

## B16 Melanoma 세포에서 돌나물 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과

심관섭<sup>#</sup> · 김진화 · 이범천\* · 이동환 · 이근수 · 표형배

한불화장품(주) 기술연구소, \*Dalhousie University

(Received December 3, 2007; Revised June 8, 2008)

### Inhibitory Effects on Melanin Production in B16 Melanoma Cells of *Sedum sarmentosum*

Gwan Sub Sim<sup>#</sup>, Jin Hwa Kim, Bum Chun Lee\*, Dong Hwan Lee, Geun Soo Lee and Hyeong Bae Pyo

R&D Center, Hanbul Cosmetics Co. Ltd., 72-7, Yongsung-ri, Samsung-myun, Umsung-kun, Chungbuk 369-834, Korea

\*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Tupper Medical Building,  
Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia B3H 1X5, Canada

**Abstract** — To develop effective skin whitening agents, we tested natural herbal extracts for their melanogenic inhibitory activities. *Sedum sarmentosum* was selected for its inhibitory effect on melanogenesis in B16 melanoma cells. Ethanolic extract of *S. sarmentosum* (SSE) was evaluated for antioxidative effect and tyrosinase inhibitory activity of melanogenesis. We investigated the changes in protein level and mRNA level of tyrosinase, tyrosinase related protein (TRP)-1 and TRP-2 by using western blotting and RT-PCR, respectively. SSE showed scavenging activities of free radicals and reactive oxygen species (ROS) with the IC<sub>50</sub> of 342.7 µg/ml against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and 64.69 µg/ml against superoxide radicals in the xanthine/xanthine oxidase system, respectively. SSE treatment suppressed the biosynthesis of melanin up to 46% and reduced tyrosinase activity up to 51% at 100 µg/ml in B16 melanoma cells. The tyrosinase activity and tyrosinase expression in B16 melanoma cells were reduced in a dose-dependent manner by SSE. Also, SSE was able to significantly inhibit tyrosinase and TRP-1 expression in mRNA level. These results suggest that SSE inhibited melanin production which may be dependent on tyrosinase activity and expression in B16 melanoma cells, and an effective whitening agent for the skin.

**Keywords** □ *Sedum sarmentosum*, B16 melanoma, melanin, tyrosinase, tyrosinase related protein

피부의 색은 주로 피부 속에 존재하는 멜라닌(melanin)이라는 색소의 함량에 의해 결정된다. 이러한 멜라닌은 피부의 기저층에 존재하는 멜라닌 생성세포(melanocytes)에 의해서 생합성되고 세포질 돌기를 통하여 표피의 기저층에서 각질층으로 각질형성세포(keratinocytes)의 각화과정에 의해서 이동하게 된다.<sup>1)</sup> 표피에 존재하는 멜라닌은 태양광선으로부터 들어오는 자외선을 차단하는 색소로서 멜라닌이 국소적으로 과도하게 합성되거나, 노화 등에 의해 피부의 생리기능이 떨어지게 되면 멜라닌이 피부 표면에 침착되어 기미, 주근깨 및 다양한 색소 침착을 유발하게 되는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 피부에서 멜라닌 생합성은 멜라닌 생성세포에서 cascade 효소 반응에 의해 생성된다. 멜라닌은 멜라닌 생성세포의 멜라노솜(melanosome)에서 합성되며, 멜라노솜에

는 정상적인 멜라닌을 합성하는데 필요한 특이적인 효소들을 함유하고 있다. 이 효소들 중 가장 잘 알려진 것으로 tyrosinase, TRP-1과 dopachrome tautomerase(DCT) 등이 있다.<sup>3,4)</sup> 이들 중 tyrosinase는 melanogenesis의 속도결정단계인 초기 반응에 작용하는 효소로서, tyrosine을 3,4-dihydroxyphenylalanin(DOPA)로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPA quinone으로 산화하는 DOPA oxidase 활성을 모두 가지고 있다. TRP-1은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid(DHICA)를 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화하는 효소이다. DCT는 초기에 TRP-2로 불려졌던 효소로서 dopachrome을 DHICA로 이성화하는 효소이다. 멜라닌은 흑, 갈색의 eumelanin과 적, 노랑색의 pheomelanin이 있다. 특히 tyrosinase는 이들 두 가지 타입의 melanin합성에 필요하며, TRP-1과 DCT는 eumelanin의 합성에 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>5)</sup> 지금까지 알려져 있는 미백물질들은 작용 기전에 따라 자외선 흡수제나 산란제, 알부틴(arbutin), 코직산(kojic acid) 등과 같은 tyrosinase 활성 저

