

## B16 Melanoma 세포에서 Chitosan Oligosaccharide가 Melanin 생성에 미치는 영향

조남영 · 윤미연 · 김경원 · 박영미 · 임혜원 · 이지윤 · 이진희 · 김연정 · 김창중 · 심상수\*

중앙대학교 약학대학

(Received November 3, 2003; Revised November 21, 2003)

### Effect of Chitosan Oligosaccharide on Melanin Production in B16 Melanoma Cells

Nam Young Cho, Mi Yun Yoon, Kyoung Won Kim, Young Mi Park, Hye Won Lim, Ji Yun Lee,  
Jin Hee Lee, Youn Joung Kim, Chang Jong Kim and Sang Soo Sim<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Chung-Ang University, 221 Huksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

**Abstract** — To investigate the effect of chitosan oligosaccharide on melanin synthesis, we measured tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells. Chitosan oligosaccharide itself did not have any anti-oxidant activity in DPPH radical scavenging, and did not affect the proliferation of B16 melanoma cells. Chitosan oligosaccharide dose-dependently increased melanin production in the absence or presence of MSH. However, chitosan oligosaccharide did not have any influence on the tyrosinase activity and tyrosinase expression in B16 melanoma cells. These results suggest that chitosan oligosaccharide-induced melanin production may be independent on tyrosinase activity in B16 melanoma cells. From the above results, chitosan oligosaccharide dose-dependently appears to increase melanin production in B16 melanoma cells, suggesting that chitosan oligosaccharide may be used as a tanning agent.

**Keywords** □ chitosan oligosaccharide, melanin, tyrosinase

Chitin은 화학적으로 N-acetyl-D-glucosamine 잔기가 5,000개 이상,  $\beta$ -(1→4) 결합한 분자량 100만 이상의 다당류 구조로 되어 있고 chitin을 알칼리로 탈아세틸화 하면 2번 탄소 위치의 아세틸아민기는 1차 아민기로 바뀌어 D-glucosamine의 pyranose 단 위체가  $\beta$ -(1→4) 결합된 키토산(poly  $\beta$ -(1→4)-2-amino-2-deoxy-D-glucan)이 생성된다.<sup>1,2)</sup> Chitosan을 부분 가수분해하여 D-glucosamine이  $\beta$ -(1→4) 결합으로 2~10개 결합된 chitosan oligosaccharide를 얻을 수 있다. chitosan oligosaccharide는 chitin · chitosan보다 분자량이 낮아 생리활성을 발현하는 경우가 많다. 더욱이 chitosan 자체는 섭취해도 거의 흡수되지 않아 생체 내에서 생리 기능을 나타내지 않는 것으로 알려져 있다. 따라서 chitosan을 생체 내에 흡수되도록 하기 위해서는 chitosan을 분해시켜 oligosaccharide 형태로 만들어 이용할 때 훨씬 효과적이다. 최근 저분자 chitosan 및 그 유도체가 연구되면서 면역성 및 암에 대한 저항력을 향상<sup>3-8)</sup> 시키고 체내 콜레스테롤을

선작용<sup>9)</sup> 및 고혈압 억제작용, 항균활성<sup>10-12)</sup>과 같은 여러 가지 생리활성 기능이 밝혀지고 있다.

Melanin은 tyrosine이 tyrosinase에 의해 DOPA, DOPA quinone으로 산화된 후 두 가지 경로로 나뉘어 황·적색의 Pheo-melanin과 흑·갈색의 Eu-melanin이 생성된다. Pheo-melanin은 DOPA quinone에서 cysteine 또는 glutathione과 반응하여 pheomelanogenesis가 생성된 후 Cystenyl DOPA, alanyl-hydroxy-benzo-thiazine를 거쳐 pheo-melanin이 생성된다. Eu-melanin은 2가지 경로로 생성되는데 DOPA quinone이 leuco-DOPA chrome을 경유하여 DOPA chrome으로 산화된 후 DHI (5,6-dihydroxy-indole)가 생성되어 tyrosinase나 peroxidase에 의해 Eu-melanin이 생성되거나, DOPA chrome에서 TRP-2 (Tyrosinase-Related-Protein-2)와 TRP-1(Tyrosinase-Related-Protein-1) 작용에 의해 Eu-melanin이 생성된다.

