

# 황기 물추출물이 B16F10 Mouse Melanoma세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향

김영옥, 이은미\*, 안덕균, 신준식, 이성환  
자생생명공학연구소, \*이은미 여성한의원

---

Effect of the Aqueous Extract of Astragalus membranaceous  
BUNGE on Melanin Formation in B16 Mouse Melanoma Cell Line

Young Ock Kim, Eun Mi Lee\*, Duk Kyun Ahn, Jun Sik Shin, Sung Whan Lee  
Jaseng Research Institute of Biotechnology and Bioscience  
\*Dr. Lady's Oriental Clinic

## ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effect of the aqueous extract of the Astragalus membranaceous(AM). AM showed inhibitory effect on the tyrosinase activity using L-tyrosine as a substrate. Tyrosinase plays an important role in the process of melanin polymer biosynthesis. In vitro AM extract(1mg/ml) inhibited melanin biosynthesis and are useful for the material used in cosmetics. B16 mouse melanoma cells were cultured in different concentrations. The non-cytotoxicity of the plant extracts was confirmed by MTT assay..

## 1. 서론

멜라닌은 피부의 5%에 해당하는 멜라닌 형성 세포(melanocyte)에서 만들어져 각질 형성 세포(keratinocyte)로 전달된다. 각질형성세포로 전달된 멜라닌은 피부

의 기저층 위부분으로 확산되어 자외선에 의해 기저층의 세포가 손상되는 것을 막아준다. 자연적으로 생성되는 멜라닌은 동.식물과 미생물계에 존재하는 고분자 천연색소로써 다양한 종류가 있으며 다단계과정을 거쳐 생성된다<sup>1)</sup>. 멜라닌의 주요 기능은 피부의 광노화와 일광각화를 억제하거나<sup>2)</sup>, 색소침착 및 멜라닌 전구물질의 독성으로 인한 세포의 사멸적인 기능도 있다<sup>3)</sup>. 멜라닌 합성과정은 tyrosin을 기질로 하여 1-3,4-dihydroxyphenylalanine을 생성하고 이를 다시 L-dopaquinone으로 전이시킨 후 DOPAquinone이 cystein과 결합하여 cysteinyl DOPA가 만들어지고 그 결과 alkali 가용성의 적갈색 pheomelanin이 만들어지거나, cystein이 없는 DOPochrome이 생성되어 alkali 난용성의 흑갈색 eumelanin이 합성된다<sup>4)</sup>. 일반적으로 melanin이라하면 eumelanin을 나타낸다. key enzyme인 tyrosinase는 구리를 함유하는 효소로서 식물의 갈변과 동물의 멜라노화에 관여한다<sup>5)</sup>. 미백화장품에서 사용되는 원료는 arbutin, kojic acid, Vit C 및 그 유도체<sup>6)</sup>가 개발되고 이외에도 식물추출물<sup>7)</sup> 상백피, 백강잠, 당귀, 고삼, 지엽, 금은화, 감초, 반하, 백작약, 음양곽<sup>8)</sup>등이 연구되어져 있다.

미백제인 hydroquinone나 kojic acid은 tyrosinase의 저해제이다. Kojic acid은 1907년 Imokawa<sup>9)</sup>등은 각질형성세포에서 분비되는 endotheikin-1(ET-1)이 멜라닌 형성세포의 성장과 분화에 중요한 요소라는 것을 밝혔으며, cammonile추출물이 이를 차단한다고 보고하였다. 누룩산으로 불리는 코직산은 타이로시네이즈의 활성부위에 존재하는 구리이온을 흡착시켜 효소활동을 저해하고<sup>10)</sup> 미백 효과를 내는 비타민 C는 산화가 잘되는 불안정성 때문에 비타민의 안정성에 많은 연구가 진행중이다<sup>11)</sup>.

