

# Anti-melanogenic Effect of Lotus Seed and Seedpod Extracts via Downregulation of Tyrosinase Stability in B16F10 Murine Melanoma Cells

Hee-Jae Shin, Mihee Kim, Bum-Soo Shin, Seunghee Bae\*

Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University, Seoul, Korea

\*Corresponding author: Seunghee Bae,  
Department of Cosmetics Engineering,  
Konkuk University, 120 Neungdong-ro,  
Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea  
Tel.: +82 2 450 0463  
Email: sbae@konkuk.ac.kr

Hee-Jae Shin, Mihee Kim and Bum-Soo Shin contributed equally to this work.

Received January 12, 2022

Revised February 12, 2022

Accepted March 03, 2022

Published March 30, 2022



## Abstract

**Purpose:** This study investigates the anti-melanogenic effects of lotus seed and seedpod extract in B16F10 murine melanoma cells, and demonstrates the possible mechanisms involved in anti-pigmentation. **Methods:** The lotus seed and seedpod extracts were prepared using 70% ethanol as solvent. The irritation potential of the extracts was investigated using water-soluble tetrazolium salt (WST-1)-based cytotoxicity assay and expression analysis of the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  in B16F10 cells and HaCaT keratinocytes, respectively. The anti-melanogenic effects of the extracts were analyzed using intracellular melanin contents and tyrosinase activity assays. The effects of the extracts on tyrosinase expression were analyzed at the mRNA and protein levels. The effects of those extracts on the stability of tyrosinase protein were analyzed by evaluating the protein level after cycloheximide treatment. **Results:** WST-1-based cytotoxicity assay indicated that the concentration of  $\leq 1.0\%$  for lotus seed and seedpod extracts did not exhibit any cytotoxicity in B16F10 cells. Also, qRT-PCR analysis showed that the expression of IL-1 $\beta$  mRNAs was not increased by those concentrations of the extracts in HaCaT keratinocytes. Additionally, intracellular melanin contents assay showed that those extracts significantly inhibited  $\alpha$ -MSH-induced melanin synthesis. Furthermore, cellular tyrosinase activity was significantly inhibited by the extracts. Additional investigations revealed that tyrosinase activity reduction was independent of its mRNA expression level, but dependent on its protein expression level. These findings were further confirmed by the results of the cycloheximide experiments stating that the protein stability of tyrosinase was reduced after the treatment with those extracts. **Conclusion:** Lotus seed and seedpod extracts showed anti-pigmentation effects by accelerating degradation of tyrosinase protein at the post-translation level in B16F10 cells.

**Keywords:** Lotus seed extract, Lotus seedpod extract, B16F10 melanoma cells, Tyrosinase, Anti-pigmentation

## Introduction

피부 색소침착(skin pigmentation)은 자외선으로 인한 피부세포의 DNA 손상 등의 많은 해로운 효과에 대응하기 위한 주요 생리적 방어 기제이고, 이러한 과정은 melanin 색소의 생합성에 의해서 발생한다(Wasmeier *et al.*, 2008). Melanin은 melanocyte 내에서 합성되고 melanosome 내에 저장되어 있다가 epidermis 전체에 분포

하기 위해 인접한 keratinocyte로 이동한다(Slominski *et al.*, 2004). 이때, melanin이 표면으로부터 유입되는 자외선에 대해 핵을 보호하기 위해 keratinocyte의 핵 위에 위치하게 된다. 생리적인 자외선 차단에 피부 색소가 필수적 역할을 하지만 hyperpigmentation 같은 비정상적인 pigmentation은 melasma, age spots, actinic keratosis, 피부암 등 여러 피부과학적 질환을 유발할 수 있다(Kadokaro *et al.*, 2012; Passeron *et al.*, 2005). Hyperpigmentation은 염증

및 자외선을 포함한 다양한 생물학적, 환경적 요인에 의해 발생하지만 pigmentation 장애에 대한 효과적인 치료는 melanin 생성을 억제하는 것을 기반으로 한다(Passeron *et al.*, 2005). 따라서 melanogenesis를 조절하거나 억제할 수 있는 천연 화합물을 선별하여 소재로써 개발하는 것은 제약 및 생물의학 목적으로 가치가 있다.

Melanogenesis는 melanocyte에서 melanin을 생성하는 대사 과정이다(Schallreuter *et al.*, 2008). 이 과정은 tyrosine을 melanin으로 전환하는 일련의 효소 반응을 포함한다(Kedekaro *et al.*, 2012; Schallreuter *et al.*, 2008). Tyrosinase는 L-tyrosine을 melanin의 전구체인 L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)으로 전환되는 것을 촉매하는 필수 및 속도 제한 효소이다(Park *et al.*, 2019). Tyrosinase 수치는 사람 피부의 pigmentation이 진행되는 정도와 밀접한 관계가 있으며, tyrosinase 활성을 억제함으로써 잠재적으로 pigmentation을 저해할 수 있다(Bae-Harboe & Park, 2012; Chan *et al.*, 2014). Tyrosinase의 발현은 skin pigmentation과 melanocyte의 분화, 증식, 생존을 조절하는 중요한 요소인 전사인자(MITF)에 의해 조절된다(Bentley *et al.*, 2014). 피부에서 자외선에 의한 hyperpigmentation은 keratinocyte로부터 분비된 c ( $\alpha$ -MSH)가 melanocortin 1 receptor (MC1R)에 의해 melanocyte로 유입되고, cyclic adenosine monophosphate (cAMP), protein kinase A (PKA), CRE-binding protein (CREB) 등의 다양한 인자들로 인한 MITF 발현에 의해 유도된다(Bonaventure *et al.*, 2013; Shibahara *et al.*, 2000; Hartman & Czyz, 2015).

