

Fucoidan의 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성도 억제 효과

정숙희 · 구미정 · 문희정 · 유병철 · 전만중 · 이용환*

고신대학교 의과대학 예방의학교실 및 건강증진천연물연구소

Received October 6, 2008 / Accepted December 4, 2008

Inhibitory Effects of Fucoidan on Melanin Synthesis and Tyrosinase Activity. Sook Hee Jung, Mi Jung Ku, Hee Jung Moon, Byeng Chul Yu, Man Joong Jeon and Yong Hwan Lee*. *Department of Preventive Medicine and Institute of Natural Products for Health Promotion, Kosin University, Busan, 602-702 Korea* - Melanogenesis is a physiological process that results in the synthesis of melanin pigments. Tyrosinase is a key enzyme for melanin biosynthesis, and hyperpigmentation disorders are associated with abnormal accumulation of melanin pigments, which can be improved by treatment with depigmenting agents. Among the possible melanin-reducing compounds, tyrosinase inhibitors are most promising for preventing and treating pigmentation disorder and are used as skin-whitening agents in the cosmetic industry. In the present study, the effects of fucoidan on melanogenesis and tyrosinase activity of B16F10 melanoma cells were investigated. Melanin synthesis and tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells were decreased in a dose-dependent manner by fucoidan. Melanin production and tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells stimulated by α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) were inhibited by fucoidan with a dose-dependent manner compared to control. Fucoidan inhibited tyrosinase activity of B16F10 melanoma cells with a dose-dependent manner as assessed by 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) staining. In conclusion, these findings indicate that fucoidan, which inhibit melanin synthesis and tyrosinase activity, is an effective skin-whitening agent.

Key words : Fucoidan, melanin synthesis, tyrosinase activity

서 론

표피의 기저층에 존재하는 melanin은 인간의 피부색을 결정짓는데 가장 중요한 역할을 하며, 멜라닌 세포(melanocyte) 내의 특수한 형태의 갈색 세포내 소기관인 멜라닌소체(melanosome)에서 합성된다. 멜라닌 합성은 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1)과 tyrosinase related protein-2 (TRP-2), cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 유도 물질인 adrenocorticotrophic hormone (ACTH), forskolin과 α -melanocyte stimulating hormone (MSH) 등에 의해서 조절된다[1,10,18].

멜라닌의 합성은 아미노산의 하나인 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)와 DOPAquinone으로 대사된다. DOPAquinone 이후의 반응은 크게 적갈색에서 황색을 결정하는 pheomelanin과 흑갈색에서 갈색을 결정하는 eumelanin 생성의 2가지로 나뉘어진다[3]. 따라서 멜라닌 생성의 주요 효소인 tyrosinase의 활성을 저해함으로써 멜라닌 생성을 억제시켜 미백 효과를 유도할 수 있다.

최근 천연물에서 tyrosinase 억제 활성을 가진 화합물을

개발하기 위한 노력이 많이 이루어지고 있다. 잘 알려진 tyrosinase 억제 물질인 누룩곰팡이로부터 분리된 kojic acid [13], hydroquinone [15], oxyresveratrol [17], 그리고 p-hydroxybenzyl alcohol [14]은 멜라닌 합성을 억제한다고 보고되고 있다. Fucoidan은 분자량이 20만 달톤을 넘는 고분자 물질로 황산기(sulfate group)를 가진 산성의 수용성 다당류로서 끈적끈적한 점질구조로 구성되어 있다. 가수분해에 의해서 L-fucose가 다량 함유되어 있는 것이 밝혀지면서 처음에는 fucoidin으로 명명되었다가 지금은 다당(多糖) 명명법에 따라 fucoidan으로 불리게 되었다[2]. 미역, 다시마 등의 갈조류 성분의 새로운 생리활성성분으로 각광을 받고 있는 fucoidan은 천연 미백물질로서의 가능성이 매우 높은 물질로 밝혀지고 있다[11].