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로

(전화) 043-879-2283 (팩스) 043-881-2128

(E-mail) gwansub@empal.com

해제, 활성 산소종을 소거하는 아스코르빈산(ascorbic acid) 및 유도체, coenzyme Q10, 토코페롤 등으로 분류할 수 있다. 또한 상백피, 당귀, 고삼, 감초, 백작약, 유기노, 삼릉 등의 다양한 식물 추출물이 미백효과가 있는 것으로 나타나고 있다.<sup>6,7)</sup>

돌나물(*Sedum sarmentosum* Bunge)은 돌나물과에 속하는 다년생 초로써 전국 산야지에 분포하고 식용, 약용, 관상용으로 쓰이며, 불갑초(佛甲草), 수분초(垂盆草)라고도 불리운다. 돌나물의 함유성분으로는 sedoheptulose, sucrose, fructose 등의 당질과 특히 비타민 C, 철분 및 칼슘 등을 풍부하게 함유하고 있다. 이러한 돌나물의 생리활성 연구로는 terpenoids에 의한 간보호 효과,<sup>8)</sup> 돌나물에서 분리한 flavonoids인 quercetin, isorhamnetin과 kaempferol 등의 배당체들에 의한 angiotensin converting enzyme 저해효과,<sup>9)</sup> 돌나물 추출물이 각질형성세포에서의 hyaluronan 생성 촉진 작용이 있다는 것이 보고 되었다.<sup>10)</sup>

본 연구에서는 천연물로부터의 미백제를 개발하기 위하여 수종의 천연물을 검색하였으며 돌나물의 멜라닌 생성 저해 효과를 발견하고 돌나물 추출물의 활성산소 소거활성 및 B16 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌생성 저해 효과를 연구하였다.

## 실험재료 및 방법

### 시료의 추출

본 실험에서 사용한 돌나물(*Sedum sarmentosum* Bunge)은 국내 약초(경동)시장에서 구입하였다. 그늘진 곳에서 건조한 돌나물 100g을 분쇄하여 70% EtOH 1로 환류하면서 3시간씩 2회 반복 추출하였다. 이를 감압 농축, 동결 건조하여 그 분말을 실험에 사용하였다.

### 세포 및 시약

B16F10은 쥐의 melanoma 세포주로 서울대학교 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 구입한 세포는 5% fetal bovine serum(Bio Whittaker, MD, USA), 1% penicillin-streptomycin(Gibco BRL, MD, USA)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에 100 nM  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone (MSH, Sigma, USA)를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2,  $\beta$ -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology(CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### DPPH radical 소거 효과

항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Aldrich, USA)를 이용하여 시료의 라디칼 소거효과를 측정하는 Blois법<sup>11)</sup>을 활용하였다. 0.1 mM DPPH methanol 용액에 동일량의 시료를 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후, 실온에 10분 동안 반응하였다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Superoxide radical 소거 효과

Xanthine/xanthine oxidase 반응에서 형성된 superoxide radical 소거효과는 nitroblue tetrazolium(NBT) 방법에 의해 측정하였다.<sup>12)</sup> 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer(pH 10.2)에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM NBT와 시료를 가한 후 25°C에서 10분간 반응하였다. 이 반응액에 0.25 U/ml xanthine oxidase를 가하고 25°C에서 25분 동안 반응 후 superoxide radical 소거효과를 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 세포 생존율 측정

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 정량은 Mosmann<sup>13)</sup>의 방법을 변형하여 실시하였다. B16 melanoma 세포를 1×10<sup>5</sup> cells/well 농도로 24 well plate에 분주한 세포에 시료를 처리하고 48시간 동안 배양하였다. MTT 용액(5  $\mu$ g/ml)을 첨가하고 3시간 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 100  $\mu$ l acid-isopropanol(0.04 N HCl in isopropanol)을 첨가한 후 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 멜라닌 정량

멜라닌 정량은 Hosoi<sup>14)</sup> 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 6 well plate에 3×10<sup>5</sup> cells/well로 세포를 분주하였고, 시료를 처리하고 48시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 세포를 수집하여 세포수를 측정하고, 1200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 침전한 후, 1 ml homogenization buffer(50 mM Sodium phosphate pH 6.5, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF)로 용해시켰다. 여기서 얻은 pellet에 1 N NaOH(10% DMSO) 200  $\mu$ l를 첨가하고 vortex 후 405 nm에서 O.D.<sub>405</sub> 값을 측정하였다. 멜라닌 표준품(Sigma, USA)으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 멜라닌 양을 산출하였다. 멜라닌은 단위세포(10<sup>4</sup> cells)에서의 멜라닌 생성량을 비교하였다.

