wakamatus, 2003; Yoon *et al.*, 2013). Tyrosinase 효소는 멜라닌 생성에서의 핵심적인 효소로 미백을 위한 주요 타겟이 된다. 대표적인 미백 소재인 다나무추출물, 알부틴(arbutin), 코직산(kojic acid), 유용성감초추출물, 에칠아스코빌 에텔 등은 멜라닌 생성의 주효소인 tyrosinase의 활성을 억제한다고 알려져 있다(Kim *et al.*, 2005; Baek *et al.*, 2009). 특별히 알부틴은 tyrosinase 효소의 기질인 L-tyrosine과 경쟁적으로 반응하여 tyrosinase의 활성을 억제하며, 코직산은 tyrosinase의 활성부

위에 결합하여 효소의 활성을 유도하는 구리 2가 이온을 chelating하여 L-DOPA와 dopaquinone의 생성을 억제한다고 알려져 있다. 이와 같이 코직산과 알부틴은 강력한 멜라닌 생성 억제 효과가 있다고 알려져 있지만, 피부자극 등의 안전성 문제가 제기되어 천연유래 신규 소재 발굴에 관한 많은 연구가 진행되고 있다(Han *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2015).

로즈마리(*Rosmarinus officinalis* L.)는 방향성을 지닌 상록과목이며 소나무 잎처럼 뾰족한 잎에 장뇌와 유사한 향이 나는 허브로 알려져 있다. 또한 로즈마리는 다년생 허브로서 예로부터 향수와 약용, 음식에 자주 이용되고 있다. 지중해 연안이 원산지이지만, 현재에는 인도, 중국, 북중미, 알제리의 사하라 지역, 북유럽 등 전세계적으로 재배되고 있다(Peng *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011). 로즈마리의 주요성분으로는 카르노스산(carnosic acid), carnosol, ursolic acid, rosmarinic acid (RA) 등의 폴리페놀(polyphenolic) 성분과 칼슘, 철, 망간, 인, 칼륨, 비타민 등이 있다고 보고된 바 있다(Cuvelier *et al.*, 1994; Duke, 1997). 특별히 로즈마리의 구성성분 중 diterpenoid의 한 종류인 카르노스산(Figure 1A)은 지방흡수의 억제, 강력한 항산화 작용, 항균 작용, 뇌손상 억제, antiangiogenic 효과 등의 생리학적 활성이 보고되어 있다(Ibañez *et al.*, 2000; Ninomiya *et al.*, 2004; Kayashima & Matsubara, 2012; Park & Mun, 2014; Zhang *et al.*, 2015).

카르노스산이 다양한 기능과 질화에 효과가 있음이 보고되어 있지만, 카르노스산이 피부 미백에 미치는 영향에 관한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 카르노스산의 멜라닌 생성 억제효과와 관련하여 마우스 유래 흑색종 세포주인 B16F1 세포주의 표지인자인 *TYR/MITF/TYRP1/TYRP2* 등의 발현에 영향을 끼치는지를 확인해 보고, α-MSH 자극에 의해 유발된 멜라닌 색소의 생산량이 카르노스산에 의해 감소되는지 입증하고자 한다. 이를 통해 카르노스산의 향후 미백관련 기능성 원료 및 바이오 소재로서의 가능성을 확인해 보고자 한다.

Materials and Methods

1. 실험재료 및 세포배양

마우스유래 melanoma 세포주인 B16F1 cell line (KCLB No.

80007)은 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Korea)에서 분양 받아 사용하였으며, 세포배양에 필요한 배지는 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM; Welgene, Korea)에 10%의 fetal bovine serum (FBS; Equitech-bio, USA), penicillin/streptomycin (Invitrogen, USA) 1%를 첨가하여 사용하였고, 100% 습윤상태에 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 배양하였다(Shim, 2019; Shim, 2021). 본 실험에 사용된 카르노스산은 로즈마리(*Rosmarinus officinalis* L.)에서 에탄올에 의해 추출된 소재로, ChemFaces Co. (China; CFN99102, Purity ≥ 98%)에서 구입하였다.