본 연구에서는 fucoidan의 멜라닌 합성에 대한 억제효과를 알아보기 위하여 cell free system인 mushroom tyrosinase activity와 B16F10 melanoma 세포의 총 멜라닌 양을 측정하여 멜라닌 합성 억제 정도를 측정하고 tyrosinase의 활성을 억제하는 정도를 평가하였으며, 아울러 멜라닌 자극 호르몬인 α -MSH를 처리하여 과색소 현상을 유도 후, 과색소 침착시 fucoidan의 미백효과를 조사하였다. 이때 멜라닌 생합성 경로에 관여하는 tyrosinase의 활성 부위에 포함되어 있는 구리 이온을 킬레이트 시킴으로써 멜라닌 활성을 저해시키는 것으로 알려진 kojic acid를 양성대조군으로 사용하여 fucoidan과 비교하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-990-6459, Fax : +82-51-246-7201

E-mail : yhlee@kosin.ac.kr

재료 및 방법

시약 및 실험 기기

실험에 사용된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)과 fucoidan, tyrosine, Triton X-100, mushroom tyrosinase, α -MSH, DOPA는 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 그 외 시약은 일급 또는 특급 시약을 사용하였으며 세포 배양을 위한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지와 fetal bovine serum (FBS), 항생제 penicillin-streptomycin은 GIBCO사(Grand Island, NY, USA)의 제품을 사용하였다.

실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator (Forma Scientific 3111, Marietta, OH, USA), clean bench (Hanback Co, Ltd. HB-402SM, Seoul, Korea), microscope (Nikon TS 100, Japan), multi-detection microplate (Bio-TEK Synergy HT, Winooski, VT, USA) 등이었다.

실험 방법

Mushroom tyrosinase inhibition assay

자외선 또는 주변 환경에 의해 tyrosinase가 활성을 갖게 되면 tyrosine (또는 DOPA)이 중간생성 단계인 DOPA chrome의 생성경로를 거쳐 자동 산화반응에 의해 멜라닌 고분자로 변화한다. 본 실험은 L-tyrosine을 기질로 하여 중간 단계인 DOPA chrome의 생성여부를 측정하였다[9]. 즉, 다양한 농도별로 희석한 fucoidan 10 μ g/ml와 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5)에 녹인 1mM L-tyrosine 170 μ l를 96-well plate에 넣고 mushroom tyrosinase (1,000 unit/ml) 20 μ l를 혼합한 후 상온에서 30분 배양한 후 490 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 구하였다.

$$\text{상대적 tyrosinase 활성도(\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 O.D at 490 nm}}{\text{시료 무첨가군의 O.D at 490 nm}} \times 100$$

세포주 및 세포 배양

한국 세포주은행에서 분양받은 B16F10 멜라닌 세포주는 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

세포 생존능(cell viability)의 측정

Yang 등[19]의 방법에 준하여 다음과 같이 cell viability를 측정하였다. B16F10 melanoma 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well 농도로 접종한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하루 동안 안정화를 시킨 후 fucoidan을 1, 10, 20 및 50 μ g/ml 농도로 처리를 한 후 48 시간 동안 배양하였다. 그 후 각 well의 배지들을 제거하고 MTT solution (5 mg/ml in PBS)을 100 μ l씩 첨가하고, 37°C에서 4시간 동안 반응시킨

후 MTT solution을 제거하고, 각 well에 100 μ l의 dimethylsulfoxide (DMSO)를 첨가하여 15~20분간 plate shaker로 흔들여 준 다음 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

B16F10 melanoma cell 내의 멜라닌 생성량 측정

6-well plate에 well당 2×10^5 cells/well로 접종한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양을 하였다. 배지를 제거하고 fucoidan이 1, 10, 20, 및 50 μ g/ml 농도로 희석된 배지로 교체한 후 48시간 동안 배양하였다. 그 후 배지를 제거한 세포를 PBS (phosphate buffered saline)로 2번 세척하고, 1% (w/v) Triton X-100을 함유한 100 mM sodium phosphate (pH 6.8) 100 μ l를 넣고 -80°C에서 30분 용해시킨 후, 12000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 얻은 pellet을 멜라닌 정량에 사용하였다. 물에 불용성을 나타내는 멜라닌의 액화를 일으키기 위하여 10% DMSO가 함유된 1 N NaOH를 적정량 넣고 65°C에서 1시간 동안 반응을 시킨 후 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다[6].

