

느릅나무의 에틸 아세테이트 추출물에 의한 Melanin 생성 효과

천현자[#] · 정승일 · 김일광^{*}

[#]원광대학교 한의학 전문대학원, ^{*}원광대학교 자연과학대학 화학과

(Received September 26, 2001; Revised November 1, 2001)

Effects of Ethyl Acetate Extract from *Ulmus davidiana* var. *japonica* on Melanogenesis

Hyun Ja Chun[#], Seung Il Jeong and Il Kwang Kim^{*}

[#]Professional Graduate School of Oriental Medicine, Won Kwang University, Iksan, 570-749, Korea

^{*}Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Won Kwang University, Iksan, 570-749, Korea

Abstract — Melanogenesis is a physiological process resulted in the synthesis of melanin pigments, which has a role in protecting skin from the damaging effect of ultra-violet (UV) radiation. The main aim of the present study was to examine the effect of *Ulmus davidiana* var. *japonica* (UL) on melanogenesis. Cells were cultured in the presence of various concentrations of *Ulmus davidiana* var. *japonica* for 48 h, and there were estimated total melanin contents as a final product and activity of tyrosinase, a key enzyme, in melanogenesis. Among the four solvent extracts tested, EtOAc extract mostly increased tyrosinase activity. And EtOAc extract increased the melanin contents and tyrosinase activity in a dose-dependent manner. Especially, It was observed that 100 µg/ml EtOAc extract promotes melanin secretion in B16/F10 melanoma cells by 140% at 48 h treatment and activity of tyrosinase increased by 180% in the presence of same concentration. In conclusion, as for EtOAc extract treatment, there was no effect on the viability of B16/F10 cell, only to stimulate melanization.

Keywords □ *Ulmus davidiana* var. *japonica* (UL), melanogenesis, tyrosinase activity, melanin content

느릅나무과(Ulmaceae)에 속하는 느릅나무(*Ulmus davidiana* var. *japonica*)는 관엽교목으로서 잎은 광립형 또는 타원형이며 밑은 썩기 모양이고 길이는 3~12 cm로서 끝은 뾰족하며 톱니가 있다. 대황록색의 작은 꽃이 4-5월에 피며 과실은 익과로서 편평한 막질이고 열매에 털이 없는 것이 당느릅나무와 다른데 전국 각지에 야생하며 일본, 중국에 분포한다.^{1,2)} 동속 식물로는 참느릅나무, 비술나무, 왕느릅나무, 큰잎느릅나무, 남티나무, 당느릅나무, 흑느릅나무, 민느릅나무 등이 있다.³⁾ 동의보감에서는 느릅나무 등의 껍질을 유백피라 하는데 치습, 이노, 임질, 부종, 종창에 효과를 보인다고 하였으며, 민간에서는 줄기 껍질의 수전액을

피부병, 특히 개선, 완선 등의 세정제로 널리 사용하기도 한다.⁴⁾ 한편, 느릅나무 과실의 가공품을 무이라 하며 구충작용, 항진균작용이 있다고 보고되어 있다.⁵⁾

*Ulmus*속 식물의 성분 연구에 관해서는 Doskotch⁶⁾ 등이 *U. americana*의 수피로부터 (+)-catechin 7-O-β-D-xylopyranoside를 분리하였고, Son⁷⁾ 등이 당느릅나무 근피에서 (+)-catechin, (+)-catechin 5-O-β-D-apiofuranoside의 분리를 보고하였다. Kim⁸⁾ 등은 참느릅나무의 잎에서 isoquercitrin, rutin을 분리하였고, Moon⁹⁾ 등은 참느릅나무에서 sterols 및 sterol glucoside, catechin rhamnoside 등을 분리하였다. 최근에는 Bae¹⁰⁾ 등이 느릅나무 수피 추출물의 주성분이 (+)-catechin 및 그 배당체 화합물인 (+)-catechin-7-O-β-D-apiofuranoside임을 보고하였다.

