

제주도 근해에 자생하는 참가죽그물바탕말 (*Dictyota coriacea*) 추출물의 멜라닌 억제 효과 및 항염증 효과

강민철 · 이주엽 · 고려경 · 김행범 · ¹홍승호 · †김기옥
(재)제주하이테크산업진흥원 생물자원산업화지원센터¹제주대학교 교육대학 과학교육과
(접수 : 2008. 4. 27., 게재승인 : 2008. 8. 5.)

Melanin Inhibitory Effect and Anti-inflammatory Effects of *Dictyota coriacea* Extracts Derived from Adjacent Sea of the Jeju Island

Min-Chul Kang, Ju-Yeop Lee, Ryeo Kyeoung Ko, Haeng-Bum Kim, Seung-Ho Hong¹, and Gi-Ok Kim[†]
Jeju Bio-Industry Development Center, Jeju Hi-Tech Industry Development Institute, Jeju 690-121, Korea
¹Department of Science Education, Teachers College, Cheju National University, Jeju 690-781, Korea

(Received : 2008. 4. 27., Accepted : 2008. 8. 5.)

We investigated several biological activities using the ethanol extract and its fractions from *Dictyota coriacea* to evaluate the usefulness of its extract as a functional biomaterial. The ethanol extract and n-hexane and ethylacetate fractions showed dependently inhibitory effect on tyrosinase activity and melanin content in B16F10 cells. The ethanol extract and its fractions showed inhibitory effect on Tyrosinase and TRP-1 gene transcription but didn't showed inhibitory effect on TRP-2 gene transcription. Also, the n-hexane and ethylacetate fractions dose-dependently inhibited the NO production in a RAW 264.7 cells. These results suggest that extract of *Dictyota coriacea* could be used as functional biomaterial in developing a skin whitening agent having the anti-inflammatory activity.

Key Words : *Dictyota coriacea*, tyrosinase activity, melanin content, anti-inflammatory activity

서 론

동양인들은 희고 고운 피부에 대한 열망이 과거에서부터 미의 상징으로 여겨져 동양권에서는 미백화장품에 대한 관심과 함께 그에 대한 연구가 집중되어 왔다. 인간의 피부색깔은 환경, 인종, 성별 등의 요인과 멜라닌, 카로틴 및 헤모글로빈 양과 같은 여러 가지 요인에 의해 결정되지만 피부의 과색소 침착과 관련된 주요한 원인은 표피 내 멜라닌색소의 이상적 증가에 기인한다. 과도한 melanin 합성은 인체에 기미, 주근깨, 피부반점을 형성하고 피부노화를 촉진하며 피부암 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다(1-2). 멜라닌 색소의 생합성은 tyrosinase 효소를 비롯하여 tyrosinase-related protein 1 (TRP1)과 dopachrome tautomerase (TRP2)에 의하여 조절되고 있으며, 그중 tyrosinase는 tyrosine을 기질로 하여 L-dopaquinone으로 전이되는 초기

생합성과정 이후 dihydroxyindole의 산화에 작용한다(3-5). 따라서 tyrosinase 활성 억제제를 찾는 연구가 미백제의 개발에 있어서 중요한 부분을 차지하고 있으며, 현재 계속 알려지고 있는 tyrosinase 저해제로 hydroquinone, 4-hydroxyanisole, ascorbic acid 유도체, kojic acid, azelaic acid, corticosteroid, retinoids, arbutin, catechin, 3,4,5-trimethoxy cinnamate thymol ester 등이 있으나, 이들의 안전성과 경제성 등에 문제가 많아 사용에 있어서 어려움이 있다(6-9). 한편 자외선에 의해 그 생성이 촉진되며 멜라닌합성을 활성화시키고 염증과 피부노화를 유도하는 물질 중에 하나인 nitric oxide (NO)는 작고 비교적 불안정하며 독성이 있는 무기 저분자 라디칼이다. NO를 생성하는 효소(NOS: nitric oxide synthase)에는 constitutive NOS (c-NOS)와 inducible NOS (iNOS)가 보고되어 있다. cNOS에 의한 NO생성은 생체 내 항상성 조절에 중요한 역할을 하지만(10), iNOS는 cNOS와는 달리 lipopolysaccharide (LPS), interferon- γ (IFN- γ), interleukin- 1β (IL- 1β) 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 자극에 의해 대식세포, 혈관평활근세포, 내피세포, 간세포와 심근세포 등에서 발현된다(11). 이들 조직에서 발현되는 iNOS는 장시간 동안 많은 양의 NO를 생성하게 되어 염증과 종양을