### 세포내 tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성 측정법은 Pawelk과 Pomerantz<sup>15,16)</sup> 방법을 사용하였다. 6 well plate에 5×10<sup>5</sup> cells/well로 세포를 분주하고 하루 동안 배양한 후 시료를 처리하였다. 24시간 후, 세포를 수집하여 용해시킨 후 0.2% L-DOPA가 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8)를 넣고 37°C에서 2시간 동안 배양하고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Western blot analysis

시료를 48시간 처리한 B16 melanoma 세포를 RIPA buffer (10 mM sodium fluoride, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1 mM DTT, 500  $\mu$ M sodium orthovanadate, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF)로 용해하고 원심 분리하였다. 여기서

연은 상층액을 12% SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 이를 nitrocellulose membrane으로 이전시켰다. 이를 3% skim milk 가 함유된 tris-buffer에서 tyrosinase(sc-7833), TRP-1(sc-10443), TRP-2(sc-10452),  $\beta$ -actin(sc-1616) 항체와 각각 반응시킨 후, alkaline phosphatase가 결합된 항체를 가한 후, 5-bromo-4-chloro-3-indoly-1-phosphate/nitro blue tetrazolium(BCIP/NBT) 을 가하여 발색시켰다. Western blot 결과는 Calibrated densitometer GS-800(Biorad, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

**RNA 분리 및 RT-PCR**

Total RNA 추출은 RNeasy mini kit(Qiagen, MD, USA)을 이용하였다. cDNA 합성은 1  $\mu$ g의 total RNA를 oligo(dT)15 primer, dNTP(0.5  $\mu$ M), 1 unit RNase inhibitor 그리고 4 unit Omniscript reverse transcriptase(Qiagen, Hilden, Germany)로 37°C에서 60분, 93°C에서 5분 heating 시킴으로써 반응을 중지시켰다. Polymerase chain reaction(PCR)은 cDNA로부터 tyrosinase, TRP-1, TRP-2,  $\beta$ -actin을 증폭하기 위하여 cDNA, 0.5  $\mu$ M의 5' 과 3'primer, 10 $\times$ buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 200  $\mu$ M dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 unit Taq polymerase(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR 증폭은 94°C 0.5분, 50~55°C 0.5분, 72°C 1분, 20~29 cycles로 반응시켰다. PCR에 의하여 생성된 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 와  $\beta$ -actin 유전자의 발현을 image analyzer(BIS303PC, DNR Imaging Systems Ltd, UK)로 확인 하였으며, 각 band의 density는 densitometric program(NIH Image software, MD, USA)을 이용하였다. Tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 oligonucleotide 서열은 tyrosinase: sense; 5'-GAGAAGCGAGTCTTGATTAG-3', antisense; 5'-TGGTGCTTCATGGGCAAAATC-3', TRP-1: sense; 5'-GCTG-CAGGAGCCTTCTTTCTC-3', antisense; 5'-AAGACGCTGCAC-TGCTGGTCT-3', TRP-2: sense; 5'-CCTGTCTCTCCAGAAGTT-TG-3', antisense; 5'-CGTCTGTAAAGAGTGGAGG-3'이며,  $\beta$ -actin의 oligonucleotide 서열은 sense; 5'-ATGAGAAGGAGATC-ACTGC-3', antisense; 5'-CTGCGCAAGTTAGGTTTTGT-3'이다.