약리 효능에 관한 연구로는 느릅나무 수피가 흰쥐의

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

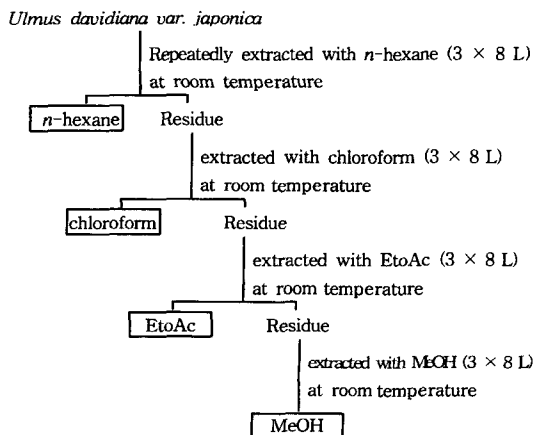
(전화) 063-850-6938 (팩스) 063-850-6840

위염, 위궤양 및 발부종에 효과가 있으며, 메탄올 추출물에서 진통, 소염, 항균작용 및 위압이나 대장암 세포주에 효능이 있음을 보고하였다.¹¹⁻¹³⁾ Jeon¹⁴⁾은 항산화 효과를 연구하였고, Kim¹⁵⁾ 등은 항균효과를 보고하였으며, Jun¹⁶⁾ 등은 메탄올 추출물의 부탄올 분획이 NO 합성을 저해한다고 보고하였다. 그러나 이와 같은 많은 연구에도 불구하고 멜라닌 생성과 관련한 연구는 보고된 바 없다. 최근에 생약이나 한약재 같은 천연물을 이용하여 멜라닌색소와 관련된 연구가 많은 연구자들에 의해 진행되어 오고 있으며, 특히, 기미, 주근깨 등의 과색소 침착이나 백반증, 백피증 등의 저색소증 같은 색소이상증의 원인 및 치료에 대한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다.¹⁷⁻²²⁾

본 연구팀이 진행시키고 있는 피부질환 치료제 및 미백제 개발의 일환으로 본 연구에서는 느릅나무가 멜라닌 생성에 영향을 주는지를 조사하고자 각 용매별 추출물에 의한 tyrosinase 활성도를 검색하였으며, EtOAc 추출물을 B16/F10 melanoma 세포에 처리하여 tyrosinase 활성 및 melanin 양을 측정한 결과 유의한 효과를 보였기에 보고하는 바이다.

실험방법

시료의 추출 및 분리 - 실험재료 2.4 kg을 실온에서 hexane으로 3 회 추출한 후 이를 감압하여 농축물인 hexane 추출물 2.3 g을 얻었다. hexane 잔사를 건조하여 CHCl₃로 3 회 추출하여 CHCl₃ 추출물 4.2 g을 얻었으며, 잔사를 EtOAc로 3회 추출하여 EtOAc



Scheme 1 - Extraction of *Ulmus davidiana* var. *japonica*.

추출물 6.9 g을 얻었고, 같은 방법으로 MeOH 추출물 20.3 g 얻었다(Scheme 1).

검액조제 - MeOH 추출물은 증류수에 녹이고, 다른 추출물들은 DMSO에 녹인 후, 세포에 투여하기 전에 0.22 μm pore 여과지로 여과 멸균하여 농도를 조정한다 다음 사용하였다.

세포배양 - B16/F10 melanoma 세포는 CO₂ 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 10% fetal bovine serum (Gibco Co.)이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 여기에 penicillin-streptomycin(Sigma Chemical Co., USA) 100 I.U.-100 μg/ml를 첨가하였으며, 약 24 시간 주기로 DMEM 배양액을 교체하였다.

MTT Assay - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 정량은 Mosmann의 방법²³⁾을 변형하여 실시하였다. 세포를 48 시간 배양한 후 상층액을 버리고 당일 제조한 500 μg/ml MTT를 배양 용기당 1 ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3 시간 동안 배양하였다. 살아 있는 세포는 MTT와 반응하여 보라색 불용성 formazan 침전물이 형성되었으며 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 10% DMSO를 200 μl씩 넣고 15 분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

Trypan blue 검사 - 대조군과 실험군의 각 well에 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액을 가하여, 각 well에서 세포를 분리 수거하였다. 이 분리 수거한 세포를 PBS로 2회 세척한 후 0.02 ml와 동량의 0.4% (w/v) trypan blue를 잘 섞은 다음 hemocytometer에 넣고 광학현미경을 이용하여 trypan blue에 염색되지 않고 살아 있는 세포수를 측정하였다.

