

레조시놀다이펜틸에터의 피부 미백 효능 평가

차영권*[†] · 조현대* · 조완구** · 변상요***

*(주)코스메카코리아 기술연구원, **전주대학교 바이오기능성식품학과,
***아주대학교 응용생명공학과
(2017년 4월 12일 접수, 2017년 5월 25일 수정, 2017년 6월 12일 채택)

Studies on Skin Whitening Effects of Resorcinol Dipentyl Ether

Young Kwon Cha*[†], Hyun Dae Cho*, Wan Goo Cho**, and Sang Yo Byun***

*Cosmecca Korea, CIR Center, 7F, Tower A, KoreaBioPark, 700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13488, Korea

**Department of Functional Food & Biotechnology, Jeonju University, 303 Cheonjam-ro, Wansan-gu, Jeonju-si, Jeonbuk-do 55069, Korea

***Cosmetic Science Major, Applied Biotechnology Department, Graduate School, Ajou University, Suwon-si, Gyeonggi-do 16499, Korea

(Received April 12, 2017; Revised May 25, 2017; Accepted June 12, 2017)

요약: 레조시놀다이펜틸에터(1,3-di(pentyloxy)benzene)의 피부 미백 효과를 확인하기 위해 *in vitro* 실험을 통하여 미백 효과를 평가하였다. 레조시놀다이펜틸에터는 resorcinol과 1-bromopentane의 알킬화반응을 통하여 제조하였으며, 반응 결과물을 NMR, MS 등의 분석장비를 통해 확인하였다. 레조시놀다이펜틸에터의 피부 안전성 평가를 위하여, 피부를 구성하는 세포들(keratinocyte, melanocyte, fibroblast)에 대한 독성을 분석한 결과 대조군에 비해서 모든 세포주들에서 유사한 cell viability를 확인하였다. 세포생존에 영향을 미치지 않는 농도인 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 세포 외 멜라닌 분비 저해능을 측정된 결과 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 약 65.75%까지 농도의존적으로 멜라닌 분비를 억제하는 것을 확인하였으며, 세포 내 멜라닌 생성 억제율을 측정된 결과에서도 약 53.89%를 억제함을 확인하였다. 멜라닌 형성 관련 티로시나제, TRP-1, TRP-2의 mRNA 발현량과 단백질 발현량을 real-time PCR 방법과 western blot으로 측정을 한 결과 레조시놀다이펜틸에터는 멜라닌 억제효과가 전사(transcription) 단계부터 억제하는 것을 확인하였다. 최종적으로 본 연구는 레조시놀다이펜틸에터의 미백기능성화장품 신소재로서의 적용가능성을 제시하였다.

Abstract: The objective of this study was to investigate skin whitening effect of Resorcinol dipentyl ether [1,3-di(pentyloxy)benzene] by *in vitro* experiments. Resorcinol dipentyl ether was prepared by alkylation of resorcinol with 1-bromopentane. The reaction products were confirmed by NMR, MS and other analytical equipments. In order to evaluate the skin safety of resorcinol dipentyl ether, the cytotoxicity of the cells constituting the skin (keratinocyte, melanocyte, fibroblast) was analyzed and similar cell viability was observed in all cell lines as compared with the control group. Inhibition of extracellular melanin synthesis effect of resorcinol dipentyl ether was approximately 65.75% at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and inhibition of intracellular melanin synthesis effect of resorcinol dipentyl ether was approximately 53.89% at 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The real-time PCR and western blot analysis of mRNA expression and protein expression of tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 related to melanogenesis revealed that melanin inhibitory effect of resorcinol dipentyl ether was inhibited from the transcription stage respectively. Finally, this

† 주 저자 (e-mail: ykcha001@cosmecca.com)
call: 031)784-6550

study suggested applicability of Resorcinol dipentyl ether [1,3-di(pentyloxy)benzene] as a whitening functional cosmetic new material.

Keywords: Resorcinol dipentyl ether, melanin, MTT assay, tyrosinase, mRNA

1. 서 론

사람의 피부색은 멜라닌, 카로틴 및 헤모글로빈의 양에 따라 결정되는데 이 중 멜라닌이 가장 결정적인 요소이다. 멜라닌은 피부 표피 내 기저층에 존재하는 색소세포인 멜라노사이트(melanocyte)에서 합성되며 주변 각질세포(keratinocyte)로 전이되어 사람의 피부색을 나타낸다[1]. 멜라닌이 비정상적으로 적게 생산되면 백반증(vitiligo)과 같은 피부 병변이 유발된다. 반대로 과잉 생산은 중년 여성들의 주요 고민 중 하나인 기미, 주근깨를 형성하며 또한 피부색과도 밀접한 관계가 있다[2].

미백 작용을 더욱 자세히 설명하면 다음과 같다. 멜라닌은 피부 표피의 기저층에 존재하는 멜라노사이트라는 세포에서 티로신(tyrosine)이 효소 및 비효소적 산화반응을 거쳐 생성되며, 표피를 구성하고 있는 각질 세포로 전이된다[3-5]. 멜라닌의 생합성에 관여하는 중요한 효소로는 티로시나제(tyrosinase), 티로시나제 관련 단백질 1 (tyrosinase-related protein 1) 및 도파크롬 토토펠라제(dopachrome tautomerase)가 있다. 멜라닌의 생합성 첫 단계는 티로시나제에 의하여 유발된다. 티로시나제에 의해 티로신이 도파(dopa)로 되고, 이 도파(dopa)를 도파퀴논(dopa-quinone)으로 만든다. 이 두 반응의 다음단계 과정들은 비효소적인 반응에 의해서도 가능한 것으로 알려져 있으며 티로시나제 단독으로도 멜라닌 생성이 가능하다고 알려져 있다[6-9].