**자료분석 및 통계처리**

모든 실험결과는 평균  $\pm$ 표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 하였으며 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

**실험결과 및 고찰**

**돌나물 추출물의 항산화 효과**

DPPH는 free radical의 안정된 모델로 반응 중 DPPH의 감소

**Table I** – Anti-oxidant activity of SSE in DPPH and NBT assay

Treatments	Concentrations ( $\mu$ g/ml)	DPPH radical scavenging activity (%)	Superoxide radical scavenging activity (%)
SSE	50	18.95 $\pm$ 1.98	39.74 $\pm$ 2.01
	100	31.79 $\pm$ 3.17	63.28 $\pm$ 2.11
	500	64.12 $\pm$ 2.32	89.19 $\pm$ 3.56
BHA	100	75.27 $\pm$ 1.69	51.38 $\pm$ 2.43

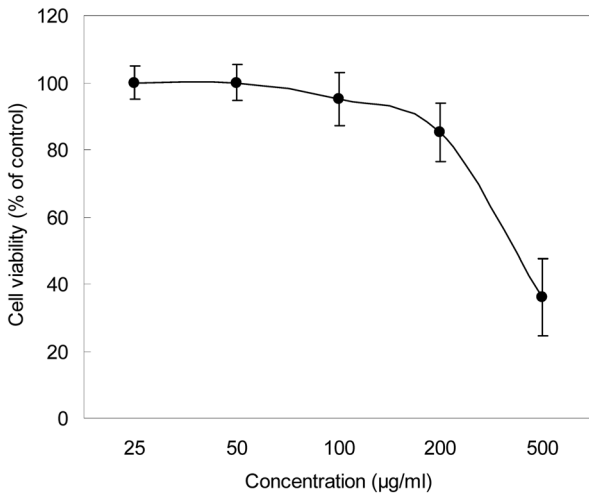
The results were expressed as the average of triplicate samples with S.D.

는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제 정도를 예측 할 수 있다. 유해산소라 불려지는 활성산소는 세포 생체막의 구성성분인 불포화지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화지질을 축적함으로 인해 생체기능이 저하되고 동시에 색소침착, 노화 및 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>17)</sup> 돌나물 추출물의 항산화 작용이 있는 지를 확인하기 위하여 DPPH를 이용한 유리 라디칼 소거 반응을 관찰하였다. 돌나물 추출물을 50, 100, 500  $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 경우 각 DPPH radical 소거능은 18.95%, 31.79%, 64.12% 소거효과를 나타내었다. 양성 대조군으로는 항산화 효과가 알려진 3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole(BHA)을 이용하여 돌나물 추출물의 항산화 효과를 비교하였다. 그 결과 BHA는 100  $\mu$ g/ml에서 75.27%의 DPPH radical을 소거하였으며, 돌나물 추출물은 투여 농도 의존적으로 DPPH radical 소거작용을 나타내었다 (Table I).

Xanthine/xanthine oxidase의 효소에 의한 superoxide 음이온 저해작용은 superoxide 음이온 소거작용과 xanthine oxidase 효소 저해에 의해 나타난다. Xanthine oxidase에 의해 형성되는 superoxide anion의 생성저해의 결과는 Table I에 나타내었다. 양성 대조군으로 BHA를 이용하여 돌나물 추출물의 superoxide radical 소거효과를 비교하였다. 그 결과 돌나물 추출물은 투여 농도 의존적으로 superoxide radical 소거작용을 나타내 50, 100, 500  $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 경우 각 superoxide radical 소거능은 39.74%, 63.28%, 89.19%로 우수한 superoxide radical 소거효과를 나타내었다. 양성 대조군인 BHA는 100  $\mu$ g/ml에서 51.38%의 superoxide radical을 소거하였다.

**돌나물 추출물의 세포 독성**

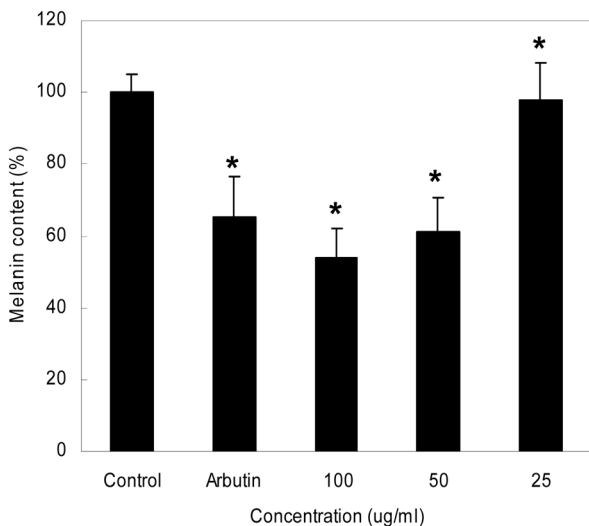
돌나물 추출물이 세포 독성에 미치는 농도를 조사하여 미백 실험에 사용될 농도 범위결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다. B16 melanoma 세포에 대한 돌나물 추출물의 세포독성을 측정 한 결과, 돌나물 추출물은 100  $\mu$ g/ml 이하의 농도로 처리 시 세포생존율이 90% 이상으로 나타났으며, 그 이상의 농도에서는 생존율이 저하되었다(Fig. 1). IC<sub>50</sub> 값은 413  $\mu$ g/ml로 나타났다.



