



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.




변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

The logo of Jeju National University, featuring a stylized flame or 'J' shape with the text 'JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952' and 'JEJU 1952' inside.

碩士學位論文

B16F10 cell 에서 백수오
(*Cynanchum wilfordii* Radix)
추출물 및 단일화합물의
미백 효능평가

濟州大學校 大學院

食品工學科

金址炫

2012年 2月



B16F10 cell 에서 백수오(*Cynanchum wilfordii* Radix)추출물 및 단일화합물의
미백 효능평가

指導教授 高 榮 煥

金 址 炫

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2012年 2月

金址炫의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ ㉠

委 員 _____ ㉠

委 員 _____ ㉠

濟州大學校 大學院

2012年 2月

Inhibitory Effect on Melanogenesis of Extract
and Compounds Isolated from *Cynanchum*
wilfordii Radix in B16F10 cells

Jihyeon Kim

(Supervised by professor Young hwan Ko)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of
Master of Engineering

2012. 2.

This thesis has been examined and approved.

Jin-Hwan Ha, Thesis director, Prof. of Food Science and Engineering

Eun-Jin Park, Prof. of Food Science and Engineering

Young Hwan Ko, Prof. of Food Science and Engineering

February 2012

Department of Food Science and Engineering

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

LIST OF TABLES	iii
LIST OF FIGURES	iv
ABSTRACT	vi
1. 서론	1
2. 재료 및 방법	4
2.1. 시료	4
2.2. 시료의 추출 및 유효성분 분리	4
2.2.1. 백수오의 70% 메탄올 추출 및 용매분획	4
2.2.2. 에틸아세테이트 분획물에서 유효성분 분리과정	4
2.3. HPLC를 이용한 성분분석	7
2.3.1. 분석시료	7
2.3.2. HPLC 분석조건	7
2.4. 미백효과 측정	8
2.4.1. Tyrosinase 효소활성 측정	8
2.4.2. 세포 배양	8
2.4.3. 세포독성 평가	8
2.4.4. 멜라닌 합성 저해율 측정	9
2.4.5. 세포내 tyrosinase 생성 저해율 측정	9
2.4.6. Western blot analysis	9
2.4.7. 통계분석	10
3. 결과 및 고찰	11
3.1. HPLC를 이용한 성분함량 분석	11
3.2. Compound 1 및 Compound 2의 분리 및 구조동정	14
3.2.1. compound 1의 분리 및 구조동정	14
3.2.2. compound 2의 분리 및 구조동정	17



3.3. 백수오 추출물의 tyrosinase 저해활성 측정	20
3.3.1. 백수오의 70% 메탄올 추출물과 용매분획물의 tyrosinase 저해활성	20
3.3.2. Compound 1, 2의 tyrosinase 저해활성	21
3.4. 백수오 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향	23
3.4.1. 백수오의 70% 메탄올 추출물과 용매분획물이 세포 생존율에 미치는 영향	23
3.4.2. Compound 1, 2의 세포 생존율에 미치는 영향	23
3.5. 백수오 추출물의 멜라닌 생성 억제효과	26
3.5.1. 백수오의 70% 메탄올 추출물과 용매분획물의 멜라닌 생성 억제효과	26
3.5.2. Compound 1, 2의 멜라닌 생성 억제효과	26
3.6. 백수오 추출물의 세포내 tyrosinase 저해활성	32
3.6.1. 백수오에서 분리된 compound 1, 2의 세포내 저해활성	32
3.7. 멜라닌 합성관련 단백질 발현 억제효과	35
4. 요약	37
5. 참고문헌	38

LIST OF TABLES

Table 1. Solvent gradient for elution of *Cynanchum wilfordii* extract from vacuum liquid chromatography.....5

Table 2. Conditions for HPLC analysis.....7

Table 3. Mobile phase conditions for HPLC gradient elution.....7

Table 4. NMR data for compound 1 from *C. wilfordii*.....15

Table 5. NMR data for compound 2 from *C. wilfordii*.....18

Table 6. Inhibitory effects of *C. wilfordii* 70% methanol extract and extraction solvents on tyrosinase activity in cell-free system 20

Table 7. Inhibitory effects concentrations of ethyl acetate, compound 1 and 2 of *C. wilfordii* on tyrosinase activity in cell-free system 22

Table 8. Inhibitory effects of sub-fractions of *C. wilfordii* extract on tyrosinase activity in cell-free system..... 22

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Procedure for fractionation of methanol extract from <i>Cynanchum wilfordii</i> .	6
Fig. 2. HPLC chromatograms of 70% methanol extract(A) and ethyl-acetate fraction(B) of <i>C. wilfordii</i> .	12
Fig. 3. HPLC chromatograms of compound 1(A) and compound 2(B) of <i>C. wilfordii</i> .	13
Fig. 4. Structure of p-hydroxyacetophenone.	15
Fig. 5. ¹ H-NMR spectrum for compound 1 from <i>C. wilfordii</i> .	16
Fig. 6. ¹³ C-NMR spectrum for compound 1 from <i>C. wilfordii</i> .	16
Fig. 7. Structure of cynandione A	18
Fig. 8. ¹ H-NMR spectrum for compound 2 from <i>C. wilfordii</i> .	19
Fig. 9. ¹³ C-NMR spectrum for compound 2 from <i>C. wilfordii</i> .	19
Fig. 10. Effects of <i>C. wilfordii</i> extracts on cell viability.	24
Fig. 11. Effects of concentration ethyl acetate fraction on cell viability.	24
Fig. 12. Effects of concentration compound 1 on cell viability.	25
Fig. 13. Effects of concentration compound 2 on cell viability.	25
Fig. 14. Inhibitory effect on melanogenesis of methanol extract and solvent fractions of <i>C. wilfordii</i> in B16F10 cells.	28
Fig. 15. Inhibitory effect on melanogenesis of ethyl acetate fraction of <i>C. wilfordii</i> in B16F10 cells.	29
Fig. 16. Inhibitory effect on melanogenesis of compound 1 of <i>C. wilfordii</i> in B16F10 cells.	30
Fig. 17. Inhibitory effect on melanogenesis of compound 2 of <i>C. wilfordii</i> in B16F10 cells.	31
Fig. 18. Inhibitory effect on tyrosinase of compound 1 of <i>C. wilfordii</i> in B16F10 cells.	33

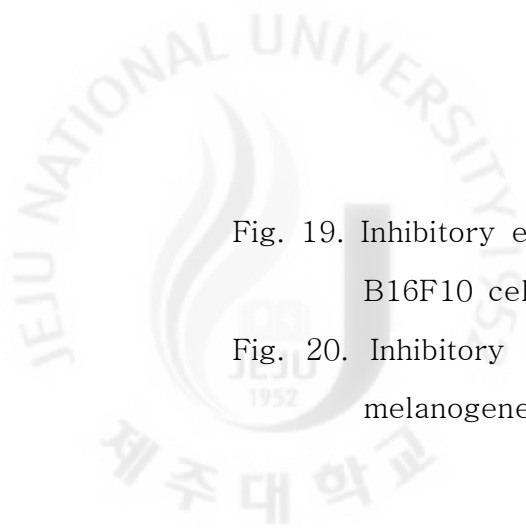


Fig. 19. Inhibitory effect on tyrosinase of compound 2 of *C. wilfordii* in B16F10 cells. 34

Fig. 20. Inhibitory effect of compound 2 on the protein level related melanogenesis in B16F10 cells..... 36

ABSTRACT

Melanogenesis is a well-known physiological response of human skin that exposure to ultraviolet light, for genetic reasons, or due to other causes. therefore In this study, we assessed the effects of *C. wilfordii* on melanogenic protein expression of murine B16F10 melanoma cells. We obtained an *C. wilfordii* extract by treatment with 70% MeOH and then successively partitioned it with n-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH and water. Present results indicated that the EtOAc fraction of the *C. wilfordii* extract was effectively inhibited melanogenesis murine B16F10 melanoma cells. Further Vacuum Liquid chromatography on revers phase silicagel separation of this fraction afforded a p-hydroxyacetophenone and cynandione A. Two compounds effect on melanin formation was assessed. Results indicated that cynandione A was shown to down regulate melanin content in a dose-dependent pattern. To clarify the target of cynandione A action in melanogenesis, we performed Western blotting for tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), TRP-2, and microphthalmia-associated factor (MITF), which are key melanogenic enzymes. Cynandione A inhibited tyrosinase, TRP-1, TRP-2, and MITF expressions in a dose-dependent manner. Therefore, this study suggests that cynandione A is a candidate anti-melanogenic agent, and it might be effective in hyperpigmentation disorders.

1. 서 론

최근 화학합성 원료에 의한 유해성 문제가 제기되면서 화학약품이 아닌 천연의 기능성 물질을 포함하는 의·약품이나 식품, 농약 등의 사용이 늘고 있다. 현대 사회는 의학기술과 경제의 발달로 인해 건강에 대한 인식이 확산되고 높은 삶의 질을 요구하고 있으며, 이에 따라 질병의 예방과 개선을 위해 동, 식물로부터 얻어지는 생리활성 물질들을 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 화장품 산업에는 약품의 기능이 첨가된 기능성 화장품 혹은 약용화장품의 개념이 도입되어 폭 넓게 이용되고 있으며, 천연재료의 기능성화장품에 대한 응용은 피부 노화방지, 미백, 주름개선 등의 기능에 초점이 맞추어져 있다(1). 그 중 미백화장품은 외모에 대한 관심이 증가하고, 희고 고운 피부에 대한 열망이 높아짐에 따라 관심이 증가하고 있고 우리나라와 동양인 여성들에게 큰 관심을 끌고 있다.

사람의 피부색은 환경, 인종, 성별 등의 요인과 표피에 존재하는 멜라닌 색소, 피하조직에 있는 카로틴 및 혈관 속에 함유된 산화-환원된 헤모글로빈 양과 멜라닌이 분해된 멜라노이드 등 여러 가지 요인에 의해 결정되지만 피부의 색소 침착은 표피 내 멜라닌 색소의 이상적 증가에 기인한다(3). 멜라닌은 피부, 머리 카락, 눈동자 등 생물체에 널리 분포되어 있는 색소 성분으로 인체 내에서는 피부표피층의 멜라노사이트(melanocyte)라는 멜라닌형성세포 내의 멜라노솜(melanosome)에서 합성되는데, 티로신(tyrosine)을 전구물질로 tyrosinase 효소에 의해 3,4-dihydroxy-phenylalanine(DOPA) 또는 DOPA quinone으로 산화되어 중합반응에 의해 멜라닌이 생합성 된다(4). 이때 생성된 멜라닌은 피부색을 검게 하므로 tyrosinase를 효과적으로 저해하는 생리활성물질을 탐색하는 실험이 미백효과를 찾아내는데 있어 유용한 연구방법으로 평가받고 있다(5). 멜라닌 생성을 조절하는 것으로는 자외선, cytokine, growth factor 및 호르몬 등이 있으며 중요한 역할을 하는 호르몬으로 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)이 있다(6,7). α -MSH는 세포내 cAMP를 증폭시켜 protein kinase A의 활성화를 유도하며 멜라닌 세포에 전사인자인 microphthalmia associated

transcription factor(MITF)의 발현을 증가시킨다(8). 또한 MITF는 멜라닌생성 관련인자인 tyrosinase와 TRP(Tyrosinase Related Protein)의 발현을 자극하여 멜라닌 생성을 조절한다(9). 이와 같이 피부 착색과 미백에 대한 관심이 높아지면서 멜라닌 생성을 억제시키는 물질을 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며 특히 안정적이고 효과적으로 억제시킬 수 있는 미백소재인 천연물로 분리된 물질을 찾기 위한 연구가 이루어지고 있다. 최근, 솔잎의 항산화 성분으로 알려진 furanone이 α -MSH에 의해 활성화된 cAMP 생성을 억제시키고, tyrosinase 및 MITF 발현을 억제시킨다고 보고하였다(10). 또한 세신 추출물이 α -MSH에 의해 유도된 tyrosinase 활성화와 멜라닌생성을 억제시킨다고 보고되었고(11), 목단피 물 추출물이 tyrosinase 및 tyrosinase mRNA발현에 억제효과가 있는 것으로 보고되었다(12). 미백 화장품 개발 소재로 이용되고 있는 약용식물, 한방 생약재에 관한 문헌을 근거로 한 tyrosinase 활성 저해효과는 메탄올 추출물인 갈근 25%, 후박3%, 에탄올 추출물인 창출 14%, 갈근 10% 및 수용성 추출물인 상백피 63%, 작약 44%, 당귀 39% 등은 비교적 낮은 저해활성을 나타내었으며 (13), 감초, 복분자 및 상백피 추출물에서 각각 67.29%, 65.37% 및 68.23%의 tyrosinase 활성 저해효과가 있었다고 보고되었다(14).