미백 화장품에 사용되는 원료는 90년대 이후, 알부틴 (arbutin), 코직산(kojic acid), 비타민 C 및 그 유도체 등<sup>13,14)</sup>이 개발되어 이를 함유한 미백 화장품이 시판되고 있고, 이외에도 식물 추출물-상백피, 당귀, 고삼, 지엽, 금은화, 감초, 반하, 백작약, 음양곽<sup>15,16)</sup> 및 essential oil<sup>17)</sup> 등이 미백 효과가 있는 것으로 나타나고 있다.

\*본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-820-5615 (팩스) 02-816-7338  
(E-mail) simss@cau.ac.kr

지금까지 chitosan oligosaccharide를 이용한 미백작용에 대한 연구 결과는 없는 실정이다. 그러므로 이 실험에서는 chitosan oligosaccharide가 melanin 생성에 어떠한 영향을 미치는지를 규명하기 위하여 B16 melanoma cell을 이용해서 tyrosinase activity와 melanin 생성을 관찰하였다.

## 실험방법

### 시약

Chitosan으로부터 분리한 chitosan oligosaccharide[(glucosamine)<sub>2,6</sub>]는 하병조 박사로부터 기증 받았다. Raffinose, melezitose, p-nitroanilide, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH),  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone(MSH), tyrosinase, L-DOPA, melanin들은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다. B16 melanoma 세포는 서울대학교 세포주 은행으로부터 구입하였으며, tyrosinase 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.에서 구입하였다.

### 세포 배양

B16 melanoma 세포는 10% fetal bovine serum과 penicillin/streptomycin(100 IU/50  $\mu$ g/ml)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 용액으로 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. B16 세포를 이용한 melanin 측정시 phenol red가 없는 DMEM을 사용하였다. 24 well plate에 5×10<sup>4</sup> cells/ml로 분주하고 12시간이 지난 뒤 세포가 plate에 완전히 부착된 것을 확인한 후 chitosan oligosaccharide를 10분간 전처리하였다. Melanin 생성을 촉진하기 위하여 1  $\mu$ M  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone를 처리하고 48시간 지난 뒤에 tyrosinase 활성과 melanin을 정량하였다.

### Sulforhodamine assay

B16 melanoma 세포를 96 well plate에 200  $\mu$ l(10<sup>4</sup> cells/ml)씩 가한 후 chitosan oligosaccharide를 처리하고 48시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 얼음에 보관한 50% TCA 용액을 50  $\mu$ l를 상층액 위에 가볍게 가하며, 최종농도가 10%되게 하였다. 4°C에서 1시간 방치한 후 수돗물로 5회 세척하고 물기를 제거하여 공기 중에서 건조시켰다. 1% acetic acid에 0.4%(W/V) sulforhodamine(SRB)을 녹인 용액 100  $\mu$ l 가하고 실온에서 30분간 방치하였다. 염색액을 버리고 1% acetic acid로 4회 세척한 후 물기를 제거하여 공기 중에서 완전히 건조 시켰다. 10 mM unbuffered Tris base(pH 10.5)를 200  $\mu$ l 가하고 침전물을 완전히 녹인 후에 564 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 항산화 활성 측정