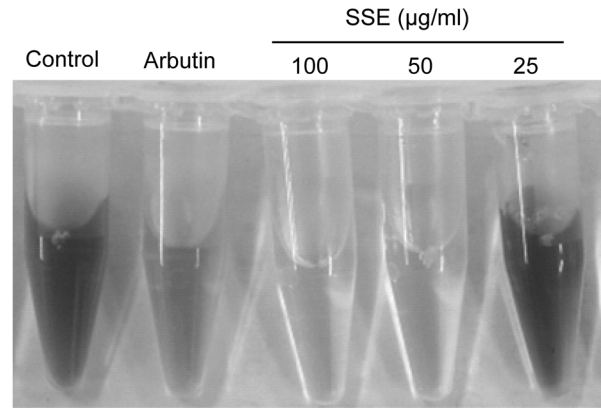
**Fig. 1** – Relative cell viability of SSE on B16 melanoma cells by MTT assay. The cells were treated with various concentration of SSE for 48 h. The cell viability was measured by the MTT method. Data are normalized by taking 100% as viability of non-treated cells. Results are means±S.D. from 3 separated experiments.

**Melanin 생성 저해 효과**

돌나물 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 B16 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 생성 저해 효과를 측정하였다. 준비된 세포에 돌나물 추출물을 농도별로 처리하고 48 시간 동안 배양하였다. 세포수를 수집하여 멜라닌 양을 측정 한 결과, 돌나물 추출물 처리군 모두가 농도에 비례하여 멜라닌 합성이 저해되었으며 100 µg/ml 농도에서 약 46% 멜라닌 생성저

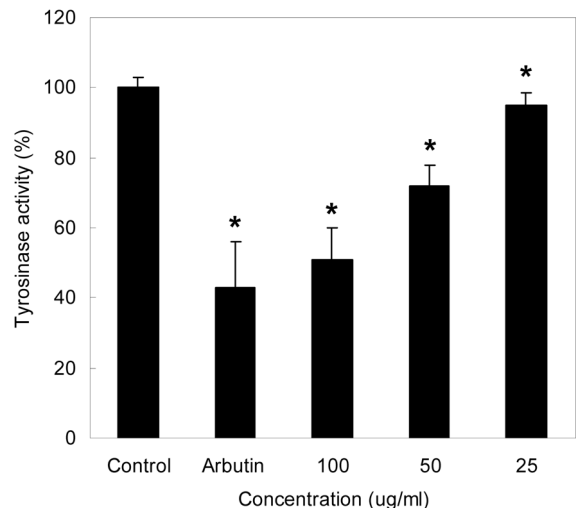


**Fig. 2** – Effect of SSE on tyrosinase activity in B16 melanoma cells. The cells were incubated with SSE for 24 h. Results are means±S.D. from 3 separate experiments. \**p*<0.05 compared with control. Arbutin (100 µg/ml).



**Fig. 3** – Effect of SSE on melanin production in B16 melanoma cells. The cells were incubated with SSE for 48 h. Melanin content is quantified by absorption at 405 nm calibrated with synthetic melanin as standard SSE decreased the intracellular melanin contents at treated concentration. Results are means±S.D. from 3 separate experiments. Arbutin (100 µg/ml).

해 효과가 있었다(Fig. 2). 양성대조군으로 사용한 알부틴은 100 µg/ml에서 약 35% 멜라닌 감소 효과를 나타냈다. 또한 멜라닌 합성 억제효과를 육안으로 관찰하기 위하여 각 시료당 1×10<sup>6</sup> 개의 세포를 수집하여 관찰하였다. 대조군으로서 멜라닌 생성을 촉진시키는 호르몬인 α-MSH를 처리한 세포군에서는 멜라닌이 상당히 증가되었음을 확인하였다. 돌나물 추출물 처리군은 대조군보다 멜라닌 색소가 감소하였고, 특히 100 µg/ml 농도에서 현저히 감소 하였다(Fig. 3).



