

찔레 추출물의 B16 세포 멜라닌 형성 억제

하세은, 김형도, 박종군*, 정연옥¹, 김현종², 박노복³

원광대학교 생명과학부, ¹(주)FIIN, ²전라북도 생물산업진흥원, ³한국농업대학교 화훼학과

Melanogenesis Inhibition Effect of *Rosa multiflora* Extracts in B16 Melanoma Cells

Se Eun Ha, Hyoung Do Kim, Jong Kun Park*, Yeon Ok Chung¹, Hyun Jong Kim² and Nou Bog Park³

Division of Biological Science, Wonkwang University, Iksan, 570-749, Korea

¹FIIN Inc., Iksan, 570-749, Korea

²Jeonbuk Bioindustry Development Institute, Jeonju, 561-360, Korea

³Department of Floriculture, Korea National Agricultural College, Hwaseong, 455-760, Korea

Abstract - In the present study, the effect of ethanol extracts of leaf and root of *Rosa multiflora* on the proliferation of B16 cells, tyrosinase activity and melanin synthesis were investigated. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay demonstrated that the cell viability upon treatment with *Rosa multiflora* extract(0-200 µg/ml) was similar to that of untreated control. Treatment with leaf or root extracts(200 µg/ml) decreased the in vitro tyrosinase activity to about 65% of that in untreated control. Similarly, the intracellular tyrosinase activity of B16 cells decreased in a concentration-dependent manner. Furthermore, the melanin synthesis of B16 cells decreased by the two extracts in a concentration dependent manner. However, the extracts did not change the level of tyrosinase mRNA, as determined by RT-PCR. These results demonstrated that the *Rosa multiflora* extracts inhibit the tyrosinase dependent melanin biosynthesis, and therefore, are candidates for skin-whitening agents.

Key words - *Rosa multiflora*, tyrosinase inhibition, B16, melanin

서 언

멜라닌은 인체 피부에 존재하며 자외선에 대항하는 기능이 있어 세포를 보호하는 작용을 한다. 체내 외적인 요인에 의해 멜라닌 생성이 증가되어 다량의 멜라닌이 각질형성세포에 전달되고 피부 상피층에 축적되어 과색소침착 현상이 나타나며 이러한 멜라닌의 과잉생산은 인체에 기미, 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하며 피부암의 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2009).

피부에서의 색소침착 방지에 대한 연구는 주로 멜라닌 합성의 주요소인 티로시나아제(tyrosinase) 활성을 조절하기 위하여 티로시나아제 합성 저해물질이나 티로시나아제의 기질에 대한 길항물질을 개발하는 방향으로 연구되어왔

다(McEwan and Parsons, 1987; Hwang *et al.*, 2006). 최근 생활수준의 향상과 평균 수명이 연장됨에 따라 피부 미용에 대한 관심이 증가되고 있다. 특히 환경오염에 따른 피부의 자외선 노출 증가로 인해 피부의 광노화 증가는 피부미백에 대한 관심을 더욱 증폭시키고 있다. 현재 과도한 색소 침착을 개선하기 위해 kojic acid, hydroquinone, sulfure, azelaic acid 및 retinoic acid 와 같은 의약품 등이 사용되고 있으나 hydroquinone과 retinoic acid 이외에는 뚜렷한 임상적 치료효과를 나타내지 못하고 있다(Jang and Roh, 2004).

화학적 미백소재는 임상 실험 등을 통해 알레르기 반응과 같은 거부 반응, 지속적이지 못한 미백효과 등의 부작용이 일어나고 있어 피부에 친화적이고 안정적인 미백소재를 발견하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 중국산 서장채국화, 홍경천, 장청과는 화학 미백소재

*교신저자(E-mail) : jkpark@wonkwang.ac.kr

보다 효과가 뛰어나다고 알려져 있다. 그 외에도 한약재로 사용하고 있는 백삼, 홍삼, 울금, 인진쑥, 빈랑자, 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)과 연어색젓버섯(*Lactarius salmonicolor*) 등이 미백효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다(Lee and Choi, 1999; Chien *et al.*, 2008; Dedeoglu and Guler, 2008). 또한 효모에서 추출한 melanoston이라는 물질은 기존에 미백소재로 알고 있는 알부틴에 비해 지속적인 미백효과가 나타난다고 밝혀졌다(Kim *et al.*, 2006).