연자육(lotus seed)은 수련과(*Nymphaeaceae*)에 속하는 다년생 수생식물인 연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaertner)의 잘 익은 종자를 가을에 수확하여 과피를 제거하여 말린 것으로 연밥 혹은 연자로 불리며, 연자방(lotus seedpod)은 연꽃의 꽃턱을 말린 것이다. 연자육과 연자방은 예부터 한방 및 민간에서 약재 혹은 식용으로 널리 사용되어져 왔다(Lee *et al.*, 2013). 선행 연구에서 연자육 추출물이 미백 효능을 갖는다는 것을 밝혔으나, tyrosinase 및 상위 단백질이 합성되는 것을 저해하는 기전만을 제시하였으며, 연자방에 대해서는 이전까지 그 효능에 대해 알려진 바가 거의 없다(Lee *et al.*, 2013).

본 연구에서는 연자육과 연자방 추출물의 anti-pigmentation 효능과 tyrosinase 단백질 합성 과정 이후의 미백 기전을 추가적으로 알아보기 위해 연자육과 연자방의 *in vitro*상의 tyrosinase 활성 저해 효과와 B16F10 melanoma cell에서의 melanogenesis 억제 효과를 관찰하였고, 작용 기전을 확인하기 위해 melanogenesis에 관여하는 단백질의 발현 변화를 확인하였다. 추가로, cycloheximide (CHX)를 사용해 RNA의 ribosome으로의 전위를 억제하여 단백질 합성을 중단시킨 뒤, tyrosinase 단백질 분해 속도 변화를 확인하였다. 본 연구에서는 연자육과 연자방 추출물이 tyrosinase 단백질의 발현을 감소시킬 뿐만 아니라, tyrosinase 단백질 분해 속도를 높여 활성을 억제하는 효과를 나타냄을 최초로 입증하였다.

## Methods

### 1. 시료 제조

국내에서 생산된 연자방(농업회사법인 주식회사 두손애약초, Korea)과 베트남에서 생산된 연자육(삼흥건재약업사, Korea)을 추출물 제조에 사용하였다. 분쇄물 50 g을 용매인 70% 에탄올 500 mL에 넣어 초음파추출(ultrasonic cleaner, (주)대한과학, Korea)을 진행한 후 filter paper (F1002; CHMLAB Group, Spain)로 여과시켰다. 여과된 추출용액 345 g을 회전증발농축기(Rotavapor® R-300; BUCHI Korea, Korea)로 용매를 제거하여 추출물 32.5 g을 얻었다. 각 추출물은  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 사용하였다.

### 2. 세포주 배양

본 실험에서는 B16F10 melanoma 세포(ATCC, USA), 인간 각질형성세포인 HaCaT 각질형성세포(ATCC, USA)를 구입하여 사용하였으며, Dulbeccos modified eagle medium (DMEM; Biowest, France)에 10% fetal bovine serum (FBS; Biowest)과 1% penicillin-streptomycin (PS; Gibco, Australia)을 포함시켜  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 의 조건으로 세포배양기(Thermo Fisher Scientific, USA)에서 배양하였다.

### 3. 세포 생존율 측정

각 추출물이 세포 독성을 유발해 세포 생존에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 water-soluble tetrazolium salt (WST-1) assay를 이용해 세포 생존율을 측정하였다. 96-well plate에 B16F10 세포를 well당 3000 cells/well로 분주하여 배양하였다. 24 h 후, 연자육과 연자방 추출물을 각각 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1% 농도로 처리해 다시 세포배양기에서 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 EZ-cytox Cell Viability Assay Kit (Dogen, Korea)를 30 min 동안 처리하고 iMark microplate reader (Bio-Rad, USA)를 이용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 생존율(%)=시료첨가군의 흡광도/대조군의 흡광도  $\times$  100

### 4. Mushroom tyrosinase assay

96-well plate에 phosphate buffered saline (pH 6.8, PBS; Biowest, France), 1000 unit/mL mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich, USA) 10  $\mu\text{L}$ 와 각 추출물을 분주하여 10 mM L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA; Sigma-Aldrich) solution 10  $\mu\text{L}$ 과  $37^{\circ}\text{C}$ , 15 min 반응시켰다. 이후 490 nm에서 iMark microplate reader (Bio-Rad)로 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 활성 저해 정도는 다음 수식을 통해 무처리군과 추출물 처리군의 흡광도 감소율로 나타내었다(Sripathi & Lalitha, 2016).

감소율(%)=[1-(시료첨가군의 흡광도/무첨가군의 흡광도)]  $\times$  100

5. Cellular tyrosinase assay

B16F10 세포를 60-mm cell culture dish에  $2.5 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 24 h 배양한 뒤, 연자육 추출물과 연자방 추출물을 농도별로 처리해 48 h 배양하였다. 음성대조군으로  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH; Sigma-Aldrich) 100 nM을 사용하였으며, 양성대조군으로는 arbutin 500  $\mu$ M을 처리하였다. 시료 처리 48 h 후, PBS로 두 차례 세척한 뒤 세포를 회수하여 원심분리(12,000 rpm, 1 min)하였다. 상층액을 제거한 후, Radiomunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer를 이용해 용해시키고 세포용해물을 2 mM L-DOPA와 함께 37°C, 1 h 조건으로 반응시켰다. 이후 iMark microplate reader (Bio-Rad, USA)를 이용해 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포용해물의 단백질 정량은 BCA solution kit (Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 수행되었다. 데이터는 처리군을 무처리군에 대한 비율로 나타내었다.

$$\text{감소율(\%)} = [1 - (\text{시료첨가군의 흡광도} / \text{무첨가군의 흡광도})] \times 100$$

6. Melanin contents assay

B16F10 세포를 60 mm cell culture dish에  $2.5 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 24 h 동안 배양한 뒤, 연자육 추출물과 연자방 추출물을 농도별로 처리해 48 h 배양하였다. 음성대조군으로 100 nM  $\alpha$ -MSH를 사용하였다. 정확한 cell pellet을 촬영 후, 1 N sodium hydroxide (NaOH; Ducksan, Korea)로 용해시키고 세포용해물을 96-well plate에 분주하였다. 이후 iMark microplate reader (Bio-Rad)를 이용해 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포용해물의 단백질 정량은 BCA solution kit를 사용하여 수행되었다. 데이터는 처리군을 무처리군에 대한 비율로 나타내었다.

$$\text{멜라닌 양(\%)} = \text{시료첨가군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도} \times 100$$