2. 카르노스산에 의한 세포 생존율 측정

카르노스산에 의한 세포 생존율을 측정하기 위하여 CCK-8 (cell counting kit-8, EZ-Cytox, DoGen, Korea) assay를 수행하였다. B16F1 세포(2.5 × 10⁴ 개)를 96 well plate에 접종한 후 카르노스산을 1000, 100, 10, 1 μg/mL, 100, 10, 1 ng/mL의 농도로 각각 처리하였다. 카르노스산을 농도 별로 처리한 B16F1 세포를 24 h 동안 인큐베이터에서 배양한 후, DMEM 배지(phenol red-free, Welgene)에 CCK-8 시약을 1/10로 희석, 세포에 처리하여 2 h 동안 인큐베이터에서 반응시켰다. 450 nm 파장에서 microplate reader (Epoch; BioTek, USA)로 흡광도를 측정하였으며, B16F1 세포를 배양하지 않고 배양배지만 처리한 흡광도를 기준으로 세포 생존율을 계산하였다(Shim, 2019; Shim, 2021).

3. Tyrosinase 효소 저해 활성

Tyrosinase from mushroom (T3824; Sigma, USA)는 276 units/mL의 농도로 0.67M PBS에 녹여 -20°C에 보관하고, 실험에 적용 시 빙상에서 녹여 사용하였다. L-tyrosine (Sigma)은 deionized water (Sigma)에 녹여 사용하였으며, 사용 직전에 제작하여 사용하였다.

150 μL의 mushroom tyrosinase (13.8 units/mL)를 0.067 M phosphate buffer를 넣은 후, 상온에서 5 min 간 선 반응시켰다. 추가로 L-tyrosine과 각각의 농도로 희석한 카르노스산을 100 μL씩 넣고 5 min 간 반응시킨 후에 475 nm 파장에서 microplate reader (Epoch; BioTek)로 흡광도를 측정하였다. 아래의 계산식을 이용하여 카르노스산의 tyrosinase 효소 저해율(%)을 도출하였다. 양성대조군으로는 kojic acid (100 μg/mL, Sigma)를 사용하여 카르노스산의

Table 1. Gene name and Assay ID number in real-time RT-PCR analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
<i>TYRP1</i>	Tyrosinase-related protein 1	Mm00453201_m1
<i>TYRP2</i>	Tyrosinase-related protein 2	Mm01225584_m1
<i>TYR</i>	Tyrosinase	Mm00495817_m1
<i>MITF</i>	Microphthalmia-associated transcription factor	Mm00434954_m1
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Mm99999915_g1

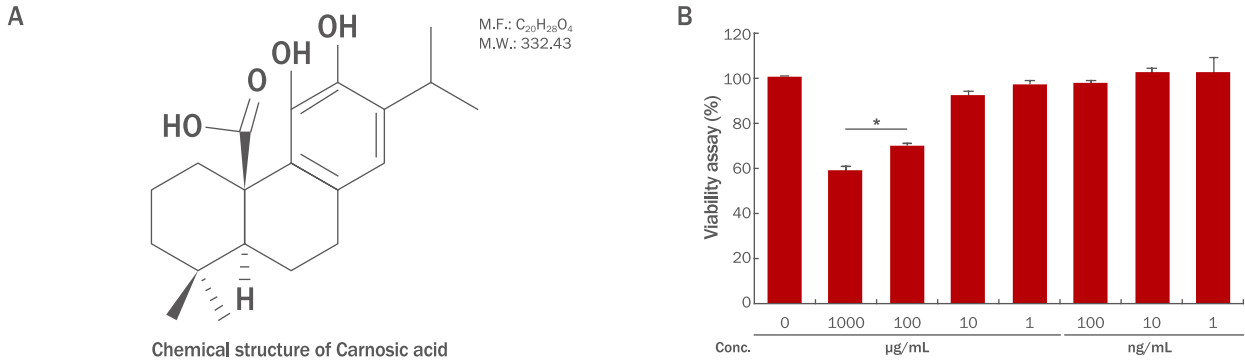


Figure 1. Chemical structure of carnosic acid and cytotoxicity aspects of carnosic acid on B16F1 cell line.

(A) The chemical structure of carnosic acid. (B) Cytotoxicity of carnosic acid. B16F1 cells were seeded (2.5×10^4 cells) in 96-well plate and treated with the carnosic acid for 24 h. Cell viability was measured by CCK-8 assay. Results are presented as the mean \pm S.D. of the percentage of control optical density in triplicates. * $p < 0.05$ compared to control.