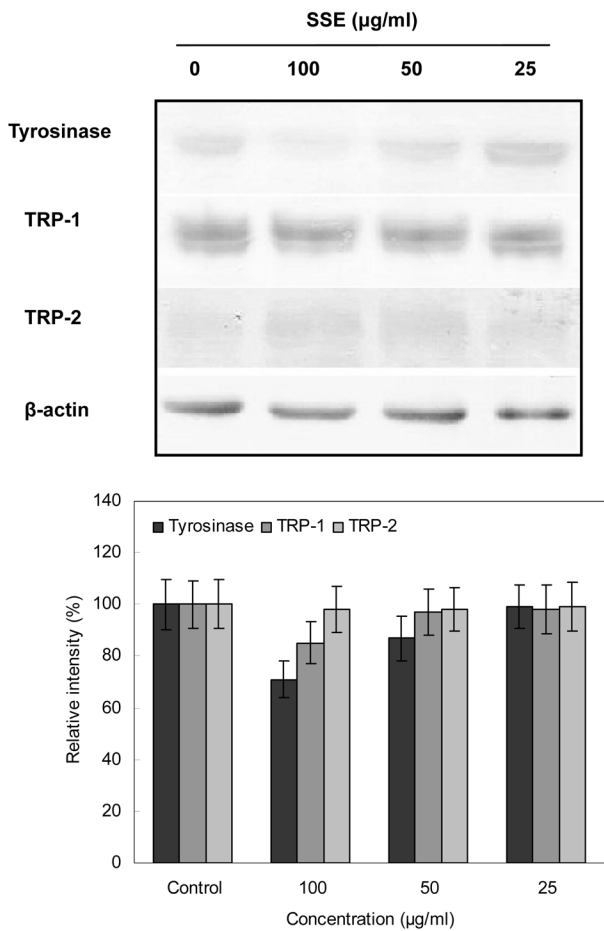
**Fig. 4** – Inhibitory effect of SSE on melanin accumulation in cultured B16 melanoma cells. Cells were cultured for 48 h in medium containing 100, 50, 25 µg/ml of SSE. Picture of cellular melanin solubilized with 2 M NaOH. Arbutin (100 µg/ml).

**세포내 tyrosinase 저해 효과**

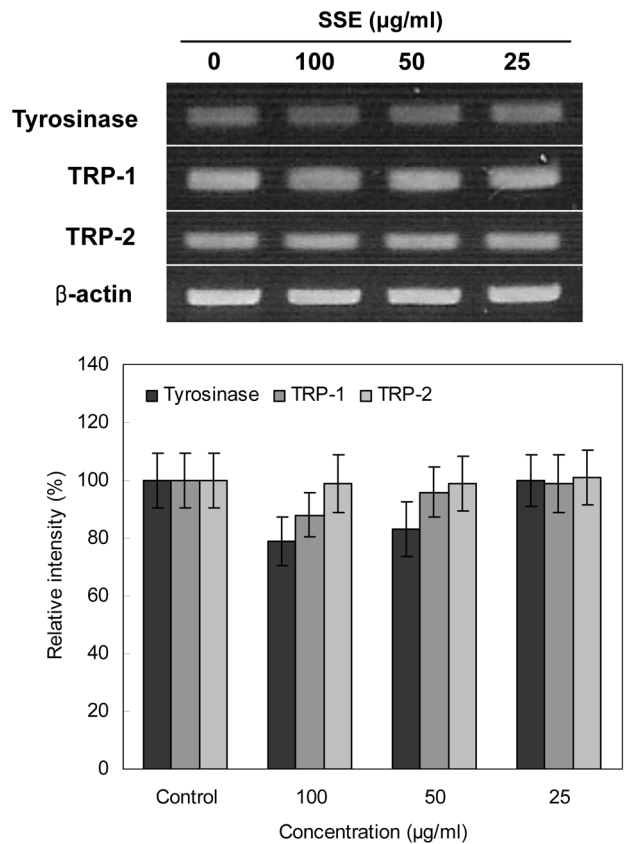
멜라닌 합성은 tyrosinase에 의해 조절되는 일련의 효소적 반응에 의해 조절되며, tyrosine을 기질로 하여 dopa를 생성시키고 다시 dopaquinone으로 산화시키는 연속적인 효소적 산화가 진행된 후 각 생성물의 중합반응에 의해 이루어진다고 알려져 있다. 멜라닌 생성에 관련하는 세포내 tyrosinase의 활성 저해 효과를 측정하였다. 돌나물 추출물을 처리한 세포를 수집하여 용해시킨 후, 0.2% L-dopa가 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8)를 넣고 37°C에서 배양한 후 흡광도를 측정하였다. Fig. 4의 결과와 같이 돌나물 추출물을 처리한 실험군에서는 농도 의존적으로 tyrosinase의 활성이 저해되었으며, 100 µg/ml에서 tyrosinase 활성을 약 51% 저해 효과가 있는 것으로 나타났다.

**Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질 발현 저해 효과**

세포내 tyrosinase 저해 실험의 결과로 돌나물 추출물은 세포내 tyrosinase활성을 저해하여 melanin 생성을 감소시켰다. 이러한 결과가 멜라닌 생성에 관련된 단백질 발현과도 연관성이 있는지를 확인하기 위해 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 항체를 이용한 western blot으로 관련 단백질의 발현량 변화에 대하여 조사하였다(Fig. 5). 돌나물 추출물은 tyrosinase, TRP-1의 발현을 저해하는 것으로 나타났으며 TRP-2의 발현량에는 영향을 미치지 않았다. 또한 이에 대한 density를 측정한 결과, 100 µg/ml에서 tyrosinase발현을 29%, TRP-1의 발현을 13% 감소시키는 것으로 나타났고, TRP-2 발현량은 변화가 없었다. Yoon 등<sup>18)</sup>에 의한 tyrosinase와 TRP-1의 발현 저해는 제주조릿대 잎 열수추출물이 α-MSH에 의한 세포신호전달 경로 중 지속적인 ERK 활성화를 저해함으로써 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 저해하는 것으로 보고되고 있다. 따라서, 돌나물 추출물은 α-MSH에 의해 유도된 extracellular signal-regulated kinase(ERK)의 활성화를 저해함으로써 멜라닌 생합성에 직접적으로 관여하는 효소인 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 저해하는 것으로 사료된다.



**Fig. 5** – Effect of SSE on tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 expression in B16 melanoma cells. B16 melanoma cells were treated for 48 h with SSE. Solubilized total protein (50 µg) was electrophoresed in 12% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membrane. Specific detection of proteins was performed with the polyclonal antibody against tyrosinase, TRP-1 and TRP-2. Similar results were observed in three independent experiments.



**Fig. 6** – Effect of SSE on tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA expression in B16 melanoma cells. B16 melanoma cells were treated for 24 h with SSE. Total RNA extracted from B16 melanoma cells was analyzed by RT-PCR.

### Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 mRNA 발현 저해 효과

돌나물 추출물이 멜라닌 생합성에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 실험결과 돌나물 추출물은 tyrosinase, TRP-1의 발현을 저해하는 것으로 나타났지만 TRP-2의 발현량에는 영향을 미치지 않았다. 또한 이에 대한 density를 측정한 결과, 100 µg/ml에서 tyrosinase 발현을 21%, TRP-1의 발현을 12% 감소시키는 것으로 나타났고, TRP-2 발현량은 변화가 없었다(Fig. 6).

멜라닌 생합성은 세포내 여러 신호 전달 경로를 통하여 tyrosinase 발현이 증가되어 일어나며, 이러한 tyrosinase 생성에 중요한 전사인자인 microphthalmia-associated transcription factor(MITF)의 발현에 의해 조절된다고 알려져 있다.<sup>19-22)</sup> MITF는 멜라닌 생합성에 관여하는 신호전달 경로 중 α-MSH에 의한 cAMP 경로를 통하여 발현이 증가되고, extracellular signal-regulated kinase(ERK)에 의해 인산화되어 발현이 저해된다.<sup>23,24)</sup> 따라서, tyrosinase와 TRP-1 유전자 발현을 저해한 돌나물 추출물은 MITF를 조절하는 신호전달 과정에 관여하여 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 추측되며 향후에 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