† Corresponding Author : Jeju Bio-Industry Development Center, Hi-Tech Industry Development Institute, Jeju 690-121, Korea
Tel : +82-64-720-2333, Fax : +82-64-720-2331
E-mail : Kimgk350@jejuhidi.or.kr

유발하며, 조직의 손상과 유전자 변이 및 신경 등의 손상을 초래한다(12-14). 따라서 최근에는 염증성 질환 등 다양한 질병을 예방 및 치료하기 위해 기능성 식품, 기능성 화장품 및 치료제 등 각 분야에서 인공물질이 아닌 천연물질을 이용한 연구가 활발히 진행되어지고 있다(15-17).

참가죽그물바탕말 (*Dictyota coriacea*)은 갈조식물의 그물바탕말과에 속하는 해조류로서 몸은 다소 부채모양으로 넓적하고 두꺼운 혁질이며, 길이는 40 cm 정도이고 겉가지 모양으로 갈라진다. 가지는 대상이며 너비는 15 mm 정도로 가장자리에 톱니가 없다. 살아 있을 때에는 때에는 암갈색이나 말리면 거의 검정색이 되고 끝부분만 황갈색이다. 이 해조류는 대개 조간대 부근에서 조하대에 걸쳐 바위에 붙어산다. 한국 (대진·영해·청하·구룡포·목도·추자도·제주도), 일본, 타이완 등지에 분포한다. 참가죽그물바탕말은 아토피 피부염 등의 알레르기성 피부질환 및 건성, 습진, 여드름을 포함한 염증성 피부질환에 효과가 있으며, 중성지방의 생합성에 관여하는 중요한 효소인 acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT)의 억제 활성을 가짐으로서 비만 조절에 유용하다고 보고 되어 있다(18).

본 연구는 제주도 근해에 자생하는 참가죽그물바탕말 (*Dictyota coriacea*)을 이용하여 에탄올 추출물 및 순차적 용매분획물을 얻어 B16F10 mouse melanoma 세포 및 RAW 264.7 세포에 처리하여 멜라닌 생합성 및 Tyrosinase 억제활성의 유전자 발현 조절 수준을 통한 미백 및 염증질환치료제의 유용자원으로서 활용가능성이 있는지 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료의 추출

본 연구에 사용된 식물 시료인 참가죽그물바탕말 (*Dictyota coriacea*)은 (재)제주하이테크 산업진흥원 추출물은행에서 분양 받아 사용하였다. 참가죽그물바탕말 건조 162.8 g을 흐르는 물에 세척 후 3일 동안 40°C 열풍건조 하여 분쇄기로 분쇄하고, 이 분쇄물을 70% 에탄올에 침적시키고 2~3일 동안 실온에서 교반하여 추출하였다. 얻어진 추출물을 여과 후 감압농축 하였으며, 침출·여과과정을 2~3회 더 반복한 다음 동결건조 과정을 거쳐 분말형태로 38.5 g의 에탄올 추출물을 수득하였다. 용매분획은 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물을 증류수 0.5 L에 현탁시킨 후에, 각각 헥산 (*n*-hexane, 0.5 L×2), 에틸아세테이트 (ethylacetate, 0.5 L×3), 부탄올 (*n*-butanol, 0.5 L×3), 물 (Water)의 극성이 낮은 용매부터 극성이 높은 용매 순으로 순차적으로 용매 분획하여 4개의 분획물을 얻었고, 각각의 분획물을 동결 건조하여 시료로 사용하였다(Fig. 1).

시료의 제조

분말로 된 헥산과 에틸아세테이트 분획물은 100% 에탄올로 녹였고, 부탄올과 물 분획물은 100% 에탄올과 1×Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.4)가 1 : 1로 혼합된 용매를 가하여 완전히 용해시킨 후 여과하여 사용하였다.

세포배양

본 연구에 사용된 B16F10 mouse melanoma 세포는 미국

세포주 은행 (ATCC)으로부터 분양받았다. B16F10 세포를 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco), 1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco), L-glutamine와 sodium bicarbonate 가 함유된 DMEM 배지 (Gibco)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 또한 RAW 264.7 세포는 murine macrophage cell line 으로 KCLB (Korean Cell Line Bank)로부터 분양받아 10% FBS와 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 포함된 DMEM 배지 (Gibco)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다.