96 well plate에 에탄올에 녹인 0.1 mM DPPH 용액 180  $\mu$ l

와 각 농도별로 조제한 chitosan oligosaccharide와 raffinose, melezitose 20  $\mu$ l를 가하고 37°C에서 30분간 배양한 후 FL 600 spectrofluorometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 B16 세포에 약물 처리 후 배양이 끝나면 1%(w/v) Triton X-100을 함유한 10 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)를 100  $\mu$ l를 가하고 5분간 shaking 한 후에 세포와 용액을 모두 eppendorf tube로 이전시키고 원심분리하여 상층액은 tyrosinase 활성과 단백질 정량에 이용하고, cell pellet은 멜라닌 정량에 사용하였다. 96 well plate에 약물 처리 후 얻은 상층액 40  $\mu$ l를 분주하고 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.2)에 녹인 2 mg/ml L-DOPA 200  $\mu$ l를 가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. Tyrosinase에 의해 생성된 DOPA chrome은 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>18)</sup> Tyrosinase 활성은 순수하게 정제된 tyrosinase를 효소 활성의 표준 검량선으로 이용하여 산출하였다. Bovine albumin을 표준 용액으로 하여 상층액 내의 단백질 양을 정량하였으며, tyrosinase 효소 활성은 unit/mg protein으로 표기하였다.

### 멜라닌 정량

Tyrosinase 활성을 측정하는 과정에서 얻은 pellet을 1 N NaOH 100  $\mu$ l와 증류수 200  $\mu$ l를 가하고 60°C에서 1시간 배양하여 멜라닌을 완전히 녹인 후 96 well plate에 200  $\mu$ l를 옮긴 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 표준품으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 멜라닌 양을 산출하였다. 멜라닌 생성량은 각 well에서 측정한 단백질 농도를 기준으로  $\mu$ g/mg protein으로 표기하였다.

### Tyrosinase immunoblotting

MSH를 48시간 처리한 B16 melanoma 세포를 extracting buffer(1% Triton X-100을 함유한 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.8)를 가하여 세포를 파괴시키고 얻은 균질액을 8~20% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동하고 nitrocellulose membrane으로 이전시켰다. 1% BSA를 함유한 Tris 완충용액에서 30분 이상 배양한 후 tyrosinase 항체와 alkaline phosphatase가 결합된 항체를 가한 후 alkaline phosphatase 기질 용액을 가하여 발색시켰다.

### 자료분석 및 통계적 검정

실험 결과는 평균±표준오차로 표기하였으며, 실험 성적은 non-paired Student's t-test로 검정하였고 P 값이 5% 미만일 때 통

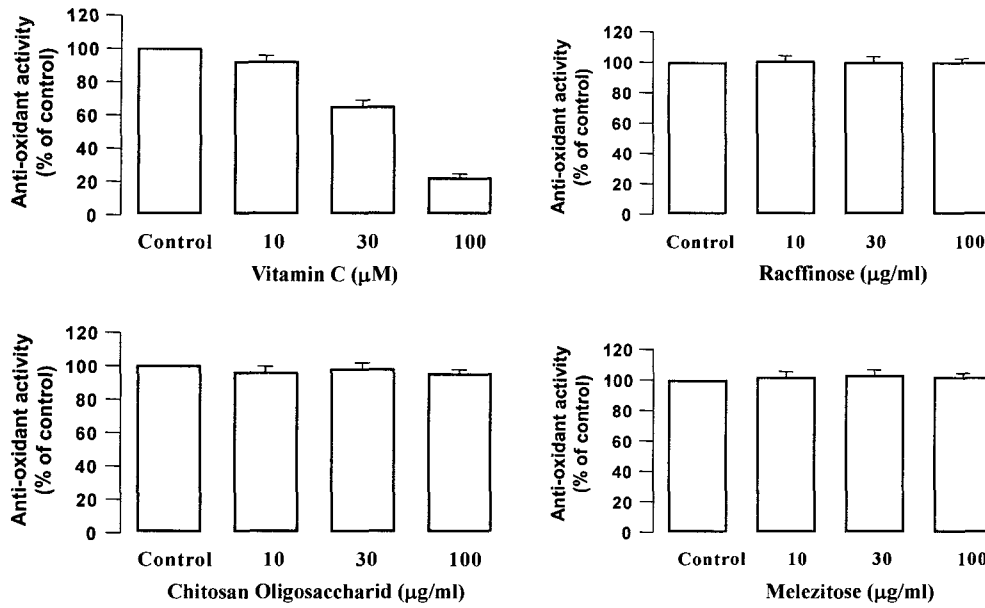


Fig. 1 – Anti-oxidant effect of chitosan oligosaccharide in the DPPH assay. A solution of 180 µl of 100 µM DPPH solution in ethanol was gently mixed with 20 µl of chitosan oligosaccharide for 30 min and the absorbance was measured at 517 nm. Results are means±SD from 3 separate experiments.