현재 기능성화장품 원료의 유효성과 안전성은 한국식품의약품안전청(KFDA)의 허가를 받아 고시되고 있고, 미백 기능성 원료로 고시된 성분으로는 tyrosinase 활성을 저해하는 알부틴, 유용성 감초추출물, 닥나무 추출물, 3-etyoxy-vit C 등이 대표적이다. 또한 약용식물로부터 미백소재를 탐색하고자 하는 연구도 많이 진행되고 있으며 eallogic acid 및 cinnamaldehyde, p-hydroxy benzoic acid, p-anicic acid 등도 미백 활성이 있음이 확인되었다. 최근에는 백출(*Atractylodes rhizoma*)로부터 selina란 물질을 분리하여 미백화장품 개발에 성공한 예가 있다.

백수오(*Cynanchum wilfordii* Radix)는 은조롱(*Cynanchum wilfordii* Hemsley)의 덩이뿌리로서 박주가리과 (Asclepiadaceae)에 속하는 다년생 덩굴성 초본으로 우리나라 전국산지에 자생하거나 재배되고 있다. 한방에서는 연년불로, 고혈압, 당뇨병, 건망증 등에 사용하고 있는 중요한 국산 생약으로 자양, 강장, 보혈, 조기백발 등의 효능을 지니고 있다(2). 백수오의 성분으로는 steroidal

alkaloid로서 gagaminine 및 이의 배당체와 wilfoside KIN, wilfoside SIN 및 cynauricoside A 등과 sarcostine, penupogenin과 같은 유도체 등이 보고되었으며 이외에도 cynandione A와 cynanchone A등을 비롯한 수종의 acetophenone류 화합물과 benzoquinone류 화합물도 보고되었다(16~20). 또 백수오 성분중의 gagaminine이 자유라디칼(free radical) 생성계 효소의 하나인 aldehyde oxidase를 강력히 억제하였으며 과산화지질의 생성도 크게 감소시킴을 보고하였고(17), cynandione A는 신경세포의 손상을 억제한다(21)고 보고되는 등 항산화 활성에 효과적인 것으로 알려져 있으며 고지사료와 알코올 투여로 유발된 고지혈증과 간 손상 예방에 효과가 있다는 보고도 있다(15). 그러나 민간요법에서 조기백발을 억제하는 약으로 사용되고 있는 백수오의 어떠한 활성과 기전에 대해 보고된 바가 없다.

이에 본 연구에서는 백수오의 미백활성을 구명하기 위하여 백수오 추출물을 제조하여 B16F10 mouse melanoma cell에서의 효과를 조사하였으며 그 중에서 유효한 활성이 검색되었던 ethyl acetate 분획물에 대한 활성성분을 분리하여 그 구조를 동정하였다. 또한 분리된 화합물에 대한 멜라닌 생성 억제효과와 관련 기전을 규명하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료

실험에 사용된 백수오는 3년생으로 제주특별자치도 농업기술원 농산물원종장에서 제공받았으며, 40℃에서 72시간 열풍건조하고 분쇄한 후 4℃ 냉장보관 하여 사용하였다.

2.2. 시료의 추출 및 유효성분 분리

2.2.1. 백수오의 70% 메탄올 추출물 및 용매분획

백수오(*C. wilfordii* Radix) 건조분말 2.5kg을 70% 메탄올 55L에 침지하고 실온에서 48시간 교반하여 침출시킨 시료를 감압여과 장치를 통하여 여액을 취해 감압농축 하였으며, 분리된 잔사는 동일한 조건으로 2회 반복하여 추출하였다. 이 과정을 통해 70% 메탄올 추출물 770g을 얻었다. 70% 메탄올 추출물을 20% 메탄올에 1L에 현탁시키고, 분별 깔대기를 이용해 각각 1L씩 n-hexane 층, methylene chloride 층, ethyl acetate 층, n-butanol 층 및 H₂O 층 등 5개의 용매 분획층을 얻었다(Fig. 1).

2.2.2. 에틸아세테이트 분획물에서 유효성분 분리과정

백수오 70% 메탄올 추출물과 용매분획물의 tyrosinase 효소활성을 측정한 결과, ethyl acetate 분획물의 효소 저해활성이 가장 높았으므로 유효성분을 분리하기 위해 용매분획 하여 얻어진 ethyl acetate 획분(1.9g)을 silica gel로 충전시켜 vacuum liquid chromatography를 이용하여 분리하였다. 용출용매는 n-hexane, CH₂Cl₂, ethyl acetate, methanol을 사용하여 Table 1의 조건으로 분획하였고 16개의 획분을 얻었다.

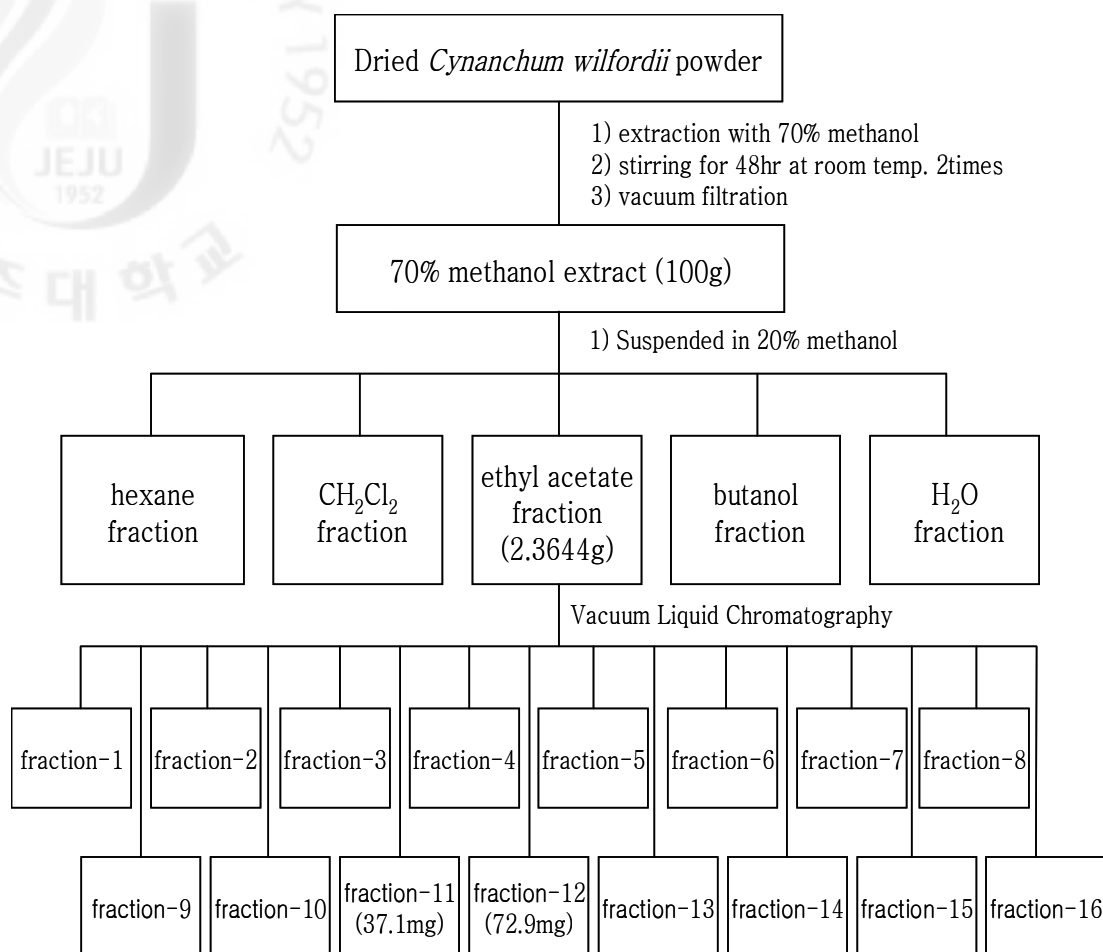


Fig. 1. Procedure for fractionation of methanol extract from *Cynanchum wilfordii*.

Table 1. Solvent gradient for elution of *Cynanchum wilfordii* extract from vacuum liquid chromatography

	hexane (mL)	CH ₂ Cl ₂ (mL)	ethyl acetate(mL)	methanol (mL)	
Fr 1	200				8mg
Fr 2	198	2			2.7mg
Fr 3	194	6			-
Fr 4	190	10			-
Fr 5	186	14			-
Fr 6	180	20			-
Fr 7	100	100			22.1mg
Fr 8		500			364mg
Fr 9		198	2		0.6mg
Fr 10		388	12		15.7mg
Fr 11		285	25		37.1mg
Fr 12		558	42		72.9mg
Fr 13		720	80		132.2mg
Fr 14		600	600		89.3mg
Fr 15			1200		299.7mg
Fr 16				400	616.4mg

2.3. HPLC를 이용한 성분 분석

2.3.1. 분석시료

백수오 70% 메탄올 추출물과 분획물의 농도는 10,000ppm, compound는 1,000ppm 농도로 HPLC용 메탄올에 녹이고 $\varnothing 0.20\mu\text{m}$ syringe filter로 여과하여 시료로 사용하였다.

2.3.2. HPLC 분석조건

성분분석은 HPLC(Waters Alliance system e2695)를 사용하였고 분석조건은 Table 2와 같다. 이동상의 조건은 Table 3과 같고 Detector로는 photodiode array detector(Waters 2998)를 사용하였으며 분석한 후 적정파장 254nm로 선택하여 결과를 도출하였다.

Table 2. Conditions for HPLC analysis

Parameter	Condition
Detector	Photodiode array detector
Column	Sunfire™ C18($5\mu\text{m}$, 4.6x150mm)
Mobile phase	Solvent A : 0.5% Acetic acid Solvent B : Acetonitrile
Flow rate	1.0mL/min

Table 3. Mobile phase conditions for HPLC gradient elution

	Time	Flow	%A	%B	Curve
1		1.00	90.0	10.0	
2	2.00	1.00	90.0	10.0	6
3	5.00	1.00	88.0	12.0	6
4	10.00	1.00	65.0	35.0	6
5	25.00	1.00	59.0	41.0	6
6	30.00	1.00	0.0	100.0	6
7	40.00	1.00	0.0	100.0	6
8	40.50	1.00	90.0	10.0	6
9	55.00	1.00	90.0	10.0	6

2.4. 미백효과 측정

2.4.1. Tyrosinase 효소 활성 측정

백수오 70% 메탄올 추출물과 분획물 0.5 mL, 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8) 0.2 mL, 5mM L-DOPA solution 0.2 mL 혼합액에 tyrosinase(250 U/mL) 0.1 mL를 첨가하여 35°C 에서 10분간 반응시킨 다음 microplate reader를 사용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. tyrosinase 효소활성 억제율은 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$[(A^{\text{control}} - A^{\text{sample}})/A^{\text{control}}] \times 100$$

2.4.2. 세포 배양

Mouse melanoma 세포인 B16F10 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)으로부터 분양 받아 penicillin-streptomycin 100 units/mL와 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 배지(GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂향온기에서 배양하였으며, 4일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다.