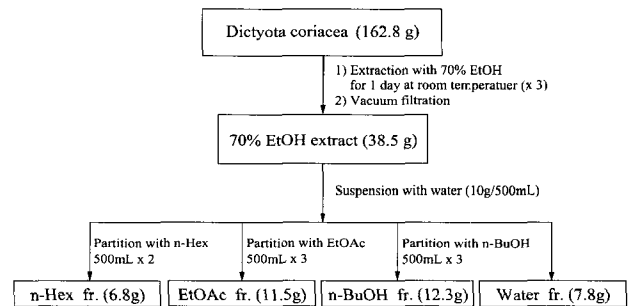


Figure 1. The fractionation using solvent partition from the ethanol extract of *Dictyota coriacea*.

MTT assay를 이용한 세포독성 측정

B16F10 세포를 24 well plate에 well당 2×10^4 개의 세포를 접종하고 24시간동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양한 후 시료를 각각의 well에 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml 그리고 100 µg/ml의 농도로 처리하여 72시간 배양하였다. 여기에 2 mg/ml의 농도로 제조한 MTT 용액 200 µl를 첨가하고 동일한 배양 조건으로 4시간을 배양하여 배지를 제거하고 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 각 well당 DMSO 200 µl를 가하여 ELISA reader (µQuant, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

멜라닌 생성 저해 활성 측정

24 well plate에 well당 2×10^4 개의 B16F10 세포를 접종하고 24시간동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양한 후 시료를 각각의 well에 12.5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml 그리고 100 µg/ml의 농도로 처리하여 3일간 시료 처리 후 배지를 제거하고 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 각 well당 500 µl의 1N NaOH를 가하고 56°C에서 30분 용해한 후 ELISA reader (µQuant, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tyrosinase 저해 활성 측정

B16F10 세포를 24 well plate에 위의 기술한 방법과 동일하게 처리한 후, well의 세포를 원심분리하여 세포 침전물을 만들고, lysis buffer (0.1 M sodimm phosphate buffer, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1% Triton X-100)를 가하였다. 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고 원심분리한 후 상층액을 취하여 효소활성측정에 사용하였다. 각 시료를 반응액에 (12.5 mM L-Dopa, 1.5 mM L-tyrosine, 67 mM sodium phosphate buffer (pH6.8))넣고 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후 ELISA reader (µQuant, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric oxide (NO) 측정

RAW 264.7 세포에서 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 생성된 NO의 양은 Griess reagent로 측정하였다. 48 well plate에 2×10^5 cell/ml의 RAW 264.7 세포를 접종하고 24시간 전 배양하였다. 그 후 배지를 제거하고, 시료가 함유된 배지를 처리하고 1시간 후 LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) 처리하였다. 전 배양과 동일 조건에서 24시간 동안 배양하여 $100 \mu\text{l}$ 의 배양액을 96 well plate에 넣고 동량의 Griess reagent [1% (W/V) sulfanilamide, 0.1% N-1-naphthylethylen diamine in 2.5% (V/V) H_3PO_4]를 첨가하고 10분간 실온에서 배양한 후 ELISA reader (μQuant , USA)를 이용하여 540 nm에서 정량하였다.

Western blotting을 이용한 단백질 분석

배양이 끝난 세포를 2~3회 PBS로 세척 후 $100 \mu\text{l}$ 의 lysis buffer를 첨가하고, 30분 동안 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 단백질 농도는 BSA (Bovine serum albumin)을 표준화하여 Protein Assay Kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 정량하였다. 30~50 μg 의 단백질을 10% mini gel Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)로 변성 분리하고, 이를 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, USA)에 15 V로 1시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (TBS (Tris-buffered saline)+0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간동안 실시 하였다. 반응이 끝난 뒤에 1차 항체 (1 : 500 - 1 : 2000)가 들어있는 5% skim milk에서 1시간 (25°C) 또는 24시간 (4°C)동안 반응시킨 후, TTBS로 3회 세척하고 2차 항체 (1 : 10000)와 상온에서 1시간 반응시킨 뒤에 TTBS로 5회 세척하여 enhanced chemiluminescence 방법으로 각 band의 영상을 얻었다.