계적으로 유의하다고 간주하였다.

### 실험결과 및 고찰

#### Chitosan oligosaccharide의 항산화 작용 및 세포독성에 미치는 영향

Chitosan oligosaccharide는 [(glucosamine)<sub>2,6</sub>] 구조를 갖는 물질로 항산화 작용이 있는지를 확인하기 위하여 DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 반응을 관찰하였다. Vitamin C는 농도의존적으로 DPPH 라디칼을 소거하였지만 chitosan oligosaccharide는 별 다른 영향을 주지 않았다(Fig. 1). 한편 자연계에 존재하는 삼당류인 raffinose(O-α-D-galactopyranosyl-[1-6]-α-D-glucopyranosyl-β-D-fructofuranoside)와 melezitose(α-D-galactose-[1-3]-β-D-fructose-[2-1]-α-D-galactose)도 DPPH 유리 라디칼 소거에 영향을 주지 않았다(Fig. 1).

Chitosan oligosaccharide가 세포 독성이 있는지를 확인하기 위하여 B16 melanoma 세포에 chitosan oligosaccharide를 처리한 후 48시간 배양하고 단백질 정량 및 sulforhodamin 정량을 하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 chitosan oligosaccharide는 대조군과 비교하여 유의한 변화를 나타내지 않는 것으로 보아 이 실험에서 사용한 chitosan oligosaccharide의 농도에서는 B16 melanoma 세포의 증식에 영향을 주지 않는 것으로 사료된다. Fibroblast에서도 chitosan oligosaccharide는 1 mg/ml 농도에서 세포 독성을 일으키지 않는 것으로 보고되었다.<sup>19)</sup>

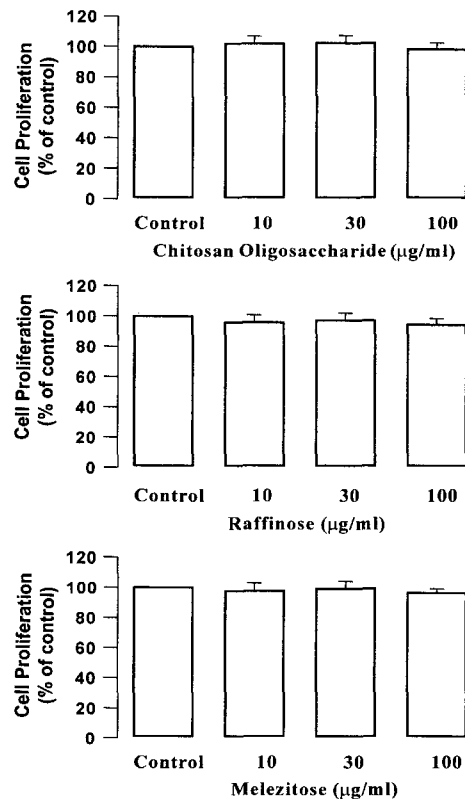


Fig. 2 – Effect of chitosan oligosaccharide on cell proliferation in B16 melanoma cells. The cells were incubated with chitosan oligosaccharide, raffinose or melezitose for 48 hr in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. The amount of living cells was measured using sulforhodamine. Results are means ± SD from 4 separate experiments.