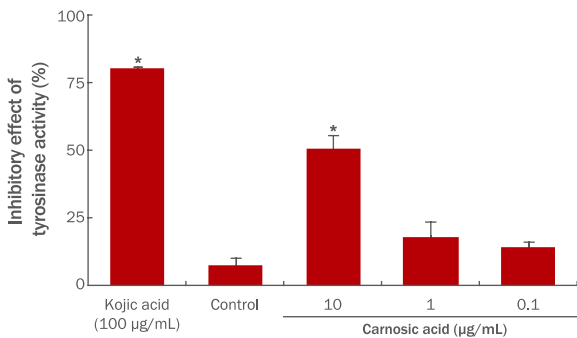


Figure 2. Tyrosinase activity inhibition effect of carnosic acid.

Results are the average of triplicate samples. * $p < 0.05$ compared with the control.

tyrosinase 효소 저해능을 비교하였다.

효소 저해율(%) = $(1 - \text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군의 흡광도}) \times 100$

4. RNA 추출 및 실시간 유전자 증합효소 연쇄반응(real-time qRT-PCR)

Invitrogen사의 TRIzol Reagent (USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA (2 µg)을 기질로 하여 Superior Script III Master Mix (Enzymomics, Korea)를 4 µL를 첨가하여 cDNA를 합성하였고(VeritiPro™ 96 well Thermal Cycler; Applied Biosystems, USA), B16F1 세포의 표지인자 발현을 확인하기 위하여 실시간 유전자 증합효소 연쇄반응(real-time qRT-PCR; Applied Biosystems)을 수행하였다. 본 실험에 사용된 Taqman® Gene expression assay (Applied Biosystems)는 Table 1에 표기하였다.

5. B16F1 세포의 melanin 생성량 측정

멜라닌 생성량의 측정은 Hosoi *et al.* (1985)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. B16F1 (1×10^5 개) 세포를 60 mm dish에 접종하였다. 24 h 동안 세포를 안정화한 후에 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH; Sigma, 200 nM)과 카르노스산을 각각 농도 별로 처리하였다. 각각의 시료를 72 h 동안 처리하고 난 후, 배지를 제거하고 PBS (Gibco, USA)로 3차례 수세한 후, 100 µL의 NaOH (1N, Sigma) 용액을 처리하여 60°C의 온도에서 2 h 동안 멜라닌을 용해시킨 후에 405 nm에서 microplate reader (Epoch; BioTek)로 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 100 µg/mL의 알부틴(Sigma)을 사용하였다. 카르노스산 처리에 의한 멜라닌 색소의 생성 저해는 α -MSH 처리조건을 기준으로 하여 멜라닌 생성량을 퍼센트(%)로 표시하였다.

6. 통계분석

모든 실험은 독립적으로 3 반복 실험을 하여 검증하였다. 통계처리 분석은 Student's *t*-test assay를 이용하였으며, 유의 수준은 0.05 ($p < 0.05$)로 하여 검정하였다.

Results and Discussion

1. 카르노스산 농도별 B16F1 세포주의 생존율 분석

B16F1 세포주에 대한 카르노스산의 세포독성 정도를 파악하기 위하여 CCK-8 assay를 실시하였다. 대조군은 카르노스산을 처리하지 않았고, 카르노스산 처리군은 각각 1000, 100, 10, 1 µg/mL, 100, 10, 1 ng/mL의 농도로 처리하여 세포생존율을 확인하였다(Figure 1B). 100 µg/ml 농도 이상의 카르노스산을 처리했을 때, B16F1 세포주의 생존율이 대조군 대비하여 유의성 있게 감소함을 확인할 수