본 연구는 천연물로서 찔레(*Rosa multiflora*) 에탄올 추출물에 대한 세포 활성과 티로시나아제 활성 저해 효과, 멜라닌 합량 등의 실험을 통해 찔레 에탄올 추출물의 멜라닌 형성 억제 효과에 대해 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

추출물

본 실험에서 사용된 찔레(*Rosa multiflora*)는 한국농업대학교에서 4~5년령 된 것을 채집하여 동결건조 시킨 후 80% 에탄올에 시료 250 g을 넣어 얼은 상온에서 48시간 동안 보관 후 추출하였으며, 뿌리는 60°C, 암상태에서 12시간 보관 후 추출용 시료로 사용하였다.

세포배양

멜라닌 세포주인 B16 세포는 10% Fetal bovine serum (FBS)와 2 mM L-glutamine이 함유되어 있는 RPMI-1640(Gibco, USA)에서 37°C, 5% CO₂ 배양기(Sanyo, Japan)에서 24시간동안 배양하였다.

세포 활성 분석

세포활성 실험은 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)를 이용하여 측정하였다. B16 세포는 96 well multiplate(Nunc, USA)에 각 well 당 1×10^5 개의 세포를 분주하고, 24시간 동안 배양한 후 FBS가 첨가된 새 배지로 교환하고 실험에 사용될 찔레 잎과 뿌리 추출물을 최종농도 0, 5, 25, 50, 100, 200 µg/ml로 처리한 후 24시간동안 배양하였다. 배양 후 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 후 0.5 mg/ml의 MTT(Sigma, USA) 용액 100 µl를 넣고, 4시간 동안 37°C에서 배양한 후, 570 nm에서 흡광도(ELISA

reader, ReTiSoft Inc, Canada)로 측정하여 그 효과를 정상 대조군에 대한 백분율로 산출하여 비교하였다.

시험관내 티로시나아제 활성 저해 분석

티로시나아제(tyrosinase) 활성 저해 분석을 위한 추출물의 농도는 세포활성 실험과 동일한 농도로 사용하였다. 96 well multiplate에 0.1 M 인산염완충액과 각 농도의 시료액 그리고 200 unit/ml의 버섯의 티로시나아제를 넣은 후 0.05% L-DOPA(L-3,4-dihydroxyphenylalanine)을 넣고 37°C에서 15분간 반응을 시킨다. 반응 후 490 nm에서 흡광도로 측정하였다. 이때 양성대조군으로 알부틴(arbutin, hydroquinone-beta-d-glucopyranoside)을 찔레 잎, 뿌리 추출물과 동일한 농도로 처리하여 측정하고, 그 효과를 정상 대조군에 대한 백분율로 산출하여 비교하였다.

세포내 티로시나아제 활성 저해 분석

멜라닌 B16 세포 내의 티로시나아제 활성 저해분석을 하기 위해서 추출물 또는 알부틴이 함유되어 있는 배지에 37°C에서 3일 동안 배양 후 0.5% sodium deoxycholate로 세포를 파쇄하였다. 파쇄한 세포를 11,000 rpm, 4°C에서 20분 동안 원심분리한 후 상층액을 0.05% L-DOPA와 인산염완충액과 혼합하고 37°C에서 10분 동안 반응 시킨 후 470 nm에서 흡광도로 측정하여 그 효과를 양성대조군인 알부틴과 비교하였다.

멜라닌양 측정

60 mm culture dish에 B16 세포를 4.5×10^5 이 되도록 분주하고 추출물 또는 알부틴이 함유되어 있는 배지에 37°C에서 3일 동안 배양하였다. 배양 후 1 N NaOH를 넣고 80°C에서 30분간 반응시키고 470 nm에서 흡광도로 측정하여 그 효과를 양성대조군인 알부틴과 비교하였다.