7. Immunoblotting

B16F10 세포에  $\alpha$ -MSH 100 mM과 0.2, 0.5%의 연자육 추출물, 0.5, 1%의 연자방 추출물을 처리한 뒤 24 h 동안 배양하였다. 추가로, B16F10 세포에  $\alpha$ -MSH 100 mM과 0.5%의 연자육 추출물, 1%의 연자방 추출물 처리 24 h 후에 CHX (Sigma-Aldrich) 50  $\mu$ g/mL을 처리해 0, 4, 8 h 동안 배양하였다(Calvo et al., 1999). 이후 얻은 cell pellet을 RIPA buffer를 이용해 용해시키고 ice에서 20 min 동안 incubation한 뒤, 12,000 rpm에서 30 min 동안 원심분리하였고 상층액을 BCA solution kit로 정량하였다. 세포용해물은 5X sample buffer (Bio-Rad)을 첨가해 7 min간 가열 후 ice에서 20 min 동안

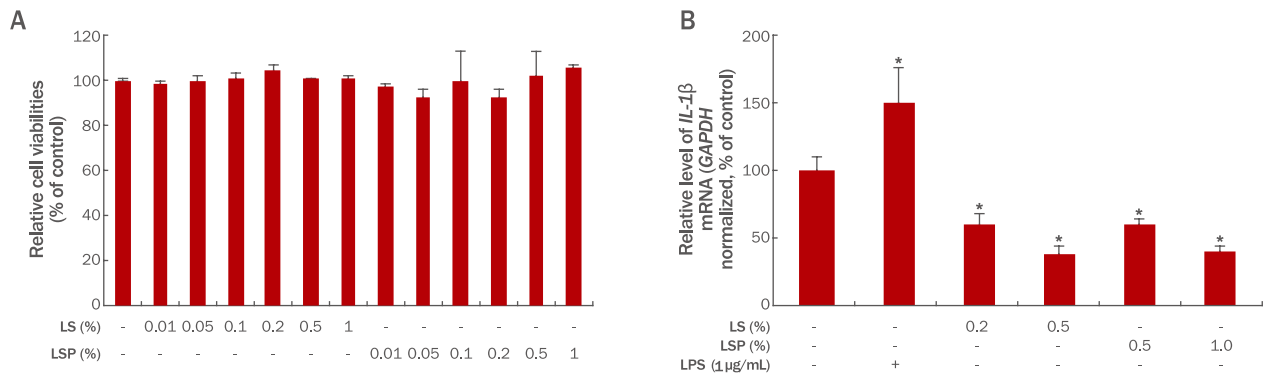
안정화시켜 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 membrane으로 transfer하고 5% skim milk로 30 min간 blocking한 뒤,  $\beta$ -actin, tyrosinase 1차 antibody를 넣고 overnight 처리하였다. 실험에 사용한 antibody 정보는 Table 1과 같다. 이후 1X TBST로 10 min씩 3번 세척하고 2차 antibody를 1 h 동안 처리해 다시 동일한 세척 과정을 거쳐 ECL (Bio-Rad)과 반응시켜 FUSION solo S (Vilber, France)로 확인하였고 image J program으로 분석하였다.

8. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

연자육, 연자방 추출물의 HaCaT 세포에 대한 염증 유발 여부와 B16F10 세포 내 tyrosinase 발현량 변화를 알아보기 위해 qRT-PCR을 통해 mRNA 발현을 분석하였다. IL-1 $\beta$ 의 음성 대조군으로 lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich) 1  $\mu$ g/mL을 사용하였고 HaCaT 세포에 LPS와 농도별 추출물들을 각각 처리한 후 24 h 동안 배양하였다. 또한,  $\alpha$ -MSH를 처리한 B16F10 세포에 농도별 추출물들을 처리하고 24 h 동안 배양하였다. 이후 RiboExTM Total RNA Isolation Solution (GeneAll Biotechnology, Korea) 1 mL을 이용해 세포를 용해시켰다. 세포 용해물에 클로로포름 (Sigma-Aldrich) 200  $\mu$ L을 넣고 12,000 rpm, 4°C에서 15 min 동안 원심 분리를 진행한 후 상층액을 분리하여 동량의 아이소프로판올(Merckmillipore, Germany)을 첨가하였다. Inverting 한 용액을 -20°C, 1 h incubation시킨 후 12,000 rpm, 4°C에서 20 min 동안 원심분리하였다. 침전된 RNA를 제외한 나머지를 버리고 70% 에탄올(Merck-Millipore, USA)을 넣어 12,000 rpm, 4°C에서 10 min 동안 원심분리 후 에탄올을 제거하였다. 그 후, nuclease free water (Affymetrix, USA)로 RNA를 용해시켜 total RNA를 추출해 MaestroNano Micro-volume Spectrophotometer (MN-913; Maestrogen, USA)로 RNA 순도와 농도를 A260/A280 파장에서 측정하였다. Oligo dT (Bionics, Korea), dNTP (Takara, Japan), DTT (Invitrogen, USA), M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen)를 사용해 complementary DNA (cDNA)를 합성하였다. 이후 denaturation (95°C, 15 min), denaturation (95°C, 15 s), annealing (60°C, 30 s), polymerization (72°C, 30 s) 과정을 40 cycle 동안 반복해 qRT-PCR을 진행하였다. 각 유전자의 threshold cycle ( $C_t$ )값을 GAPDH 발현에 대한  $C_t$ 값으로 표준화한 후에  $C_t$ 값의 변화량을 비교하여 상대적인 유전자의 발현 정도를 정량 분석하였다. 실험에 사용했던 유전자 primer 정보는 Table 2과 같다.

Table 1. List of 1st antibodies used immunoblot analysis

Antibody	Dilution	Species	Source
Tyrosinase	1:500	Rabbit	Abcam
$\beta$ -actin	1:500	Mouse	Santa Cruz



**Figure 1. Evaluation of cell viability and inflammatory response of LS extract and LSP extracts.**

B16F10 cells were treated with (A) LS and LSP for 24 h. WST-1 assay was conducted to evaluate the cell viability. (B) HaCaT cells were treated with LS and LSP for 24 h. qRT-PCR was conducted to evaluate the expression level of *IL-1β* mRNA. Each bar represents the mean±S.D. from three independent experiments. \**p*<0.05 indicates statistical significance. LS, lotus seed extract; LSP, lotus seedpod extract; *IL-1β*, interleukin 1 beta; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction.