RNA 분리 및 RT-PCR을 이용한 mRNA 발현 분석

배양이 끝난 세포를 2~3회 PBS로 세척 후 total RNA 추출은 TRIzol-reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 분리하였다. 세포에 TRIzol-reagent를 첨가하여 균질화한 후, 클로로포름을 첨가하여 원심분리 (12,000 rpm, 15min)하였다. 상등액에 동량의 이소프로판올을 첨가하여 원심분리 (12,000 rpm, 10 min)하여 RNA를 침전시키고 75%의 diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리된 에탄올로 세척한 후, 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에 녹였다. 260 nm의 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, A260/A280 nm의 비율이 1.6~1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다. cDNA 합성은 Improm- II^{TM} cDNA kit (Promega, USA)를 이용하였고, 1 μg 의 total RNA를 oligo (dT) primer, dNTP (0.5 μM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 Improm- II^{TM} reverse transcriptase (2 U)로 25°C 5분, 37°C 60분, 그리고 70°C 에서 10분간 heating 시킴으로써 반응을 중지시켰다. Polymerase chain reaction (PCR)은 합성된 cDNA로부터 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, β -actin를 증폭시키기 위하여 1 μl cDNA, 4 μM 의 5'과 3' primer, 10 \times buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 μM dNTP, 25 mM MgCl_2 , 1 unit Taq polymerase (Promega, USA)를 섞고 3차 증류수로 최종 25 μl 로 맞춘 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때 PCR 조건은 94°C /30초, $50\text{--}55^\circ\text{C}$ /45초, 72°C /45초 20~25회이며, PCR에 의하여

생성된 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다. RT-PCR에서 사용된 primer는 Table 1과 같다.

Table 1. The primer sequences of the genes used in RT-PCR analysis and the expected size of their PCR products

Gene	Primer sequences	Fragment size (bp)
Tyrosinase	Forward 5'-GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT-3'	477
	Reverse 5'-TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC-3'	
TRP-1	Forward 5'-GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC-3'	268
	Reverse 5'-AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT-3'	
TRP-2	Forward 5'-GGA TGA CCG TGA GCA ATG GCC-3'	380
	Reverse 5'-CGG TTG TGA CCA ATG GGT GGC-3'	
β -actin	Forward 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'	349
	Reverse 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'	

결과 및 고찰

세포 생존률에 미치는 영향

참가죽그물바탕말 (*Dictyota coriacea*) 에탄올 추출물 및 순차적 분획물이 B16F10 mouse melanoma 세포의 세포 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 그리고 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지 다양한 농도로 1일 처리하고 3일간 배양한 후에 MTT 방법으로 세포의 생존률을 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 대조군의 세포 생존률을 100%로 하였을 때, 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물 및 각각의 순차적 분획물 농도들 중 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 거의 88~103%로 대조군에 비해 약간 감소하거나 증가하였으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 에틸아세테이트 분획물만 20%로 억제되는 경향을 보였다. 이처럼 대조군에 비해 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도들은 약간의 차이가 있으나 유의할만한 변화를 나타내지 않았으며, 세포독성이 낮아야 하는 미백제로서의 기준에 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물 및 순차적 분획물이 부합하는 것으로 사료되어진다.

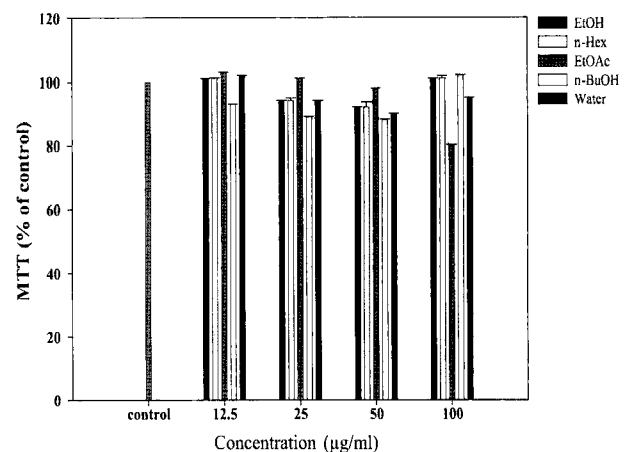


Figure 2. Cell viability rates of the ethanol extract and its fractions of *Dictyota coriacea* in B16F10 cells. The data represent the mean \pm SD of three determinations.