멜라닌 양 측정 - 멜라닌 양은 Hosoi²⁴⁾ 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 2회 세척한 후 원심분리하여 세포 침전물을 만들었다. 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액을 200 μl 첨가하고 80°C에서 1 시간 동안 용해하였으며, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 합성 멜라닌(Sigma Co.)을 사용하여 작성된 표준 직선에서 구하고, 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하였다.

Tyrosinase 활성도 측정 - Tyrosinase 활성도는 Matinez-Esparza²⁵⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 각 well의 세포를 원심분리하여 세포 침전물을 만들고,

100 μ l의 lysis buffer(1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate, 0.1 mM PMSF)를 가하였다. 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고 원심분리한 후 상층액을 취하여 효소용액으로 사용하였다. 100 mM sodium phosphate(pH 7.0) 용액 100 μ l에 시료인 효소용액 50 μ l를 가하고 37°C에서 5 분간 보온하였다. 100 mM catechol 50 μ l를 넣은 후 ELISA reader로 37°C, 405 nm의 조건에서 흡광도의 변화를 1 시간 동안 관찰하였다.

통계방법 - 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 이용하였다.

실험결과 및 고찰

각 용매별 추출물의 tyrosinase 활성 검색 - B16/F10 melanoma 세포에 hexane, CHCl_3 , EtOAc, MeOH 추출물을 각각 처리하고 48 시간 배양한 다음 tyrosinase 활성을 측정한 결과를 Table I에 나타내었다. Table I에서 보는 바와 같이 EtOAc 추출물, MeOH 추출물, CHCl_3 추출물을 처리한 군에서는 tyrosinase 활성도가 증가되었으며, hexane추출물을 처리한 군에서는 tyrosinase 활성도의 변화를 볼 수 없었다. 비극성인 hexane 추출물 처리군에서는 tyrosinase 활성도의 변화가 없고 극성용매인 EtOAc 추출물, MeOH 추출물, CHCl_3 추출물 처리군에서는 tyrosinase 활성도가 증가되는 경향을 보이는 것은 tyrosinase 활성에 영향을 주는 성분이 극성용매에 추출되어 나오는 것으로 사료된다. 극성용매 추출물 중에는 EtOAc 추출물 > MeOH 추출물 > CHCl_3 추출물 순서로 EtOAc 추출물이 가장 높은 tyrosinase 활성 증가를 나타내었다.

EtOAc 추출물이 세포생존율에 미치는 영향 - 가장

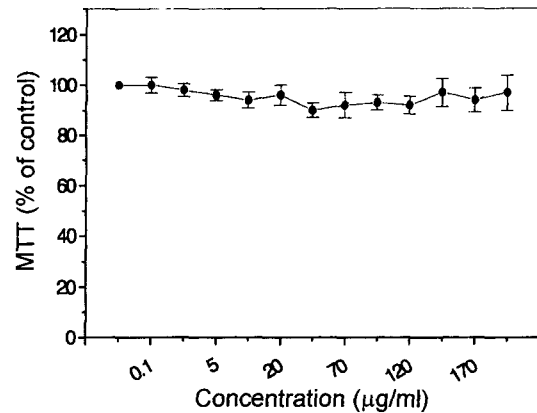


Fig. 1 - Effect of ethyl acetate extract from *Ulmus davidiana var. japonica* (UL) on the viability of B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of UL for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % control and data were mean \pm SD of at least five.

강한 활성을 보인 EtOAc 추출물을 1 μ g/ml에서 200 μ g/ml까지 다양한 농도로 처리하고, 48 시간 배양한 후에 MTT 방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, EtOAc 추출물을 최고 200 μ g/ml 처리시에도 세포 생존율은 유의할만한 변화를 볼 수 없었다. EtOAc 추출물을 처리하고 세포수를 조사해본 결과 세포수가 약간 증가하는 경향을 보였으나 유의성 있게 나타나지는 않았으며, 또한 세포의 형태학적 변화를 관찰해 본 결과 대조군과 큰 차이도 보이지 않았다(Fig. 2). 따라서 이 농도 범위에서 EtOAc 추출물은 세포독성이 거의 없는 것으로 사료되어 이 농도 범위를 기준으로 실험을 실시하였다.