최근에는 피부 세포 내의 신호 전달물질의 발현에 따른 멜라닌 형성과정에 대한 새로운 이론이 제시되고 있다. 즉, 피부가 자외선에 노출되면 염증을 유발시키는 인터루킨-알파(interlukin- α)가 상피(epidermis) 내에 있는 각질세포로부터 발현되고, 이 인터루킨-알파가 각질세포 엔도셀린(endothelin)발현을 촉진시킨다. 이러한 일련의 과정이 멜라노사이트의 형성을 증가시키고 멜라노사이트를 활성화시킨다. 이렇게 형성된 멜라노사이트 내 멜라노솜에서 티로신이 티로시나제에 의해 멜라닌이 형성된다[10,11].

이미 아스코르빈산, 코직산, 알부틴 및 일부의 화합

물들이 티로시나제 저해 활성을 가지고 있어 미백 화장품의 원료로 이용되고 있으나, 화장품 제형 내에서 분해되어 착색되거나, 이취의 발생, 생체 레벨에서의 효능, 효과의 불분명 및 피부자극과 같은 안전성 문제 등으로 그 사용이 제한되고 있는 실정이다[12,13]. 대부분의 티로시나제 저해제들은 플라보노이드계열, 찰콘(chalcone, 1,3-diphenyl-2-propen-1-one), 스틸벤(stilbene; C₁₄H₁₂)과 같은 기본 구조에 디히드록시벤젠과 레조시놀 같은 독특한 수산화기들을 가지고 있다. 또한 레조시놀 구조를 가지는 벤조싸이아졸(benzothiazolyl), 치환된 벤조이미다졸 화합물(benzimidazolyl derivatives) 등은 티로시나제 저해 screening에서 코직산 보다 좋은 효과를 나타낸 것으로 보고되고 있다[14,15].

따라서, 본 연구에서는 속수자(*Euphorbia Lathyris*)의 구조물질인 sucrose 3,4,6,2',6-pentaisovalerate (SPI)의 구조/활성 상관성 분석(structure/activity relationship analysis)을 수행하여 개발된 피부 미백제 레조시놀다이펜틸 에터의 피부 안전성을 평가하고, *in vitro* 실험을 통한 미백 효과를 평가하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 레조시놀다이펜틸에터의 합성재료

레조시놀다이펜틸에터의 합성에 사용된 resorcinol은 Junsei EP grade을 사용하였으며, 1-bromopatane은 TCI의 제품을 정제 없이 그대로 사용하였다. Potassium phosphate tribasic, potassium iodide와 sodium chloride, magnesium sulfate anhydrous, ethyl acetate는 Daejung chemicals & metals Co. Ltd. 제품을 정제 없이 사용하였다. 물은 순수제조장치(RiOs™ 5, Millipore, USA)에 의해 제조된 정제수를 사용하였다.

2.2. 레조시놀다이펜틸에터의 세포 생존율 및 멜라닌 생성 저해 실험 및 방법

2.2.1. 실험 재료

세포독성 및 멜라닌 생합성에 미치는 영향을 확인하

기 위해 B16F10 melanoma (ATCC[®] CRL 6475TM), keratinocyte HaCaT (CLS 300493), fibroblast CCD986SK (ATCC[®] CRL 1947TM)와 세포 배양을 위해 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (high glucose DMEM, Thermo Fisher, USA), penicillin/streptomycin solution (SV30010, Thermo Fisher), fetal bovine serum (SH30406.02, Thermo Fisher), trypsin-EDTA (10x 15400-054, Thermo Fisher), 6-well cell culture plate (3335, Corning, USA), 96-well cell culture plate (3595, Corning), 100 mm cell culture dish (172958, Thermo Fisher), EZ-CYTOX (EZ-1000, Daeillab, Korea)를 사용하였다.

2.2.2. 세포 배양(Cell Culture)

본 실험에 사용된 세포주인 B16F10 melanoma, keratinocyte, fibroblast를 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 DMEM으로 세포수가 5×10^5 cells/dish가 되도록 배양한다. 100 mm cell culture dish를 사용하여 5% CO₂ 배양기에 배양한다. Confluence에 도달한 세포는 trypsin-EDTA를 사용하여 계대 배양하여 유지한다.

2.2.3. 레조시놀다이펜틸에터의 안전성 실험

레조시놀다이펜틸에터의 안전성을 평가를 위하여, 피부를 구성하는 keratinocyte, melanocyte, fibroblast 세포들에 대한 독성을 분석하였다. 독성 분석은 각 세포 주들의 미백제에 대한 생존력(cell viability)을 조사하여 평가하였다. 피부를 구성하는 각각의 세포주들을 CO₂ 배양기에서 각각 6-well cell culture plate에 1×10^5 cells/well 농도로 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 DMEM 배양액으로 24 h 배양한 후 레조시놀다이펜틸에터를 농도별(5-20 μ g/mL)로 48 h 동안 처리한 후 MTT assay를 통해서 세포 생존율을 분석하였다. 세포에 시료 처리 시 각각의 시료 농도에 대한 solvent로 사용한 DMSO 양이 다르기 때문에 시료농도 5, 10, 20 μ g/mL에 대한 각각의 대조군을 설정하였다.