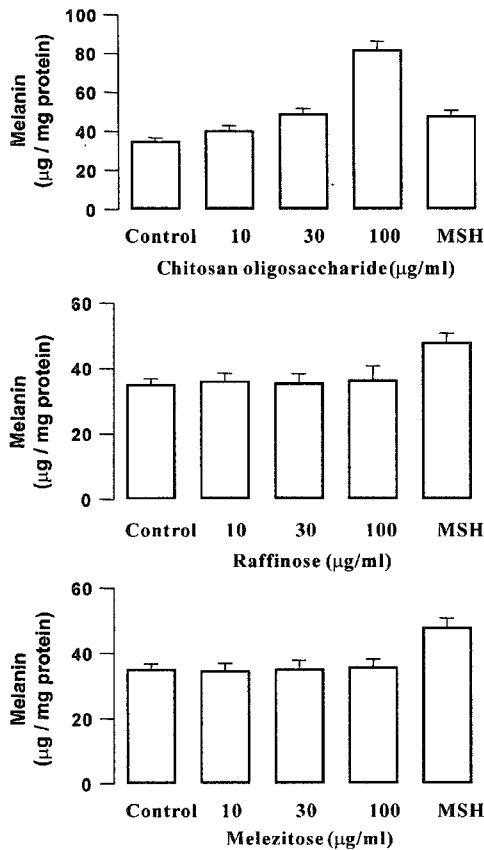


Fig. 3 – Effect of chitosan oligosaccharide on melanin production in B16 melanoma cells. The cells were incubated with chitosan oligosaccharide, raffinose, melezitose or 1 µM MSH. Results are means±SD from 4 separate experiments. \*Significantly different from MSH alone ( $p < 0.05$ ).

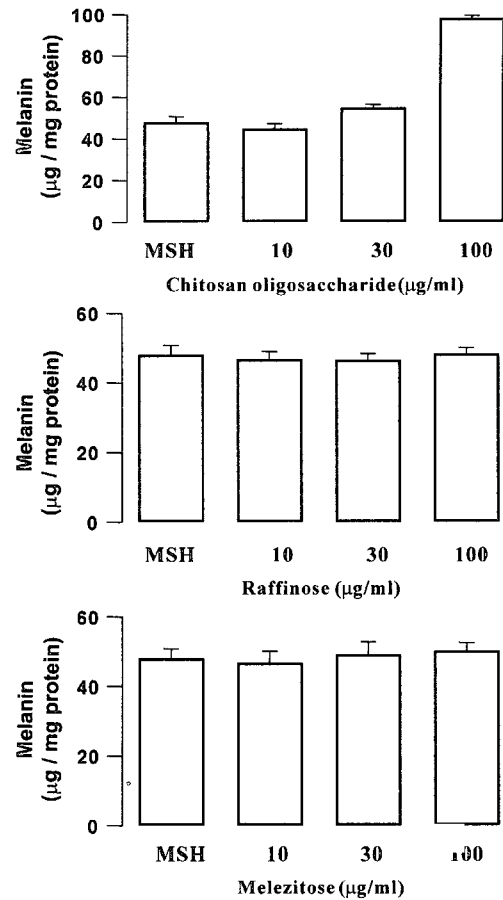


Fig. 4 – Effect of chitosan oligosaccharide on MSH-induced melanin production in B16 melanoma cells. The cells were incubated with chitosan oligosaccharide, raffinose or melezitose and then stimulated with 1 µM MSH. Results are means±SD from 4 separate experiments. \*Significantly different from MSH alone ( $p < 0.05$ ).

**B16 melanoma 세포에서 tyrosinase 활성과 melanin 생성에 미치는 영향**

B16 melanoma 세포는 안정 상태에서 생성되는 melanin 은  $35.1 \pm 1.6 \mu\text{g/mg protein}$  이었다. 한편 1 µM MSH는 melanin 생성을  $47.8 \pm 1.4 \mu\text{g/mg protein}$ 로 증가시켰다. Chitosan oligosaccharide는 MSH가 없는 상태에서 B16 melanoma 세포를 자극하여 melanin 생성을 농도 의존적으로 증가시켰으며 100 µg/ml 농도에서는 MSH에 의한 melanin 생성보다 1.7배 정도 더 증가시켰다(Fig. 3). 그러나 3당류인 raffinose와 melezitose는 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않았다. 한편 MSH만을 처치한 실험군보다 MSH와 chitosan oligosaccharide를 같이 처치한 군에 있어서 MSH나 chitosan oligosaccharide만을 단독 처치한 군보다 더 많은 melanin을 생성하였다(Fig. 4).