B16F10 melanoma cell내의 tyrosinase 활성도 측정

6-well plate에 well 당 2×10^5 cells/well 농도로 접종한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양을 하였다. 배지를 제거하고 fucoidan이 1, 10, 20, 50 μ g/ml 농도로 희석된 배지로 교체한 후 48시간을 배양하였다. 그 후 배지를 제거한 세포를 PBS로 2번 세척하고, 1% (w/v) Triton X-100을 함유한 100 mM sodium phosphate (pH 6.8) 을 100 μ l 넣고 -80°C에서 30분 용해시킨 후, 12,000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 얻은 상등액을 tyrosinase 활성도 측정에 사용하였다. 상등액 40 μ g/ml와 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 2 mg/ml L-DOPA 160 μ g/ml를 첨가하여 1시간 동안 37°C incubator에서 배양하였다. 반응이 끝난 후 tyrosinase에 의해 DOPA로부터 형성되는 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정하여 상대적 tyrosinase 활성으로 나타내었다.

α -MSH에 의한 과생성 멜라닌 생성량 및 tyrosinase 활성도 측정

외부 자극에 대한 B16F10 melanoma 세포 내 과생성 멜라닌과 tyrosinase의 활성도에 대하여 fucoidan이 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 외부 자극제로 α -MSH를 사용하였으며 실험방법은 B16F10 melanoma 세포의 멜라닌 생성량 측정 및 tyrosinase 활성도 측정과 동일하게 시행하였다.

Polyacrylamide gel에서 tyrosinase 활성 측정

B16F10 melanoma 세포를 6-well에 2×10^5 cells/well로 분주한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 24시간 후

에 α -MSH가 포함된 배지에 fucoidan을 1, 10, 20 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 희석하여 교체한 다음 48시간 동안 배양하였다. 그 후 배지를 제거한 세포를 PBS로 세척하고, 1% (w/v) Triton X-100을 함유한 100 mM sodium phosphate (pH 6.8)을 100 μl 넣고 -80°C 에서 30분 동안 반응시킨 후 12,000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 얻은 상층액은 tyrosinase 효소원으로 사용하였다. BSA를 표준 단백질로 이용하여 단백질을 정량하고 SDS-10% polyacrylamide gel에서 일정량의 단백질과 sample loading buffer 혼합액을 전기영동 하였다. 얻어진 gel을 200 ml의 100 mM sodium phosphate buffer에 넣고 상온에서 30분 동안 가볍게 흔들어준 후 새로운 용액으로 교환하고 한 번 더 세척하였다. 그리고 10 mM-DOPA 용액을 넣고 37°C 에서 2시간 이상 반응시켜 나타나는 갈색의 밴드를 확인하였다[5].

결과 및 고찰

Mushroom tyrosinase inhibition assay

Tyrosinase에 대한 fucoidan의 직접적인 영향을 알아보기 위하여 fucoidan을 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000 및 4,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 다양한 농도로 조제한 후 L-tyrosine을 이용하여 tyrosinase 활성 억제율을 알아보았다. 양성대조군으로 사용된 kojic acid의 경우 농도가 높아짐에 따라 tyrosinase의 활성을 억제시키는 경향을 보였다($p < 0.05$). 그러나 fucoidan의 경우 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서만 대조군에 비하여 tyrosinase의 활성을 $16.7 \pm 4.1\%$ 억제하여($p < 0.05$) 양성 대조군으로 사용된 kojic acid에 미치지 못하는 활성을 나타내었다(Fig. 1, 2). 이는 Park 등[16]이 다시마 열수추출물의 alginate와 fucoidan이 tyrosinase에 직접적인 작용을 하지 않는 것으로 보고한

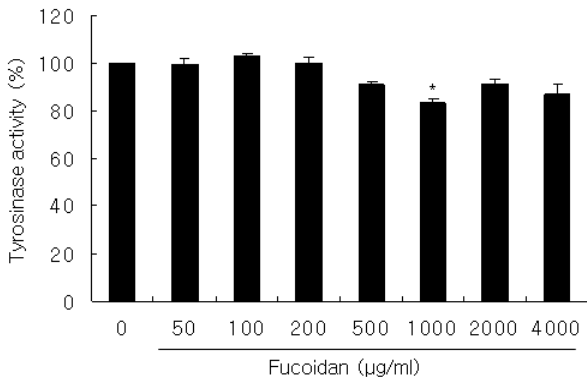


Fig. 1. Inhibitory effect of fucoidan on mushroom tyrosinase activity. Assay solution contains different concentrations of fucoidan, 1,000 units/ml mushroom tyrosinase and 1mM tyrosine. The assay mixture was incubated 25°C for 30 min. Following incubation was determined microplate reader at 490 nm. Each value represents the mean \pm S.E. (n=3). * $p < 0.05$ compared with no treatment.