2.4.3. 세포독성 평가

백수오의 ethyl acetate 분획물과 분리한 화합물들이 B16F10 세포의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 이용하여 세포독성을 평가하였다. B16F10 세포(2×10^4 cells/mL)를 96 well plate에 접종하고, 18시간 배양 후 백수오 추출물과 분획물을 처리하여 3일 동안 37 °C, 5 % CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 여기에 phosphate buffer saline(PBS) 2 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 용액 200 µL를 첨가하고 동일한 배양 조건으로 4시간을 배양하였다.

plate의 배양액을 제거하고 각 well에 dimethyl sulfoxide(DMSO) 200 μ L를 가하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4.4. 멜라닌 합성 저해율 측정

B16F10 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 1×10^5 cells/mL로 조절한 후 6 well plate에 접종하고, 18시간 배양 후 백수오 추출물과 분획물을 멜라닌 형성 자극제인 α -MSH (200 nM)와 동시에 처리하여 3일간 배양하였다. 3일 후 plate의 배지를 제거하고 PBS를 이용하여 2번 세척하였다. 세척된 세포를 수확하여 1 N NaOH를 첨가하여 세포를 완전히 녹인 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4.5. 세포내 tyrosinase 생성 저해율 측정

B16F10 세포를 6 well plate에 1×10^5 cells/mL로 접종하고, 18시간 배양 후 시료와 α -MSH (200 nM)를 동시에 처리하여 3일간 배양하였다. 3일 후 plate의 배지를 제거 후 PBS를 이용하여 2번 세척하였고, 1% Triton X-100을 500 μ L 넣고 cell scraper로 세포를 수거하였다. 수거한 세포는 -70°C 에서 급속 냉동시킨 후 해동시켰으며 이와 같은 방법을 3번 반복하여 세포막을 파괴하였다. 15000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상층액을 취하여 10 mM L-DOPA 0.2mL와 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8) 0.2mL를 첨가하여 37°C 에서 1 시간 동안 반응시켰으며 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4.6. Western blot analysis

배양이 끝난 세포를 수집하여 2~3회 PBS로 세척 한 후 1 mL의 lysis buffer를 첨가하여 30분간 lysis 시킨 후 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)를 표준화한 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량 하였다. 20~30 μ g의 lysate

를 8~12% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane(BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS(0.1% Tween 20 + Tris-Buffered Saline) 용액에서 상온 2시간 동안 실시하였다.

단백질의 발현 양을 검토하기 위한 항체로는 tyrosinase, microphthalmia-associated transcription factor(MITF), tyrosinase-related protein(TRP)-1 그리고 tyrosinase-related protein(TRP)-2 (Santa Cruz, CA, USA; 1:200 dilution)를 사용하였고 TTBS 용액에서 희석하여 상온 2시간 반응시킨 후 TTBS로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 anti-rabbit IgG(Cell Signalling Technology, Beverly, MA, USA)를 1:5000으로 희석하여 상온에서 30분 간 반응시키고, TTBS로 3회 세정하여 Enhanced Chemiluminescence(ECL) 기질(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 1~3분 간 반응시킨 후 X-ray 필름에 감광하였다.

2.4.7. 통계분석

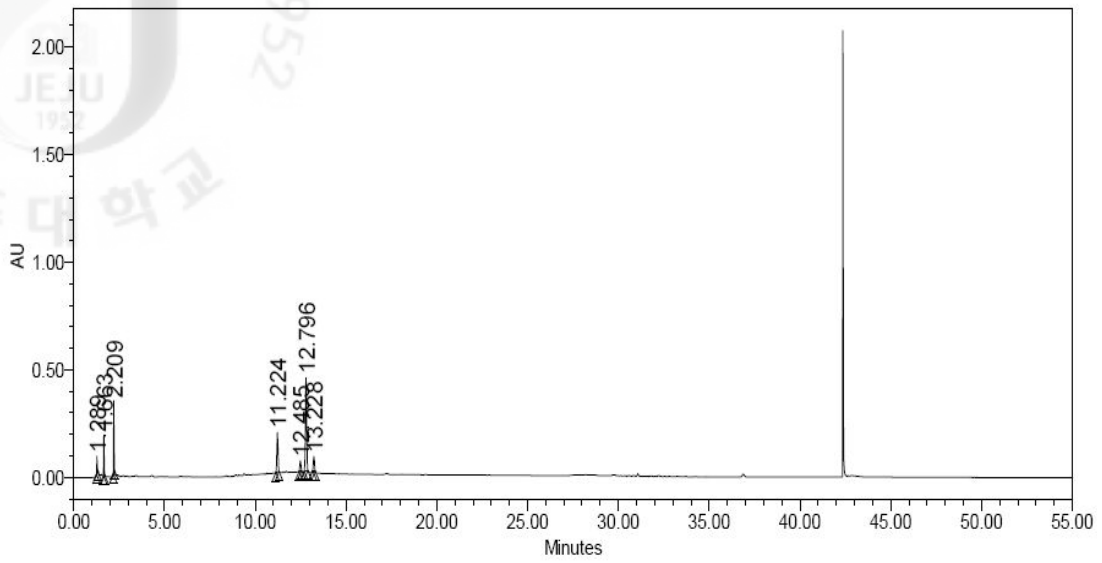
모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치 \pm 표준편차 (SD)를 구하여 신뢰수준 95% ($p < 0.05$)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. HPLC를 이용한 성분함량 분석

백수오 70% 메탄올 추출물의 지표성분을 탐색하기 위해 HPLC를 이용하여 분석을 수행하였고 그 결과, 11.2, 12.4, 12.7, 13.2분에서 4개의 주요성분이 검출되었다(Fig. 2A). 또한 tyrosinase 저해활성이 가장 높았던 ethyl acetate 분획물의 성분분석을 위해 동일한 조건하에 분석을 실시하였고 그 결과, 70% 메탄올 추출물에 비해 두 성분이 고농도로 정제되었다(Fig. 2B). 두 물질의 구조를 확인하기 위해 정제를 실시하여 두 개의 단일 화합물 compound 1(Fig. 3A), compound 2(Fig. 3B)를 분리 하였고 분리된 물질에 대해 HPLC 분석을 실시한 결과 11분, 12분에서 동일한 retention time을 확인하였다.

A



B

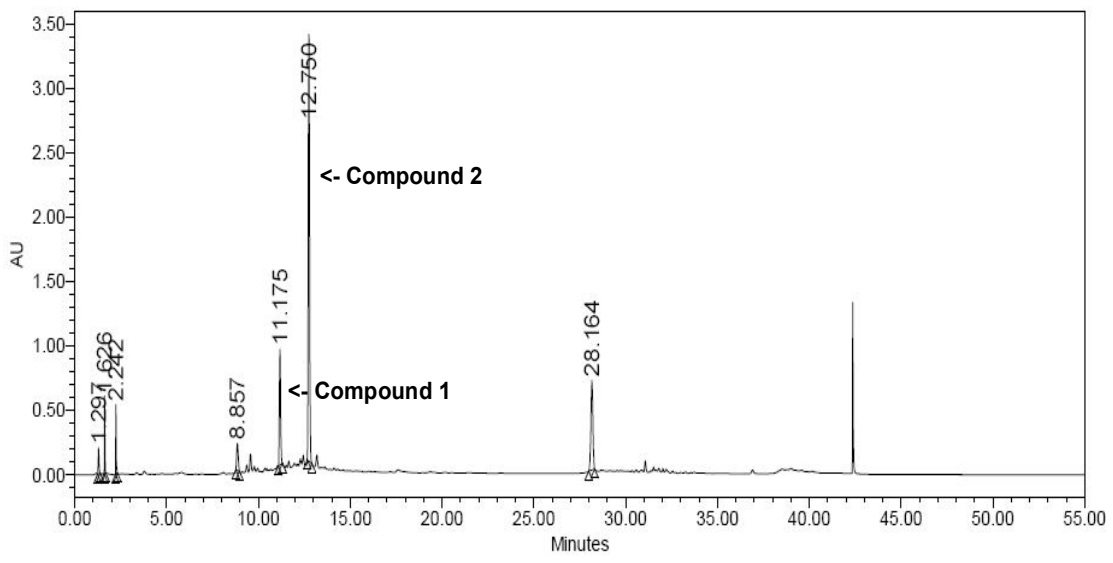
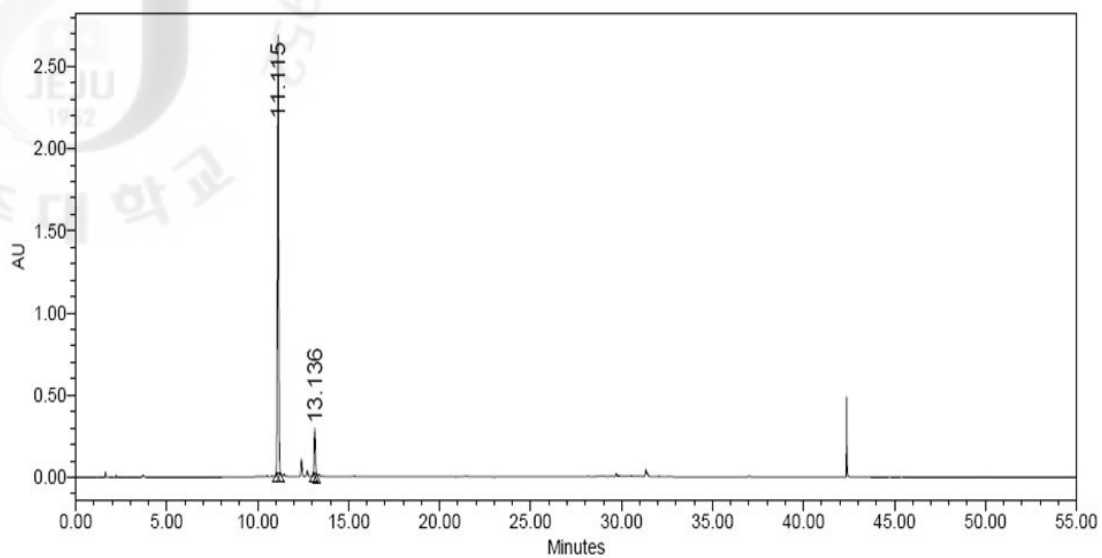


Fig. 2 HPLC chromatograms of 70% methanol extract(A) and ethyl acetate fraction(B) of *C. wilfordii*.