역전사-중합효소 연쇄반응(Reverse Transcriptase PCR)

티로시나아제 유전자의 mRNA 발현량은 역전사-중합효소 연쇄반응실험을 이용하여 확인하였다. RNA 추출은 TRIzol Reagent(Invitrogen Co., Carlsbad, USA)을 이용하여 배양된 세포주로부터 total RNA를 분리하였으며 total RNA 1 µg으로 first cDNA를 합성하였다. 중합 효소 반응은 각 cDNA 주형(template), GAPDH 또는 티로시나

아제 유전자의 프라이머, 10 mM dNTP 그리고 0.25 unit Taq polymerase를 모두 포함하는 25 μ l PCR 혼합물을 이용하여 이루어졌다. 중합 효소 반응 결과물을 1.6% agarose gel로 50 V에서 30분간 전기영동 하여 분석하였으며 0.05 mg/ml ethidium bromide 염색을 이용하여 가시화하였다. DNA의 크기는 DNA 분자량 마커와의 비교를 통하여 측정하였다.

결과 및 고찰

쥘레(*Rosa multiflora*) 추출물에 대한 세포 활성 실험은 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 분석 방법으로 수행하였다. 쥘레 잎, 뿌리 추출물을 24 시간 동안 처리한 결과 모든 농도에서 추출물을 처리하지 않은 정상 대조군과 비교해서 차이를 나타내지 않았다(Fig. 1). 이는 쥘레의 잎 뿌리 추출물이 세포 활성에 영향을 미치지 않음을 발견하였다.

세포 활성에 영향을 미치지 않은 농도 범위에서 티로시나아제 활성 저해 효과를 분석하였다. 티로시나아제 활성을 저해하는 것으로 이미 규명된 양성 대조군인 알부틴의 경우에는 5 μ g/ml의 낮은 농도에서는 티로시나아제 활성을 저해하는 효과가 나타나지 않았지만 25, 100과 200 μ g/ml을 처리했을 경우에는 각각 약 20, 40, 55% 정도로 농도 의존적인 티로시나아제 활성 저해 효과를 나타냈다. 쥘레 잎 추출물의 경우에는 동일한 농도에서 양성 저해군인 알부틴이 보인 티로시나아제 활성 저해 비율보다 약 10 ~ 25% 정도 낮게 나타났으나, 추출물을 처리하지 않은 정

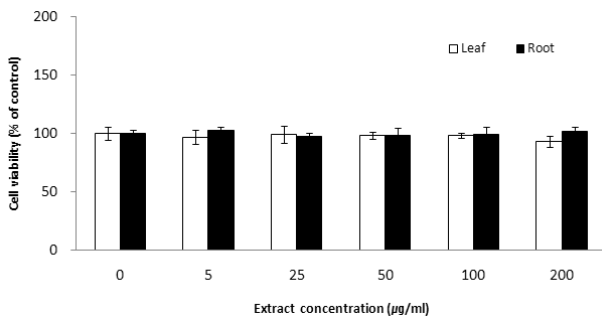


Fig. 1. Effects of *Rosa multiflora*(RM) extracts on the cell viability. B16 cells were incubated for 24 hr with extract of leaf(white bars) or root(black bars) of *R. multiflora*. Each data represent the mean \pm S.D of at least three independent experiments.

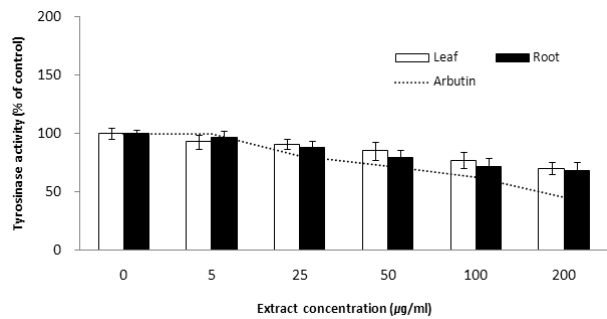


Fig. 2. Effect of RM extract on in vitro tyrosinase activity. Mushroom tyrosinase were incubated with various concentration of RM extract or arbutin. Tyrosinase activity is expressed as a percentage of that untreated control. Each data represent the mean \pm S.D of least three independent experiments.