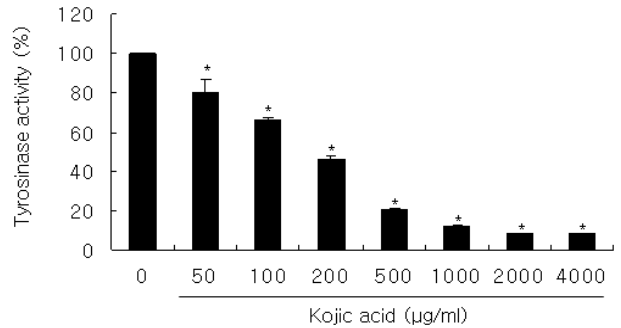


Fig. 2. Inhibitory effects of kojic acid on mushroom tyrosinase activity. Assay solution contains different concentrations of kojic acid, 1,000 units/ml mushroom tyrosinase and 1mM tyrosine. The assay mixture was incubated 25°C for 30 min. Following incubation was determined microplate reader at 490 nm. Each value represents the mean \pm S.E. (n=3). * $p < 0.05$ compared with no treatment.

연구와도 일치하였다. 이러한 결과로 미루어 fucoidan이 직접적으로 tyrosinase 효소의 활성을 억제하지는 않은 것으로 판단된다.

세포 생존능(cell viability)

Fucoidan이 B16F10 melanoma 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT 방법을 이용하여 생존율을 측정하였다. Fucoidan을 1, 10, 20 및 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 48시간동안 배양한 결과 대조군과 비교하여 fucoidan 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $113.2 \pm 3.3\%$ 로서 대조군보다 유의하게 높은 세포 생존율을 보였으며($p < 0.05$), 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 $110.3 \pm 3.3\%$, 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $103.6 \pm 5.4\%$ 대조군과 유의한 차이는 없었다. Fucoidan 50 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서는 세포생존능이 $93.4 \pm 5.2\%$ 로서 대조군보다 유의하게 더 낮았다($p < 0.05$, Fig. 3). 즉, 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 고농도에서는 세포 독성이 나타

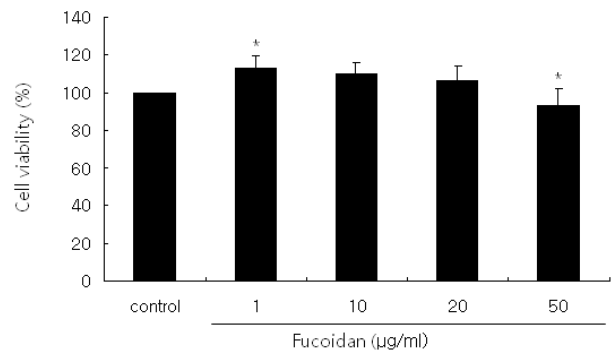


Fig. 3. Cell viability of B16F10 melanoma cells after treatment with fucoidan. The cells were cultured in the presence of various concentrations of fucoidan for 48 hours. The viability of the cells was measured by MTT assay. Each bar represents the mean \pm S.E. (n=5). * $p < 0.05$ compared with control.

날 수 있음을 의미하였다.

Fucoidan의 B16F10 melanoma cell 내의 멜라닌 생성 억제 효과

Fucoidan이 B16F10 melanoma 세포의 신호전달경로를 통하여 간접적으로 tyrosinase 활성화에 관여하는지를 확인하기 위하여 먼저 멜라닌 합성에 대하여 fucoidan이 억제작용을 하는지를 알아보았다. Fucoidan을 1, 10, 20 및 50 µg/ml의 농도로 처리하고 48시간이 지난 후 멜라닌 생성량을 측정하였다. Fucoidan 1 µg/ml의 농도에서는 대조군에 비하여 9.9%, 10 µg/ml에서는 26.6%, 20 µg/ml에서는 43.4%를 감소시켰으며, 최종 농도인 50 µg/ml에서는 46.5%로 멜라닌 생성을 감소시켰으므로 통계적으로 유의하게 멜라닌 생성이 억제되고 있었다($p < 0.05$, Fig. 4). 양성대조군인 kojic acid와 비교하였을 때 모든 농도에서 fucoidan에 의한 멜라닌 생성량 감소가 더욱 현저하였다.