**9. 통계분석**

각 연구결과는 독립적으로 3회 반복 실험하여 진행되었다. 통계분석 데이터는 평균±표준편차(mean±standard deviation, Mean±S.D.)로 표기하였고 그래프의 통계 분석은 GraphPad prism을 사용하여 생성되었다. One-way ANOVA 또는 two-way ANOVA는 정규 분포 데이터를 평가하는 데 사용되었으며 Tukey's test는 다중 비교를 수정하는데 사용되었다. \**p*-value 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하게 차이가 있다고 판정하였다.

**Results and Discussion**

**1. 연자육과 연자방 추출물의 세포 독성 및 염증반응 평가**

미백 효능을 확인하기 위한 실험을 진행하기에 앞서 B16F10 세포에 대한 연자육 및 연자방 추출물의 세포독성을 조사하기 위해 WST-1 assay를 수행하였다(Kang, 2020). 가장 높은 세포 독성을 갖는 농도에서 92% 이상의 세포 생존율을 나타냈으며 이 또한 유의미한 세포 독성을 갖는 것으로 볼 수 없으므로 시료를 처리하지 않은

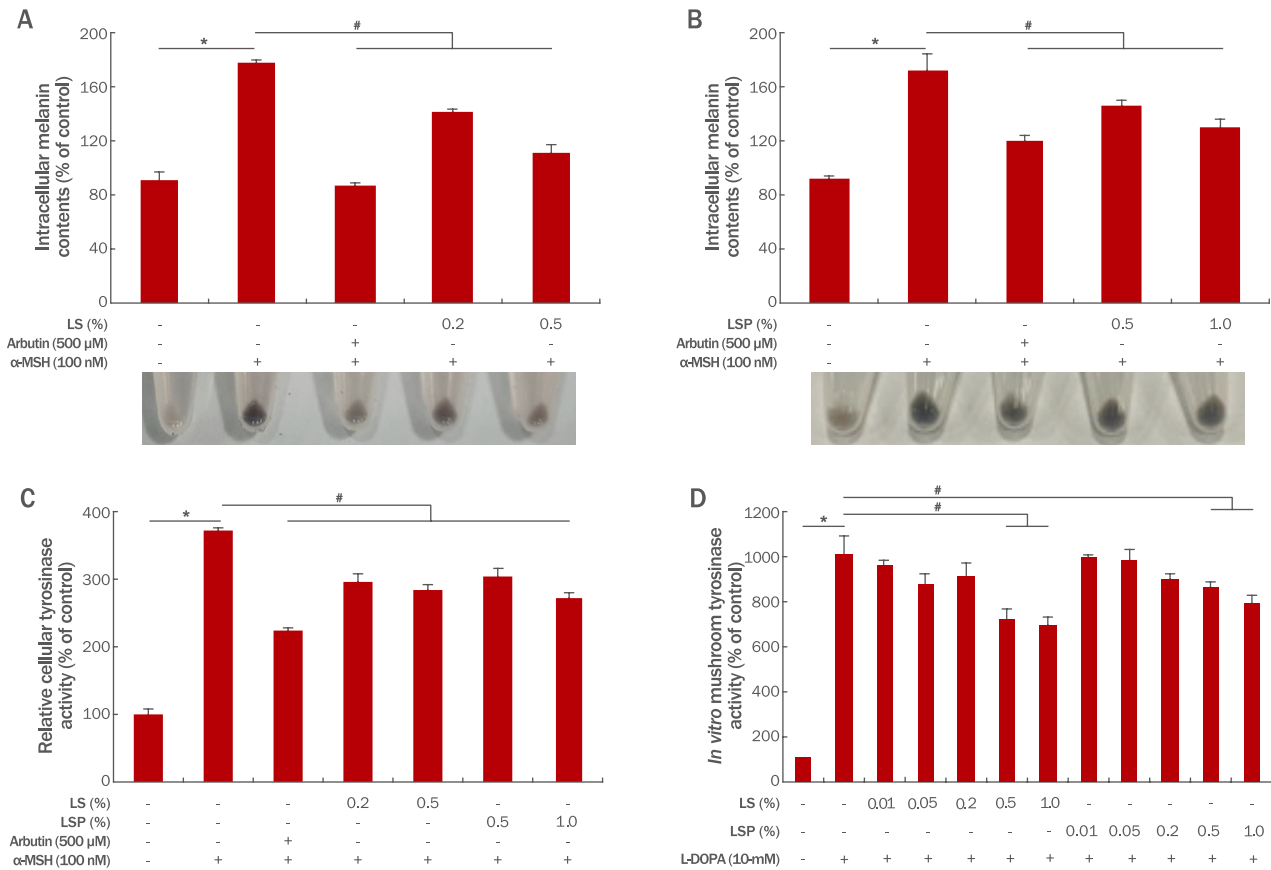
대조군과 시료를 각 농도별로 처리한 그룹 모두 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다(Figure 1A). 따라서 이후 실험에서는 0.2%, 0.5%의 연자육 추출물과 0.5%, 1.0%의 연자방 추출물을 처리하여 미백 효능 실험을 진행하였다. 또한, 본 연구의 목적은 연자육 및 연자방 추출물을 화장품 소재로서 피부에 도포하였을 때의 효능을 확인하는 것이다. *IL-1β*는 통증, 염증 및 자가면역 상태와 관련된 염증성 cytokine이다(Ren & Torres, 2008). *IL-1β*의 과발현은 다양한 질병상태에서 발생하는 병태생리학적 변화와 관련이 있다(Dinarello, 2004; Braddock & Quinn, 2004; Dinarello, 1996). 따라서 두 추출물의 미백 효능 여부를 실험하기에 앞서 추출물이 화장품 소재로서 피부에 적용되었을 때의 안전성을 검증하기 위해 인간각질형성 세포인 HaCaT 세포 내 추출물 처리에 따른 *IL-1β*의 mRNA 발현을 분석하였다(Nisticò *et al.*, 2010). 무처리군과 1 μg/mL의 LPS를 처리한 음성대조군을 비교하였을 때 음성대조군에서 *IL-1β* mRNA의 발현량이 32% 증가하였지만, 추출물을 처리한 결과, 무처리군에 비해 *IL-1β*의 발현량이 0.2%, 0.5% 연자육 추출물에 의해 각각 41%, 63% 감소하였으며, 0.5%, 1.0% 연자방 추출물에 의해서 41%, 61% 감소하였다(Figure 1B). 이를 통해 연자육 및 연자방 추출물이 염증