2.2.4. 레조시놀다이펜틸에터의 세포 내·외 멜라닌 생성 및 분비 저해능 실험

B16F10 melanoma를 6-well cell culture plate에 1×10^5 cells/well 농도로 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 DMEM 배양액으로 24 h 배양한다. 그 후 멜라닌 생성 유도 물질 α -MSH 50 nM과 시료가 포함된 DMEM

배양액으로 교체하여 48-72 h 배양한다. 세포 외 멜라닌 분비 저해능 측정은 배양이 끝난 세포를 배양액과 함께 원심분리하고 상층액을 96-well plate에 옮겨 450 nm에서 흡광도를 측정한다. 세포 내 멜라닌 생성 억제율 측정은 원심분리하여 수득한 cell pellet을 DPBS로 세척한 후 40 °C에서 건조시킨다. 건조된 cell pellet에 1N NaOH를 첨가하여 80 °C 열수에서 30 min 동안 중탕하여 멜라닌을 용해시키고 17,000 rpm으로 30 min 동안 원심분리하여 상층액을 450 nm 흡광도에서 측정하였다. 본 실험의 세포는 37 °C, 5% CO₂ 조건의 배양기에 배양하였다.

2.2.5. 멜라닌 형성 관련 mRNA 발현량 측정(RT-PCR)

2.2.5.1. RNA Extraction and Quantification

B16F10 melanoma를 100 mm cell culture dish에 4×10^5 cells/dish로 seeding하여 24 h 후 시료를 농도별로 처리하고 48 h 후 세포를 수득한다. 수득한 세포를 DPBS로 세척하고 원심분리하여 상층액을 제거하고 cell pellet을 얻었으며, Nucleospin RNA (740955, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany)를 사용하여 RNA를 추출하였다. TakeTM micro-volum plate (Yeastern biotech, Taiwan)를 사용하여 RNA를 정량하였다.

2.2.5.2. cDNA Synthesis

Maxime RT PreMix kit random primer (iNtRON biotechnology, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. PCR 조건은 45 °C 60 min, 95 °C 5 min을 수행하였다.

2.2.5.3. Real-Time PCR

iQTM SYBR green supermix (Bio-Rad, Singapore)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였으며, 조건은 polymerase activation과 DNA denaturation 95 °C에서 3 min 진행한 후, amplification은 94 °C에서 15 s 동안 denaturation, annealing 58 °C 30 s, extension 72 °C 1 min으로 35 cycle 하였고, melt curve는 65 °C에서 95 °C를 수행하였다.

2.2.6. 멜라닌 형성 관련 단백질 발현량 측정(Western Blot)

2.2.6.1. Protein Extraction and Quantification

B16F10 melanoma를 100 mm cell culture dish에 4×10^5 cells/dish로 seeding하여 24 h 배양 후 시료를 농도

Table 1. Primer Sequences of β -actin and Tyrosinase and TRP-1, TRP-2

Gene	Primer	Sequence
β -actin	Sense	5-TATGAAGTGITGTGACGTTGACATCCG-3'
	Antisense	5-CCTAGAAGCATTGCGGTGCACGATG-3'
TRP-1	Sense	5-GCTGCAGGAGCCTTCTTTCTC-3'
	Antisense	5-AAGACGCTGCACTGCTGGTCT-3'
TRP-2	Sense	5-GCTGCAGGAGCCTTCTTTCTC-3'
	Antisense	5-AAGACGCTGCACTGCTGGTCT-3'
Tyrosinase	Sense	5-CAATGGCTGCGAAGGCACCG-3'
	Antisense	5-TCCCACCAGTGCTGCCCAA-3'

별로 처리하고 48 h 뒤에 세포를 수득한다. 수득한 세포를 DPBS로 세척하고 원심분리하여 상층액을 제거하고 cell pellet에 protein extraction buffer를 처리하고 vortexing한다. 얼음을 이용하여 3 min 간 방치한 후 4 °C, 1,500 rpm으로 4 min 동안 원심분리하고 그 상층액을 얻어 단백질을 추출하였다. BCA™ protein assay kit (Thermo 23227, Thermo Fisher)를 사용하여 단백질을 정량하였고 동일하게 30 μ g의 단백질을 단백질 발현량 측정에 사용하였다.

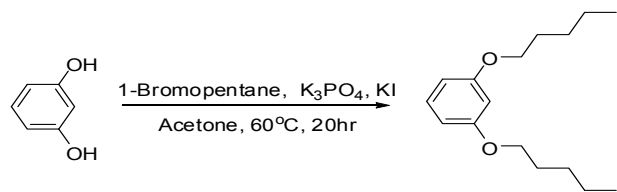
2.2.6.2. Western Blot

30 μ g의 단백질을 Nupage LDS sample buffer를 첨가하여 5 min 간 100 °C에서 증탕하고 반응이 끝난 후 얼음에 방치하여 시료를 준비하였으며 NuPAGE SDS-PAGE gel system (Invitrogen)을 이용하여 100 V에서 전기영동을 하였다. 전기영동이 완료된 후 gel transfer device (Invitrogen)를 이용하여 blotting을 실시하였다. Antibody는 β -actin sc-47778 (Santa Cruz, USA)을 1 : 2,000으로 희석하여 사용하였고, tyrosinase sc-7833 (Santa Cruz), TRP-1 sc-10443 (Santa Cruz), TRP-2 sc25544 (Santa Cruz)는 1 : 500으로 희석하여 사용하였다. ChemiDoc을 이용하여 이미지를 획득하였고 image lab software를 이용하여 단백질 발현량을 분석하였다.