## 결 론

돌나물 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 항산화 효과 및 B16 melanoma 세포를 이용하여 세포내 tyrosinase 저해효과, 멜라닌생성 저해효과, tyrosinase와 관련단백질 및 유전자에 미치는 영향을 연구하였다. 돌나물 추출물의 DPPH 소거효과와 superoxide radical 소거효과가 우수하게 나타났으며, B16 melanoma세포를 이용한 세포내 tyrosinase 활성은 51% 저해하였고, 멜라닌 생성은 100 µg/ml 농도를 처리한 실험군에서 46% 감소하였다. 또한 tyrosinase 단백질 발현량은 29% 감소, TRP-1도 13% 감소시켰으나 TRP-2에 대한 저해효과는 나타나지 않았다. RT-PCR을 이용한 유전자 발현을 평가한 결과 tyrosinase, TRP-1의 mRNA 발현도 감소하였으나, TRP-2의 발현은 변화가 없었다. 돌나물 추출물은 항산화 효과 및 멜라닌 생합성에 관여하는 단백질과 유전자의 발현조절 경로를 통하여 멜라닌 생합성 저해 효과를 나타내는 것으로 보이며 향후 미백제로 응용 할 수 있을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

- Seiberg, M. : Keratinocyte-melanocyte interaction during melanosome transfer. *Pigment Cell Res.* **14**, 236 (2001).
- Hill, H. Z., Li, W., Xin, P. and Mitchell, D. L. : Melanin: a two edged sword? *Pigment Cell Res.* **10**, 158 (1997).
- Cabanes, J., Chazarra, S. and Garcia-Carmona, F. : Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 982 (1994).
- Marmol, V. and Beermann, F. : Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation. *FEBS Letters* **381**, 165 (1996).
- Hearing, V. J. and Tsukamoto, K. : Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **4**, 24 (1999).
- Lee, K. E., Sim, G. S., Kim, J. H., Park, S. M., Lee, B. C., Yun, Y. P., Zhang, Y. H. and Pyo, H. B. : Effects of the Scirpi rhizoma on antioxidation and melanogenesis. *Yakhak Hoeji* **48**, 323 (2004).
- Cho, Y. H., Lee, B. C., Kim, J. H., Kim, J. H., Pyo, H. B., Zhang, Y. H. and Park, H. D. : Effect of *Aetemisia anomala* S. Moore on antioxidant activity and melanogenesis. *Korean J. Pharmacognosy* **36**, 273 (2005).
- Aimin, H., Mingshi, W., Hongyan, H., Decheng, Z. and Lee, K. H. : Hepatoprotective triterpenes from *Sedum sarmentosum*. *Phytochemistry* **49**, 2607 (1998).
- Oh, H. C., Kang, D. G., Kwon, J. W., Kwon, T. O., Lee, S. Y., Lee, D. B. and Lee, H. S. : Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 2035 (2004).
- Sim, G. S., Kim, J. H., Lee, D. H., Na, Y., Lee, G. S. and Pyo, H. B. : *Sedum sarmentosum* enhances hyaluronan synthesis in transformed human keratinocytes and increases water content in human skin. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **33**, 17 (2007).
- Blois, M. S. : Antioxidation determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199 (1958).
- Furuno, K., Akasako, T. and Sugihara, N. : The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 19 (2002).
- Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methos* **65**, 55 (1983).
- Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. : Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**, 1474 (1985).
- Pawelk, J. : Melanoma cells in culture. *Methods Enzymol.* **58**, 564 (1978).
- Pomerantz, S. H. : Separation, purification, and properties of two tyrosinase from hamster melanoma. *J. Biol. Chem.* **238**, 2351 (1963).
- Hatano, T. : Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species tannins and related polyphenols. *Natural Medicines* **49**, 357 (1995).
- Yoo, H. S., Kim, J. K. and Kim, S. J. : The inhibitory effect on

- the melanin synthesis in B16/F10 mouse melanoma cells by *Sosa quelpaertensis* leaf extract. *J. Life Sciences* **17**, 873 (2007).
- 19) Bentley, N. J., Eisen, T. and Goding, C. R. : Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7996 (1994).
- 20) Fisher, D. E. : Microphthalmia: A signal responsive transcriptional regulator in development. *Pigment Cell Res.* **13**(Suppl. 8), 145 (2000).
- 21) Steingrimsson, E., Copeland, N. G. and Jenkins, N. A. : Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 365 (2004).
- 22) Tachibana, M. : MITF: A stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Res.* **13**, 230 (2000).
- 23) Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T. J., Bille, K., Fisher, D. E., Ortonne, J. P. and Ballotti, R. : Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J. Cell Biol.* **142**, 827 (1998).
- 24) Busca, R. and Ballotti, R. : Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* **13**, 60 (2000).