상 대조군보다 100 과 200 μ g/ml에서 각각 23과 30% 정도 저해되었다(Fig. 2). 쥘레 뿌리 추출물의 경우에는 상대적으로 고농도(200 μ g/ml)에서는 32% 정도 저해 효과를 나타냈다. 이는 양성대조군인 알부틴의 50 μ g/ml 일 경우와 유사한 티로시나아제 활성 저해효과를 나타낸 것을 관찰할 수 있었다.

멜라닌 세포주 B16 세포에서의 티로시나아제 활성을 저해하는 효과를 분석한 결과 알부틴의 경우에는 고농도에서 약 54%의 저해효과를 나타냈다. 쥘레 잎 추출물의 경우에는 100과 200 μ g/ml에서 각각 74와 68%의 활성을 보였다. 쥘레 뿌리 추출물의 경우에는 상대적으로 저농도에서는 티로시나아제 활성을 저해하는 효과가 나타나지 않았지만 50, 100과 200 μ g/ml을 처리했을 경우에는 추출물을 처리하지 않은 대조군보다 각각 23, 29와 36%의 저해효과가 나타나는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

위의 결과를 토대로 B16 세포의 멜라닌 함량에 대한 추출물의 효과를 분석하였다. 알부틴의 경우 5 μ g/ml에서 멜라닌을 저해하는 효과가 나타나지 않았지만, 50과 200 μ g/ml의 경우에는 각각 22과 51% 정도의 멜라닌 함량 저해효과를 나타냈다. 쥘레 잎과 뿌리 추출물의 경우에는 5 μ g/ml의 경우에는 정상 대조군과 유사하였지만, 고농도를 처리할수록 멜라닌의 함량이 저해되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

알부틴의 경우 L-DOPA 혹은 티로신 같은 기질과의 경쟁적 억제 반응에 의한 티로시나아제 활성 억제반응이 나타나 티로시나아제 mRNA 수준을 변화시키지 않음이 규명되었다(Sugimoto *et al.*, 2004). 이에 쥘레 추출물 처리

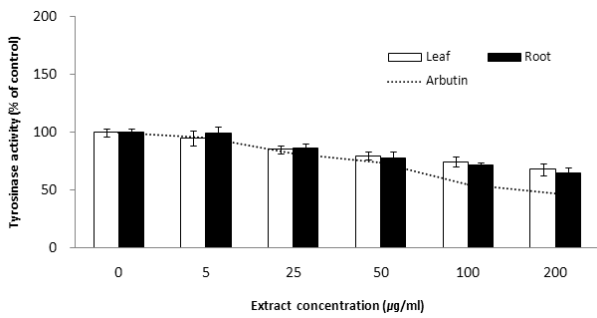


Fig. 3. Effect of RM extract on intracellular tyrosinase activity. B16 cells were incubated with various concentrations of RM extract or arbutin for 3 days. Tyrosinase activity is expressed as a percentage of that untreated control. Each data represent the mean ± S.D of least three independent experiments.

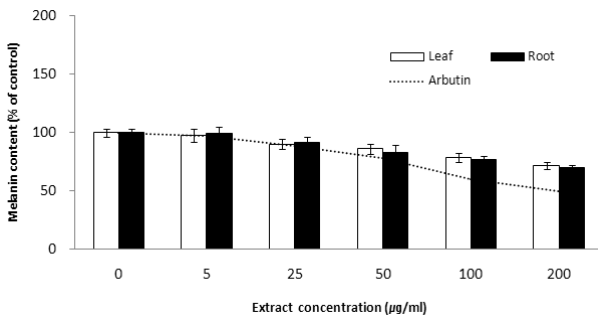


Fig. 4. Effect of RM extract and arbutin on melanin contents. B16 cells were incubated with the RM extract or arbutin for 3 days. Melanin content was determined as described in Materials and Methods and is expressed as a percentage of that untreated control. Each data represent the mean ± S.D of least three independent experiments.