Whitening Effects of Carnosic acid

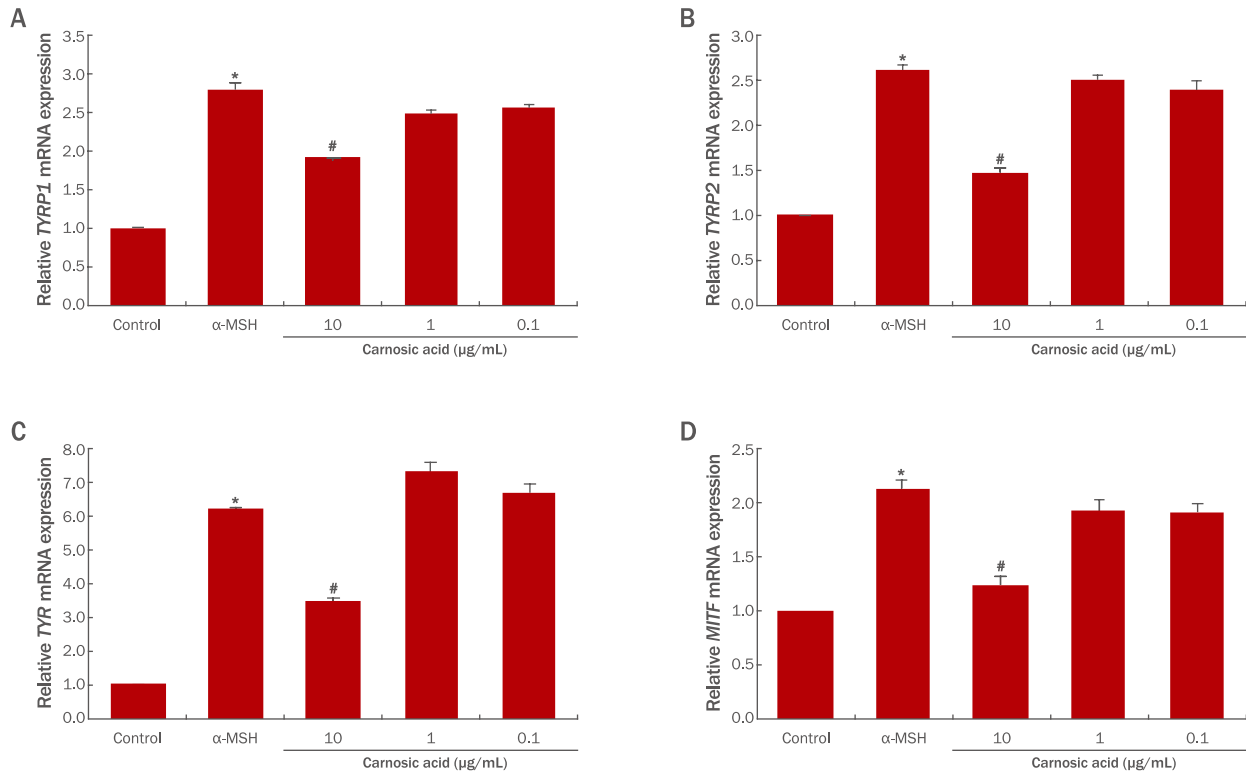


Figure 3. Characterization of carnosic acid treatment on α -MSH-treated B16F1 cells.

Real-time quantitative RT-PCR analysis of melanocyte markers *TYRP1* (A), *TYRP2* (B), *TYR* (C) and *MITF* (D). Values are mean \pm S.D. of three independent experiments. *significantly different compared to control, $p < 0.05$. #significantly different compared to α -MSH-treated condition, $p < 0.05$.

있었다(Figure 1B). 10 μ g/mL 이하 농도의 카르노스산 처리시에는 B16F1 세포의 생존율이 대조군과 비교하여 유사하였기에, 후속 실험에서는 10, 1, 0.1 μ g/mL 농도의 카르노스산을 처리하여 추가실험을 진행하였다.

2. 카르노스산에 의한 tyrosinase 효소 활성 저해 효과

본 실험에서 카르노스산이 tyrosinase 효소 활성 저해에 미치는 영향을 평가하기 위하여 양성대조군으로 코직산을 사용하였고, 10, 1, 0.1 μ g/mL 농도의 카르노스산을 각각 처리하여 tyrosinase 효소 활성 저해 정도를 확인한 결과, 카르노스산에 의해 tyrosinase의 활성이 저해됨을 확인할 수 있었다(Figure 2). 양성대조군인 코직산 처리군에서 78.3%의 tyrosinase 효소 저해효과를 확인하였고, 10 μ g/mL 농도의 카르노스산 처리군에서는 50.3%의 tyrosinase 효소 저해 효과를 나타냄을 통해 카르노스산이 미백 효과가 있음을 확인하였다.