Citosan oligosaccharide에 의한 melanin 증가가 tyrosinase 활성과 관련성이 있는지를 확인하기 위하여 melanin을 측정할 같은 세포내에서 tyrosinase 활성을 관찰하였다. Melanocyte를 자극하는 MSH는 대조군에 비하여 tyrosinase 활성을 2.4배 증가

시켰다. Chitosan oligosaccharide는 안정상태시나 MSH로 자극한 B16 melanoma 세포에서 tyrosinase 활성에는 별다른 영향을 주지 않았다(Fig. 5). 이러한 결과로 미루어 볼 때 chitosan oligosaccharide에 의한 melanin 생성은 MSH와는 다른 기전을 통해 작용하는 것으로 생각되며, 미백제와는 반대로 tanning 제제로서의 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다.

**Tyrosinase immunoblotting**

위의 결과로 미루어 볼 때 chitosan oligosaccharide는 tyrosinase 활성과는 상관없이 melanin 생성을 증가시켰다. 이러한 tyrosinase 활성 변화와 관계없이 chitosan oligosaccharide에 의한 melanin 생성 증가가 tyrosinase 발현과 연관성이 있는지를 알기 위하여 tyrosinase 항체를 이용하여 immunoblot를 수행하였다. Fig. 6에 있는 바와 같이 MSH에 의해 tyrosinase 활성이 증가된 것과 마찬가지로 MSH에 의한 tyrosinase의 발현이 증가된 것을 볼 수

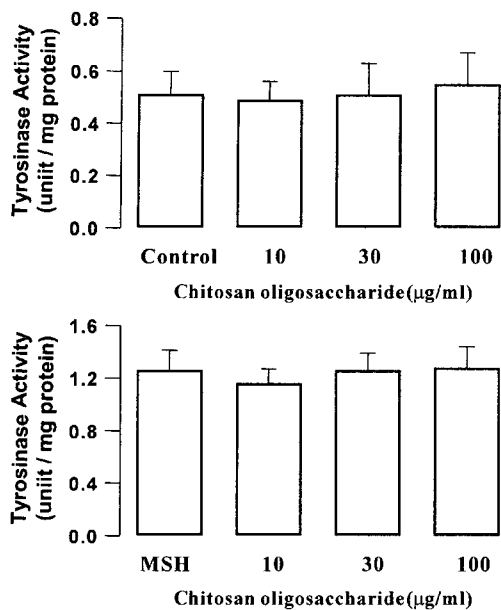


Fig. 5 - Effect of chitosan oligosaccharide on tyrosinase activity in basal (upper) and MSH-stimulated (lower) B16 melanoma cells. The cells were incubated with chitosan oligosaccharide in the absence or presence of 1  $\mu$ M MSH for 48 hr at 37°C. Results are means  $\pm$  SD from 4 separate experiments.

	1	2	3	4
Tyrosinase	→	→	→	→
Chitosan oligosaccharide	-	-	+	+
MSH	-	+	-	+

Fig. 6 - Effect of chitosan oligosaccharide on tyrosinase expression in MSH-stimulated B16 melanoma cells. B16 cells were treated for 48 hr with distilled water (lane 1), 1  $\mu$ M MSH (lane 2), 100  $\mu$ g/ml chitosan oligosaccharide (lane 3) and 1  $\mu$ M MSH plus 100  $\mu$ g/ml chitosan oligosaccharide (lane 4). Solubilized total protein (20  $\mu$ g) were electrophoresed in 8~20% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membrane. Specific detection of tyrosinase was performed with the polyclonal antibody against tyrosinase. Similar results were observed in three independent experiments.