A



B

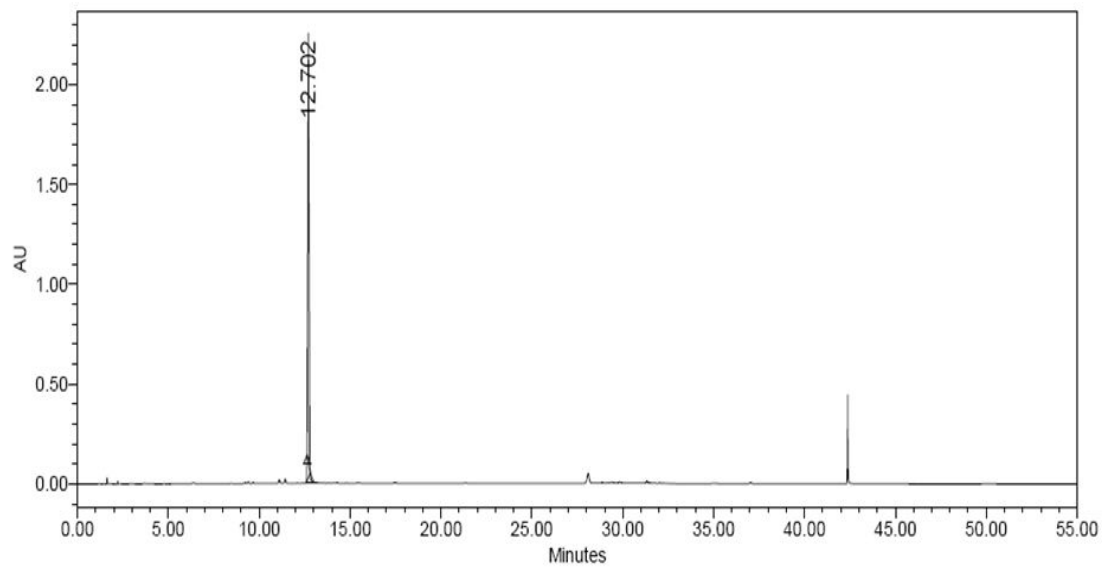


Fig. 3. HPLC chromatograms of compound 1(A) and compound 2(B) of *C. wilfordii*.

3.2. Compound 1 및 Compound 2의 분리 및 구조동정

3.2.1. Compound 1의 분리 및 구조동정

백수오 건조분말을 70% 메탄올로 추출한 후 n-hexane, CH₂Cl₂, ethyl acetate, n-butanol, H₂O로 용매분획하였다. 5종의 분획물에 대해서 tyrosinase 저해활성 실험결과 ethyl acetate층에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 따라서 ethyl acetate 분획물층을 n-hexane, CH₂Cl₂, ethyl acetate, methanol 용매를 사용하여 vacuum liquid chromatography로 분리하여 16개의 분획을 얻었다(Fig. 1). 그 중 두 개의 단일화합물을 얻었고 fraction 11에서 compound 1(37.1 mg)을 얻었다.

Compound 1은 옅은 황갈색의 분말로 ¹H-NMR을 spectrum에서 δ 7.89 (2H, d, J=8.92Hz)과 δ 6.84(2H, d, J=10.12Hz) signal을 나타냈다. 각각의 peak가 doublet으로 coupling하고 있는 것을 확인하였고 그 결과 벤젠고리가 있음을 알 수 있었다. 또한 벤젠고리의 수소들이 ortho 위치에 있음을 알 수 있었다. δ 2.51(3H, s)에서 singlet을 확인하였고 각각의 적분값을 확인한 결과 분자구조가 대칭이라는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

¹³C-NMR은 6개의 carbon signal이 나타났으며 δ 199.5에서 하나의 carbonyl carbon을 확인하였다. δ 132.2 와 δ 116.2에서 대칭구조의 두 개의 carbon을 확인하였고, δ 26.3 에서 하나의 methyl group signal을 확인하였다(Fig. 5).

이와 같이 NMR data를 분석하여(Table 4), compound 1은 C₈H₈O₂분자식을 갖는 p-hydroxyacetophenone(Fig. 6)로 추정하고 문헌(22)의 데이터와 비교 검토하여 구조를 동정하였다.

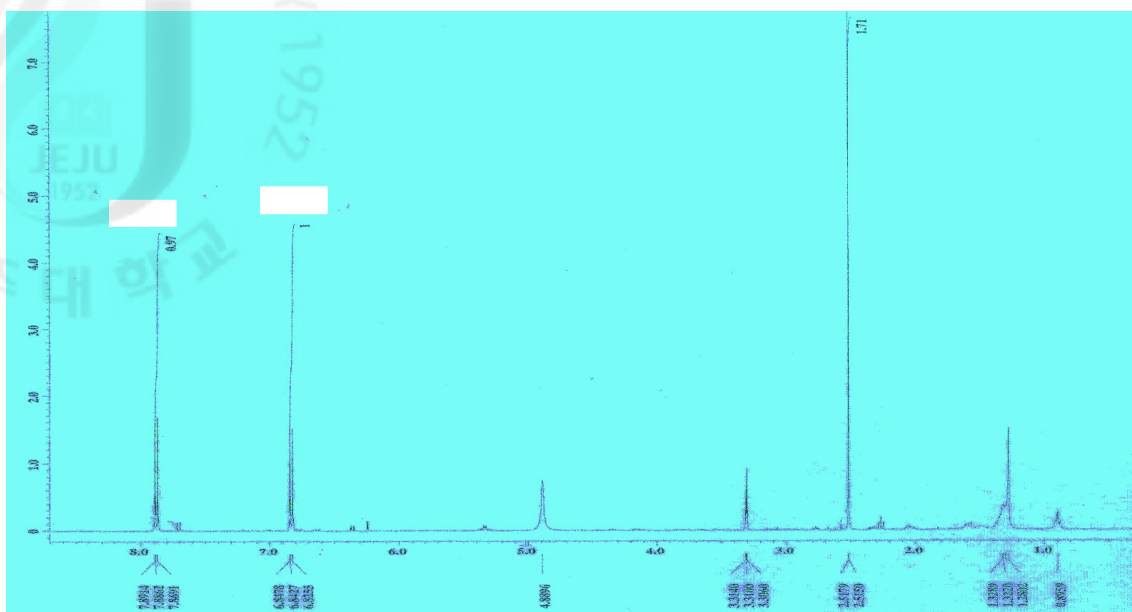


Fig. 4. ^1H -NMR spectrum for compound 1 from *C. wilfordii*.

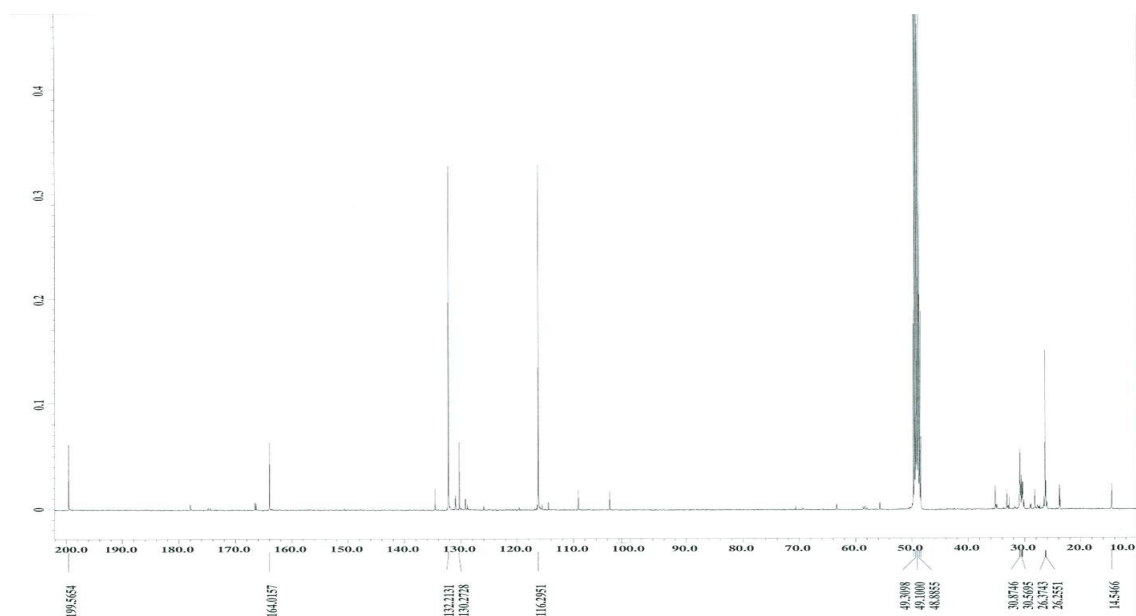


Fig. 5. ^{13}C -NMR spectrum for compound 1 from *C. wilfordii*.

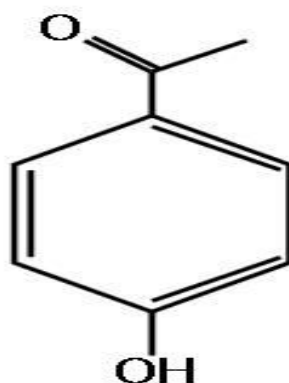


Fig. 6. Structure of p-hydroxyacetophenone.

Table 4. NMR data for compound 1 from *C. wilfordii*

	compound 1	
	δ_c	δ_H (int, mult, <i>J</i> in Hz)
1	130.2	-
2	132.2	7.89 (2H, d, 8.92)
3	116.2	6.84 (2H, d, 10.12)
4	164.0	-
5	116.2	6.84 (2H, d, 10.12)
6	132.2	7.89 (2H, d, 8.92)
7	199.5	-
8	26.3	2.51 (3H, s)

3.2.2. Compound 2의 분리 및 구조동정

Compound 1의 분리에서처럼 ethyl acetate 분획물을 vacuum liquid chromatography로 분리하여 얻어진 fraction 12에서 compound 2(72.9mg)를 얻었다.

Compound 2는 미황색의 분말로 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ 6.94 (1H, d, $J=8.92$ Hz), δ 6.80 (1H, d, $J=8.92$ Hz), δ 6.50 (1H, d, $J=8.96$ Hz)으로 두 쌍의 1, 2, 3, 6-사치환된 벤젠고리 signal이 나타났고, δ 2.57과 δ 2.17에서 두 개의 methyl group signal이 나타났다(Fig. 7).

$^{13}\text{C-NMR}$ 에서는 총 16개의 carbon signal이 나타났으며 δ 207.4 와 δ 204.6 에서 두 개의 carbonyl carbon을 확인하였고, 또한 δ 31.0과 δ 26.4에서 두 개의 methyl group signal이 확인되었다(Fig. 8). 이와 같이 NMR data를 분석하여(Table 5), compound 2는 $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_6$ 의 분자식을 갖는 acetophenone 계열의 cynandione A(Fig. 9)로 추정하고 문헌(23)과 비교 검토하여 구조를 동정하였다. 또한 백수오 추출물을 HPLC로 분석한 결과, cynandione A가 백수오의 주요성분으로 확인되었다. Cynandione A는 百前科(*cynanchum taiwanianum*)에서 처음 분리되었으며(28) 동속 식물인 이엽우피소 외에 다른 식물에서의 분리는 보고된 바 없다.

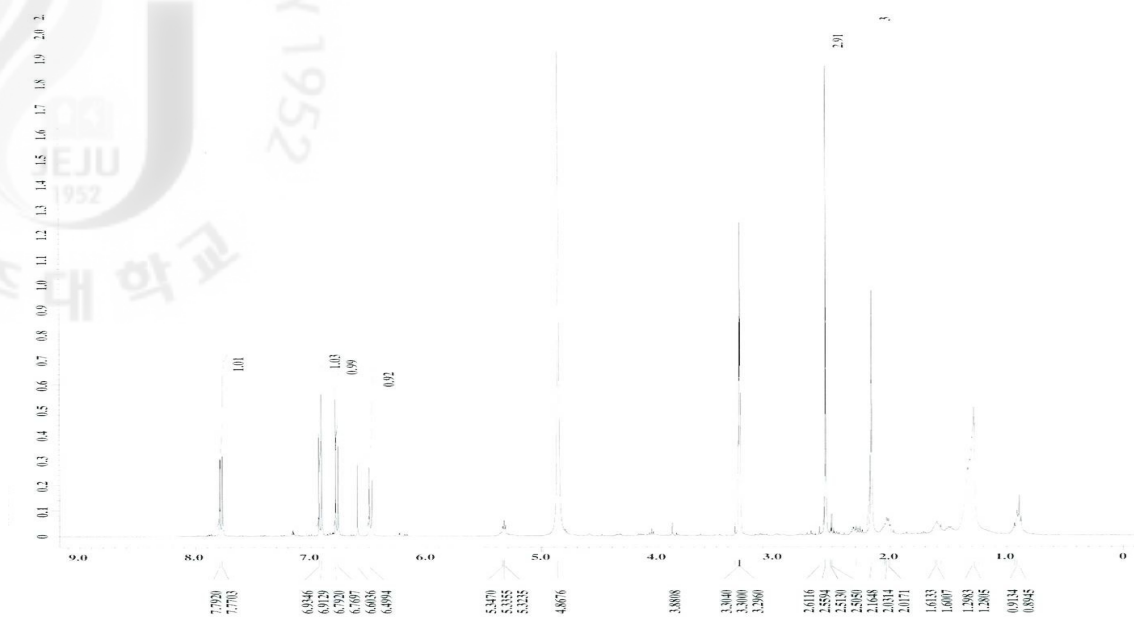


Fig. 7. ^1H -NMR spectrum for compound 2 from *C. wilfordii*.