전국 생산량의 60%를 차지하는 정선황기는 식물명으로 단너삼이라고도 하는데 黃芪는 神農本草經에 상약으로 수록되어 있어 고래로부터 민간에서 사용하던 약으로써 補中益氣湯, 十全大補湯, 및 黃芪建中湯등 여러 가지 처방에 사용되어왔다. 뿌리를 사용하는데 氣를 보하고 汗을 멎게하는 익기고표, 利水소종의 효능이 있고 自汗, 盜汗, 血肥를 치료하고<sup>12)</sup> 내상노권, 비허설사, 기허혈탈을 치료한다. 잎은 止渴의 효능이 있다. 약리작용으로는 면역 작용이 강하여 방사선, 노화에 의해 약해진 항체반응이 회복되었고<sup>13)</sup> 세포실험에서는 recombiant interluekin-2의 활성이 강하여 lymphocyte-activated killer cell의 생산을 증가시킨 보고도 있다<sup>14)</sup>. 黃芪의 구성성분으로는 flavonoid계통<sup>15)</sup>과 triterpenoide, glicoside 계통이 있으며 생리활성인 saponin이 있고 polysaccharie등이 보고되어 있다<sup>16)</sup>. 최근에는 자연친화적인 미백화장품의 개발로 수종의 식물에서 미백효과가 있음을 보고하였다. 그에 따라 당나무추출물, 호장근추출물 및 백피추출물이 보고되었으나 현재까지황기 추출

물의 미백효과는 알려진 바 없다. 본 실험실에서는 여러 가지 식물을 대상으로 하여 미백효과를 실험한 결과황기에서 황기의 물 추출물이 B16F10 melanoma 세포에 처리하여 tyrosinase 활성 및 melanin양을 측정한 결과 유의한 효과를 나타내어서 보고하는 바이다.

## II. 실험 방법

### 1. 시료의 조제

황기 200g에 3차 증류수 4L를 가하여 3시간 동안 끓였다. 소독용 거즈로 여과를 하고 3000rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 취하였으며 -70℃에서 freeze dryer로 냉동, 건조 시킨 후 38.5g의 시료를 만들었다. 시료는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Co, USA) 배양액에 녹인 후 세포에 투여하기 전 0.22 um pore 여과지로 여과 멸균하여 농도를 조정하여 사용하였다.

### 2. 시약 및 기기

B16F10 세포는 충남대학교 생화학교실에서 기증받았다. Tyrosinase(EC 1.14.18.1), L-3,4-Dihydroxyphenylalanine(L-DOPA),albutin,triton-X,phosphate, 2-mercaptoethanol, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide), penicillin /streptomycin 등은Sigma chemical co..로부터 구입하였다.

### 3. 세포배양

B16F10 melanoma 세포는 10% fetal bovine serum과 penicillin /streptomysin (100IU/100ug/ml) 을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)용액으로 37℃의 5% CO<sub>2</sub>humidified incubator에서 배양하였다. 멜라닌 정량과 tyrosinase 효소 활성측정을 할때는 phenol red가 없는 DMEM을 사용하였고 24 시간주기로 DMEM 배양액을 교체하였다.

### 4. 세포생존률의 측정

B16F10 멜라닌 세포를 세포배양용 6 Well microplate(NUNC)를 사용하여 각 Well(2ml)당  $7.7 \times 10^4$  개 씩 분주하였고 16시간 배양후에 세포가 부착되면멜라닌

생성 유도 물질인 감초산을 1mM 처리 한 후 알부틴, 은행, 갈근을 농도별로 (0.5mM, 1mM, 1mM, 4mM, 5mM)를 3일간 매일 처리하였다. 3일 후 배지를 갈아주고 1mg/ml MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl tetrasolium bromide)를 전체 배지 양의 1/10 정도 넣고 3시간 동안 37°C에서 배양 한 후, 배지를 제거하고, DMSO(Dimethyl Sulfoxide)로 세포를 용해시켜 96well micriplate에 바꿔 ELISA reader로 570nm에서 흡광도를 측정했다.

### 5. 시험관내 멜라닌 생성 억제 실험

멜라닌 양의 측정에는 Ando<sup>17)</sup> 등의 방법을 이용하여 측정하였다. B16F10 세포를 6 well에  $5 \times 10^5$  cell/well (왜냐하면 FBS가 없는 media에서 cell의 proliferation 을 억제한 상태에서 황기를 처리 할 것이기에 세포수를 많이 분주하였음) 로 분주한 후 12시간 배양하였다. 황기를 각각 1mg/ml 처리한 것과 처리하지 않은 대조군으로 나누고 0% FBS(duplicate), 2% FBS(duplicate), 5% FBS(duplicate)들여간 배양액으로 나누어서 48시간 배양 한 후 상층액을 제거 한 후 3차 증류수 200ul를 다시 넣었다. 여기에 1:1의 EtOH-Ether<sup>18)</sup> 첨가 한 수 상온에서 15분간 배양하였다. 원심분리를 하여 세포 침전물을 만들어서 상층액을 걸어내고 1N NaOH/10% Ether로 조성된 lysis solution 100ul 를 각각의 sample에 처리하고 96 well plate에 100ul씩 옮긴 후 470nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 한 실험군에 3개씩 총 3번 실험하였다(n=9). 계산은 흡광도를 제한하여(blank를 빼 값) melanin의 흡광 정도로 표시와 퍼센트(대조군을 100으로 해서)로 표시하였다.