Fucoidan의 B16F10 melanoma cell 내의 tyrosinase 활성화도 억제 효과

Tyrosinase는 피부 멜라닌 생성에 있어서 매우 중요한 역할을 하며, melanosome에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 만들고 다시 DOPA를 산화시켜 DOPA chrome을 만드는 DOPA oxidase로 작용하여 멜라닌 polymer를 합성하는데 있어서 key enzyme으로 작용한다. 그러므로 tyrosinase 활성화도 억제는 피부 내에서 멜라닌 polymer 합성을 효과적으로 저해할 수 있기 때문에 중간 생성단계에서 tyrosinase에 의해 생성되는 반응 산물인 DOPA chrome의 저해 정도를 확인하는 L-DOPA oxidase 방법을 채택하였다[12]. Fucoidan이 B16F10 melanoma 세포의 tyrosinase 활성화도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 fucoidan을 1, 10, 20 및 50 µg/ml의

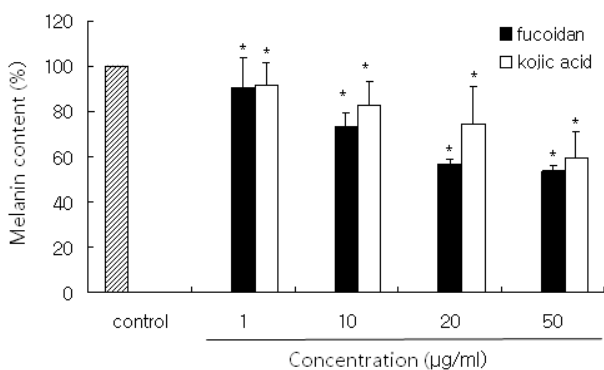


Fig. 4. Effect of fucoidan on melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. Cells were seeded at 2×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were treated with various concentrations of fucoidan, and cultured for 48 hours. Then, melanin contents were measured at 405 nm. Each bar represents the mean \pm S.E (n=3). * $p < 0.05$ compared with control.

농도로 처리하고 48시간이 지난 후 tyrosinase 활성도를 측정하였다. Fucoidan 1 µg/ml의 농도에서는 대조군에 비하여 tyrosinase 활성도가 8.8%, 20 µg/ml에서는 12.8%, 최종 농도인 50 µg/ml에서는 43.3%가 감소되었으며 통계적으로도 유의하였다($p < 0.05$, Fig. 5). 양성대조군인 kojic acid와 비교하였을 때 모든 농도에서 fucoidan에 의한 tyrosinase 활성화도 감소가 더욱 현저하였다.

α-MSH로 멜라닌 생성 유도 후 fucoidan의 멜라닌 생성 억제 효과

멜라닌 생성 유도 물질인 α-MSH는 뇌하수체 및 피부를 포함한 여러 가지 말초조직에서 분비되는 pleiotropic molecule으로써 표피세포의 성장과 증식, 국소조직의 면역 조절, 멜라닌 색소 생성 등 다양한 생리적 기능에 관여한다. 이는 세포막 수용체(melanocortin receptor 1, MC1R)와 결합하여 Gs 단백질을 활성화시키고, 이차적으로 adenylate cyclase 활성화에 의해 cAMP가 증가되고 연속적으로 protein kinase A (PKA), tyrosinase 활성화 등을 통하여 멜라닌 생성을 촉진시키며 microphthalmia-associated transcription factor (MITF) 단백질의 발현을 증가시켜 tyrosinase 유전자의 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다[4,8]. 실제로 Hunt 등[7]은 α-MSH에 의해 멜라닌 형성 및 tyrosinase 활성이 증가되었다고 보고한 바 있다. 이에 본 연구에서도 B16F10 melanoma 세포에 α-MSH를 투여함으로써 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성화에 fucoidan이 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. Fucoidan이 멜라닌을 생성하는 세포 수준에서 미백효과가 있는지를 확인하기 위하여 α-MSH로 자극한 B16F10 melanoma 세포에서 멜라닌 생성을 관찰하였다. B16F10