**Table 2. List of primers for quantitative real time polymerase chain reaction**

Gene		Sequence (5' to 3')
<i>IL-1β</i>	Forward	AATCTGTACCTGCTCCTGCGTGTT
	Reverse	TGGGTAATTTTTGGGATCTACTACTCT
Tyrosinase	Forward	AGTCGTATCTGGCCATGGCTTCTTG
	Reverse	GCAAGCTGTGGTAGTCGCTTTGTGTC
<i>GAPDH</i>	Forward	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
	Reverse	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCCAG

*IL-1β*, Interleukin 1 beta; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.





**Figure 2. Effect of LS and LSP on melanogenesis inhibition.**

B16F10 Cells were treated with LS at concentrations of 0.2, 0.5% and LSP at concentrations of 0.5, 1.0%. (A) Melanin contents assay in B16F10 cells treated with LS and (B) LSP. (C) Cellular tyrosinase activity assay in B16F10 cells treated with LS and LSP; (D) Mushroom tyrosinase inhibition assay was conducted to evaluate the enzymatic inhibitory effect of LS and LSP. Each bar represents the mean±S.D. from three independent experiments. \**p*<0.05 indicates significant from vehicle treated group. #*p*<0.05 indicates significant from α-MSH treated group. LS, lotus seed extract; LSP, lotus seedpod extract ; α-MSH, α-melanocyte-stimulating hormone; L-DOPA, L-dihydroxyphenylalanine.

성 cytokine인 *IL-1β*의 mRNA 발현을 억제하였기 때문에 해당 추출물들의 *IL-1β*를 통한 염증 유발 가능성을 배제할 수 있으며, 화장품 소재로서의 안전성을 검증하였다.

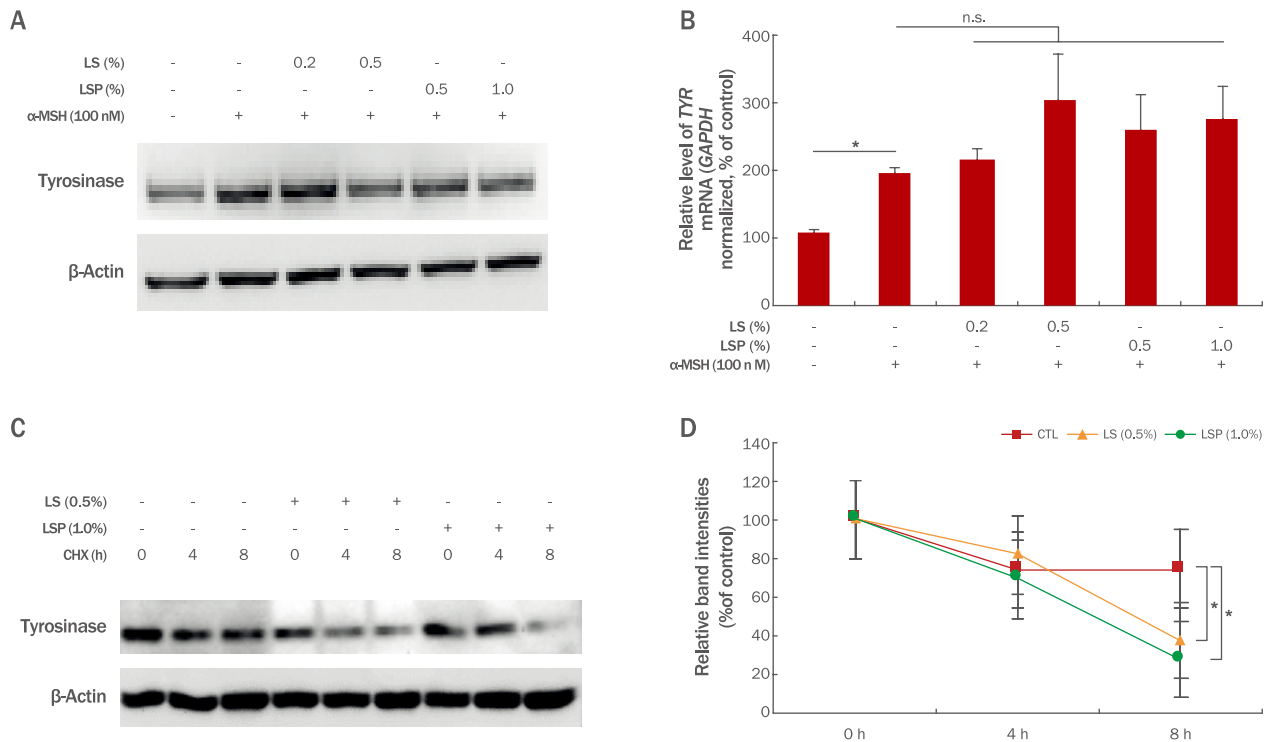
## 2. 연자육과 연자방 추출물의 tyrosinase 저해 효과 확인

B16F10 세포에서 연자육과 연자방 추출물이 α-MSH에 의해 유도된 melanogenesis를 감소시키는지 알아보기 위해 0.2%, 0.5% 연자육(Figure 2A)과 0.5%, 1.0% 연자방(Figure 2B)을 48 h 동안 B16F10 세포에 처리한 후 melanin content assay를 진행했으며 양성대조군으로는 arbutin을 사용하였다. α-MSH를 처리한 대조군에서 melanin의 양이 유의하게 증가했으며 arbutin 처리 시 각각의 실험에서 51%, 31%의 멜라닌 감소량을 보였다. 연자육 추출물(0.2%, 0.5%)과 연자방 추출물(0.5%, 1.0%)을 처리했을 때 melanin의 양이 연자육 추출물에 의해 20%, 37% 감소하였으며, 연자방 추출물에 의해

14%, 24% 감소하였으며 이는 농도 의존적인 수치임을 확인하였다.