3. 카르노스산 처리에 의한 B16F1 세포의 mRNA 발현

UV는 표피층에 존재하는 각질형성세포를 자극하여 α -MSH의 합성을 유도하여 각질형성세포의 외부로 분비하고, 분비된 α -MSH는 인근의 멜라닌형성세포 세포막에 존재하는 수용체인 melanocortin 1

receptor (MC1R)에 결합하여 멜라닌형성세포 내부로 멜라닌 합성에 관련된 신호를 전달하여 멜라닌 색소 생성을 유도한다(Yoon *et al.*, 2013). 본 실험에서는 B16F1 세포주의 멜라닌색소 생성을 유도하기 위하여 200 nM 농도의 α -MSH를 처리하여 B16F1 세포주의 흑화를 유도하였다. 흑화가 유발된 B16F1 세포주에 카르노스산을 처리하여 멜라닌 생성에 관여하는 표지인자인 *TYRP1*, *TYRP2*, *TYR*, *MITF* 유전자의 발현양상을 실시간 유전자 중합효소 연쇄반응(real-time RT-PCR) 기법을 통해 확인하였다. B16F1 세포주에 카르노스산을 처리한 후, 실시간 유전자 중합효소 연쇄반응 분석을 통해 표지인자의 발현을 확인한 결과, α -MSH 처리군 대비 카르노스산 처리군에서 *TYRP1*, *TYRP2*, *TYR*, *MITF*의 발현이 유의성 있게 감소하였다. 특별히 10 μ g/mL의 카르노스산 처리군에서 *TYRP1*, *TYRP2*, *TYR*, *MITF*의 발현이 각각 31.5, 43.5, 44, 42% 감소하는 우수한 효과를 보였다(Figure 3). 반면 상대적으로 낮은 농도인 1, 0.1 μ g/mL 농도의 카르노스산을 처리한 실험군에서는 위의 표지인자 발현이 감소되는 효과가 나타나지 않았다.

4. 카르노스산의 멜라닌 생성을 저하 효과

카르노스산의 처리가 멜라닌색소 형성에 필수적인 표지인자인

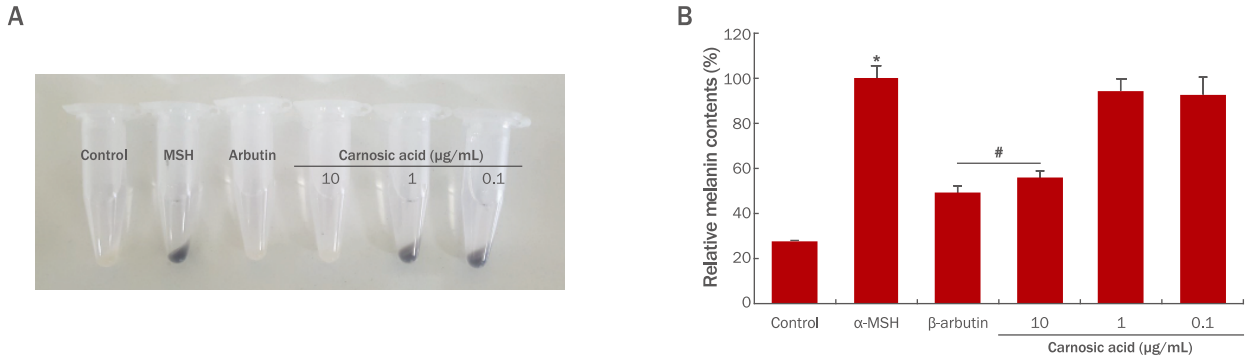


Figure 4. Melanin synthesis inhibition of carnosic acid on B16F1 cells.

Representative image of B16F1 cells after carnosic acid treatment (A). Treated cells were lysed with NaOH (1N) and absorbance was measured at 405 nm (B). Results are expressed as means±S.D. of three independent experiments. *compared to control, $p < 0.05$. #compared to α-MSH-treated condition, $p < 0.05$.

