

B16/F10 생쥐 흑색종 세포에서 제주조릿대 추출물의 멜라닌 합성 저해 효과

윤훈석^{1,2} · 김정국² · 김세재^{1*}

¹제주대학교 지역기술혁신센터 및 제주대학교 생명과학과, ²고려대학교 생명과학과

Received May 19, 2007 / Accepted June 8, 2007

The inhibitory effect on the melanin synthesis in B16/F10 mouse melanoma cells by *Sasa quelpaertensis* leaf extract. Hoon Seok Yoon^{1,2}, Jeong Kook Kim² and Se Jae Kim^{1*}. ¹Technology Innovation Center for Life Sciences and Department of Life Science, Cheju National University, 66 Jejudaehakno, Jeju 690-756, Korea, ²Department of Life Sciences, School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Anam-Dong, Sungbuk-Gu, Seoul 136-701, Korea – Effects of hot-water extract from *Sasa quelpaertensis* leaf (HWES) on melanogenesis were investigated in B16/F10 mouse melanoma cells. HWES inhibited cellular tyrosinase activity and melanin biosynthesis in a dose-dependent manner. Western blotting analysis showed that HWES dose-dependently inhibited tyrosinase and tyrosinase related protein-1 expression. Also, HWES suppressed sustained ERK activation in a concentration-dependent manner, suggesting that HWES inhibits the melanin biosynthesis through the suppressive effect against pathway involving sustained ERK activation.

Key words – *Sasa quelpaertensis*, tyrosinase, melanogenesis, sustained ERK activation.

서 론

피부색은 기저층에 존재하는 멜라닌 세포가 만들어내는 멜라닌의 함량에 의해 결정된다. 멜라닌은 태양 광선으로부터 들어오는 자외선을 차단하는 색소로서 과도하게 합성되거나, 노화 등에 의해 피부의 생리기능이 떨어지면 피부 표면에 침착되어 기미, 주근깨 및 다양한 색소로 나타난다[7]. 멜라닌은 멜라닌 생성세포내의 멜라닌 소체에서 티로시나제(tyrosinase), 티로시나제 관련 단백질 1(tyrosinase related protein 1; TRP-1), TRP-2 등과 같은 멜라닌 생합성 효소의 작용으로 합성된다[2,3]. 멜라닌 생합성에서 티로시나제는 티로신(tyrosine)이 도파퀴논(dopaquinone)으로 전환되는 중요한 속도조절 단계를 매개하기 때문에 피부 색소조절 과정을 연구하는데 중요한 표지 유전자이다. 또한 티로시나제는 유멜라닌(eumelanin)의 중간대사산물인 5,6-dihydroxyindole (DHI)을 indole-5,6-quinone으로 전환하는 과정에도 관여한다고 알려져 있다[11,18]. TRP-1의 기능은 아직 확실하게 밝혀져 있지는 않지만, 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) 산화효소의 역할을 할 것이라는 보고와 더불어 티로시나제를 안정화시키는 작용을 할 것이라는 보고도 있다[6,10]. 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA) chrome tautomerase라고 불리는 TRP-2는 중간대사 산물인 DOPA chrome을 DHICA로 이성질화시키는데 관여하며 멜라닌 생합성체 내에 carboxylated subunits의 구성을 조절하는 스위치 역할을 한다고 알려져 있다. 그러나 B16 흑색종 세포에서

α -MSH 등의 멜라닌 생성 활성화 인자들에 의해 Trp-2의 발현이 오히려 억제된다는 보고도 있다[13,14,19].

피부가 자외선 자극을 받으면 각질형성세포(keratinocyte)에서 endothelin-1 (ET-1), α -MSH, 부신피질 자극 호르몬, 일산화질소(NO) 등이 분비되어 피부색소가 증가된다. α -MSH는 멜라닌 생성세포에 있는 melanocortin-1 수용체에 결합하여 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 농도를 증가시켜 멜라닌 생성을 증가시키고, 일산화질소는 cyclic guanine monophosphate (cGMP) 경로를 통해 멜라닌 생성을 증가시킨다[9,16]. ET-1의 경우 멜라닌 세포의 protein kinase C 경로와 cAMP 경로를 통해 피부 색소형성을 촉진시킨다[8,17]. 이밖에도 각질형성세포에서 분비되는 멜라닌 생성 촉진인자는 basic fibroblast growth factor, stem cell factor 등이 있다[4,5].