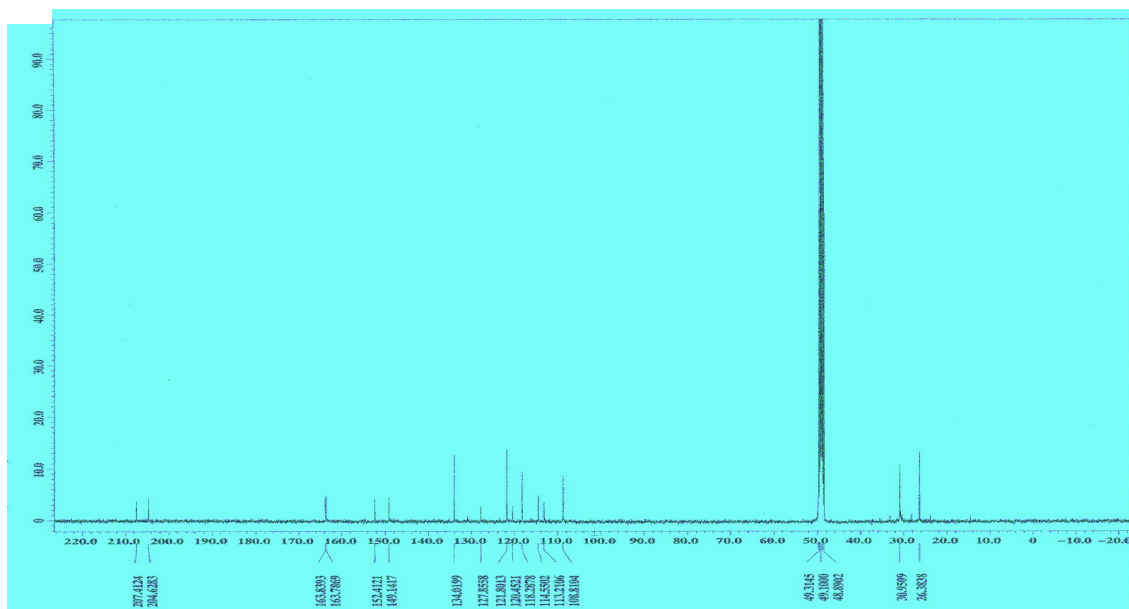


Fig. 8. ^{13}C -NMR spectrum for compound 2 from *C. wilfordii*.

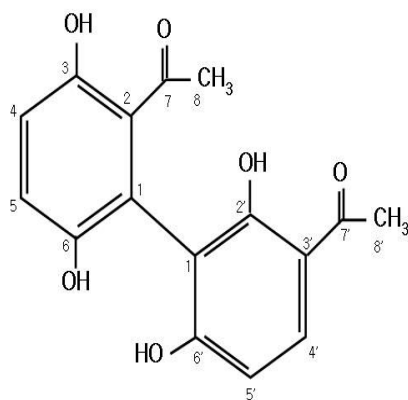


Fig. 9. Structure of cynandione A

Table 5. NMR data for compound 2 from *C. wilfordii*

	compound 2	
	δ_C	δ_H (int, mult, <i>J</i> in Hz)
1	127.8	-
2	120.4	-
3	152.4	-
4	118.2	6.80 (1H, d, 8.92)
5	121.8	6.94 (1H, d, 8.92)
6	149.1	-
7	207.4	-
8	31.0	2.17 (3H, s)
1'	114.5	-
2'	163.8	-
3'	113.2	-
4'	134.0	7.80 (1H, d, 8.92)
5'	108.8	6.50 (1H, d, 8.96)
6'	163.7	-
7'	204.6	-
8'	26.4	2.57 (3H, s)

3.3. 백수오 추출물의 tyrosinase 저해활성 측정

3.3.1. 백수오의 70% 메탄올 추출물과 용매분획물의 tyrosinase 저해활성

멜라닌은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 생물고분자 물질로 검은 색소와 단백질의 복합체이다. 멜라닌의 생합성 과정에서 tyrosinase는 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 효소이며, tyrosinase의 활성을 저해함으로써 멜라닌 생성을 억제할 수 있다. 따라서 tyrosinase 저해활성을 확인함으로써 백수오의 미백효과 가능성을 검토하였다. Mushroom tyrosinase를 효소원으로 하여 기질인 L-DOPA의 반응으로 생성된 L-dopaquinone의 흡광도를 측정하여 tyrosinase의 저해활성을 측정한 결과는 Table 6과 같다. 70% 메탄올 추출물과 n-hexane, CH₂Cl₂, ethyl acetate, butanol, H₂O 분획물을 cell free 상태에서 확인한 결과, 그 중 ethyl acetate 분획물이 다른 분획물과 무처리군인 대조군에 비해 tyrosinase의 저해활성이 가장 높은 것을 확인하였다(Table 6). 또한 ethyl acetate 층을 농도별(25, 50, 100, 200 µg/mL) 처리한 결과, tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 유의적 억제를 나타내었다(Table 7).

Table 6. Inhibitory effects of *C. wilfordii* 70% methanol extract and extraction solvents on tyrosinase activity in cell-free system

Samples (200µg/mL)	70% methanol	hexane	CH ₂ Cl ₂	ethyl acetate	butanol	H ₂ O
Inhibitory effect of tyrosinase (%)	5.4	3.0	8.1	59.1**	24.0	15.5

*p<0.05, **p<0.01

3.3.2. Compound 1, 2의 tyrosinase 저해활성

백수오의 분획물 중 tyrosinase 저해활성이 가장 높았던 ethyl acetate 분획물에서 유효성분을 찾기 위해 백수오 ethyl acetate 분획층을 vacuum liquid chromatography를 이용하여 분리하였고 16개의 sub-fraction 중 10개의 sub-fraction에 대한 tyrosinase 활성을 측정하였다. 그 결과 compound 1과, compound 2가 각각 92.5%, 92.4%로 가장 높은 저해효과를 보였으며, fraction 7은 42.6%, fraction 8은 32.3%로 tyrosinase 활성 저해효과가 있었고 fraction 10은 오히려 tyrosinase 활성이 증가되어 melanin 생성을 증가시키는 물질이 포함되어 있는 것으로 생각된다(Table 8). 이러한 결과를 바탕으로 tyrosinase 저해활성이 높은 compound 1과, compound 2를 농도별로 활성을 확인하였고 그 결과 농도 의존적으로 유의적 억제를 나타내었다.

Table 7. Inhibitory effects concentrations of ethyl acetate, compound 1 and 2 of *C. wilfordii* on tyrosinase activity in cell-free system

Samples ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibitory effect of tyrosinase (%)			
	25	50	100	200
ethyl acetate	25.8**	36.6**	49.5**	61.6**
compound 1	35.3*	53.4**	73.3**	76.9**
compound 2	73.4**	80.4**	84.6**	85.4**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 8. Inhibitory effects of sub-fractions of *C. wilfordii* extract on tyrosinase activity in cell-free system

Samples (200 $\mu\text{g/mL}$)	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Inhibitory effect of tyrosinase(%)	42.6*	32.3*	6.8	-73.6	92.5**	92.4**	19.4*	-23.0	4.24	3.15

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3.4. 백수오 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향

3.4.1. 백수오의 70% 메탄올 추출물과 용매분획물이 세포 생존율에 미치는 영향

백수오 추출물이 B16F10 melanoma cell의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 확인하였다. MTT assay는 살아있는 세포에서 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 자주색을 띄는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다. 백수오 70% 메탄올 추출물과 용매 분획물을 각각 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 B16F10 cell에 처리한 후 처리군의 세포 생존율을 무처리군과 비교한 결과, 70% 메탄올 추출물 처리군에서는 109.5%로 증가하였고, 나머지 용매 분획물을 처리한 실험구의 세포생존율은 hexane 분획물이 36.5%, 나머지 분획물 처리구의 세포 생존율은 72.9~89.2%로 나타났다(Fig.10. Tyrosinase 효소 저해활성이 높은 ethyl acetate 분획물의 경우 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 106.8%와 108.0%로 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다(Fig. 11).

3.4.2. Compound 1, 2의 세포 생존율에 미치는 영향

Ethyl acetate 분획물로부터 분리된 compound 1과 compound 2를 25, 50, 100 μM 의 농도로 처리하여 세포생존율에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, Compound 1의 경우 25 μM 처리구에서 102.3%, 50 μM 과 100 μM 에서 96.5%와 92.8%로 나타났으며(Fig. 12) compound 2는 25 μM 처리구에서는 101.8%, 50 μM 과 100 μM 에서는 92.8%와 95.1%로 세포 생존율을 확인하였다(Fig. 13).

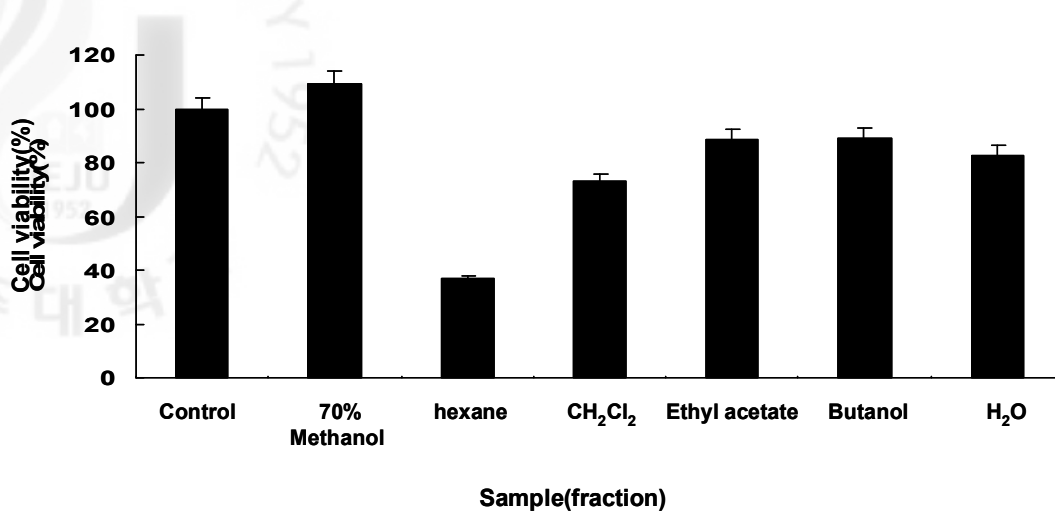


Fig. 10. Effects of *C. wilfordii* extracts on cell viability.