멜라닌 생성 저해 활성에 미치는 영향

위의 실험결과 세포독성이 없는 것으로 밝혀진 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물 및 순차적 분획물들을 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 그리고 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지 다양한 농도로 처리하여 3일 배양 한 후, 멜라닌 생성량을 측정하였다. 측정된 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 대조군으로서 미백제로 알려진 합성물질인 melasolv(9) 처리시 74%의 멜라닌 생성 억제활성을 보였으며, 각각 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 그리고 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 처리시 에탄올 추출물은 3%, 15%, 34%, 72%로 탁월한 억제활성을 보였다. 또한 각각의 순차적 분획물들 중 부탄올과 물 분획물을 제외한 헥산과 에틸아세테이트 분획물들의 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 85%, 76%로 대조군 보다 탁월한 멜라닌 억제 활성을 보였다. 따라서 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물 및 헥산과 에틸아세테이트 분획물들은 B16F10 세포에서 투여량이 처리 농도가 증가 함에 따라 멜라닌 생성이 억제되는 경향을 보였으며 통계학적으로 유의성이 있음을 보여주었다. 따라서 이러한 결과로 보면 멜라닌 생성을 줄이면서 세포독성은 낮아야 하는 천연식물 미백제로서의 기준에 참가죽그물바탕말의 에탄올 추출물 및 순차적 분획물이 부합하는 것으로 사료되어진다.

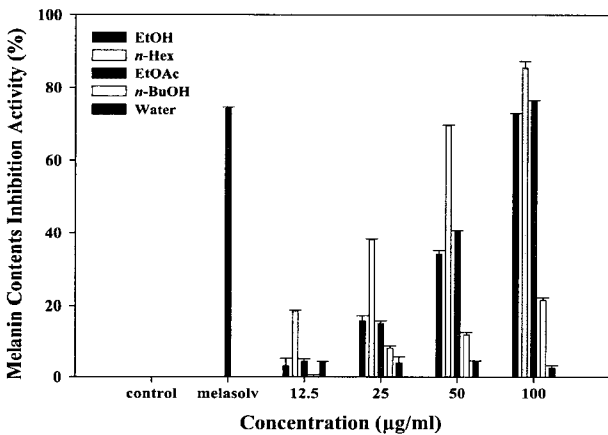


Figure 3. Melanin contents inhibitory activity of the ethanol extract and its fractions *Dictyota coriacea* in B16F10 cells. The data represent the mean \pm SD of three determinations.

세포내 tyrosinase 저해 활성에 미치는 영향

참가죽그물바탕말 에탄올 추출물 및 각각의 순차적 분획물들을 처리 후 최종 멜라닌양이 억제된 것은 멜라닌 합성에 관여하는 효소들의 활성과 관련이 있음을 나타내므로 B16F10 세포에서 tyrosinase 활성을 각각 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 그리고 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지 다양한 농도로 처리하여 3일 배양 한 결과, Fig. 4와 같이 대조군인 melasolv 처리시 20%의 tyrosinase 저해 활성을 보였으며, 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물 및 각각의 순차적 분획물들을 12.5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 그리고 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리시 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 52%, 82%, 36%, 24%의 억제활성을 보였다. 따라서 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물 및 각각의 순차적 분획물들은 B16F10 세포에서 처리농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성도가 탁월하게 억제되는 경향을 보였으며, 통계학적으로 유의성이 있음을 보여 주었다. 이러한 결과로 볼 때 B16F10 세포주에서의 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물 및 순차적 분획물들에 의한 멜라닌 생성 감소는 tyrosinase 저해 활성에 의한 것이 주요

한 원인중의 하나로 판단된다.

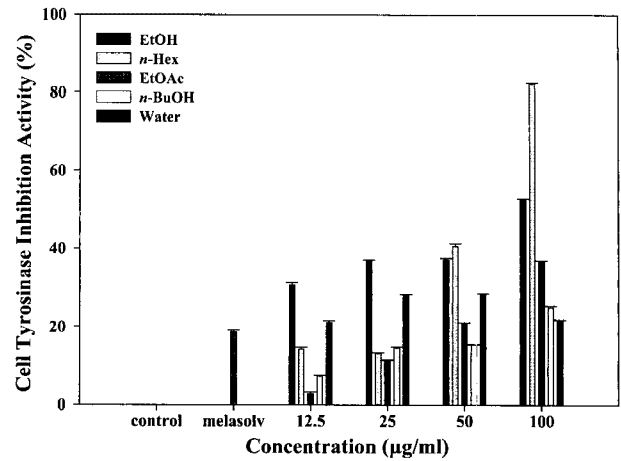


Figure 4. Cell tyrosinase inhibitory activity of the ethanol extract and its fractions of *Dictyota coriacea* in B16F10 cells. The data represent the mean \pm SD of three determinations.

Nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 NO 생성은 COX-2를 활성화하여 PGE₂와 같은 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다(19-20).