### 6. 자료분석 및 통계적 검정

실험결과는 mean±SD으로 표기하였으며, 실험성적은 non-paired Student's t-test로 검정하였고 P<0.05 미만일때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

## III. 실험 결과

### 1. Tyrosinase inhibitory activity

아미노산의 일종인 tyrosine은 tyrosinase의 작용으로 피부의 주된 색소인 멜라닌으로 합성된다<sup>19)</sup>. 이런 total melanin 합성 억제에 대한 효과를 보면 control에

대한 양성대조군인 arbutin의 멜라닌 합성저해 차이를 10분, 20분, 25분, 30분, 60분의 시간대별로 처리했으며 시중의 미백화장품의 원료로 사용하고 있는 銀杏 (Ginco Biloba)과 葛根(Pueraria Thunbergiana)을 황기와 같은 농도로 처리하였다. 세 개의 한약재를 시간에 따라 melanin 흡수량을 측정 한 결과 크게 다른 유의성은 없지만 그 중에서도 황기를 30분간 처리하였을 때가 가장 좋은 효과를 나타내었다(Fig.1). Control의 melanin 합성 저해율을 0%로 하였을때 양성 대조군인 arbutin의 저해율은 50ug/ml, 100ug/ml, 250ug/ml, 500ug/ml, 1000ug/ml에서 각각 5.26%, 8.25%, 8.77%, 8.12%, 12.27%로 나타났고 황기는 각각 4.6%, 5.97%, 5.62%, 7.95%, 10.37% 로 우수한 저해율을 나타내었다(Fig.2). 황기의 농도가 증가 할수록 저해율도 증가하는 경향을 보였다. 특히 500mg/kg에서는 양성 대조군과 거의 같은 효과를 나타내었다(Fig.2).

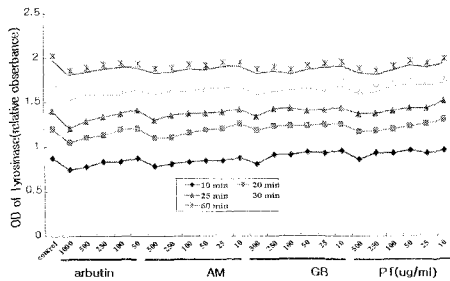


Fig. 1. L-tyrosine is converted into L-dopa by tyrosinase. Concentration of L-dopa can be determined by spectrophotometry. This experiment shows that whitening agents such as arbutin inhibit tyrosinase activity in a dose and time dependent manner. AM, GB and PT inhibit tyrosinase activity in a dose and time dependent manner. AM: Astragalus membranaceous, GB: Ginco biloba, PT: Pueraria Thunbergiana

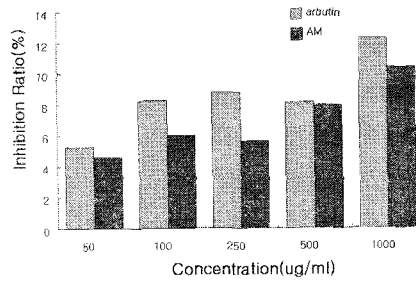


Fig. 2. Inhibitory effects of Astragalus membranaceous(AM) on total melanin synthesis. The cells were treated with various concentration of AM for 30 min. The results were expressed as the average of triplicate samples compared with control.