본 연구는 제주도 한라산에 광범위하게 자생하는 제주조릿대(*Sasa quelpaertensis* Nakai) 잎 열수추출물이 미백소재로서의 활용 가능성을 평가하기 위하여 수행하였다. 제주조릿대 잎은 2005년 4월에 제주도 교래리 지역에서 채집하여 음건한 다음 미세말로 만든 후 증류수에 침적하고 100°C에서 추출하여 동결 건조 분말로 만들었다. 우선 제주조릿대 잎 열수추출물의 버섯 티로시나제 억제활성을 분석한 결과, 미백소재로 사용되는 arbutin과는 달리 버섯 티로시나제 활성에 직접적인 영향을 나타내지는 않았다(Data not shown). 다음은 제주조릿대 잎 열수추출물이 세포내 티로시나제 활성과 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하였다. B16/F10 흑색종 세포를 6 well plate에 5×10^4 cells/mL 농도로 24시간 동안 배양한 후 50 nM α -MSH와 제주조릿대 잎 열수추출물(31, 63, 125, 250, 500 μ g/mL) 시료를 처리하였다. 세포배양

*Corresponding author

Tel : +82-64-754-2135, Fax : +82-64-726-3539

E-mail : sjkim@cheju.ac.kr

36시간이 지난 후 똑같은 조건으로 배지를 교환하여 총 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 세포를 수확하여 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)와 1% Triton-X 100을 함유한 67 mM 인산 나트륨 완충용액(pH 6.8) 500 μ L를 첨가하여 초음파 분쇄기로 세포를 분쇄하였다. 세포 분쇄액을 1시간 동안 얼음에 보관한 후 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 얻고, 이 상층액을 티로시나제 활성 분석에 사용하였다. 33 mM 인산 나트륨 완충용액(pH 6.8), 9 μ M L-tyrosine, 4 mM L-DOPA를 혼합한 후 상층액 100 μ L를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 2 시간 반응시켜 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. 제주조릿대 잎 열수추출물을 α -MSH와 동시에 처리한 실험군에서는 α -MSH만 처리한 대조군에 비해 세포내 티로시나제 활성(Fig. 1A)