TYRP1, *TYRP2*, *TYR*, *MITF*의 발현량을 감소시킴을 확인한 이후 (Figure 3), 피부색을 결정하는 직접적인 인자인 멜라닌색소의 생성이 감소되는지를 확인하기 위하여 B16F1 세포에서 멜라닌색소의 생성 정도를 확인하였다(Figure 4). 카르노스산을 10, 1, 0.1 µg/mL 농도로 각각 처리한 B16F1 실험군을 수확하여 육안으로 멜라닌색소 생성 정도를 확인해 보았을 때, 10 µg/mL의 카르노스산을 처리한 실험군에서 멜라닌색소의 생성이 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다(Figure 4A). 정량적으로 멜라닌색소 생성량을 확인한 결과, 카르노스산 처리시 멜라닌색소의 생성이 α-MSH 처리군 대비 감소됨을 확인할 수 있었다(Figure 4B). 10 µg/mL의 카르노스산을 처리했을 때, 멜라닌색소의 생성률이 α-MSH 처리군 대비 44% 감소하였다(Figure 4B). 이러한 결과는 멜라닌색소 생성에 관여하는 핵심적인 표지인자의 발현에 대한 실시간 실시간 유전자 중합효소 연쇄반응 결과와 일치하며(Figure 3), 카르노스산이 유전자의 발현에 관여할 뿐만 아니라 멜라닌색소의 생성에도 일관성 있게 영향을 끼침을 확인하였다.

대표적인 항산화제인 ascorbic acid는 세포대사과정에서 부수적으로 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 제거하는 능력이 있으며, 멜라닌형성세포에서 멜라닌 생성과정 중의 중간 대사 물질인 dopaquinone을 L-DOPA로 환원시킴으로 멜라닌색소 합성을 억제시키는 중요한 미백소재로 널리 사용되고 있다(Tomita & Seiji, 1997; Panzella *et al.*, 2018). 카르노스산 역시 항산화효과가 있다고 보고되어 있으며, 이러한 항산화효과에 의해 카르노스산이 멜라닌형성세포에서 미백에 관여하는 효과가 있을 수 있다고 보여진다(Ibañez *et al.*, 2000). 추후 카르노스산에 의해 멜라닌형성세포에서 일어나는 항산화 효과 및 catalase, superoxide dismutase 1 (SOD1), SOD2, SOD3 등과 같은 세포 내 항산화효소의 발현 등에 미치는 영향에 대한 후속 연구도 진행되어야 할 것으로 보인다.

Conclusion

피부에 도달하는 UV는 비타민 D 합성과 살균작용 등의 유익한 기능을 가지고 있으면서 다른 측면으로는 탄력저하, 주름, 홍반, 색소 침착, 염증 등을 유발하고, 세포내 활성산소종의 생성을 통해 노화를 심화시킨다(Talwar *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2011). 또한 UV와 같은 외부자극에 의한 외인성 노화는 인체에 존재하는 구성세포의 정상적 기능저하 및 감소를 유발하여 건강하고 정상적인 조직으로의 기능을 약화시키고 조직이 손상되었을 때 재생을 하지 못하게 한다(Kirkwood, 2005; Jones & Rando, 2011). 본 연구를 통해 카르노스산은 10 µg/mL 이하의 농도에서는 세포의 생존에 영향을 미치지 않음을 Figure 1을 통해 확인할 수 있었다. Tyrosinase 효소의 활성 억제효능 측정결과에서 10 µg/mL 농도의 카르노스산이 tyrosinase 효소의 활성을 유의성있게 감소시킴을 확인하였다(Figure 2). 또한 표지인자인 *TYRP1*, *TYRP2*, *TYR*과 *MITF*의 발현을 분석한 결과, 카르노스산이 α-MSH에 의해 증가된 유전자의 발현을 유의성 있게 감소시킴을 알 수 있었다(Figure 3). 추가적으로 카르노스산이 B16F1 세포주에서 멜라닌색소를 감소시킴을 확인하였다(Figure 4). 이러한 결과를 바탕으로 카르노스산이 새로운 미백 후보물질로서의 가능성을 보여준다.

본 연구는 카르노스산이 피부 노화, 특별히 멜라닌 생성을 억제시킬 수 있음을 제시한 결과라고 보여진다. 추가적으로 카르노스산이 B16F1 세포 내부에서 어떠한 신호전달 기전에 의해 멜라닌 생성을 억제시키는 지, 그리고 카르노스산이 멜라닌형성세포에 내부에 존재하는 항산화효소에 끼치는 영향에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

Acknowledgements

본이 논문은 2022학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

Author's contribution

JHS designed, performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. All figures are created by the author.

Author details

Joong Hyun Shim (Professor), Department of Cosmetic Science, Semyung University, 65 Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do 27136, Korea.