RAW 264.7 세포에서 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물과 그 분획물들의 NO 생성 억제 활성을 분석하여 IC₅₀ 값을 산출하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 100 ng/ml의 LPS와 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물과 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 NO 생성량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 같은 농도로 처리하였을 때 세포독성은 나타나지 않았다. 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물과 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물에서의 NO 생성 억제율에 대한 IC₅₀ 값은 각각 47.72 $\mu\text{g/ml}$, 40.37 $\mu\text{g/ml}$, 38.91 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 이러한 결과는 아토피 피부염 등의 알레르기성 피부질환에 효과가 있다고 보고 되어진 결과처럼 참가죽그물바탕말의 유효성분 추출을 통한 항염증 물질 연구개발에 있어서 중요한 기초 자료가 될 것이라 사료된다.

Table 2. The effects on LPS-induced NO production of the ethanol extract and its fractions of *Dictyota coriacea* in RAW 264.7 cells

<i>Dictyota coriacea</i>	IC ₅₀ ¹⁾ ($\mu\text{g/ml}$)
70% EtOH extract	47.72 \pm 0.5
n-Hex fraction	40.37 \pm 2.9
EtOAc fraction	38.91 \pm 0.8
n-BuOH fraction	>100
Water fraction	>100

¹⁾ IC₅₀ is the concentration producing 50% inhibition of NO production in RAW 264.7 cells.

멜라닌 생성에 관여하는 단백질 및 mRNA 발현 저해 활성

멜라닌 세포는 자외선에 의해 각질형성세포 등에서 생성된 NO가 cGMP 경로를 통하여 멜라닌 생성을 증가시키고, Tyrosinase와 TRP-1을 증가시키고 Tyrosinase 활성의 mRNA 발현을 유도하는 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다(21-23).

B16F10 mouse melanoma 세포에서 독성을 보이지 않는 농도에서 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물과 헥산, 에틸아세테이트 분획물의 멜라닌 억제 효과가 단백질 발현 억제에 의한 것인지 확인하기 위하여 western blotting을 실시하였다. 멜라닌 생성에 주요한 효소로 알려진 Tyrosinase 외의 TRP-1, TRP-2 단백질의 발현 억제양상을 확인하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물과 헥산, 에틸아세테이트 분획물이 TRP-1 단백질의 발현양이 농도 의존적인 감소를 보였다. 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물의 분획물 중에서는 헥산 분획물이 가장 높은 억제 경향을 보였다. 또한 위의 단백질 발현 억제가 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 유전자 mRNA의 감소에 의한 것임을 확인하기 위해 RT-PCR을 실시한 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 tyrosinase, TRP-1 mRNA의 발현양이 농도 의존적으로 감소함을 보였다. 보통 멜라닌 합성 과정에서 TRP-2는 dopachrome을 carboxylated derivative인 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 전환시키는 기능을 한다고 보고 되어 있지만(24), TRP-2 단백질과 mRNA 유전자의 발현을 확인한 결과, TRP-2 단백질과 mRNA 발현이 농도에 관계없이 일정하였다. 따라서 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물과 헥산, 에틸아세테이트 분획물은 TRP-2와 상관없이 tyrosinase와 TRP-1의 mRNA 발현을 감소시킴으로서 멜라닌 합성을 저해하는 것으로 사료되어 진다. 이상의 결과로 해조류인 참가죽그물바탕말이 B16F10 흑중세포에 대하여 뛰어난 멜라닌 색소 생성 억제 및 tyrosinase 억제 효과를 가지고 있는 것으로 사료되어지며 항염증 활성을 가지는 미백 관련 기능성 소재로서의 활용가치가 있음을 보여준다.