멜라닌은 효소 촉매 반응과 화학 반응의 조합에 의해 형성되는데, melanogenesis 과정에서 tyrosine과 dopa는 tyrosinase에 의해서 dopaquinone으로 산화된다. 멜라닌 생성은 tyrosine의 산화에서부터 시작되며 이 단계는 멜라닌 합성의 rate-limiting 단계이다(Chang, 2009). 따라서 세포 내에서 melanogenesis 과정에 관여하는 가장 중요한 단백질인 tyrosinase의 활성을 저해하는지 알아보기 위해 cellular tyrosinase activity assay를 진행하였다(Figure 2C) (Chang, 2009; Baek & Lee, 2015). α-MSH와 연자육 추출물 0.2%, 0.5%와 연자방 추출물 0.5%, 1.0%를 함께 처리하였고, 양성대조군으로는 arbutin을 사용하였다. 실험 결과를 통해 추출물이 B16F10 세포 내에서 cellular tyrosinase의 활성을 0.2%, 0.5%에 의해 21%, 24% 감소시켰으며, 0.5%, 1.0% 연자방 추출물에 의해

## Anti-pigmentation Effect of Lotus Seed and Seedpod Extract



**Figure 3. Effects of LS extract and LSP extract on tyrosinase expression.**

(A) qRT-PCR was conducted to evaluate the mRNA expression level of tyrosinase in B16F10 cells treated with LS and LSP. (B) Immunoblotting was conducted to evaluate the protein expression level of tyrosinase. (C) Immunoblotting was conducted to evaluate the protein degradation level of tyrosinase. Quantifications of the protein expression were measured by scanning densitometry using the Image-J program. Each bar represents the mean $\pm$ S.D. of three independent experiments. \* $p$ <0.05 indicates statistical significance. LS, lotus seed extract; LSP, lotus seedpod extract.

18%, 27% 감소시킴으로써 농도 의존적으로 저해함을 확인하였다. 이는 세포 내 tyrosinase 발현이 억제되거나 효소 활성이 직접적으로 억제되어 cellular tyrosinase의 활성이 저해된 결과이므로, 추출물이 MITF와 같은 상위 기전과 관계없이 tyrosinase의 효소 활성을 직접적으로 저해하는지 확인하기 위해 *in vitro* mushroom tyrosinase inhibition assay (Shim, 2019)를 진행하였다. L-DOPA 단독처리군에 비해 추출물 처리군에서 tyrosinase 활성이 감소하였고 0.5, 1%의 연자육 처리군에서 각각 29%, 32%의 감소율을 보였으며, 같은 농도의 연자방 처리군에서 각각 15%, 21% 감소율을 보이며 유의한 결과를 나타냈다(Figure 2D). 추출물이 tyrosinase의 효소 활성을 직접적으로 조절하여 cellular tyrosinase의 활성을 저해했음을 확인했고, 이는 곧 melanogenesis 과정을 억제해 melanin 합성량의 감소로 이어진다.

### 3. 연자육과 연자방 추출물 처리에 의한 tyrosinase 발현 및 반감기 확인

이전 실험 결과를 통해, 두 추출물이 tyrosinase 활성을 직접적으로 저해한다는 것을 확인하였다. 또한 두 추출물을 처리한 B16F10

cell 내 tyrosinase를 추출하여 L-DOPA와 반응시켰을 때, 반응이 감소하는 것도 확인하였다. 이는 cell 내에서 시료에 의한 tyrosinase 활성 감소에 의한 것뿐만 아니라 시료에 의한 tyrosinase의 양 감소에 의한 것일 수도 있다. 따라서 추출물 처리에 의한 tyrosinase protein level의 변화를 확인하기 위해 B16F10 세포에  $\alpha$ -MSH로 멜라닌 합성을 자극하고 연자육 추출물 0.2, 0.5%와 연자방 추출물 0.5, 1%를 처리한 후, Table 1에서 언급된 antibody를 사용하여 immunoblotting을 진행하였다. 무처리군에 비해  $\alpha$ -MSH 단독 처리군에서 tyrosinase protein level이 증가하였고 추출물을 처리함에 따라 농도 의존적으로 발현량이 감소하였다(Figure 3A). 이후, tyrosinase의 protein level 감소가 tyrosinase의 mRNA 양 감소에 의한 것인지를 확인하는 실험을 진행하였다. 이전 실험과 동일한 조건으로 시료를 처리한 후, Table 2에서 언급된 primer를 사용하여 qRT-PCR을 통해 tyrosinase mRNA 발현량의 변화를 확인하였다.  $\alpha$ -MSH 단독처리군의 경우, 무처리군에 비해 tyrosinase mRNA 발현량이 증가하였지만 농도별 추출물 처리 조건에서는 유의한 변화를 확인할 수 없었다(Figure 3B).  $\alpha$ -MSH에 의해 증가된 tyrosinase

단백질 발현량이 두 추출물 처리에 의해 감소하는 것은 tyrosinase mRNA 양 조절과 관련이 없음을 확인하였다. 연자육 및 연자방 추출물이 tyrosinase protein의 stability를 감소시켜, tyrosinase의 단백질 분해를 촉진시키는데 대한 여부를 알아보기 위한 실험을 진행하였다(Buchanan, 2016). 따라서 추출물 처리 24 h 후 CHX 0, 4, 8 h 간 처리를 통해, 시간에 따른 tyrosinase protein level을 확인하였다. CHX 처리 4 h 후, 단백질 양의 유의미한 변화를 관찰할 수 없었으나, 8 h 후, 무처리군에 비해 0.5% 연자육 추출물과 1.0% 연자방 추출물 처리군에서 각각 62%와 72%의 tyrosinase 단백질 발현량 감소를 보였다(Figure 3C). 따라서 본 연구는 각 추출물이 tyrosinase의 post-translational modification 과정에 관여하여 tyrosinase 반감기 감소에 따른 조절을 통해 B16F10 cell 내에서  $\alpha$ -MSH에 의한 melanogenesis를 저해함을 입증한다.