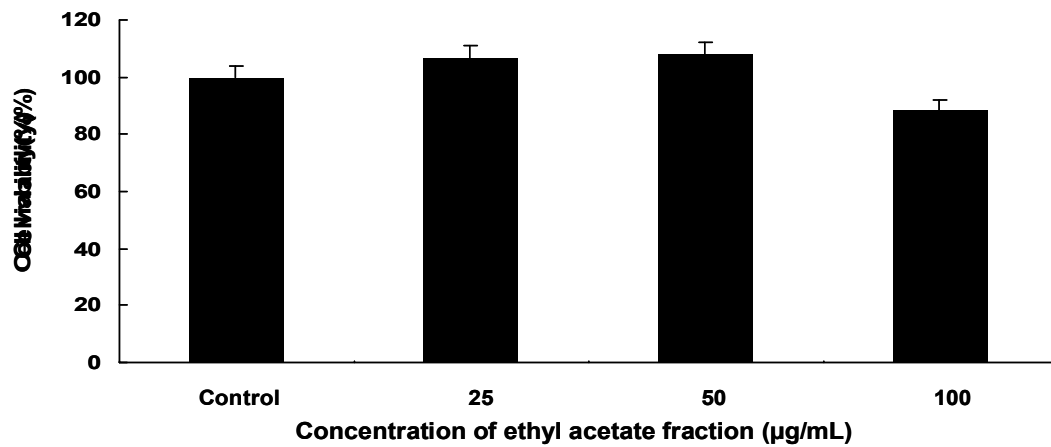


Fig. 11. Effects of concentration ethyl acetate fraction on cell viability.

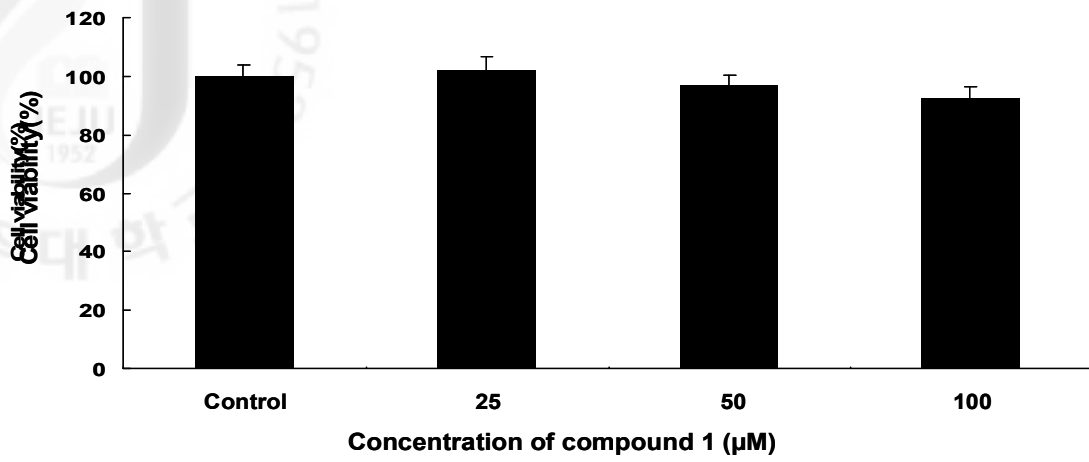


Fig. 12. Effects of concentration compound 1 on cell viability.

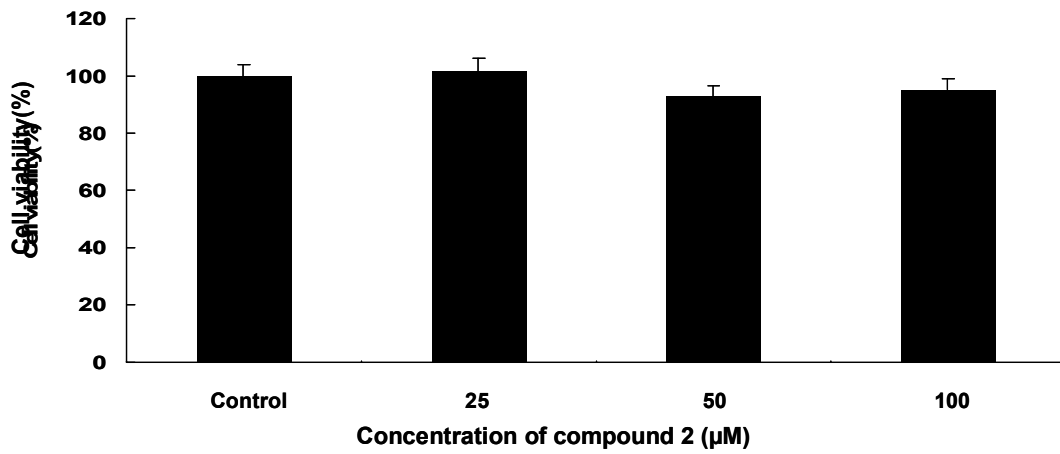


Fig. 13. Effects of concentration compound 2 on cell viability.

3.5. 백수오 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과

3.5.1. 백수오의 70% 메탄올 추출물과 용매분획물의 멜라닌 생성 억제 효과

백수오의 70% 메탄올 추출물과 용매 분획물에 대한 멜라닌 생성 억제 효과를 조사하였다. B16F10 cell에서 α -MSH가 멜라닌 형성을 유발하는 것으로 알려져 있으므로 B16F10 cell에 α -MSH와 백수오 70% 메탄올 추출물 및 분획물을 동시에 처리 하여 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하였다. 멜라닌 생성은 α -MSH 단독 처리군에 비해 백수오의 70% 메탄올 116.4%, hexane -21.8%, CH_2Cl_2 -26.0%, ethyl acetate 105.1%, butanol 95.5%, 잔사인 H_2O 분획물은 95.5%로 각각 나타났다(Fig. 14). 그 중에서도 백수오의 hexane, CH_2Cl_2 그리고 ethyl acetate 분획물이 높은 멜라닌 생성 억제 효과를 보였는데, hexane과 CH_2Cl_2 분획물은 세포생존을 실험에서 세포증식을 억제함으로 세포독성에 의해 멜라닌 생성에 영향을 미치는 것으로 여겨진다. Ethyl acetate 분획물 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서는 세포생존율에 영향을 미치지 않으면서 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 억제하였다(Fig. 15.)

3.5.2. Compound 1, 2의 멜라닌 생성 억제 효과

Ethyl acetate 분획물로부터 분리된 compound 1과 compound 2의 멜라닌 생성 억제효과를 조사하였고 멜라닌 생성 억제물질로 알려진 arbutin과 melasolv를 각각 100 μM , 40 μM 농도로 처리하여 비교 대조군으로 사용하였다. Compound 1의 경우 25, 50, 100 μM 농도에서 각각 98.3%, 92.3%, 88.0%로 무처리군에 비해 농도 의존적으로 멜라닌 생성이 감소되었다(Fig. 16). Compound 2의 경우에는 25, 50, 100 μM 농도에서 87.0%, 58.1%, 37.7%로 농도 의존적으로 멜라닌 생성이 감소하여, compound 2가 compound 1 보다 멜라닌 생성 억제 효과가 더 높은 것으로 판단된다(Fig. 17). 또한 대조물질인 arbutin 보다도 멜라닌 생성 억제효과가 높은 것으로 보이며 Choi(23)도 이엽우 피소에서 분리한 cynandione A가 B16F10 melanoma 세포에서 대조물질인

arbutin 보다 강한 멜라닌 생성 억제효과를 낸다고 보고하였다. 따라서 백수오 ethyl acetate 분획물의 미백활성에는 cynandione A가 주요한 작용을 하는 것으로 사료된다.

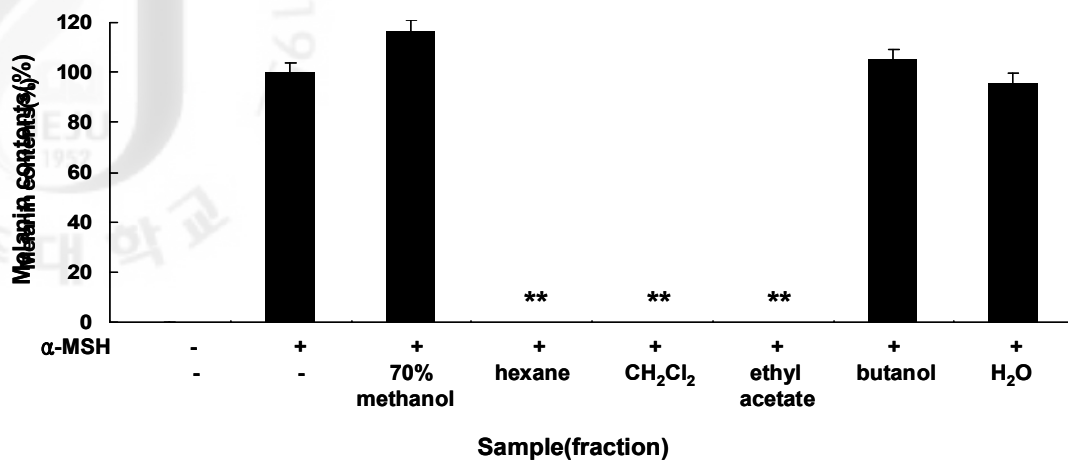


Fig. 14. Inhibitory effect on melanogenesis of methanol extract and solvent fractions of *C. wilfordii* in B16F10 cells. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

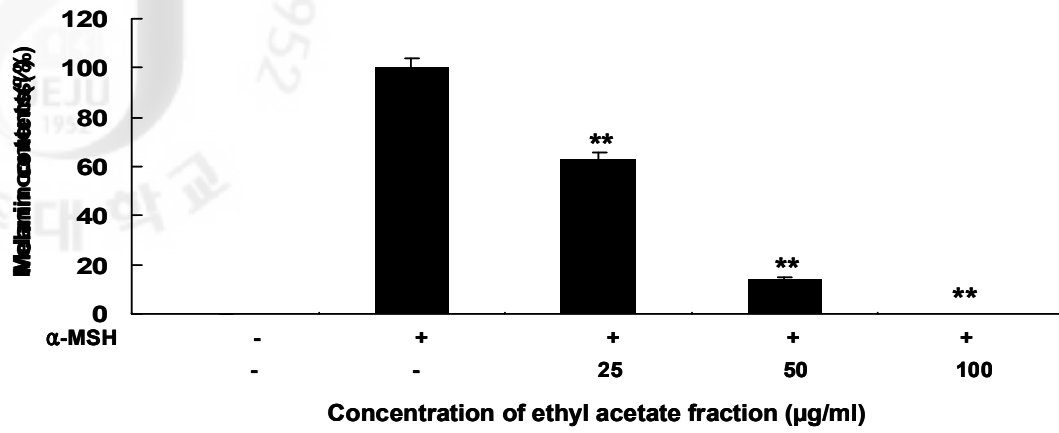


Fig. 15. Inhibitory effect on melanogenesis of ethyl acetate fraction of *C. wilfordii* in B16F10 cells. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

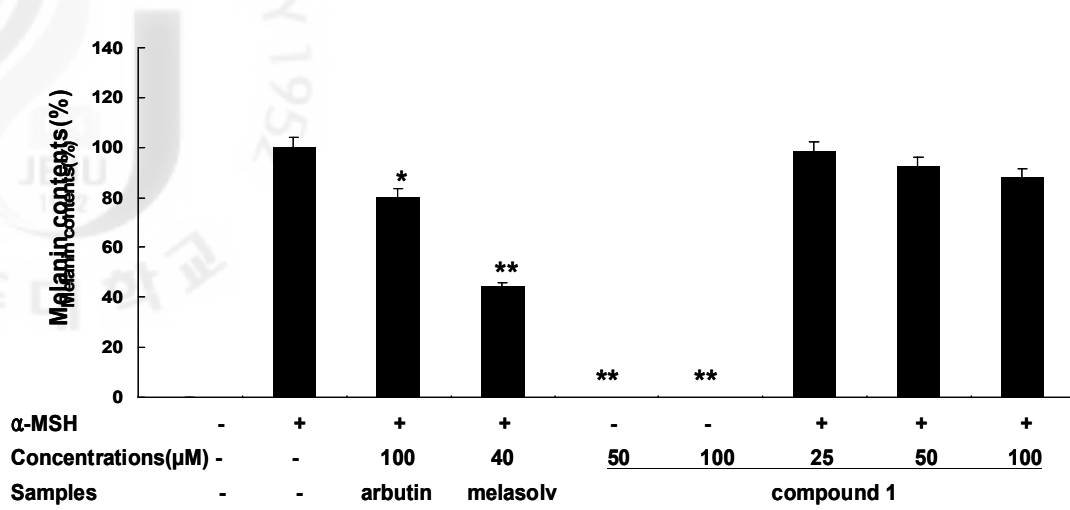


Fig. 16. Inhibitory effect on melanogenesis of compound 1 of *C. wilfordii* in B16F10 cells. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