3. 결론 및 토의

3.1. 레조시놀다이펜틸에터의 합성

Resorcinol 50 g과 아세톤 250 mL을 플라스크에 투입하고 교반하여 용해시킨다. 용해가 완료되면 K_3PO_4 212.06 g과 KI 3.63 g을 넣고 5 min 간 교반한다. 1-bro-

**Figure 1.** The chemical structure of 1,3-di(pentyloxy)benzene.

mopentane 150.89 g을 플라스크에 넣고 60-70 °C로 가열하여 20 h 환류 시킨 후 실온으로 냉각하고 여과, 농축한다. 농축액에 에칠아세테이트 250 mL를 넣어 혼합 후 물 250 mL로 유기층을 세척한 다음, 포화 NaCl 수용액 250 mL로 세척한다. 유기층을 분리하여 $MgSO_4$ 로 수분을 제거하고 감압하여 농축한다. 감압 농축하여 수득한 crude 1,3-di(pentyloxy)benzene을 고온 감압의 조건에서 증류, 정제하였다. 1차 증류하여 수득한 증류오일을 동일한 조건에서 2차 증류하여 99.5%의 고순도 1,3-di(pentyloxy)benzene (Figure 1)를 수득하였다.

수득한 반응물을 NMR spectrometer과 MS spectrometer 등을 통해 구조를 확인하였다. 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, δ_H) 스펙트럼의 저자장 영역에서 4개의 olefine methine proton δ_H 7.12 (1H, t-like, $J=8.0$ Hz), 6.46 (1H, d-like, $J=2.4$ Hz), 6.44 (2H, t, $J=8.0$ Hz) signal을 관측하여 meta-1,3-치환 벤젠고리가 존재하는 것을 확인하였다. 수산기 영역에서는 2개의 oxygenated methylene proton δ_H 3.90 (4H, t, $J=7.6$ Hz) signal을 관측하였다. 고자장 영역에서는 6개의 methylene proton δ_H 1.75 (4H, m), 1.38 (8H, m) signal과 2개의 methyl proton δ_H 0.90 (6H, t, $J=7.6$ Hz) signal을 관측하였으며, signal의 적분 값으로부터 각 signal이 벤젠고리에 대칭으로 존재함을 확인하였다(Figure 2). ESI-MS에서

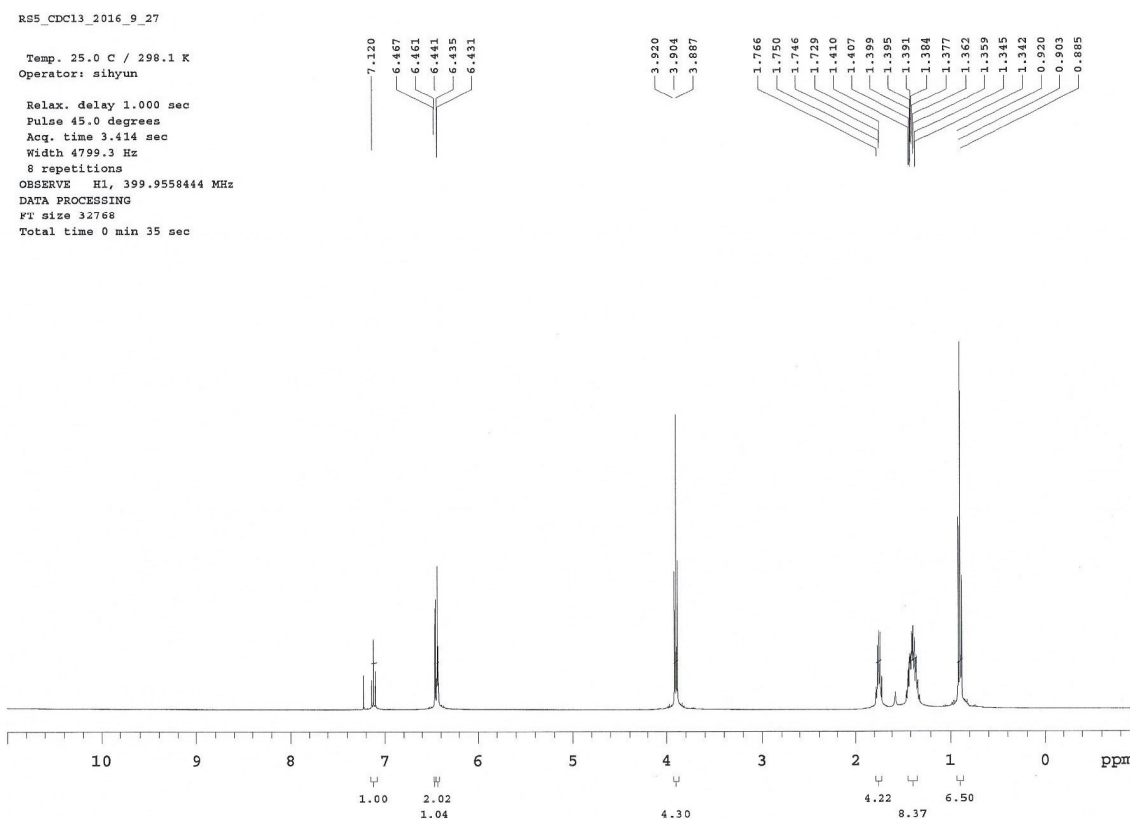


Figure 2. NMR spectrum of 1,3-di(pentyloxy)benzene.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 7.12 (t, Ar-H), 6.46 (d, Ar-H, *J* = 2.4), 6.44 (t, 2Ar-H), 3.90 (t, 4H), 1.75 (m, 4H), 1.38 (m, 8H), 0.90 (t, 6H).

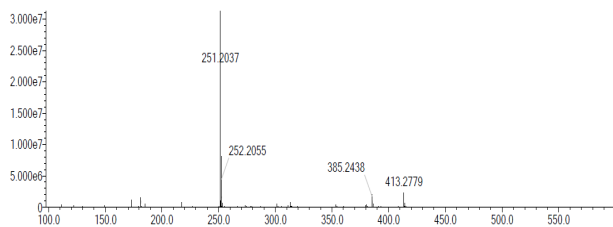


Figure 3. MS spectrum of 1,3-di(pentyloxy)benzene.