EtOAc 추출물이 tyrosinase 활성에 미치는 영향 - Tyrosinase는 멜라닌 합성과정에서 속도제한 효소이며, 멜라닌 합성의 주요한 조절단계에 작용하는 효소이다.

Table I - Effects of various solvent extracts from *Ulmus davidiana var. japonica* on tyrosinase activity

Concentration (g/ml)	Solvent			
	Hexane	Chloroform	EtOAc	Methanol
Control	100	100	100	100
5	104.0 \pm 8.1	104.0 \pm 8.2	1201 \pm 2.1**	105 \pm 6.7
20	107.5 \pm 5.8**	134.5 \pm 7.1*	158 \pm 8.7*	1391 \pm 2.1**
50	118.0 \pm 9.2*	154.0 \pm 12*	1791 \pm 0.9*	1521 \pm 0.8*

Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. Tyrosinase activity was measured at 405 nm. Results were expressed as % control and data were mean \pm SD of at least five determinations. *significantly different from control group (* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$).

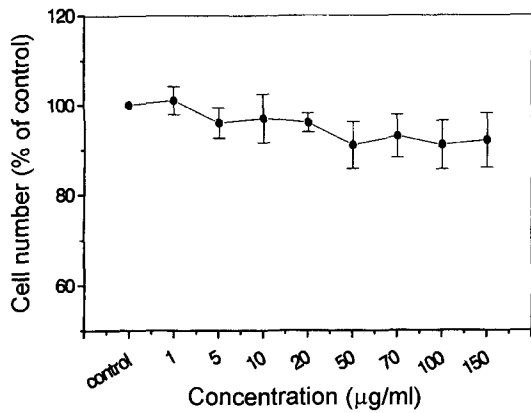


Fig. 2 - Effect of ethyl acetate extract from *Ulmus davidiana* var. *japonica* (UL) on the viability of B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of AI for 48 h. The viability of the cells was measured by Trypan blue test. Results were expressed as % control and data were mean \pm SD of at least five determinations.

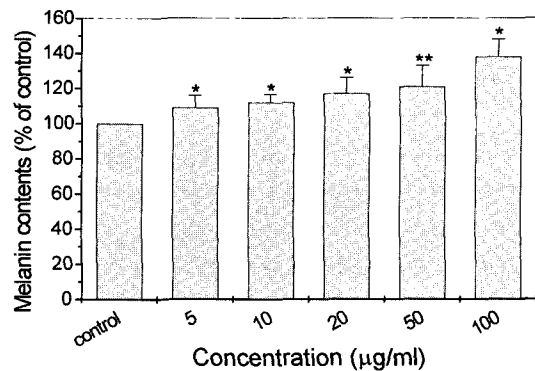


Fig. 4 - Effect of ethyl acetate extract from *Ulmus davidiana* var. *japonica* (UL) on melanin contents in B16/F10 melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After the treatment of UL for 48 h, melanin contents were measured at 405 nm. Results were expressed as % control and data were mean \pm SD of at least five determinations. *significantly different from control group (* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$).

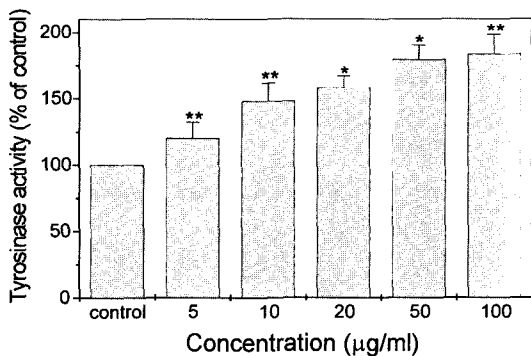


Fig. 3 - Effect of ethyl acetate extract from *Ulmus davidiana* var. *japonica* (UL) on tyrosinase activity in B16/F10 melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After the treatment of UL for 48 h, tyrosinase activity was measured at 405 nm. Results were expressed as % control and data were mean \pm SD of at least five determinations. *significantly different from control group (* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$).