있다. 그러나 chitosan oligosaccharide만을 단독 투여한 군과 MSH와 같이 투여한 군에 있어서 각각의 대조군과 비교시 별다른 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 6). chitosan oligosaccharide에 의한 melanin 생성 증가는 tyrosinase 활성 뿐만 아니라 tyrosinase 발현과는 무관하게 일어나고 있음을 알 수 있다. 앞으로 chitosan oligosaccharide가 melanin 생성을 증가시키는 기전에 대한 연구는 더 진행되어야 할 과제이다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때 chitosan oligosaccharide는

항산화 작용은 없지만 melanin 생성을 증가시키며, hyaluronidase 활성을 억제하는 것으로 보아 tanning 제제로서 개발 가능성이 있는 물질로 사료된다.

## 문 헌

- Muzzarelli, R. A. A. : Chitin, Pergamon Press, New York (1977).
- Brine, C. J., Sandford, P. A. and Zikakis, J. P. : Advances in Chitin and Chitosan, Elsevier Applied Science, New York (1992).
- Itoh, Y. and Miyazawa, F. : *BIO INDUSTRY*. **11**, 5 (1994).
- Tokora, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Growth-inhibitory effect of hexa-N-cetylchito-hexaose and chito-hexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 784 (1988).
- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokora, A., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Antitumor effect of hexa-N-acetylchito-hexaose and chito-hexaose. *Carbohydr. Res.* **151**, 403 (1986).
- Nishimura, K., Ishihara, C., Ueki, S., Tokura, S. and Azuma, I. : Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin. *Vaccine*. **4**, 151 (1986).
- Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Numata, F., Tone, Y., Tokura, S. and Azuma, I. : Adjuvant activity of chitin derivatives in mice and guinea pigs. *Vaccine*. **13**, 379 (1985).
- Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Tokura, S. and Azuma, I. : Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine*. **2**, 93 (1984).
- Maizaki, Y., Tsuji, K., Nakagawa, Y., Kawai, Y., Akimoto, M., Tsugita, T., Takekawa, W., Terada, A., Hara, H. and Mitsoka, T. : Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 439 (1993).
- Shimojoh, M., Masaki, K., Kurita, K. and Fukushima, K. : Bactericidal effects of chitosan from squid pens on oral streptococci. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*. **70**, 787 (1996).
- Amako, K., Shimodori, S., Imoto, T., Miyake, S. and Umeda, A. : Effects of chitin and its soluble derivatives on survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 608 (1987).
- Kendra, D. F. and Hadwiger, L. A. : Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.* **8**, 276 (1984).
- Higuchi, M., Miura, Y., Boohena, J., Kinoshita, Y., Yamamoto, Y., Yushimura, I. and Yamaha, Y. : Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts. *Planta. Med.* **59**, 253 (1993).
- Ryu, K. Y., Kang, W. S., Kim, Y. H., Jang, H. D., Hong, J. T., Yoo, H. S. and Yun, Y. P. : Antioxidative effects of the rhizome of

- Rhodiola sa halinensis. *Yakhak Hoeji*. **42**(3), 312 (1998).
- 15) Park, J. H., Shin, Y. G., Baek, S. K., Lee, U. K., Chung, H. and Park, Y. I. : Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs. *Yakhak Hoeji*. **41**(4), 518 (1997).
- 16) Lee, S. H., Park, J. S., Kim, S. Y., Kim, J. J. and Chung, S. R. : Isolation of Inhibitory components on tyrosinase activity from the bark of paeonia moutan. *Yakhak Hoeji*. **42**(4), 353 (1998).
- 17) Lim, H. W., Cho, N. Y., Yoon, M. Y., Cha, S. B., Kim, K. W., Park, Y. M., Lee, J. Y., Lee, J. H., Kim, C. J. and Sim, S. S. : Effects of citrus essential oils on melanin production in B16 melanoma cells. *Yakhak Hoeji*. **47**, 25 (2003).
- 18) Ohkura, T., Yamashita, K., Mishima, Y. and Kobata, A. : Purification of hamster melanoma tyrosinases and structural studies of their asparagine-linked sugar chains. *Arch Biochem Biophys*. **15**;235(1), 63 (1984).
- 19) Ha, B. J. : Studies on the cosmetic effects of chitosan oligosaccharide. *Annual Bulletin of The Bum-Suk Scholarship Foundation*. **2**, 393 (1998).