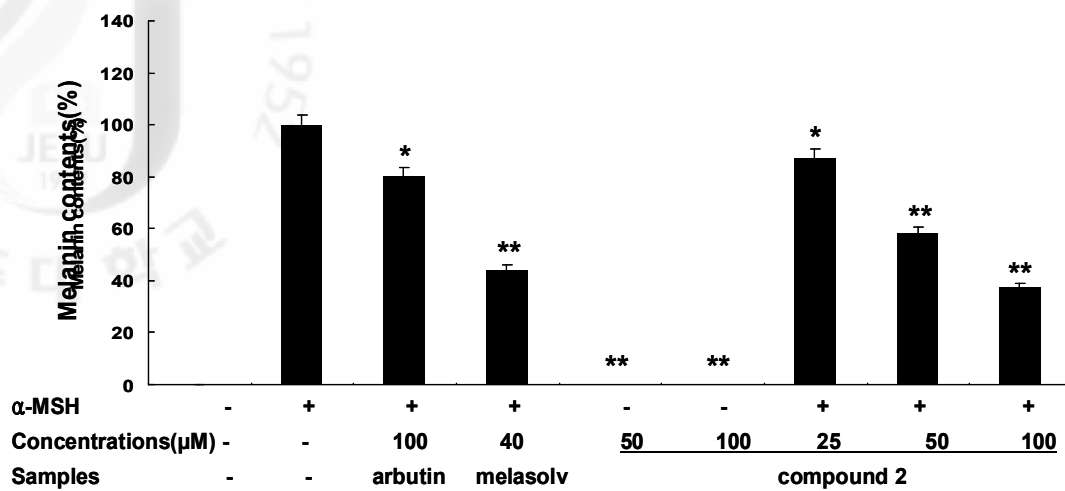


Fig. 17. Inhibitory effect on melanogenesis of compound 2 of *C. wilfordii* in B16F10 cells. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

3.6. 백수오 추출물의 세포내 tyrosinase 저해활성

3.6.1. 백수오에서 분리된 compound 1, 2의 저해활성

백수오 ethyl acetate 분획물에서 분리된 compound 1과 compound 2가 멜라닌 합성에 주요한 조절적 작용을 하는 효소인 tyrosinase에 미치는 영향을 확인하기 위해 B16F10 cell에 α -MSH와 compound 1 및 compound 2를 동시에 처리 하여 세포 내 tyrosinase 활성을 확인하였다. 비교 대조군으로는 arbutin과 melasolv를 각각 100 μ M, 40 μ M 농도로 처리하여 사용하였다. Fig. 18에서와 같이 Compound 1의 tyrosinase 활성은 α -MSH만 처리한 대조군에 비해 25, 50, 100 μ M에서 각각 85.3%, 90.2%, 74.9%의 활성을 나타냈다. compound 2의 경우 25, 50, 100 μ M에서 74.0%, 66.6%, 47.3%로 농도 의존적으로 tyrosinase 활성이 감소하였는데, 이러한 억제효과는 현재 미백 원료로 사용중인 arbutin과 melasolv보다 높은 억제활성을 갖는 것으로 나타났다(Fig. 19). 따라서 compound 2가 compound 1에 비해 세포 내 tyrosinase 활성 저해효과가 더 높은 것으로 판단된다. 피부의 색소침착과 멜라닌 생성은 tyrosine에서 출발하는 일련의 산화 중합반응이며, 이 과정에서 tyrosinase가 중요한 역할을 한다. Tyrosinase의 활성 억제는 멜라닌 생합성을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다 (27). 따라서 Compound 2는 tyrosinase의 활성을 억제함으로써 멜라닌 생합성을 억제하는 것으로 보여진다.

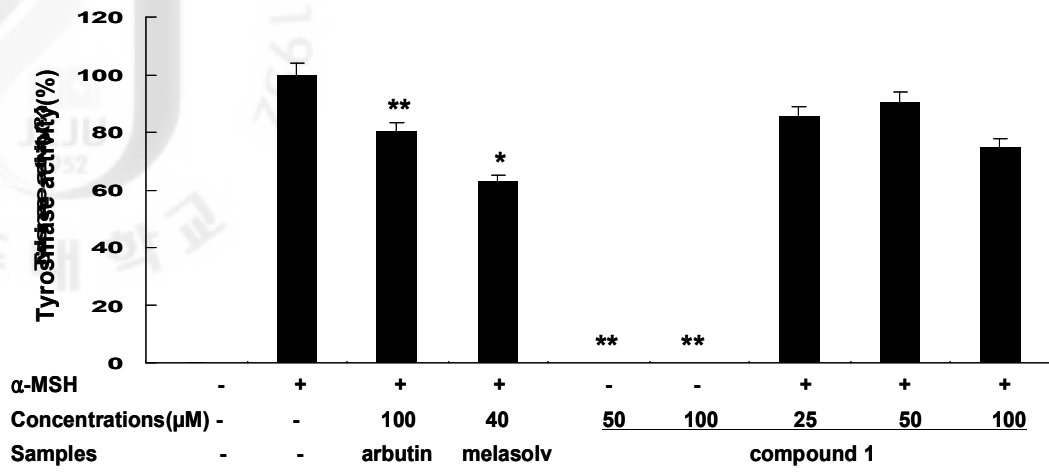


Fig. 18. Inhibitory effect on tyrosinase of compound 1 of *C. wilfordii* in B16F10 cells. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

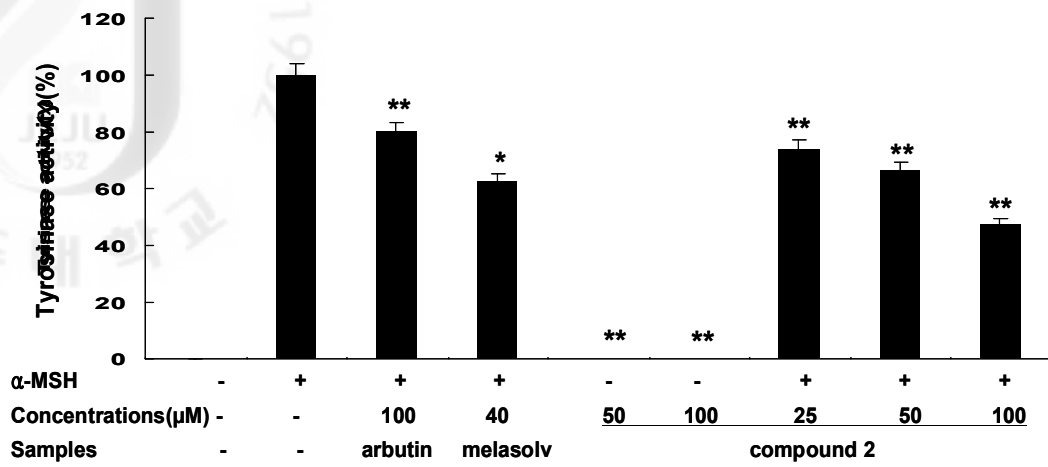


Fig. 19. Inhibitory effect on tyrosinase of compound 2 of *C. wilfordii* in B16F10 cells. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

3.7. 멜라닌 합성관련 단백질 발현 억제효과

Compound 1과 compound 2에 대한 α -MSH 자극에 의해 유도된 멜라닌 생성 조건에서 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성 억제효과를 조사한 결과, compound 2의 억제활성이 더 높다는 것을 확인하였고 compound 2의 멜라닌 합성 관련 단백질 발현에 대한 영향을 조사하기 위하여 Western blot으로 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 및 MITF 발현을 확인하였다. MITF는 melanogenic enzyme인 tyrosinase와 TRP의 발현을 자극하여 멜라닌세포의 멜라닌 생성을 조절하는 것으로 알려져 있다(9,24). Fig. 20에서 보는 바와 같이 α -MSH를 단독 처리한 경우에 단백질 발현이 증가한 것을 확인 할 수 있었으며 compound 2를 농도별(25, 50, 100 μ g/mL)로 처리하여 조사한 결과, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질의 발현을 농도 의존적으로 억제시키는 것을 확인할 수 있었으며, 단백질 발현을 조절하는 전사인자인 MITF의 발현도 억제시키는 것을 확인하였다. 멜라닌 생성을 유도하는 것으로 알려진 α -MSH는 멜라닌 합성에 있어서 가장 중심적인 효소인 tyrosinase의 활성을 촉진시킬 뿐만 아니라, 멜라닌 합성에 관여하는 또 다른 효소인 TRP에 작용하여 멜라닌을 합성하도록 유도한다는 보고가 있다(25,26). 따라서 compound 2는 α -MSH에 의하여 유도된 멜라닌 합성을 저해하는 것으로 보여지며, 이러한 억제효과는 tyrosinase 효소 활성저해 뿐만 아니라 멜라닌 생성 관련 단백질의 발현을 조절함으로써 나타나는 것으로 사료된다. 이상의 결과에서 백수오 ethyl acetate 분획물에서 분리된 compound 2가 α -MSH에 의해 유도된 단백질의 발현을 억제하는 것을 나타내며 Fig.17에서 멜라닌 생성을 억제시킨 결과와 연관성이 있음을 알 수 있다. 또한 compound 2는 tyrosinase 발현을 조절하는 전사인자인 MITF의 발현을 억제시키는 것을 확인하였으며, 이는 α -MSH에 의해 유도된 tyrosinase 발현 억제에는 compound 2에 의한 MITF 발현의 감소가 영향을 미치는 것으로 판단된다.

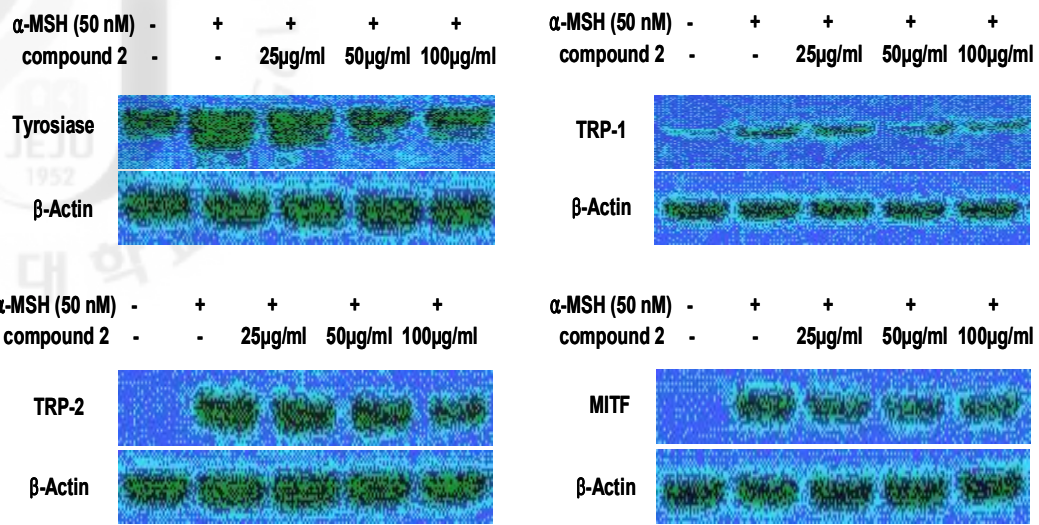


Fig. 20. Inhibitory effect of compound 2 on the protein level related melanogenesis in B16F10 cells.