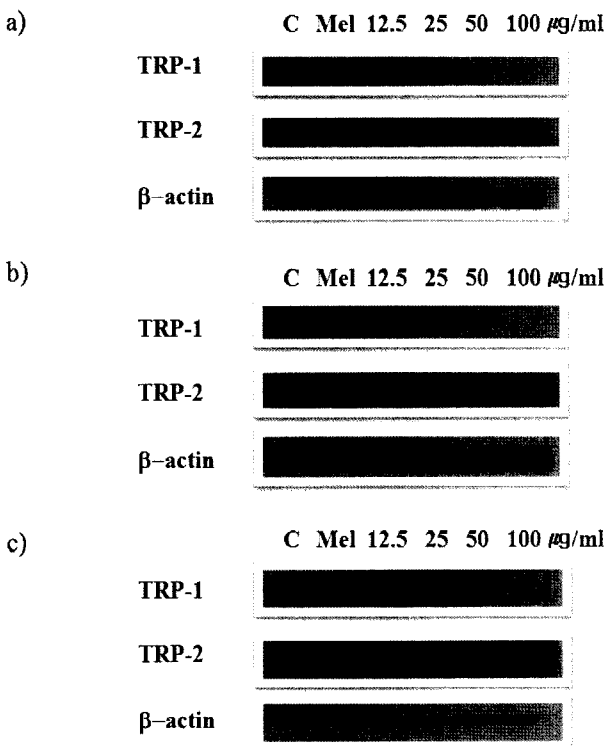


Figure 5. Effects of *Dictyota coriacea* on the TRP-1, TRP-2 protein expression in B16F10 cells. B16F10 cells were cultured for 72hrs inducing melanogenesis with α -MSH. When it passed for 24hrs, media were exchanged and (a) EtOH extract and (b) n-Hex and (c) EtOAc fractions were retreated.

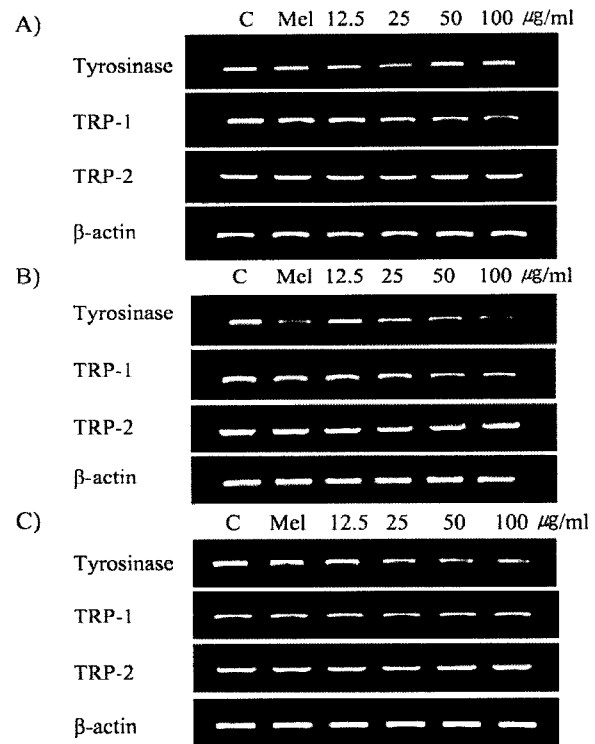


Figure 6. Effects of *Dictyota coriacea* on the tyrosinase and TRP-1, TRP-2 mRNA expression in B16F10 cells. B16F10 cells were cultured for 72 hrs inducing melanogenesis with α -MSH. When it passed for 24 hrs, media were exchanged and (a) EtOH extract and (b) n-Hex and (c) EtOAc fractions were retreated. Total RNA was subjected to RT-PCR.

요약

본 연구는 제주도 근해에 자생하는 참가죽그물바탕말 (*Dictyota coriacea*)의 에탄올 추출물 및 순차적 용매분획물을 얻어 B16F10 mouse melanoma 세포 및 RAW 264.7 세포에 처리하여 멜라닌 생합성 및 tyrosinase 억제활성, NO 억제활성을 통하여 유용자원으로서 미백 및 기능성 화장품료 산업적 활용 가능성이 있는지 알아보려고 연구를 시행하였다. 실험한 결과 B16F10 세포에서 참가죽그물바탕말 에탄올 추출물과 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물이 tyrosinase와 멜라닌 합성을 농도 의존적으로 떨어지게 억제하였으며, 단백질 및 mRNA 발현양이 tyrosinase와 TRP-1 유전자에서 농도 의존적으로 감소함을 보였다. 하지만 TRP-2 단백질과 mRNA 유전자의 발현을 확인한 결과, TRP-2 단백질과 mRNA 발현이 농도에 관계없이 일정하였다. 또한 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에서 참가죽그물바탕말의 에탄올 추출물과 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 NO 생성 억제 활성을 보였다. 따라서 본 연구 결과는 참가죽그물바탕말 추출물이 항염증 활성을 가지는 미백 관련 기능성 소재로서의 활용가치가 있음을 보여준다.

REFERENCES

1. Chen, J. S., C. Wei, and M. R. Marshall (1991), Inhibition mechanism of Koji acid on polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1897-1901.