EtOAc 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 EtOAc 추출물을 농도별로 처리하고 48 시간 배양한 후 tyrosinase 활성도를 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 EtOAc 추출물 처리 양이 증가함에 따라 tyrosinase 측정값은 대조군에 비하여 모두 의미있는 증가를 보였다. 특히 100 µg/ml 투여군에서는 대조군에 비해 약 1.8 배의 증가를 보였다.

EtOAc 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향 - EtOAc 추출물이 *in vivo*에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였다. B16/F10 melanoma 세포에 EtOAc 추출물을 1 µg/ml에서 100 µg/ml의 다양한 농도로 처리하고 48 시간 배양한 다음 멜라닌 생성을 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 EtOAc 추출물의 첨가량이 증가함에 따라 대조군에 비하여 실험군에서 모두 통계적으로 유의성있게 증가하였다($p < 0.05$). 특히 100 µg/ml 투여군에서는 대조군에 비하여 약 1.4 배의 멜라닌 생성 증가를 보였다. 생체에서의 멜라닌 합성과정은 tyrosine을 기질로 하여 dopa를 생성시키고 다시 L-dopaquinone으로 산화시키는 연속적인 효소적 산화가 진행된 후 각 생성물의 중합반응에 의해 이루어진다.²⁶⁾ EtOAc 추출물을 B16/F10 melanoma 세포에 처리시 대조군에 비하여 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성이 모두 증가하는 경향을 보였다. 이것은 EtOAc 추출물을 처리함으로써 B16/F10 melanoma 세포내에서 tyrosinase가 활성화되어 멜라닌화가 증가되는 것으로 해석된다. 한편, EtOAc 추출물을 처리한 군들의 tyrosinase 활성도와 멜라닌 생성을 비교해 볼 때 tyrosinase 활성도가 멜라닌 생성에 비하여 더 많이 증가하는 경향을 보였는데 이것은 EtOAc 추출물을 B16/F10 melanoma 세포에 처리함으로써 멜라닌 합성

의 초기단계인 tyrosinase 활성이 증가하지만 최종산물인 멜라닌이 합성되는 경로는 다양하고 복잡하므로 여러 요인들에 의해서 멜라닌 생성율이 tyrosinase의 증가율에 비례되지는 않는 것으로 사료된다.

결 론

느릅나무 추출물이 피부의 멜라닌 색소 형성에 어떠한 영향을 나타내는지를 규명하기 위하여, B16/F10 melanoma 세포에 용매별 추출물을 처리하여 tyrosinase 활성도를 검색하였으며, 다양한 양의 EtOAc 추출물을 처리하여 B16/F10 melanoma 세포의 생존율, 멜라닌 양의 변화 및 tyrosinase 활성도를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 용매별 추출물 중에서 EtOAc 추출물 처리군이 가장 높은 tyrosinase 활성 증가를 보였다.

2. EtOAc 추출물이 B16/F10 melanoma 세포의 생존율에 영향을 거의 주지 않았다.

3. Tyrosinase 활성도는 EtOAc 추출물 처리군 모두에서 통계적으로 유의한 증가를 보였으며, 특히 100 µg/ml 투여군에서 가장 큰 증가를 보였다.

4. 멜라닌 생성은 EtOAc 추출물 처리군 모두에서 통계적으로 유의할만한 증가를 보였다.

이상의 결과를 종합해보면 느릅나무 추출물 중에서 EtOAc 추출물이 가장 높은 tyrosinase 활성을 보였으며, EtOAc 추출물이 B16/F10 melanoma 세포의 생존율에는 영향을 주지 않으면서 멜라닌 생성을 증가시키는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 BK 21 사업의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) 이창복 : 대한식물도감, p.280, 향문사 (1982).
- 2) 육창수 : 한국약품식물자료도감, p.76, 진명출판사 (1981).
- 3) 약품식물학연구회 : 약품식물학각론, p.129, 진명출판사 (1981).
- 4) 동의학연구소 : 동의보감, 여강출판사 p.2798 (1994).