References

- Baek YS, Ryu YB, Curtis-Long MJ, Ha TJ, Rengasamy R, Yang MS, Park KH. Tyrosinase inhibitory effects of 1,3-diphenylpropanes from *Broussonetia kazinoki*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17: 35-41, 2009.
- Cuvelier ME, Berset C, Richard H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 665-669, 1994.
- Duke JA. The green pharmacy. Rodale Press, New York, pp6-23, 1997.
- Han NK, Park CM, Kwon JC, Joung MS, Choi JW. Whitening effect of *Fagopyrum tataricum* extract. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 40: 179-186, 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.
- Ibañez E, Cifuentes A, Crego AL, Señorán FJ, Cavero S, Reglero G. Combined use of supercritical fluid extraction, micellar electrokinetic chromatography, and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4060-4065, 2000.
- Imokawa G. Possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis: expression of a deacylase enzyme that cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. *Journal of Dermatological Science*, 55: 1-9, 2009.
- Ito S, Wakamatsu K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Research*, 16: 523-531, 2003.
- Jones DL, Rando TA. Emerging models and paradigms for stem cell ageing. *Nature Cell Biology*, 13: 506-512, 2011.
- Kayashima T, Matsubara K. Antiangiogenic effect of carnosic acid and carnosol, neuroprotective compounds in rosemary leaves. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76: 115-119, 2012.
- Kim HJ, Seo SH, Lee B, Lee YS. Identification of tyrosinase inhibitors from *Glycyrrhiza uralensis*. *Planta Medica*, 71: 785-787, 2005.
- Kim J, Lee CW, Kim EK, Lee SJ, Park NH, Kim HS, Kim HK, Char K, Jang YP, Kim JW. Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 137: 427-433, 2011.
- Kim BY, Park SH, Park BJ, Kim JJ. Whitening effect of Androsace umbellata extract. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 41: 21-26, 2015.
- Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell*, 120: 437-447, 2005.
- Lintner K, Mas-Chamberlin C, Mondon P, Peschard O, Lamy L. Cosmeceuticals and active ingredients. *Clinical Dermatology*, 27: 461-468, 2009.
- Liu T, Sui X, Zhang R, Yang L, Zu Y, Zhang L, Zhang Y, Zhang Z. Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 1218: 8480-8489, 2011.
- Ninomiya K, Matsuda H, Shimoda H, Nishida N, Kasajima N, Yoshino T, Morikawa T, Yoshikawa M. Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14: 1943-1946, 2004.
- Panzella L, Ebato A, Napolitano A, Koike K. The late stages of melanogenesis: exploring the chemical facets and the application opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 1753, 2018.
- Park SK, Kim SN, Lee JC, Kim HS, Kim YJ, Lee BG, Chang IS. Anti-aging effect on skin with Jaeum-Dan (JED). *The Korean Journal of Herbology*, 19: 67-76, 2004.
- Park MY, Mun ST. Carnosic acid inhibits TLR4-MyD88 signaling pathway in LPS-stimulated 3T3-L1 adipocytes. *Nutrition*

- Research and Practice*, 8: 516-520, 2014.
- Peng CH, Su JD, Chyau CC, Sung TY, Ho SS, Peng CC, Peng RY. Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71: 2223-2232, 2007.
- Shim J. Whitening effect of brazilin in B16F10 cells. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 17: 287-294, 2019.
- Shim J. Anti-aging effect of ganoderol A in UVA-irradiated normal human epidermal keratinocytes. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 19: 57-64, 2021.
- Talwar HS, Griffiths CE, Fisher GJ, Hamilton TA, Voorhees JJ. Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 105: 285-290, 1995.
- Tomita Y, Seiji M. Inactivation mechanism of tyrosinase in mouse melanoma. *The Journal of Dermatology*, 4: 245-249, 1977.
- Yoon Y, 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.
- Zhang D, Lee B, Nutter A, Song P, Dolatabadi N, Parker J, Sanz-Blasco S, Newmeyer T, Ambasudhan R, Mckercher SR, et al. Protection from cyanide-induced brain injury by the Nrf2 transcriptional activator carnosic acid. *Journal of Neurochemistry*, 133: 898-908, 2015.