ESI-MS: [M-H]⁺ calcd for C₁₆H₂₆O₂ (m/z): 251.3844, found: 251.2037.

m/z 251 [M-H]⁺의 분자이온 peak가 관찰되어 분자량을 250으로 결정하였다(Figure 3).

3.2. 레조시놀다이펜틸에터의 안전성 평가 및 멜라닌 생성 저해 효과

3.2.1. 레조시놀다이펜틸에터의 안전성 평가

레조시놀다이펜틸에터를 농도별로 5-20 μg/mL 처리

Table 2. Melanoma Cell Viability Assay of 1,3-di(pentyloxy)benzene

Samples	Concentration (μg/mL)	Cell viability (%)
Control	0	100 ± 1.54
	5	98.97 ± 1.74
	10	96.66 ± 2.78
	20	88.77 ± 2.33
1,3-di(pentyloxy)benzene	5	95.29 ± 1.55
	10	92.30 ± 2.41
	20	83.55 ± 3.44

한 후 48 h 동안 관찰한 결과 대조군에 비해서 모든 세포주들에서 유사한 cell viability를 보여주었다.

이러한 결과는 각각의 농도에 대한 대조군과 비교시 DMSO에 대한 독성이 나타날 뿐 레조시놀다이펜틸에터에 대한 독성은 없는 것으로 확인하였다(Table 2-4).

Table 3. Keratinocyte Cell Viability Assay of 1,3-di(pentyloxy) benzene

Samples	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell viability (%)
Control	0	100 \pm 1.32
	5	99.23 \pm 1.85
	10	95.44 \pm 2.33
	20	90.55 \pm 3.12
1,3-di(pentyloxy) benzene	5	98.80 \pm 1.77
	10	92.30 \pm 2.53
	20	85.77 \pm 3.44

Table 4. Skin Fibroblast Cell Viability Assay of 1,3-di(pentyloxy) benzene

Samples	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Cell viability (%)
Control	0	100 \pm 1.45
	5	99.80 \pm 1.77
	10	97.50 \pm 2.10
	20	91.30 \pm 3.10
1,3-di(pentyloxy) benzene	5	97.12 \pm 2.13
	10	92.20 \pm 2.80
	20	85.75 \pm 3.45

Table 5. Effect of 1,3-di(pentyloxy)benzene on the Inhibition of Extracellular Melanin Synthesis. The Data were Expressed as Values (\pm Standard Deviations) of One Experiments (Paired *t*-test: * *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.005)

Samples	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition of extracellular melanin synthesis (%)	<i>p</i> -value
Control	0	71.65 \pm 0.37	0.00000001**
α -MSH	0	0 \pm 0.30	1.0000
α -MSH+ α -arbutin	25	45.03 \pm 0.26	0.000000027**
	50	62.86 \pm 0.89	0.000000399**
	100	65.09 \pm 0.90	0.000000204**
	200	67.59 \pm 0.26	0.000000008**
	400	67.72 \pm 0.30	0.000000000**
α -MSH+ 1,3-di(pentyloxy) benzene	1.25	0.7874 \pm 0.42	0.0069
	2.5	25.20 \pm 0.30	0.000000678**
	5	43.04 \pm 0.30	0.000000136**
	10	53.15 \pm 0.26	0.000000016**
	20	65.75 \pm 0.50	0.000000008**

Table 6. Effect of 1,3-di(pentyloxy)benzene on the Inhibition of Intracellular Melanin Synthesis. The Data were Expressed as Values (\pm Standard Deviations) of One Experiments (Paired *t*-test: * *p*-value < 0.005, ** *p*-value < 0.0005)

Samples	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition of intracellular melanin synthesis (%)	<i>p</i> -value
Control	0	48.70 \pm 0.77	0.0000566**
α -MSH	0	0 \pm 0.44	1.0000
α -MSH+ α -arbutin	25	30.31 \pm 1.18	0.00011**
	50	40.93 \pm 1.55	0.00026**
	100	41.71 \pm 0.77	0.0000771**
	200	40.93 \pm 1.34	0.00026**
	400	40.41 \pm 2.49	0.000799**
α -MSH+ 1,3-di (pentyloxy)benzene	1.25	11.40 \pm 1.34	0.00179*
	2.5	17.36 \pm 1.18	0.000778*
	5	19.69 \pm 1.79	0.00112*
	10	41.97 \pm 0.89	0.0000571**
	20	53.89 \pm 1.18	0.0000462**