4. 요약

백수오(*Cynanchum wilfordii* Radix)는 우리나라 전국산지에 자생하거나 재배되고 있는 약용작물로 gagaminine과 wilfoside KIN, cynandione A등을 함유하고 있다. 이에 백수오로부터 추출물과 분획물을 얻어 α -MSH로 멜라닌 생성을 자극한 B16F10 cell에서 멜라닌 생성량과 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 조사하였으며, 이와 관련된 단백질의 발현에 미치는 효과를 확인하기 위해 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF를 측정하였다. 그 결과, 백수오 ethyl acetate 분획물이 B16F10 cell에서 tyrosinase 저해활성과 멜라닌 생성 억제효과를 타나내었다. 백수오의 ethyl acetate 분획물에서 p-hydroxyacetophenone와 cynandion A를 분리하였으며 그 중 cynandion A가 B16F10 cell에서 tyrosinase 저해활성과 멜라닌 생성 억제효과를 타나내었는데, 이것은 멜라닌 합성 관련인자인 MITF와 TRP-1, TRP-2의 발현 억제에 의한 결과로 생각된다. 또한 tyrosinase 발현을 조절하는 전사인자인 MITF의 발현을 억제시키는 것으로 보아 α -MSH에 의해 유도된 tyrosinase 발현 억제에는 cynandion A에 의한 MITF 발현의 감소가 영향을 미치는 것으로 판단된다. 이러한 결과로 백수오 ethyl acetate 분획물의 미백 활성효과에는 cynandion A가 주요한 작용을 하고 있다고 사료되며 황산화력이 높고 tyrosinase 활성을 효과적으로 억제할 수 있는 백수오에서 분리된 cynandion A를 미백 화장품 개발에 활용할 수 있는 가능성을 제시하였다.


5. 참고문헌

1. 이학주, 이오규. 식물에서 유래한 기능성 소재에 관한 최근 연구동향. 서울 : 산림, 72-75(2006)
2. 지형준. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 서울:한국메디칼인덱스사, 266-267 ; 633-4(1998)
3. Hearing VJ, Ekel TM. Mammalian tyrosinase, *Biochem. J.* 157, 549-557(1976)
4. Vile GF, Tyrrell RM. UVA radiation-induced oxidative damage to lipid and protein *in vitro* and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. *Free Radic Biol Med.* 18(4): 721-730(1995)
5. Prota G. Screening advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J Invest Dermatol* 75:122-128(1990)
6. Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 21(4): 976-994(2007)
7. Funasaka Y, Chakraborty AK, Hayashi Y, Komoto M, Ohashi A, Nagahama M, Inoue Y, Pawelek J, Ichihashi M. Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, in interleukin-1alpha, interleukin-1beta, endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha. *Br J Dermatol.* 139(2): 216-224(1998)
8. Bertolotto C, Buscà R, Abbe P, Hemesath TJ, Bille K, Fisher DE, Ortonne JP, Ballotti R. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J. Cell Biol.* 142, 827-835 (1998)
9. Bertolotto C, Buscà R, Abbe P, Bille K, Aberdam E, Ortonne JP,

- Ballotti R. Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP-1 and TRP-2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol Cell Biol.* 18(2): 694-702(1998)
10. Lee J, Jung E, Lee J, Huh S, Boo YC, Hyun CG, Kim YS, Park D. Mechanisms of melanogenesis inhibition by 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *Br. J. Dermatol.* 157(2): 242-248(2007)
 11. Jang JY, Kim HN, Kim YR, Kim BW, Choi YH, Choi BT. Studies of inhibitory mechanism on melanogenesis by partially purified asiasariradix in α -MSH stimulated B16F10 melanoma cells. *J. Life Sci* Vol. 20. No. 11. 1617-1624(2010)
 12. You JK, Chung MJ, Kim DJ, Seo DJ, Park JH, Kim TW, Choe M. Antioxidant and Tyrosinase inhibitory effects of *Paeonia suffruticosa* water extract. *J. Korea Soc Food Sci nutr* 38(3): 292-296(2009)
 13. Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han DS. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J Food Sci Technol.* 27: 891-896(1995)
 14. Cha JY, Yang HJ, Jeong JJ, Seo WS, Park JS, Ok M, Cho YS. Tyrosinase inhibition activity and antioxidant capacity by fermented products of some medicinal plants. *J. Life Sci.* Vol. 20. No. 6: 940-947(2010)
 15. Seo BI. Effects of *cynanchi wilfordii* radix on prevention of hyperlipidemia and liver damage induced by alcohol. *Kor. J. Herbology* No. 23(4): 31-38(2008)
 16. Lee DU, Shin US, Huh K. Structure-activity relationships of gagaminine and its derivatives on the inhibition of hepatic aldehyde oxidase activity and lipid peroxidation. *Arch. Pharm. Res.* Vol. 21, No. 3: 273-277(1998)
 17. Lee DU, Shin US, Huh K. Inhibitory effects of gagaminine, a steroidal alkaloid from *Cynanchum wilfordii* on lipid peroxidation and aldehyde

- oxidase activity. *Planta medica*. 62: 485-487(1996)
18. Hwang BY, Kim SE, Kim YH, Kim HS, Hong YS, Ro JS, Lee KS, Lee JJ. Pregnaneglycoside multidrug-resistance modulators from *Cynanchum wilfordii*. *J Nat Prod*. 62: 640-643(1999)
 19. Hwang BY, Kim YH, Ro JS, Lee KS, Lee JJ. Acetophenones from the root of *Cynanchum wilfordii* Hemsley. *Arch Pharm Res*. 22: 72-74(1999)
 20. Yeo HS, Kim JW. A benzoquinone from *Cynanchum wilfordii*. *Phytochemistry*. 46: 1103-1105(1997)
 21. Lee MK, Yeo HS, Kim JW, Markelonis GJ, Oh TH, Kim YC. Cynandione A from *cynanchum wilfordii* protects cultured cortical neurons from toxicity induced by H₂O₂, L-glutamate and kainate. *J Neurosci Res*. 59: 259-264 (2000)
 22. YEO HS, KIM JW A Bezoquinone from *Cynanchum wifordii*. *Phytochemistry* Vol. 46 No. 6, 1103-1105(1997)
 23. Lee HW, Park SY, Lee AY, Chae SW, Choi GY, Choo BK, Kim HK. Quantitative analysis of *cynanchum wilfordii* hemsley. *Korean journal of oriental medicine* Vol. 14, No. 1(2008)
 24. Schwahn DJ, Xu W, Herrin AB, Bales ES, Medrano EE. Tyrosin levels regulate the melanogenic response to alpha-melanocyte-stimulating hormone in human melanocyte: implications for pigmentation and proliferation. *Pigment Cell Res*. 14(1): 32-39(2001)
 25. Hunt G, Todd C, Cresswell JE, Thody AJ. Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle⁴DPhe⁷α-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J Cell Sci*. 107(pt1): 205-211(1994)
 26. Hearing VJ, Jiménez M. Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *Int J Biochem*. 1987;19 (12): 1141-7

27. Widlund HR, Fisher DE. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 22: 3305-3041(2003)
28. Huang PA, Lu CM, Yen MH, Wu RR, Lin CN. Acetophenones from *Cynanchum taiwanianum*. *Phytochemistry*. 40(2) 537-541(1995)
29. Yoon WJ, Kim MJ, Moon JY, Kang HJ, Kim GO, Lee NH, Hyun CG. Effect of palmitoleic in murine B16 melanoma. *J. Oleo Sci.* 59, (6): 315-319(2010)
30. Yoon WJ, Kim MJ, Koh HB, Lee WJ, Lee NH, Hyun CG, Effect of Korean Red Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*) on Melanogenic Protein Expression in Murine B16 Melanoma. *International Journal of Pharmacology* 6 (1): 37:42, (2010)
31. Li SH, Ryu JY, Zhang R, Yoo HS, Kim JH, Kwon TJ, Kang SM, Choe TB, An SK. The effect of *Bletilla striata* on tyrosinase expression and melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. *J. Beau. Tricbo.* Vol. 3, No. 2(2007)
32. Kim SS, Yoon WJ, Hyun CG, Lee NH. Down-Regulation of tyrosinase, TRP-2 and MITF Expressions by *Neolitsea aciculata* Extract in Murine B16F10 Melanoma. *International Journal of Pharmacology* (2010)
33. Jang MJ, Cheon SJ, Kim HY, Kwoen DJ, Kim HY, Kim SH, Lee JT. The anti wrinkle and whitening effect of extracts of *Castanea crenata* Inner shell. *J. Life. Sci* Vol. 21. No. 5: 734-738(2011)
34. Lee JY, An BJ. Whitening and anti-wrinkle effects of *Prunus persica* Flos. *J. Appl. Biol. Chem.* 53(3): 154-161(2010)
35. Chung MH, Moon YH, Lee BJ, Chung EJ. Effect of *polygoni multiflori* radix and *cynanchi wilfordii* radix extract on experimentally induced hyperlipemia in rats. *J. Pharm. Res. C.S. Univ* Vol. 16.: 57-75(1994)
36. Choi HG, Jiang Y, Roh E, Kim YS, Xu GH, Na MK, Lee SH.



Constituents of *Cynanchum auriculatum* and their Inhibitory Effect on
Melanogenesis in B16 Mouse Melanoma Cell Lines. Kor. J.
Pharmacogn. 41(4) : 238-244(2010)

감사의 글

끝나지 않을 것 같던 석사논문을 마무리하며, 아쉬움과 기쁨이 교차합니다. 지나온 시간들과 저의 연구 결과물을 돌이켜보니, 다듬어지지 않은 부분이 많음을 깨달으며 더욱 노력하리라 다짐을 하게 됩니다. 2년 동안 대학원 생활을 하면서 힘들고 포기하고 싶을때도 있었지만 그럴 때 마다 힘을 준 많은 분들 덕에 잘 이겨낸 것 같습니다. 일일이 찾아가 감사의 마음을 전해야 하지만 지면으로나마 인사를 드리고자 합니다.

먼저 부족함이 많던 저를 이끌어주시고 지도해주신 고영환 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 논문의 부족한 부분을 세심하게 지적해주신 하진환 교수님, 박은진 교수님께도 감사의 마음을 전합니다. 대학원 과정 동안 늘 관심과 조언으로 학문의 길을 이끌어 주신 강영주 교수님, 임상빈 교수님께도 감사의 인사와 함께 항상 건강하시길 기원합니다.

대학원 생활을 함께하며 힘이 되어준 경민, 현정, 수경, 충우오빠, 경진오빠, 강진아 선생님, 최영진 선생님께도 감사의 마음을 전합니다.

학업과 일을 병행하며 논문을 마무리 하느라 힘든적도 많았고, 힘들다는 핑계로 회사일을 게을리 한적도 있었습니다. 그럼에도 불구하고, 항상 이해해주고 조언을 해주신 정용환 소장님, 실험의 모든 것에 도움을 준 원중오빠, 영민언니, 그리고 항상 웃을수 있게 해준 명석오빠, 대주오빠 에게도 너무 고맙고, 힘들고 지칠 때 많이 위로해주던 은진, 민진 고마워. 또한 일일이 이름을 나열하지는 못하지만 모든 생물종다양성 연구소 식구들에게도 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 부족한 딸을 믿어주시고 사랑으로 지켜봐 주신 아빠, 엄마, 잘 챙겨주지 못했던 동생, 소중한 팔짱 친구들에게 말로 다 표현할 수 없는 고마움과 사랑하는 마음을 전합니다. 항상 행복하고 건강하세요. 사랑합니다.