## 2. Melanine 세포에 미치는 영향

### 1) Cell내의 melanine생성 억제

Fig. 3에서 MTT assay로 B16F10멜라닌 생성결과 485nm에서 황기를 녹인 vesicle인 DMSO로 측정해 보았으나 control과 거의 같은 수준이어서 DMSO에 대한 세포 생존 효과는 없는 것으로 판명되었다. 감초산 처리군은 무처리군에 비해 멜라닌 함량이 0.5mM에서는 410nm와 485nm에서 15%, 14.4%가 증가하여 농도 의존성을 나타내었고 1mM에서 각각 32.5%, 28.4%로 멜라닌이 증가 되었다. 감초산의 세포에 대한 일반적인 독성과 멜라닌유도에 대한 기능은 이미 잘 알려져 있다<sup>20)</sup> 양성 대조군인 arbutin은 23.4%, 17.2%가 감소한 반면 황기 1mg/ml에서는 19.2%, 10.5%의 멜라닌 합성 억제능력을 나타내었다. 양성대조군인 albutin 3mM에서는 17.21%의 멜라닌 합성 억제능력이 나타났고 황기 1mg/ml에서는 10.51%의 멜라닌 합성 억제능력이 나타났다. arbutin과 비교하여보여준 이 근소한 차이의 결과는 황기 추출물이 멜라닌 합성 억제능력 있다고 할 수 있는 범위이다.

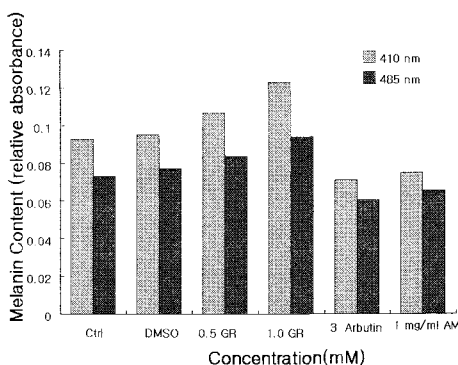


Fig. 3. The effect of AM on the melanin contents in B16 melanoma cells. Melanin content assay was done according to the method, previously described.

Results are expressed as relative absorbance of control/GR  
=Glycyrrhizic acid AM=Astragalus membranaceus

### 2) 세포생존을 측정(Cell viability)

황기 추출물이 B16F10melanoma세포의 증식에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위해 황기 추출물을 0mg/ml, 2.5mg/ml, 1.25mg/ml, 0.83mg/ml, 0.625mg/ml, 0.416mg/ml까지의 다양한 농도로 처리하고 48시간 후에 MTT방법으로 세포의

생존율을 관찰하였다. Fig.4에서 보는 바와 같이, LD<sub>50</sub>은 0.625mg/ml로 나타났는데 이것은 통상의 실험농도보다 아주 높은 농도이므로(보통의 실험 농도의 10배) 실지로 세포의 독성은 거의 없다고 할 수 있다. 황기 추출물에 의한 세포의 생존율은 최고 2.5mg/ml에서는 높은 생존율을 나타내고 1.25mg/ml과 0.416mg/ml 사이에서는 유의할 만한 변화를 나타내지 않았다. 또한 세포의 형태학적인 변화를 관찰해 본 결과 대조군과 큰 차이로 보이지 않았다. 따라서 이 농도 범위에서 황기 추출물의 독성이 없는 것으로 생각되어 이 농도 범위에서 실험을 실시하였다.

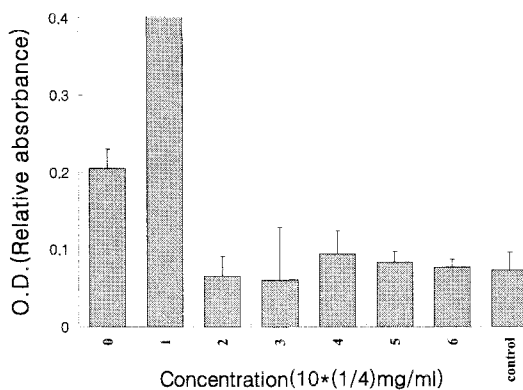


Fig. 4. Effect of AM on the viability of B16 melanoma cells. Cells were cultured in the presence of various concentrations of AM for 48h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as absorbance and data were mean±SD of at least six determination.

#### IV. 고찰 및 결론

본 연구는 황기 추출물로부터 피부 melanin 생합성에서 key enzyme으로 작용하는 tyrosinase활성 억제효과를 알아보았다.