가 티로시나아제 mRNA 수준을 변화시킬 수 있는지를 RT-PCR 방법으로 분석하였다. 추출물 처리군들은 정상대조군과 비교하여 티로시나아제 mRNA 수준이 유의적으로 차이가 나지 않았으며, 또한 농도 의존적인 변화도 없었다 (Fig. 5). 이를 통해 짙레 추출물의 경우, 티로시나아제의 발현을 억제하지는 않는 것을 알 수 있었다(Santos and Stephanopoulos, 2008.).

최근 들어 천연물에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있고, 화학물을 이용하는 대신 천연물의 성분을 미백 및 항 주름 화장품에 응용하는 경우가 많아지고 있다. 현재까지 밝혀진 미백 효과를 나타내는 성분들로는 비타민 A, 비타민 C, coixol, grifolin, neorifolin, mannitol, oxyresveratrol 이 있다(Meyskens and Fuller, 1980; Shin *et al.*, 1998;

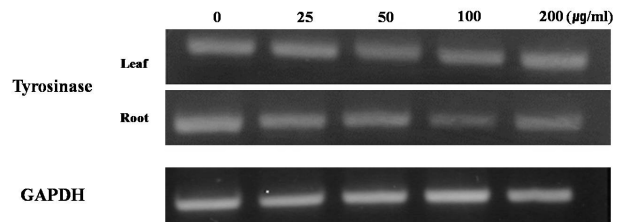


Fig. 5. Effect of the RM extract on tyrosinase mRNA level. B16 cells were incubated with the RM extract at the indicated concentrations for 24 hr. The tyrosinase and GAPDH mRNA levels were subjected to a RT-PCR analysis.

Kim *et al.*, 2002). 짙레 잎, 뿌리 추출물의 경우 화학 미백 소재인 알부틴보다는 티로시나아제를 저해시키는 효능이 낮지만 약 2배 정도의 고농도로 사용할 경우에는 알부틴과 유사한 수준까지 티로시나아제를 저해시킬 수 있을 것으로 시사된다. 이 후 성분에 대한 분석적인 연구를 토대로 짙레의 티로시나아제를 저해시키는 효능을 가진 성분을 정확히 규명하고, 기존의 미백제로 사용하고 있는 합성 성분보다 좋은 효과를 나타낼 수 있도록 연구하며 범위를 더 확장하여 많은 국내 자생 식물들에서 더 우수한 천연 미백 성분들을 규명하는 것이 필요하다고 생각된다.

적 요

본 연구는 짙레 에탄올 추출물의 세포 활성 및 티로시나아제활성 저해를 분석하였다. 짙레 추출물의 세포활성을 분석한 결과 짙레 잎과 뿌리 추출물의 경우에는 추출물을 처리하지 않은 대조군과 유사한 결과를 관찰하였다. 모든 농도에서 세포 활성이 나타나지 않아 티로시나아제 활성 저해 효과를 분석한 결과 짙레 잎과 뿌리추출물은 상대적으로 고농도(200 µg/ml)에서 약 30~32% 정도를 저해하는 효과를 나타냈다. 또한 B16 세포에서 티로시나아제활성 저해 효과를 분석한 결과 상대적으로 고농도(200 µg/ml)에서 양성대조군인 알부틴보다 20~25% 정도 낮은 저해 효과를 나타냈다. 멜라닌 함량 저해 효과를 분석한 결과 짙레 잎과 뿌리 추출물의 경우 티로시나아제의 저해 효과와 유사하게 농도 의존적인 저해효과를 나타내는 것을 관찰하였다. RT-PCR 방법으로 분석한 결과, 추출물 처리군들은 정상대조군과 비교하여 티로시나아제 mRNA 수준이 유의적으로 차이가 나지 않았으며, 또한 농도 의존적인 변화도 없었다.