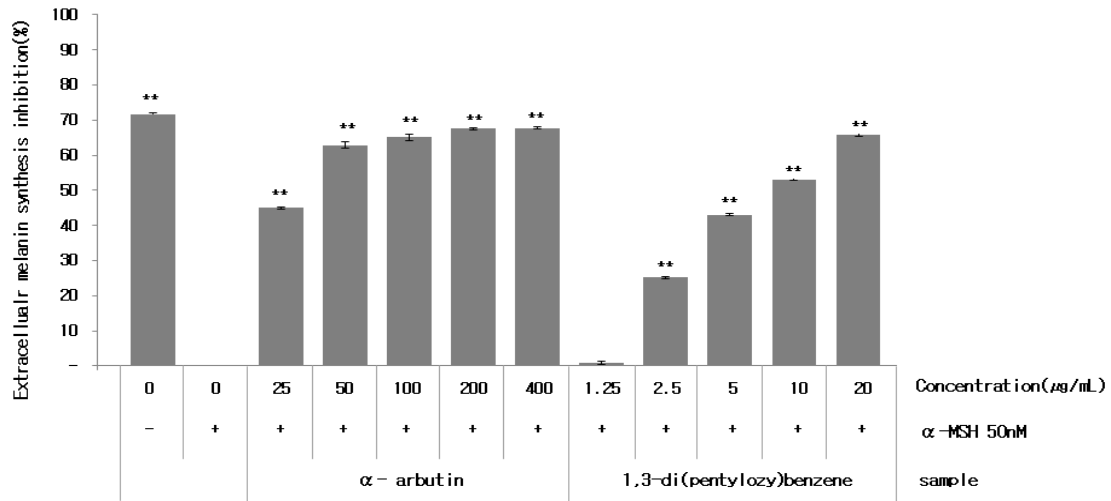


Figure 4. Effect of 1,3-di(pentyloxy)benzene on the inhibition of extracellular melanin synthesis (paired t-tast : * *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.005).

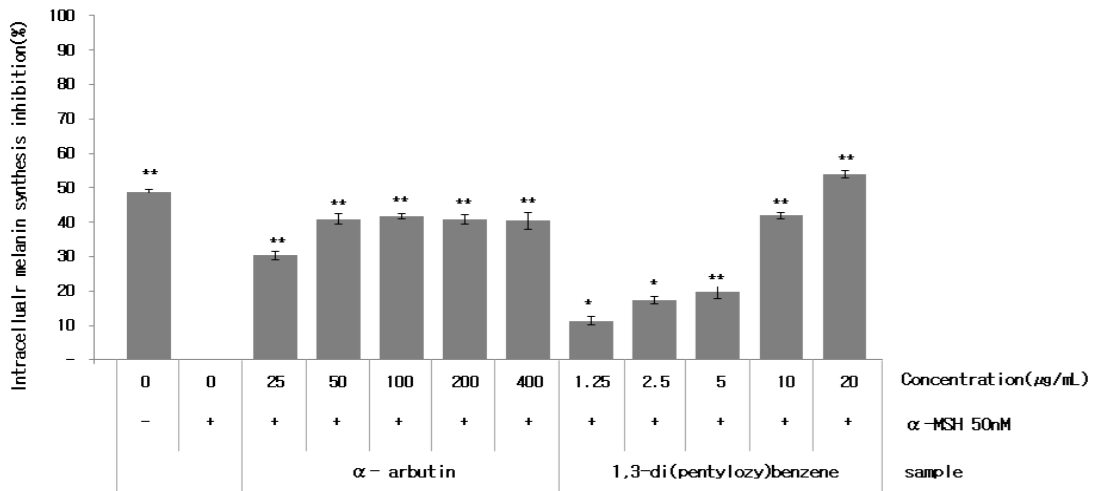


Figure 5. Effect of 1,3-di(pentyloxy)benzene on the inhibition of intracellular melanin synthesis (paired t-tast : * *p*-value < 0.005, ** *p*-value < 0.0005).

3.2.2. 레조시놀다이펜틸에터의 세포 내·외 멜라닌 생성 저해능 실험 결과

레조시놀다이펜틸에터의 세포 생존에 영향을 미치지 않는 20 μg/mL 이하 농도로 세포 내·외 멜라닌 측정을 수행하였다. 세포 외 멜라닌 분비 저해능을 측정한 결과 20 μg/mL 농도에서 약 65.75%까지 농도 의존적으로 멜라닌 분비를 저해시켰으며, 세포 내 멜라닌 생성 억제율을 측정한 결과 20 μg/mL 농도에서 약

53.89%까지 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 억제하였다 (Table 5, 6 and Figure 4, 5).

3.2.3. 멜라닌 형성 관련 mRNA 발현량 측정(RT-PCR)

시료처리 후 24 h 후의 멜라닌 형성 관련 mRNA 발현량을 측정한 결과에서 티로시나제의 경우 발현량을 억제시키지 못하였고(Figure 6), TRP-1, TRP-2의 경우 농도 의존적으로 억제시키지 못하였으나, 0.31, 0.62,

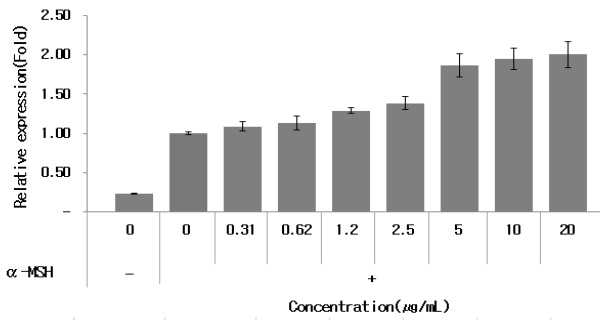


Figure 6. Effect of the mRNA expression of tyrosinase was determined by RT-PCR for 24 h.

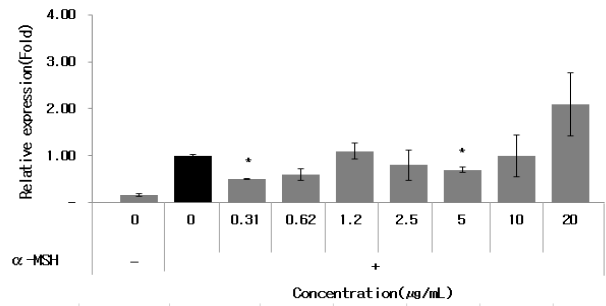


Figure 9. Effect of the mRNA expression of TRP-1 was determined by RT-PCR for 48 h (* *p*-value < 0.05).