Tyrosinase는 L-tyrosine을 L-dopa로 하이드록실화 한 후 이를 dopaquinone으로 산화시킨다. 현재까지 개발된 대부분의 미백제는 hydroquinone나 kojic acid 또는 arbutin과 같은 tyrosinase 저해제이다. 또한 천연물에서는 감초에서 formononetin, glabrene, glabridin, glabrol등이 분리되었고, 상백피에서는

oxyresveratrol등이 보고되었다<sup>21)</sup>. 韓方에서도 白斑症과 같은 저색소 침착증에 대한 약물연구가 있었으며 한약재의 melanogenesis 영향에 대한 연구도 꾸준히 있어 왔지만 아직 어떤 작용을 하는지는 알려져 있지 않다. Eisinger and Marko<sup>22)</sup>에 의해 멜라닌 형성 세포가 *in vitro*에서 장기 배양에 대한 보고 이래 많은 연구가 진행되었다. 본 연구에서는 melanogenesis에 대한 영향을 검색하기 위하여 약재의 처리 농도를 결정하기 위한 MTT assay를 하여 세포독성을 확인하였다. Melanogenesis로 판단하는 melanin 세포 정량을 측정하였는데 이 세포들은 자외선과 estrogen, histamine, interferon, dopachrome conversion factor, Vit. D와 prostaglandin과 같은 호르몬에 의해 영향을 받는다. MTT assay로 melanin을 정량해 본 결과 본 연구에 사용된 최고농도인 1.25mg/ml에서도 세포의 생존율이 89.48%로 나타나 황기추출액은 melanin 세포 배양시 특이한 세포독성에 영향을 주지 않는 전제하에 1mg/ml의 고농도를 선택하였다. 이 농도를 기준으로 하여 FIG. 3의 결과를 볼때 1mg/ml의 황기가 양성 대조군인 3mM의 arbutin과 거의 같은 수준으로 억제를 한 것으로 보여진다. 그러나 좀 더 확실한 결론을 도출하려면 arbutin의 세포독성도 함께 보아야 할 것이다. 왜냐하면 실험에서 well당 멜라닌 양을 측정하는데 동일 연구자에 의한 실험횟수에도 많은 차이가 나타난다는 보고<sup>23)</sup>가 있으므로 melanin 합성에 대한 실험군간의 비교는 매 실험시 실시해야 하는 상대적인 비교가 더 확실하다고 본다. 또한 감초산을 처리하지 않은 군보다 처리한 군에서 세포의 생존률이 410nm의 파장에서 32.5%나 떨어지므로 여기서 melanin의 양이 얼마나 나오는지를 측정하였다면 황기 추출액의 melanin 양과 상대 비교를 할 수 있다고 생각된다.

이상의 연구 결과를 종합하면 황기에 의한 B16mouse 흑색종의 세포주에서 색소생성 억제효과가 황기 1mg/ml을 30분간 처리하였을 경우 10.37%를 나타낸 것은 양성대조군인 arbutin의 12.27%에는 미치지 못하지만 높은 효과를 보여준 것이다. 황기의 미백 효과 중 1mg/ml의 농도에서 효능은 실제 미백효능인 것은(Fig.3) 세포자체의 사멸이 없기 때문에 단정 할 수 있다(Fig.4). 앞으로 melanin 세포의 melanin 化에 대한 더욱 심도 있는 세포내 작용기전의 규명이 필요하다고 생각하며 황기를 화장품용 미백원료로 사용할 경우라면 고려해야 할 사항은 본 실험에서 높은 결과를 나타낸 B16 세포주는 사람이 아닌 쥐유래의 형질 전환된 세포이며, 이것은 인체 세포의 생리화학적인 멜라닌 생성과정과 같을 수는 없고 또한 정상 세포와 형질 전환된 세포에서의 세포 독성이 다를 수 있으므로 인체 세포를 대상으로 비교 실험을 해야 한다고 생각한다.