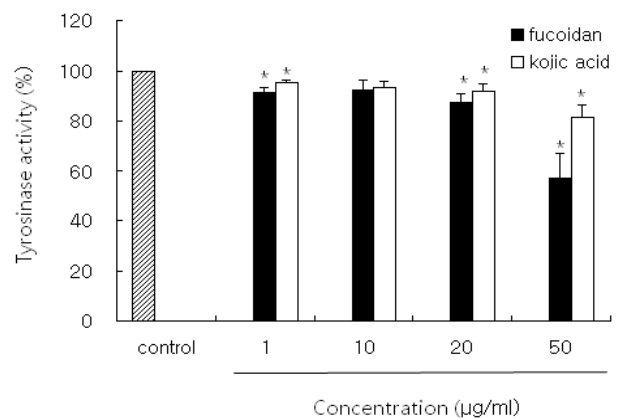


Fig. 5. Inhibitory effect of fucoidan on tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells. Cells were seeded at 2×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were treated with various concentrations of fucoidan, and cultured for 48 hours. Then, tyrosinase activity was measured at 490 nm. Each bar represents the mean \pm S.E. (n=3). * $p < 0.05$ compared with control.

melanoma 세포에서 1 μ M의 α -MSH로 유도된 군은 대조군에 비하여 멜라닌 생성량이 193.3% 증가하였다. 여기에 fucoidan 1 μ g/ml의 농도로 처리된 경우 fucoidan을 처리하지 않은 α -MSH 유도군에 비하여 15.3%의 멜라닌 생성이 감소하였고, 10 μ g/ml의 농도에서는 29.1%, 20 μ g/ml의 농도에서는 37.5%, 50 μ g/ml의 농도 45.1%의 멜라닌 생성 감소율을 보였으며, fucoidan 50 μ g/ml의 농도에서만 통계적으로 유의하였다($p < 0.05$, Fig. 6). 양성대조군인 kojic acid와 비교하였을 때 10 μ g/ml의 농도에서만 fucoidan에 의한 멜라닌 생성량 감소가 더 많았으나 1, 20, 그리고 50 μ g/ml의 농도에서는 kojic acid에 의한 멜라닌 생성량 감소가 더 많았다.

α -MSH 투여 후 tyrosinase의 활성도에 미치는 fucoidan의 효과

B16F10 melanoma 세포에 α -MSH를 처리한 후 tyrosinase 활성도에 미치는 fucoidan의 효과를 확인하였다. B16F10 melanoma 세포에 1 μ M의 α -MSH를 투여하였을 때 대조군에 비하여 tyrosinase 활성도가 182.4% 증가하였다. Fucoidan 1 μ g/ml 처리시 α -MSH군에 비하여 tyrosinase 활성도가 6.6% 감소하였으며 10 μ g/ml의 농도에서는 26.6%, 20 μ g/ml에서는 38.7%, 최종 농도인 50 μ g/ml의 농도에서는 50.6%의 tyrosinase 활성도 억제 효과가 있었다($p < 0.05$, Fig. 7). 양성대조군인 kojic acid와 비교하였을 때 1 μ g/ml 농도를 제외한 모든 농도에서 fucoidan에 의한 tyrosinase의 활성도 감소가 더 많았다.

전기영동 gel에서 DOPA 염색을 통한 tyrosinase 발현 정도 멜라닌 생성 과정 중 tyrosinase는 tyrosine을 DOPA로 전

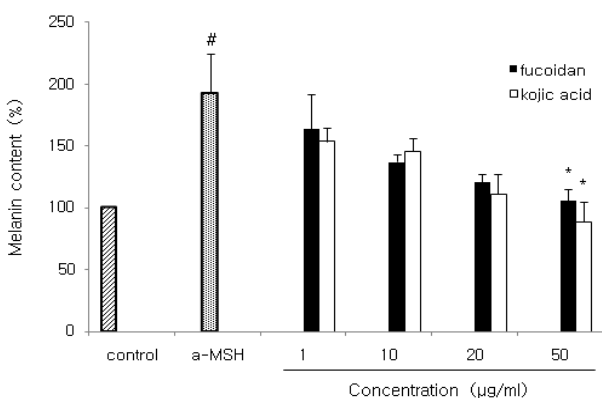


Fig. 6. Inhibitory effect of fucoidan on melanin synthesis in B16F10 melanoma cells stimulated by 1 μ M α -MSH. Cells were seeded at 2×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were treated with various concentrations of fucoidan and α -MSH for 48 hours. Then, melanin contents were measured at 405 nm. Each bar represents the mean \pm S.E. (n=4). # $p < 0.05$ compared with control. * $p < 0.05$ compared with α -MSH.