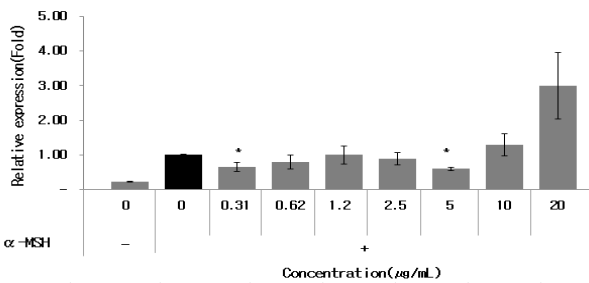


Figure 7. Effect of the mRNA expression of tyrosinase was determined by RT-PCR for 48 h (* *p*-value < 0.05).

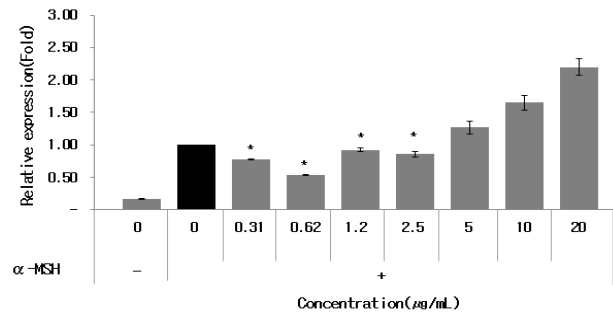


Figure 10. Effect of the mRNA expression of TRP-2 was determined by RT-PCR for 24 h (* *p*-value < 0.05).

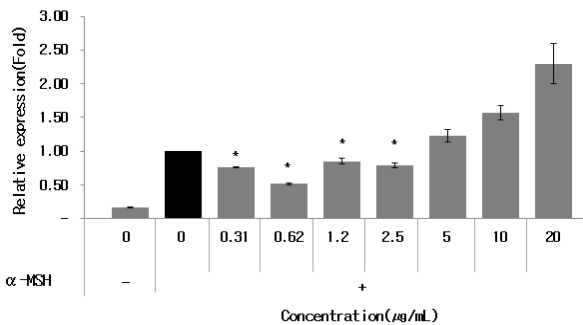


Figure 8. Effect of the mRNA expression of TRP-1 was determined by RT-PCR for 24 h (* *p*-value < 0.05).

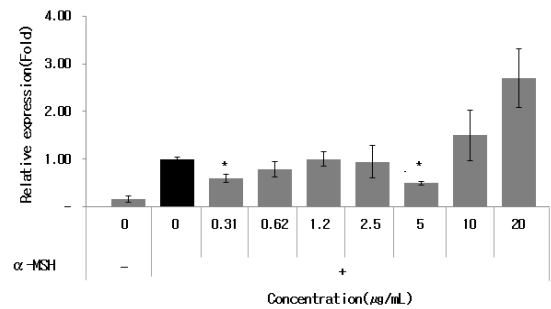


Figure 11. Effect of the mRNA expression of TRP-2 was determined by RT-PCR for 48 h (* *p*-value < 0.05).

1.25, 2.5 µg/mL 농도에서 발현이 억제함을 확인하였다 (Figure 8, 10). 또한 시료처리 후 48 h 후의 mRNA 발현 결과에서도 농도 의존적인 억제 결과는 얻지 못하였으나, 티로시나제, TRP-1, TRP-2 유전자 모두 0.31, 5 µg/mL 농도에서 mRNA 발현이 억제함을 확인하였다 (Figure 7, 9, 11).

3.2.4. 멜라닌 형성 관련 단백질 발현량 측정(Western Blot)

멜라닌 형성 관련 단백질인 티로시나제 단백질 발현량을 측정하였고 0.62, 1.25 µg/mL 농도에서 티로시나제 발현이 억제되는 것을 확인하였다(Figure 12). 또한, TRP-1 단백질 발현량을 측정한 결과에서도 0.62, 1.25, 10 µg/mL 농도에서 TRP-1 발현이 억제되는 것을 확인하였다(Figure 13). TRP-2 단백질 발현량을 측정한 결과에서도 2.5, 5, 10 µg/mL 농도에서 억제되는 것을 확

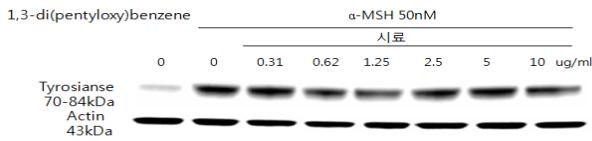


Figure 12. Effect of tyrosinase protein expression in B16F10 cell. Expression of tyrosinase protein in B16F10 cells were treated with various concentrations of 1,3-di(pentyloxy)benzene and α -MSH for 48 h.

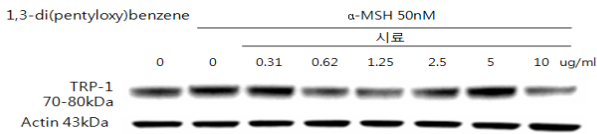


Figure 13. Effect of TRP-1 protein expression in B16F10 cell. Expression of TRP-1 protein in B16F10 cells were treated with various concentrations of 1,3-di(pentyloxy)benzene and α -MSH for 48 h.

인하였다(Figure 14). 이상의 결과에서 농도 의존적으로 멜라닌 생성량을 억제시켰던 결과와 달리 멜라닌 형성 관련 mRNA과 단백질 발현량을 농도 의존적으로 억제시키지 못하였으나, 영향은 있는 것으로 분석되며 시료의 약물동태특성상 steady state가 발생됨이 확인하였다[16]. 본 실험에서 1차 반응을 거쳐 0차 반응이 시험농도 범위에서 나타남을 확인하였다.