## Conclusion

본 연구에서 0.2, 0.5%의 연자육 추출물 및 0.5, 1%의 연자방 추출물을 처리하였을 때 B16F10 세포에 대한 독성과 HaCaT 세포에 대한 염증 유발이 관찰되지 않았다. 각 추출물을 동일한 농도로 B16F10 세포에 처리했을 때 멜라닌 합성량이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였고, *in vitro* 및 세포 내에서 확인한 tyrosinase 활성을 저해한다는 것을 확인하였다. 이후, 동일 조건에서 tyrosinase mRNA 발현량은 변화하지 않았으나 tyrosinase 단백질 수준은 감소하였다. Cycloheximide 처리를 통해 tyrosinase 단백질 수준 감소는 각 추출물에 의한 단백질 분해 촉진에 의한 것임을 확인하였다. 이를 통해 연자육 및 연자방 추출물이 post-translational modification 과정에 관여하며, tyrosinase 활성을 저해하고 이를 통해 멜라닌 합성을 저해한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구는 연자육 및 연자방 추출물에 대해 미백 기능성 화장품 소재로서의 가능성을 제시한다.

## Acknowledgements

본 연구는 건국대학교 대학혁신지원사업(차세대 화장품공학 실무 역량 강화 프로그램, 혁신사업3:A308)의 일환으로 수행하였음.

## Author's contribution

HS, MK and BS performed experiments and HS, MK and SHB analyzed the data and designed overall experiments together and wrote the manuscript. All authors read and confirmed the final version of manuscript.

## Author details

Hee-Jae Shin (Student), Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University, 120 Neungdong-ro,

Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea; Mihee Kim (Student), Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University, 120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea; Bum-Soo Shin (Student), Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University, 120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea; Seunghee Bae (Professor), Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University, 120 Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul 05029, Korea.

## References

- Bae-Harboe YS, Park HY. Tyrosinase: a central regulatory protein for cutaneous pigmentation. *Journal of Investigative Dermatology*, 132: 2678-2680, 2012.
- Baek SH, Lee SH. Sesamol decreases melanin biosynthesis in melanocyte cells and zebrafish: possible involvement of MITF via the intercellular cAMP and p38/JNK signaling pathways. *Experimental Dermatology*, 24: 761-766, 2015.
- Bentley NJ, Eisen T, Goding CR. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Molecular and Cellular Biology*, 14: 7996-8006, 1994.
- Bonaventure J, Domingues MJ, Larue L. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 26: 316-325, 2013.
- Braddock M, Quinn A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3: 330-340, 2004.
- Buchanan BW, Lloyd ME, Engle SM, Rubenstein EM. Cycloheximide chase analysis of protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Visualized Experiments*, 10: 3791-53975, 2016.
- Calvo P, Frank D, Bieler B, Berson J, Marks M. A cytoplasmic sequence in human tyrosinase defines a second class of di-leucine-based sorting signals for late endosomal and lysosomal delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 12780-12789, 1998.
- Chan CF, Huang CC, Lee MY, Lin YS. Fermented broth in tyrosinase- and melanogenesis inhibition. *Molecules*, 19: 13122-13135, 2014.
- Chang TS. An updated review of tyrosinase inhibitors.

## Anti-pigmentation Effect of Lotus Seed and Seedpod Extract

- International Journal of Molecular Sciences*, 10: 2440-2475, 2009.
- Dinarelo CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87: 2095-2147, 1996.
- Dinarelo CA. Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. *Current Opinion in Pharmacology*, 4: 378-385, 2004
- Hartman ML, Czyz M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72: 1249-1260, 2015.
- Kang J. Suppression of matrix metalloproteinase-3 expression in human dermal fibroblasts by decursin from *Angelica gigas* Nakai root extracts fermented with Jeju lava seawater. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 19: 65-76, 2020.
- Kadekaro AL, Chen J, Yang J, Chen S, Jameson J, Swope VB, Cheng T, Kadakia M, Abdel-Malek Z. Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses oxidative stress through a p53-mediated signaling pathway in human melanocytes. *Molecular Cancer Research*, 10: 778-786, 2012.
- Lee JY, Im KR, Jung TK, Yoon KS. The inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* Gaertner extract on melanogenesis. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 28: 137-145, 2013.
- Park JY. Melanogenesis inhibitory effect of steamed *Platycodon grandiflorum* on B16F10 cells. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 17: 37-46, 2019.
- Passeron T, Mantoux F, Ortonne JP. Genetic disorders of pigmentation. *Clinics in Dermatology*, 23: 56-67, 2005.
- Ren K, Torres R. Role of interleukin-1 $\beta$  during pain and inflammation. *Brain Research Reviews*, 60: 57-64, 2008.
- Nisticò S, Paolillo N, Minella D, Piccirilli S, Rispoli V, Giardina E, Biancolella M, Chimenti S, Novelli G, Nisticò G. Effects of TNF- $\alpha$  and IL-1  $\beta$  on the activation of genes related to inflammatory, immune responses and cell death in immortalized human HaCaT keratinocytes. *International Journal of Immunopathology Pharmacology*, 23: 1057-1072, 2010.
- Schallreuter KU, Kothari S, Chavan B, Spencer JD. Regulation of melanogenesis--controversies and new concepts. *Experimental Dermatology*, 17: 395-404, 2008.
- Shibahara S, Yasumoto K, Amai S, Uono T, Watanabe K, Saito H, Takeda K. Regulation of pigment cell-specific gene expression by MITF. *Pigment Cell Research*, 13: 98-102, 2000.
- Shim JH. Whitening effect of Brazilin in B16F10 cells. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*, 17: 287-294, 2019.
- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews*, 84: 1155-1228, 2004.
- Sripathi SK, Lalitha P. Keratolytic molecule aided inhibition of DNA damage and tyrosinase activity of a herbal formulation. *International Journal of BioSciences and Technology*, 9: 7-14, 2016.
- Wasmeier C, Hume AN, Bolasco G, Seabra MC. Melanosomes at a glance. *Journal of Cell Science*, 121: 3995-3999, 2008.