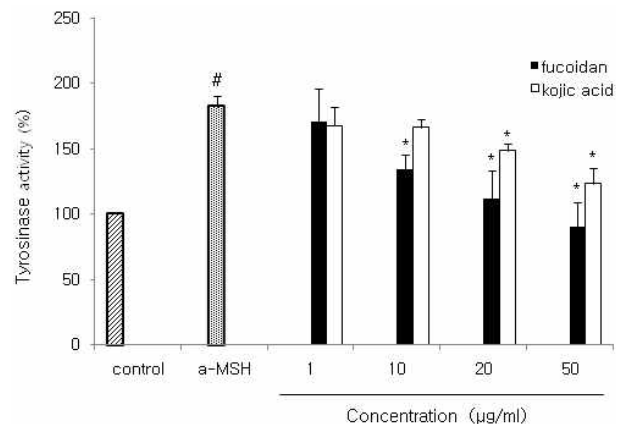


Fig. 7. Inhibitory effect of fucoidan on tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells stimulated by 1 μ M α -MSH. Cells were seeded at 2×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were treated with various concentrations of fucoidan and α -MSH for 48 hours. Then, tyrosinase activity was measured at 490 nm. Each bar represents the mean \pm S.E. (n=3). # $p < 0.05$ compared with control. * $p < 0.05$ compared with α -MSH.

환시키는 tyrosine hydroxylase와 DOPA를 DOPAquinone으로 전환시키는 DOPA oxidase의 두 가지 역할을 함으로써 멜라닌 합성의 처음 두 단계 반응을 촉매하게 된다. 본 연구에서는 DOPA에서 DOPA quinone으로 전환될 때 관련되는 DOPA oxidase 발현 정도를 DOPA 염색을 통하여 관찰하였다. B16F10 melanoma 세포에 α -MSH와 fucoidan을 48시간 동안 처리하여 얻어진 세포 lysate를 SDS-10% acrylamide gel 상에서 전기영동한 후 기질인 L-DOPA 용액을 흡윤시켜 검은색의 tyrosinase 밴드를 측정하였다. Fucoidan은 α -MSH 자극으로 유도한 tyrosinase 발현을 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 8). 양성대조군인 kojic acid와 비교하였을 때에도 각 농도에서 fucoidan에 의한 tyrosinase 발현 억제가 kojic

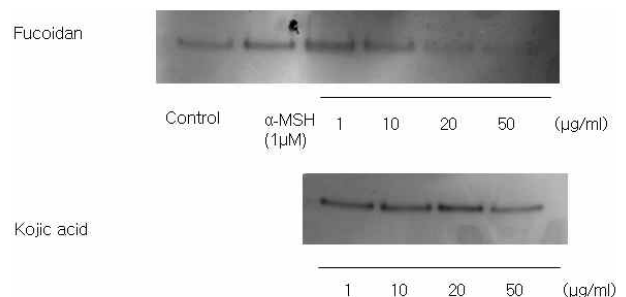


Fig. 8. Gel-dopa staining after treatment with various concentrations of fucoidan and kojic acid in B16F10 melanoma cells. Expression of tyrosinase protein in B16F10 cells were treated with various concentrations of fucoidan and α -MSH for 48 hours. After cell lysates were electrophoresed on SDS polyacrylamide gel. The gel was incubated in L-DOPA to visualize tyrosinase.

acid보다 더 심하였다. 이는 fucoidan이 tyrosinase의 활성을 억제하는 효과가 있음을 의미한다.

결론적으로 fucoidan은 B16F10 melanoma 세포의 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성도에 있어서 억제 작용을 나타내므로 미백 활성 물질로서의 가능성을 가지고 있는 것으로 생각된다.

요 약

미역, 다시마 등 갈조류의 추출물로서 생리활성성분으로 각광 받고 있는 fucoidan이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 알아봄으로써 미백제로서의 개발 가능성 여부를 확인하기 위하여 B16F10 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성도에 대한 실험의 결과 B16F10 melanoma 세포의 멜라닌 생성과 tyrosinase 활성도는 fucoidan의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 억제되었다. B16F10 melanoma 세포에 α -MSH를 투여 후 멜라닌 생성과 tyrosinase의 활성도 역시 fucoidan의 농도가 증가할수록 멜라닌 생성과 tyrosinase 활성도가 억제되는 경향을 보였다. 또한 DOPA 염색의 결과 fucoidan은 농도 의존적으로 tyrosinase 활성도를 억제하였다. 이상의 결과 해조 추출 다당류인 fucoidan은 B16F10 melanoma 세포의 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성도 억제 작용을 나타내므로 미백 활성 물질로서의 가능성을 가지고 있는 것으로 생각된다.