사 사

본 연구는 농림부 농림기술개발사업(106081-03-2HD120)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

- Chien, C.C., M.L. Tsai, C.C. Chen, S.J. Chang and C.H. Tseng. 2008. Effects on tyrosinase activity by the extracts of *Ganoderma lucidum* and related mushrooms. *Mycopathologia*. 166(2):117-20.
- Dedeoglu, N., and O. Guler. 2008 Differential in vitro inhibition of polyphenoloxidase from a wild edible mushroom *Lactarius salmonicolor*. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2: 1.
- Eisenman, H., M. Mues, S. Weber, S. Frases, S. Chaskes, G. Gerfen, and A. Casadevall. 2007. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiology*. 153: 3954-62.
- 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(4): 1474-8.
- Hwang, E.Y., Y.H. Kong, Y.C. Lee, Y.C. Kim, K.M. Yoo, Y.O. Jo., and S.Y. Choi. 2006. Comparison of phenolic compounds contents between white and red ginseng and their inhibition effect on melanin biosynthesis. *J. Ginseng Res*. 30(2): 82-87.
- Hyun, S.K., W.H. LEE, D.M. Jeong, Y.S. Kim., and J.S. Choi. 2008. Inhibitory Effects of Kurarinol, Kuraridinol, and Trifolirhizin from *Sophora flavescens* on Tyrosinase and Melanin Synthesis. *Biol. Pharm. Bull*. 31(1): 154-158.
- Jang, K.H., and S.S. Roh. 2004. Depigmentation activity of many herb. *Research Institute of Korean Medicone*. 13(2): 289-302.(in Korean)
- Kim J.H., M.R. Kim, E.S. Lee., and H.C. Lee. 2009. Inhibitory effects of calycosin isolated from the root of *Astragalus membranaceus* on melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull*. 32(2): 264-8.
- Kim, J.S., K.T. Park, Y.S. Ahn., and H.J. Yu. 2006. Inhibitory and Eliminating Effects of Yeast-extracted Melanoston on Pigmentation and Preexisting Pigmentation, Respectively. *Kor. J. Dermatol*. 44(4): 391-398.(in Korean)
- Kim, Y.M., J. Yun, C.K. Lee, H. Lee, K.R. Min., and Y. Kim. 2002. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J Biol Chem*. 277(18): 16340-4.
- Lee, K.K., and J.D. Choi. 1999. The effects of areca catechu L extract on anti-inflammation and anti-melanogenesis. *Int J Cosmet Sci*. 21(4): 275-84.
- Lee, S.J., D.W. Park, H.G. Jang, C.Y. Kim, Y.S. Park, T.C. Ki., and B.G. Heo. 2006. Total phenol content, electron donating ability, and tyrosinase Inhibition activity of pear cut branch extract. *Kor. J. Hort. Sci. Technol*. 24(3): 338-341.
- Lim, S.H., S.M. Kim, Y.W. Lee, K.J. Ahn., and Y.B. Choe. 2008. Change of biophysical properties of the skin caused by ultraviolet radiation-induced photodamage in Koreans. *Skin Res Technol*. 14(1): 93-102.
- McEwan, M., and P. Parsons 1987. Inhibition of melanization in human melanoma cells by a serotonin uptake inhibitor. *J Invest Dermatol*. 89(1): 82-6.
- Meyskens, F.J., and B. Fuller. 1980. Characterization of the effects of different retinoids on the growth and differentiation of a human melanoma cell line and selected subclones. *Cancer Res*. 40(7): 2194-6.
- Santos, C., and G. Stephanopoulos. 2008. Melanin-based high-throughput screen for L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 74(4): 1190-7.
- Seto, T., I. Yasuda., and K. Akiyama. 1992. Purgative activity and principals of the fruits of *Rosa multiflora* and *R. wichuraiana*. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*. 40(8): 2080-2.
- 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(3): 801-3.
- Sugimoto, K., T. Nishimura, K. Nomura, K. Sugimoto., and T. Kuriki. 2004. Inhibitory Effects of a-Arbutin on

- Melanin Synthesis in Cultured Human Melanoma Cells and a Three-Dimensional Human Skin Model. *Biol. Pharm. Bull.* 27(4): 510—514.
- Tomita, Y., A. Hariu, C. Mizuno., and M. Seiji. 1980. Inactivation of tyrosinase by dopa. *J Invest Dermatol.* 75(5): 379-82.
- Wen, A., M. K. Choi., and D. D. Kim. 2006. Formulation of liposome for topical delivery of arbutin. *Arch Pharm Res.* 29(12): 1187-92.

(접수일 2008.10.27; 수락일 2009.6.22)