2. Urabe, K., P. Aroca, K. Tsukamoto, D. Mascagna, A. Paulumbo, G. Prota, and V. J. Hearing (1994), The inherent cytotoxicity of melanin precursors, *Biochim. Biophys. Acta.* **1221**, 272-278.
3. Aroca, P., K. Urabe, K. Kobayashi, K. Taskamoto, and V. J. Hearing (1993), Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation, *J. Biol. Chem.* **268**, 25650-25655.
4. Iozumi, K., G. E. Hoganson, R. Pemella, M. A. Everett, and B. B. Fuller (1993), Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes, *J. Invest. Dermatol.* **100**, 806-811.
5. Jimenez-Cervantes, C., F. Solano, T. Kobayashi, K. Urabe, V. J. Hearing, J. Lozano, and C. Garcia-Borron (1994), A new enzymatic function in the melanogenic pathway, *J. Biol. Chem.* **269**, 17993-18001.
6. Tomita, K., N. Oda, M. Kamel, T. MiyaKi, and T. Oki (1990), A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*, *J. Antibiotics.* **12**, 1601-1605.
7. Cabanes, J., S. Chazara, and C. F. Garcia (1994), Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 982-985.
8. Jung, S. W., N. K. Lee, S. J. Kim, and D. Han (1995), Screening of tyrosinase inhibitor from plants, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**, 891-896.
9. Hwang, J. S., H. J. Shin, H. S. Noh, H. J. Choi, S. M. Ahn, D. S. Park, D. H. Kim, B. G. Lee, I. S. Chang, and H. H. Kang (2002), The inhibitory effects of 3,4,5-Trimethoxy cinnamate thymol ester (TCTE, Melasolv[®]) on Melanogenesis, *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.* **28**(1), 135-149.
10. Kawamata, H., H. Ochiai, N. Mantani, and K. Terasawa (2000), Enhanced Expression of Inducible Nitric oxide Synthase by Junen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage cell line, *Am. J. Chin. Med.* **28**, 217-226.
11. Lee, B. G., S. H. Kim, O. P. Zee, K. R. Lee, K. Y. Lee, and H. W. Lee (2000), Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*, *Eur J Pharmacol.* **406**, 301-309.
12. Nathan, C. (1992), Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB J.* **6**, 3051-3064.
13. Stuehr, H. J., N. S. Kwon, M. Weise, and C. Nathan (1991), Purification of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase : and FAD- and FMN-containing flavoprotein, *Proc. Natl. Aca. Sci U.S.A.* **88**, 7773-7777.
14. Weisz, A., L. Cicatiello, and H. Esumi (1996), Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma Bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine, *Biochem. J.* **316**, 209-215.
15. Kim, S. J., M. Y. Heo, K. H. Son, and Kim Hp (2003), Tyrosinase inhibitory activity of 80 plant extracts (II), *J. Appl. Pharmacol.* **11**, 5-7.
16. Suk, K. D., S. J. Lee, and J. M. Bae (2004), Inhibitory Effects of *Cuscuta japonica* Extract and *C. australis* Extract on Mushroom tyrosinase Activity, *Kor. J. Pharmacogn.* **35**(4), 380-383.
17. Lee, H. B., S. Bai, and J. E. Chin (2005), Inhibitory Effect of *Lithospermum erythrorhizon* Extracts on Melanin Biosynthesis, *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **34**(9), 1325-1329.
18. Kim, J. Y. (2006), Studies on the bioactive compounds isolated from *Pachydictyon coriaceum* and *Polygonum cuspidatum*, M. S. Thesis, Dept. of Applied Chemistry, Hanbat National University, Daejeon.
19. Lee, H. J., Y. S. Jeong, S. Y. Ryu, and J. H. Ryu (1998), Inhibition of nitric oxide synthesis by 8-epi-xanthatin in activated RAW 264.7 cells, *Yakhak Hoeji.* **42**(5), 540-543.
20. Bennett, A., M. T. Del, I. F. Stamford, and T. Zebro (1977), Prostaglandins from tumors of human large bowel, *Br. J. Surg.* **35**, 882-884.
21. Romero-Graillet, C., E. Aberdam, N. Biagoli, W. Massabni, J. P. Ortonne, and R. Ballotti (1996), Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes, *J. Biol. Chem.* **271**(45), 28052-28056.
22. Romero-Graillet, C., E. Aberdam, M. Clement, J. P. Ortonne, and R. Ballotti (1997), Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis, *J. Clin. Invest.* **99**(4), 635-642.
23. Sasaki, M., T. Horikoshi, H. Uchiwa, and Y. Miyachi (2000), Up-regulation of tyrosinase gene by nitric oxide in human melanocytes, *Pigment. Cell. Res.* **13**(4), 248-52.
24. Solano, F., P. Aroca, C. Salinas, J. C. Gracia-Borron, and J. A. Lozano (1992), Regulation of final phase of melanogenesis, *Eur. J. Biochem.* **208**, 155-163.