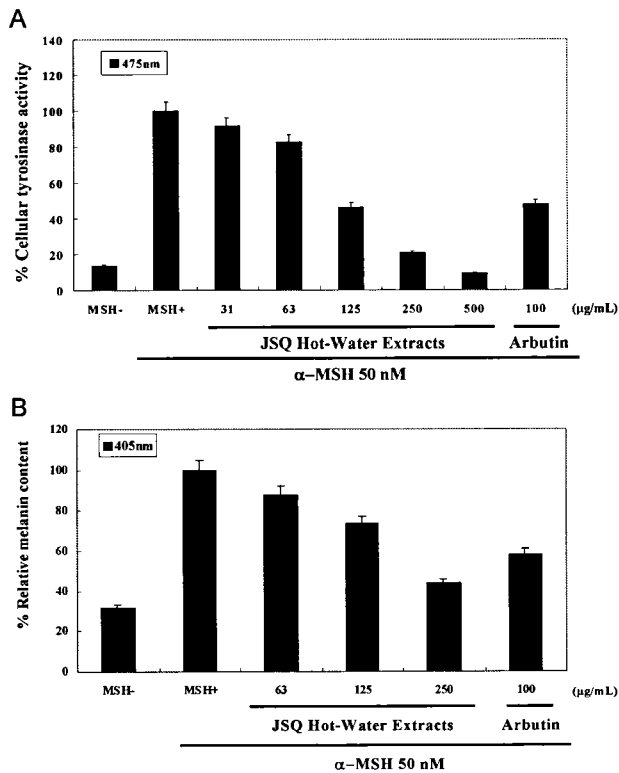


Fig. 1. Effects of hot-water extracts from *Sasa quelpaertensis* leaf (HWES) on tyrosinase activity (A) and melanin synthesis (B) in α -MSH stimulated B16/F10 mouse melanoma cells. Cells were treated with 50 nM α -MSH in presence or absence of HWES at the indicated concentrations for 72 h. Tyrosinase activity was measured by absorbance at 475 nm and melanin content was quantified by absorbance at 405 nm. The relative activity of the indicated concentrations of HWES was compensated by total protein contents. Data were expressed as mean \pm SD (SEM) of three independent experiments under the same conditions. Arbutin was used as a reference. MSH-: negative control without α -MSH; MSH+: positive control with 50 nM α -MSH.

과 멜라닌 생합성(Fig. 1B)이 농도 의존적으로 저해됨을 관찰할 수 있었다. 이는 제주조릿대 잎 열수추출물이 직접적으로 티로시나제의 활성을 저해하지 않고, α -MSH에 의해 유도된 멜라닌 생합성 신호전달 경로에 작용하고 있음을 말해주는 결과이다. 따라서 제주조릿대 잎 열수추출물에 의한 멜라닌 생합성 관련 단백질의 발현양상을 분석하였다. 제주조릿대 잎 열수추출물은 티로시나제와 Trp-1 (DHICA oxidase)의 발현과 α -MSH에 의해 유도되어지는 지속적인 ERK (extracellular signal-regulated kinase)의 활성화를 농도 의존적으로 저해하는 결과를 보여 주었다(Fig. 2).

피부 미백에 도움을 주는 소재로 활용되는 물질들은 멜라닌이 합성되기 전 단계, 합성 중, 혹은 합성 이후 단계에 각각 작용하여 멜라닌 생성을 저해한다. hydroquinone과 arbutin은 티로시나제 저해제이며, linoleic acid와 α -linolenic acid는 티로시나제를 분해하는 물질로 알려져 있다. 또한, 멜라노솜의 이동을 억제할 수 있는 물질, 피부박리를 촉진시키는 물질, 티로시나제의 글리코실화(glycosylation)를 저해하여 멜라노솜의 성숙을 억제하거나, 티로시나제의 전사(transcription)를 억제하는 물질들에 대한 다양한 연구들이 진행되고 있다[1,12]. 최근에는 부작용이 없는 식물추출물들을 대상으로 미백소재를 찾기 위한 연구들이 활기를 띠고 있다[15].

자외선 자극에 의해 피부 각질형성세포는 α -MSH를 분비하여 멜라닌 생성세포의 멜라닌 생합성을 촉진한다. 본 연구에서 제주조릿대 잎 열수추출물은 α -MSH에 의한 세포신호전달 경로 중 지속적인 ERK 활성화를 저해함으로써 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 저해하는 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 이는 제주조릿대 잎 열수추출물이 멜라닌 생

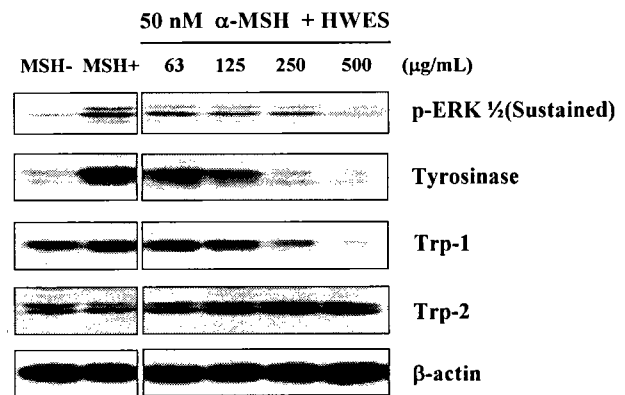


Fig. 2. Effects of hot-water extracts from *Sasa quelpaertensis* leaf (HWES) on p-ERK 1/2, tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 protein expression in α -MSH stimulated B16/F10 mouse melanoma cells. Cells were treated with 50 nM α -MSH in presence or absence of HWES at the indicated concentrations for 72 h. β -actin was served as a loading control. MSH-: negative control without α -MSH; MSH+: positive control with 50 nM α -MSH.