국문초록

카르노스산의 멜라닌생성 억제활성

심중현

세명대학교 화장품과학과, 충청북도 제천시, 한국

목적: 본 연구는 카르노스산이 B16F1 세포의 미백 효과를 확인하기 위하여 수행되었다. **방법:** MSH에 의해 유도된 B16F1 세포의 흑화가 카르노스산에 의해 완화되는지 여부를 확인하기 위해서 카르노스산의 농도별 세포 생존률, 티로시나제 활성도 억제, 멜라닌 생성을 유도하는 mRNA의 발현 양상, 멜라닌 단백질의 생성 정도를 확인하였다. **결과:** 카르노스산의 미백 효과를 확인하기 위하여 티로시나제 활성도를 측정된 결과, 10 µg/ml의 카르노스산을 처리한 조건에서 50.3%의 티로시나제 활성도를 억제하는 효과를 보였다. 또한 *TYRP1/TYRP2/TYR/MITF*의 유전자 발현을 확인한 결과, MSH에 의해 증가한 유전자의 발현이 카르노스산에 의해 각각 31.5%, 43.5%, 42%, 44% 감소하였다. B16F1 세포의 멜라닌생성에 카르노스산이 미치는 영향을 확인한 결과, 10 µg/mL의 카르노스산을 처리하였을 때 44%의 멜라닌형성 억제 효능을 보임을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구자는 카르노스산의 미백 효능을 확인하였다. **결론:** 본 연구결과를 통하여 카르노스산의 미백 효능을 확인하였고, 향후 카르노스산이 화장품 및 건강식품과 의약품의 개발에 응용될 수 있는 소재로서의 가능성을 확인하기 위해 추가적인 기전연구가 필요할 것으로 생각된다.

핵심어: 카르노스산, 미백, 멜라닌, *MITF*, *TYR*

이 논문은 2022학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

참고문헌

- 김보윤, 박성하, 박병준, 김진준. 봄맞이 추출물의 미백 효능 연구. *대한화장품학회지*, 41: 21-26, 2015.
- 박성규, 김수남, 이종찬, 김한성, 김연준, 이병곤, 장이섭. 자음단이 피부의 노화에 미치는 영향. *대한본초학회지*, 19: 67-76, 2004.
- 심중현. B16F10 세포에서 브라질린의 미백효능. *아시아뷰티화장품학술지*, 17: 287-294, 2019.
- 심중현. 자외선 조사에 의해 노화된 인간각질형성세포에서 Ganoderol A의 항노화효능. *아시아뷰티화장품학술지*, 19: 57-64, 2021.
- 윤영민, 배승희, 안성관, 최용범, 안규중, 안인숙. 자외선이 피부 및 피부세포 내 신호전달체계에 미치는 영향. *아시아뷰티화장품학술지*, 11: 417-526, 2013.
- 한나경, 박창민, 권주찬, 정민석, 최종완. 슌메밀 추출물의 미백 개선 효과. *대한화장품학회지*, 40: 179-186, 2014.

中文摘要

鼠尾草酸对黑色素合成的抑制作用

沁重鉉

世明大学化妆品科学系, 忠清北道提川市, 韩国

目的: 本研究旨在确定鼠尾草酸对B16F1小鼠黑色素瘤细胞系的美白作用。**方法:** 测定细胞活力以及基因表达、酪氨酸酶活性和黑色素含量的测定。确定了鼠尾草酸对酪氨酸酶 (*TYR*)/小眼相关转录因子 (*MITF*)/酪氨酸酶相关蛋白 1(*TYRP1*)/*TYRP2* mRNA表达水平和黑色素含量的影响。**结果:** 实时定量逆转录聚合酶链反应(实时qRT-PCR)表明, 与 α -黑素刺激激素处理的B16F1细胞相比, 鼠尾草酸降低了*TYR*/*MITF*/*TYRP1*/*TYRP2*的表达水平和黑色素含量。酪氨酸酶活性测定还显示鼠尾草酸减少 B16F1 细胞中黑色素的产生。**结论:** 这些数据表明鼠尾草酸增加了对B16F1细胞的美白效果。因此, 鼠尾草酸是一种可用于皮肤美白的潜在成分。此外, 还应进一步研究鼠尾草酸的作用机制, 以开发功能性食品、化妆品和药物。

关键词: 鼠尾草酸, 美白, 黑色素, 小眼相关转录因子, 酪氨酸酶