## V. 참고 문헌

- 1) Pawelek JM AND Korner A. M. Biosynthesis of mamalian melanin (1982) *Sci.* 70(2), 136-45
- 2) Kaufman RJ, Davies MV, Sasley LC and Michnick D. Improved vectors used for stable expression in mamalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19(16), 4485-4490
- 3) Kameyama K, Takemura T, Hamada Y, Sakai C, Kondoh S and Nishiyama 1993 Pigment production in murine melanora cells is regulated by tyrosinase, trosinase-related protein(TRP1), DOPAchrometautomerase(TRP2) and a melanogenic inhibitor (1993) *J. Invest. Dermatol.* 100(2) 126-131
- 4) Pawelek JM. After DOPAchrome? *Pigment cell Res.* (1991) 4 53-62
- 5) Sanchez-Ferrer A., Rodriguez-Lopez JN., Garcia-Canovas F. and Garcia-Carmona F. Tyrosinase: a comprehensive revies of its mechanism *Biochim. Biophys Acta.* Feb 22:1247(1) 1-11
- 6) Higuchi M., Miura Y., Boचना J., Kinoshita Y., Yamamamoto Y., Yushimura I. and Yamaha Y.: Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichem tissues and bionts. *Planta. Med.* (1993) 59:253
- 7) Choi SS., Noh HS., Cho SH. and Kong KH: Screening of inhibitors against tyrosinase activity from natural products. *Yakhak Hoeji* (2001) 45(5) 522-528
- 8) Chun HJ., Mun YJ., Kim JH., Kim IK., Jeon BH and Woo WH: Effect of the aqueous extract of *Epimedium Koreanum Nakai* on melanin formation in B16 Mouse Melanoma cell line *Yakhak Hoeji* (2000) 44(5) 455-462
- 9) Imokawa G. and Mishima Y. Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glycosylation inhibitors within malignant melanoma cells 1982 *Cancer Res.* 42: 1994-2002
- 10) Battaini G., Monzani E., Casella L., Santagostini L. and Paglianin R.: Inhibition of the catecholase activity of biomimetic dinuclear copper complexes by kojic acid. (2000) *J Bio Inorg Chem Apr*:5(2):262-268

- 11) Morisaki K. and Ozaki S.: Design of novel hybrid vitamin C derivatives: Thermal stability and biological activity. (1996) Chem Pharm Bull(Tokyo) S대:44(9):1647-1655
- 12) Tu GS.: Pharmacopoeia of the People's Republic of Chiana. (1998) 109
- 13) Zhao KS., Manicini C. and Doria G: Enhancement of the immune response in mice by Astragalus membranaceus extracts.(1990) Immunopharmacology 20 225-233
- 14) Chu DT., Lepe-Zuniga J., Wong WL., laPushin R. and Mavligit GM.: Fractionated extract of Astragalus membranaceus, a Chinese medicinal herb, potentiates LKA cell cytotoxicity generated by a low dose of recombinant interleukin-2. (1988) J. Clin. Lab. Immunol.(J3K) 26 183-187
- 15) Ma XQ, Shi A., Duan JA.,Dong TT and Tsim KW: Chemical analysis of Radix A stragali (Huanggi) in China: a comparison with its adulterants and seasonal variations. (2002) J Agric Food Chem Aug 14:50(17): 4861-4866
- 16) Hirotani M., Zhou Y., Rui H. and Furuya T.: Cycloartane Triterpene Glycosides from the hairy root cultures of Astragalus membranaceus. (1994) Phytochemistry 37(5) 1403-1407
- 17) Fernanders S. S., Arcuri R., Morgado-Diaz J. A. and Benchimol M. Increase of melanogenesis by reinoic acid: an ultrastructural and morphometric study (2004) Tissue & Cell 36, 95-105  
Ando H.,Funasaka Y., Oka M., Ohashi A., Furumura J., Matsunaga J., Matsunaga N., Hearing J. and Ichihashi M. Possible involvement of proteolytic degradation of tyrosinase in the regulatory effect of fatty acid on melanogenesis (1999) J. Lipid Research 40, 1312-1316
- 18) Ando H.,Funasaka Y., Oka M., Ohashi A., Furumura J., Matsunaga J., Matsunaga N., Hearing J. and Ichihashi M. Possible involvement of proteolytic degradation of tyrosinase in the regulatory effect of fatty acid on melanogenesis (1999) J. Lipid Research 40, 1312-1316
- 19) Korner AM. and Pawelek J. Mammalian tyrosinase catalyses three reactions in biosynthesis of melanin (1982)Science sep 217(4565)

1163-1165

- 20) Gi-Dong Jung, Jeong-Yeh Yang, Eun-Sup Song and Jin Woo Park  
Stimulation of melanogenesis by glycyrrhizin in B16 melanoma cells.  
Experimental and Molecular Medicine (2001) 33(3) 131-135
- 21) 池田孝夫 and 堤龍彦 生藥의 機能과 美白效果 (1990) Fragrance Journal  
90(6). 59
- 22) Eisinger M. and Marko O. Selective proliferation of normal human  
melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin  
(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 2018-2022
- 23) Mansur CP., Gordon PR., Ray S., Holick MF. and Gilchrist BA Vitamin  
D, its precursors, and metabolites do not affect melanization of cultured  
human melanocytes J Invest Dermatol (1988) Jul 91(1) 16-21