- 5) 김창민 외 : 중약대사전, 청담출판사 p.3348 (1997).
- 6) Doskotch, R. W., Milhail, A.A. and Chatterji, S. K. : Structure of the water-soluble feeding stimulant for *Scolytus multistriatus*: a revision, *Phytochem.* **12**, 1153 (1973).
- 7) Son, B. W., Park, J. H. and Zee, O. P. : Catechin glycoside from *Ulmus davidiana*. *Arch. Pharm. Res.* **12**, 219 (1989).
- 8) Kim, S. H., Hwang, K. T. and Park, J. C. : Isolation of flavonoids and determination of rutin from the leaves of *Ulmus parvifolia*. *Kor. J. Pharmacogn.* **23**, 1205 (1992).
- 9) Moon, Y. H. and Rim, G. R. : Studies on the Constituents of *Lumus parvifolia*. *Kor. J. Pharmacogn.* **26**(1), 1 (1995).
- 10) Bae, Y. S. and Kim, J. K. : Extractives of the bark of ash and elm as medicinal hardwood tree species. *Mokchae Konghak* **28**(3), 62 (2000).
- 11) Lee, E. B., Kim, O. K., Jung, C. S. and Jung, K. H. : The influence of methanol extract of *Ulmus davidiana* var. *japonica* cortex on gastric erosion and Ulcer and Paw Edema in rats. *Kor. J. Pharmacol.* **39**(6), 671 (1995).
- 12) Hong, N. D., Rho, Y. S., Kim, N. J. and Kim, J. S. : A study on efficacy of *Ulmi cortex*. *Kor. J. Pharmacogn.* **21**(3), 217 (1990).
- 13) Yang, Y., Hyun, J. W., Lim, K. H., Kim, H. J., Woo, E. R. and Park, J. : Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants and various plants(III). *Kor. J. Pharmacogn.* **27**(2), 105 (1996).
- 14) Jeon, E. K. : Studies on the antioxidant activity of *Ulmi cortex*, Graduate school Chungnam Univ. (1995).
- 15) Kim, C. K., Lee, H.y., Sung, T. K., Moon, T. K. and Lim, C. J. : antibacterial activity of *Ulmus pumila* L. extract. *Kor. J. Applied Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1 (1992).
- 16) Jun, C. D., Pae, H. O., Kim, Y. C., Jeong, S. J., Yoo, G. C., Lee, E. J., Choi, B. M., Chae, S. W., Park, R. K. and Chung, H. T. : Inhibitory of nitric oxide synthesis by butanol fraction of the methanol extract of *Ulmus davidiana* in murine macrophages. *J. Ethnopharmacol.* **62**, 129 (1998).
- 17) Choi, B. W., Lee, B. H., Kang, K. J., Lee, E. S. and Lee, N. H. : Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor. J.*

- Pharmacogn.* **29**(3), 237 (1998).
- 18) Lee, S. H., Park, J. S., Kim, S. Y., Kim, J. J. and Chung, S. R. : The screening of the inhibitory compounds on tyrosinase activity from the natural product. *J. Pharm. Soc. Korea* **41**(4), 456 (1997).
- 19) Yang M. J., Kim M. G., Lim S., Ann H. S. and Ahn R. M. : Inhibitory effects of water-acetone extracts of chestnut inner shell, pine needle and hop on the melanin biosynthesis. *J. Pharm. Soc. Korea* **43**, 494 (1999).
- 20) Chun H. J., Mun Y. J., Kim J. H., Kim I. K., Jeon B. H. and Woo W. H. : Effect of the aqueous extract of *Epimedium koreanum* Nakai on melanin formation in B16 mouse melanoma cell line. *J. Pharm. Soc. Korea* **44**(5), 455 (2000).
- 21) Chun H. J., Kim I. K. and Woo W. H. : Inhibitory effects on retinoic acid and melanization of B16 melanoma cell by *Epimedium koreanum* Nakai and α -MSH. *J. Kor. Chem. Soc.* **44**(5), 533 (2000).
- 22) Chun, H. J., Choi, E. Y., Yoon, S. C., Nam, H. W. and Woo, W. H. : Inhibitory effects of *Atractylodes Rhizoma alba* on melanin biosynthesis. *J. Pharm. Soc. Korea* **45**(3), 269 (2001).
- 23) Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods* **65**, 55 (1983).
- 24) Hosoi J., Abe E., Suda T. and Kuroki T. : Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α -25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**, 1474 (1985).
- 25) Matinez-Esparza M. : Mechanisms and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **225**, 139 (1998).
- 26) Hearing V. J. : Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *Soc. Invest. Dermatol.* **4**(1), 24 (1999).