References

1. Buscà, R. and R. Ballotti. 2000. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* **13**, 60-69.
2. Choi, J. H., D. I. Kim, S. H. Park, D. W. Kim, J. S. Lee, J. H. Ryu and Y. S. Chung. 1999. Effects of sea tangle (*Laminaria japonica*) and fucoidan components on chronic degenerative diseases. *J. Life Science* **9**, 430-438.
3. del Marmol, V., S. Ito, I. Jackson, J. Vachtenheim, P. Berr, G. Ghanem, R. Morandini, K. Wakamatsu and G. Huez. 1993. TRP-1 expression correlates with eumelanogenesis in human pigment cells in culture. *FEBS Lett.* **327**, 307-310.
4. Friedmann, P. S., F. Wren, J. Buffey and S. Macneil. 1990. Alpha-MSH causes a small rise in cAMP but has no effect on basal or ultraviolet-stimulated melanogenesis in human melanocytes. *Br. J. Dermatol.* **123**, 145-151.
5. Fuller, B. B., M. A. Drake, D. T. Spaulding and F. Chaudhry. 2000. Down regulation of tyrosinase activity in human melanocyte cell cultures by yohimbine. *J. Invest Dermatol.* **114**, 268-276.
6. Hosoi, J., E. Abe, T. Suda and T. Kuroki. 1985. Regulation

- of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**, 1474-1478.
7. Hunt, G., P. D. Donatien, J. Lunec, C. Todd, S. Kyne and A. J. Thody. 1994. Cultured human melanocytes respond to MSH peptides and ACTH. *Pigment Cell Res.* **7**, 217-221.
8. Hunt, G., C. Todd, J. E. Cresswell and A. J. Thody. 1994. Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7 alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J. Cell Sci.* **107**, 205-211.
9. Kim, Y. J., J. K. No, J. H. Lee and H. Y. Chung. 2005. 4,4'-Dihydroxybiphenyl as a new potent tyrosinase inhibitor. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 323-327.
10. Kreiner, P. W., C. J. Gold, J. J. Keirns, W. A. Brock and M. W. Bitensky. 1973. Hormonal control of melanocytes: MSH-sensitive adenylyl cyclase in the Cloudman melanoma. *Yale J. Biol. Med.* **46**, 583-591.
11. Kwon, D. J., S. T. Lim, Y. J. Chung, S. H. Park and D. K. Kweon. 2006. Comprehension and practical use of fucoidan extracted from brown sea weeds. *Food Sci. Ind.* **39**, 73-80.
12. Laskin, J. D. and L. A. Piccinini. 1986. Tyrosinase isozyme heterogeneity in differentiating B16/C3 melanoma. *J. Biol. Chem.* **261**, 16626-16635.
13. Lim, J. T. 1999. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. *Dermatol. Surg.* **25**, 282-284.
14. Liu, S. J., I. H. Pan and I. M. Chu. 2007. Inhibitory effect of p-hydroxybenzyl alcohol on tyrosinase activity and melanogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1135-1139.
15. Palumbo, A., M. d'Ischia, G. Misuraca and G. Prota. 1991. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. *Biochim. Biophys. Acta.* **1073**, 85-90.
16. Park, Y. J., M. Y. Yoon, H. W. Lim, J. Y. Lee, C. J. Kim and S. S. Sim. 2004. Effect of hot-water extracts from *Laminaria japonicus* on melanin production in B16 melanoma cells. *J. Pharm. Soc. Korea* **48**, 374-378.
17. Shin, N. H., S. Y. Ryu, E. J. Choi, S. H. Kang, I. M. Chang, K. R. Min and Y. Kim. 1998. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 801-803.
18. Tada, A., I. Suzuki, S. Im, M. B. Davis, J. Cornelius, G. Babcock, J. J. Nordlund and Z. A. Abdel-Malek. 1998. Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. *Cell Growth Differ.* **9**, 575-584.
19. Yang, Y., Q. Chen and J. T. Zhang. 2002. Structural and functional consequences of mutating cysteine residues in the amino terminus of human multidrug resistance-associated protein 1. *J. Biol. Chem.* **277**, 44268-44277.