합성 신호전달 경로를 저해하는 기전을 가진 식물성 미백 소재로서 활용 가능성이 있음을 보여준다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지역산업공통기술연구개발사업비 (2005)의 지원으로 수행되었다.

참고 문헌

1. Briganti, S., E. Camera and M. Picardo. 2003. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* **16**, 101-110.
2. Cabanes, J., S. Chazarra and F. Garcia-Carmona. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 982-985.
3. del Marmol, V. and F. Beermann. 1996. Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.* **381**, 165-168.
4. Gilchrest, B. A., H. Y. Park, M. S. Eller and M. Yaar. 1996. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem. Photobiol.* **63**, 1-10.
5. Grabbe, J., P. Welker, E. Dippel and B. M. Czarnetzki. 1994. Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes. *Arch. Dermatol. Res.* **287**, 78-84.
6. Han, R., H. P. Baden, J. L. Brissette and L. Weiner. 2002. Redefining the skin's pigmentary system with a novel tyrosinase assay. *Pigment Cell Res.* **15**, 290-297.
7. Hill, H. Z., W. Li, P. Xin and D. L. Michell. 1997. Melanin: a two edged sword? *Pigment Cell Res.* **10**, 158-161.
8. Imokawa, G., T. Kobayashi, M. Miyagishi, K. Higashi and Y. Yada. 1997. The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment Cell Res.* **10**, 218-228.
9. Im, S., E. S. Lee, W. Kim, W. On, J. Kim, M. Lee and W. H. Kang. 2002. Donor specific response of estrogen and progesterone on cultured human melanocyte. *J. Korea Med. Sci.* **17**, 58-64.
10. Kobayashi, T., G. Imokawa, D. C. Bennett and V. J. Hearing. 1998. Tyrosinase stabilization by Tyrp1 (the brown locus protein). *J. Biol. Chem.* **273**, 31801-31805.
11. Korner, A. and J. Pawelek. 1982. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* **217**, 1163-1165.
12. Lee, Y. H., S. S. Park, S. W. Lee, S. H. Lee, K. H. Park, Y. J. Choi and S. W. Gal. 2006. Whitening effect of mycelial culture broth of *Paecilomyces japonica* in the mixture of cucumber and grape extracts. *J. Life Sci.* **16**, 870-875.
13. Manga, P., K. Sato, L. Ye, F. Beermann, M. L. Lamoreux and S. J. Orlow. 2000. Mutational analysis of the modulation of tyrosinase by tyrosinase-related protein 1 and 2 *in vitro*. *Pigment Cell Res.* **13**, 364-374.
14. Martinez-Liarte, J. H., F. Solano, J. C. Garcia-Borrón, J. R. Jara and J. A. Lozano. 1992. Alpha-MSH and other melanogenic activators mediate opposite effects on tyrosinase and dopachrome tautomerase in B16/F10 mouse melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **99**, 435-439.
15. Park, J. H., Y. G. Shin, S. K. Baek, U. K. Lee, H. Chung and Y. I. Park. 1998. Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs. *Yakhak Hoeji.* **41**, 518-523.
16. Romero-Graillet, C., E. Aberdam, M. Clement, J. P. Ortonne and R. Bailotti. 1997. Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated stimulates melanogenesis. *J. Clin. Invest.* **99**, 635-642.
17. Thody, A. J. and A. Graham. 1998. Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Res.* **11**, 265-274.
18. Tripathi, R. K., V. J. Hearing, K. Urabe, P. Aroca and R. A. Spritz. 1992. Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 23707-23712.
19. Tsukamoto, K., I. J. Jackson, K. Urabe, P. M. Montague and V. J. Hearing. 1992. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPA chrome tautomerase. *EMBO J.* **11**, 519-526.