## 국문초록

## 연자육과 연지방 추출물을 이용한 세포 내 미백 효능 유효성 평가

신희재, 김미희, 신범수, 배승희\*  
 건국대학교 화장품공학과, 서울, 한국

**목적:** 본 연구는 B16F10 세포 내에서 연꽃(*Nelumbo nucifera* Gaertner)의 부위인 연자육과 연지방 추출물의 anti-melanogenesis 기전을 입증하여 그 효능을 조사하고, 화장품의 새로운 소재로써 사용하는 것을 목표로 하였다. **방법:** 연자육과 연지방 추출물은 70% 에탄올 용액으로 추출하였다. 각 추출물의 자극성은 B16F10 세포와 HaCaT 세포에서 WST-1을 기반으로 세포 독성 분석 및 염증성 cytokine인 IL-1 $\beta$  분석을 통해 확인하였다. 해당 추출물들의 미백 효과는 세포 내 멜라닌 함량 및 tyrosinase 활성 분석을 통해 확인하였다. Tyrosinase 발현에 미치는 영향은 mRNA와 단백질 수준에서 분석되었다. Cycloheximide 처리 후 단백질 수치를 평가하여 해당 추출물이 tyrosinase 단백질 안정성에 미치는 영향을 분석하였다. **결과:** WST-1 세포 독성 평가를 통해  $\leq 1.0\%$  농도의 연자육과 연지방 추출물은 B16F10 세포에서 독성을 나타내지 않았다. 또한 qRT-PCR 분석에 의해 HaCaT 세포 내에서 IL-1 $\beta$  mRNA 발현은 해당 추출물 처리에 의해 증가하지 않았다. 세포 내 멜라닌 함량 측정을 통해 연자육과 연지방 추출물이  $\alpha$ -MSH로부터 유도된 멜라닌 합성을 현저하게 저해함을 확인했다. 세포 내 tyrosinase 활성은 추출물에 의해 유의하게 감소하였다. 추가 연구를 통해 tyrosinase 활성의 감소는 mRNA 발현 수준과 무관하며 단백질 발현 수준에 의존함을 확인했다. 이러한 결과는 cycloheximide를 사용한 tyrosinase 안정성 평가에서 해당 추출물들에 의해 감소한 것을 재확인하였다. **결론:** 연자육과 연지방 추출물은 B16F10 세포에서 번역 후 과정에서 tyrosinase 단백질 분해를 가속화하여 색소 침착 방지 효과를 보였다.

**핵심어:** 연자육 추출물, 연지방 추출물, B16F10 melanoma, Tyrosinase, Anti-pigmentation

본 연구는 건국대학교 대학혁신지원사업(차세대 화장품공학 실무 역량 강화 프로그램, 혁신사업3:A308)의 일환으로 수행하였음.

## 참고문헌

- 강정욱, 남가람, 윤예화, 김경미, 배소원, 이현정, 배승희, 차영권, 조현대, 조항의. 제주 용암해수로 숙성된 참당귀 (*Angelica gigas* Nakai) 뿌리 추출물과 지표물질 데커신(Decursin)의 인간 진피섬유아세포 내 MMP3 발현 억제 효과. *아시아뷰티화장품학술지*, 19: 65-76, 2021.
- 박정용, 이지연, 이대영, 김형돈, 김금숙, 이승은, 서경혜. B16F10 세포에서 증속도라지 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과. *아시아뷰티화장품학술지*, 17: 37-46, 2019.
- 심중현. B16F10 세포에서 브라진린의 미백 효능. *아시아뷰티화장품학술지*, 17: 287-294, 2019.
- 이준영, 임경란, 정택규, 윤경섭. 연자육 추출물의 멜라닌 합성 저해효과. *KSBB Journal*, 28: 137-145, 2013.

## 中文摘要

### 莲籽和莲蓬提取物的细胞内美白功效的功效评价

慎熙綽, 金美熙, 申范秀, 裴承熙\*  
建国大学化妆品学科, 首尔, 韩国

**目的:** 本研究探讨了莲籽和莲蓬提取物对B16F10小鼠黑色素瘤细胞的抗黑色素生成作用, 并证明了参与抗色素沉着的可能机制。**方法:** 以70%乙醇为溶剂, 制备莲籽和莲蓬提取物。分别使用water-soluble tetrazolium salt (WST-1)进行细胞毒性测定和促炎细胞因子 IL-1 $\beta$ 在B16F10 细胞和 HaCaT 角质形成细胞中的表达分析来研究提取物的刺激潜力。使用细胞内黑色素含量和酪氨酸酶活性测定分析提取物的抗黑色素生成作用。在mRNA和蛋白质水平上分析了提取物对酪氨酸酶表达的影响。通过评估放线菌酮处理后的蛋白质水平, 分析了这些提取物对酪氨酸酶蛋白稳定性的影响。**结果:** 基于 WST-1的细胞毒性测定表明,  $\leq 1.0\%$  浓度的莲籽和莲蓬提取物在B16F10细胞中没有表现出任何细胞毒性。此外, qRT-PCR 分析显示, 在HaCaT 角质形成细胞中, 这些提取物浓度范围内并未增加 *IL-1 $\beta$*  mRNA 的表达。此外, 细胞内黑色素含量测定表明, 这些提取物显著抑制了  $\alpha$ -MSH 诱导的黑色素合成。此外, 提取物显著抑制细胞酪氨酸酶活性。进一步的研究表明, 酪氨酸酶活性降低与其 mRNA 表达水平无关, 但取决于其蛋白质表达水平。放线菌酮实验的结果进一步证实了这些发现, 表明用这些提取物处理后酪氨酸酶的蛋白质稳定性降低。**结论:** 莲籽和莲蓬提取物通过在B16F10细胞中加速翻译后水平的酪氨酸酶蛋白降解而显示出抗色素沉着作用。

**关键词:** 莲籽提取物, 莲蓬提取物, B16F10 黑色素瘤细胞, 酪氨酸酶, 抗色素沉着