4. 결 론

레조시놀다이펜틸에터는 레조시놀(resorcinol)과 1-bromopentane의 알킬화반응을 통하여 제조되어지며, 피부를 구성하는 세포들에 대한 독성을 분석한 결과 대조군에 비해서 모든 세포주들에서 유사한 cell viability를 보여주었으며, 레조시놀다이펜틸에터에 대한 세포 독성이 거의 나타나지 않는 것으로 관찰되었다.

또한 세포 외 멜라닌 분비 저해능을 측정된 결과에서 20 μ g/mL 농도로 처리하였을 때 약 65.75% 억제하였으며, 세포 내 멜라닌 생성 억제율을 측정된 결과에서도 약 53.89%를 억제함을 확인하였다.

멜라닌 억제 효과가 전사(transcription)단계부터 억제되는지 확인하기 위해서 멜라닌 형성 관련 mRNA 발현량과 단백질 발현량을 western blot으로 측정된 결과

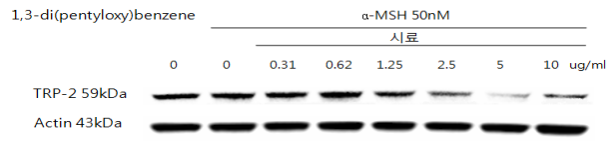


Figure 14. Effect of TRP-2 protein expression in B16F10 cell. Expression of TRP-2 protein in B16F10 cells were treated with various concentrations of 1,3-di(pentyloxy)benzene and α -MSH for 48 hours.

농도 의존적으로 멜라닌 생성량을 억제시켰던 결과와 달리 멜라닌 형성 관련 mRNA과 단백질 발현량을 농도 의존적으로 억제시키지 못하였으나, 영향은 있는 것으로 분석되며, TRP-2 단백질 발현 억제로 인한 영향이 멜라닌 억제효과에 컸던 것으로 사료된다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 레조시놀다이펜틸에터는 색소 침착 방지 개선효과에서 기능성 미백화장품 소재로서의 활용가능성이 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 HN12C0056).

Reference

1. G. Negroiu, N. Branza-Nichita, A. J. Petrescu, R. A. Dwek, and S. M. Petrescu, Protein specific N-glycosylation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 in B16 mouse melanoma cells, *Biochem. J.*, **344**, 659 (1999).
2. S. Y. Choi, Y. C. Kim, and B. S. Chang, Inhibitory efficacy of black tea water extract on melanogenesis in melan-a cells and its action mechanisms, *Korean J. Microscopy*, **41**, 169 (2011).
3. K. Urabe, P. Aroca, K. Tsukamoto, D. Mascagna, A. Palumbo, and G. Prota, The inherent cytotoxicity of melanin precursors: a revision, *Biochim. Biophys. Acta*, **1221**, 272 (1994).
4. H. S. Lee, K. H. Shin, G. S. Ryu, K. Y. Jee, I. S. Cho, and H. Y. Kim, Whitening efficacy study of natural compounds-peptide derivatives via cAMP sig-

- naling pathway, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **37**, 275 (2011).
5. B. Saha, S. K. Singh, C. Sarkar, R. Bera, J. Ratha, and D. J. Tobin, Activation of the Mitf promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB, *Pigment Cell Res.*, **19**, 595 (2006).
 6. T. Yokota, H. Nishio, and Y. Kubota, The inhibitory effect of glabridin from licolice extracts on melanogenesis and inflammation, *Pigment Cell Res.*, **11**, 335 (1998).
 7. K. Sapkota, E. Roh, E. Y. Lee, E. M. Ha, J. H. Yang, E. S. Lee, Y. J. Kwon, Y. S. Kim, and Y. W. Na, Synthesis and anti-melanogenic activity of hydroxyphenyl benzyl ether analogues, *Bioorgan. Med. Chem.*, **19**, 2168 (2011).
 8. H. J. Kim, H. R. Choi, D. S. Kim, and K. C. Park, Topical hypopigmenting agents for pigmentary disorders and their mechanisms of action, *Ann. Dermatol.*, **24**, 1 (2012).
 9. S. K. Singh, R. Baker, J. I. Wibawa, M. Bell, and D. J. Tobin, The effects of *Sophora angustifolia* and other natural plant extracts on melanogenesis and melanin transfer in human skin cells, *Exp. Dermatol.*, **22**, 67 (2013).
 10. E. T. Makino, R. C. Mehta, A. Banga, P. Jain, M. L. Sigler, and S. Sonti, Evaluation of a hydroquinone-free skin brightening product using in vitro inhibition of melanogenesis and clinical reduction of ultraviolet-induced hyperpigmentation, *J. Drugs Dermatol.*, **12**(3), 16 (2013).
 11. M. Seiberg, Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer, *Pigment Cell Res.*, **14**, 236 (2001).
 12. R. E. Boissy, Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte, *Exp. Dermatol.*, **13**, 1 (2003).
 13. D. S. Kim, S. Y. Kim, S. H. Park, Y. G. Choi, S. B. Kwon, M. K. Kim, J. I. Na, S. W. Youn, and K. C. Park, Inhibitory effects of 4-n-butylresorcinol on tyrosinase activity and melanin synthesis, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 2216 (2005).
 14. G. Y. Park, Ph. D. Dissertation, Pusan National Univ., Korea (2012).
 15. M. Seibers, C. Paine, E. Sharlow, P. Andrade Gordon, M. Costanzo, M. Eisinger, and S. S. Shapiro, The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interaction, *Exp. Cell Res.*, **25**, 254, (2000).
 16. M. J. Neal, medical pharmacology at a glance, ed. J. Wiley, 7, 24, Wiley-Blackwell, New Jersey (2012).