

## 머루포도 씨 추출물의 $\alpha$ -Melanin Stimulating Hormone으로 자극한 B16세포에서 melanin 생성억제 효과

이평재\*

세명대학교 자연약재과학과

### Inhibitory Effect of Muscat Bailey A Seed Extract on Melanin Production in $\alpha$ -Melanin Stimulating Hormone-stimulated B16 Cell

Pyeongjae Lee\*

Department of Natural Medicine Resources, Semyung University, Jecheon 390-711, Korea

**Abstract** - Inhibitory effect of skin and seed of three species grape cultivated in Korea on melanogenesis was investigated. Melanin generation was examined in  $\alpha$ -Melanin Stimulating Hormone-stimulated B16 cell, mouse melanoma, in the presence of samples. All skin sample did not show the inhibitory effect. Seed extract of Campbell early and Neo Muscat had negative effect on cell viability. When 50  $\mu$ g/ml seed extract of Muscat Bailey A was treated, amount of generated melanin and cell viability were  $51.6 \pm 20.5\%$  and  $90.4 \pm 11.3\%$  compared to control, respectively. Seed extract of Muscat Bailey A reduced the tyrosinase protein induced by  $\alpha$ -Melanin Stimulating Hormone, which suggests that inhibitory effect of seed extract of Muscat Bailey A on melanin is partly due to suppression of tyrosinase that is responsible for melanin production.

**Key words** - B16, Grape, Melanin, Melanocyte, Muscat Bailey A, Tyrosinase

#### 서 언

포도는 한국 농가에서 주요하게 재배되는 과일로서 주로 과육을 식용으로 하고 있으며 과육을 제외한 포도껍질과 씨는 버려지고 있다. 최근 포도껍질과 씨의 생리활성효과가 밝혀지고 있어 관심의 대상이 되고 있다. "French paradox"로 이야기 되는 포도의 항산화 효과의 주요 물질은 resveratrol로 밝혀졌으며 주로 포도껍질에 함유되어 있다. 포도씨 또한 항산화와 항염증 효과 등의 활성이 밝혀지면서 포도씨 추출물이 크게 관심을 받고 있다(Kar et al., 2006; Miyagi et al., 1997; Vitseva et al., 2005).

피부의 흑화는 피부에 존재하는 melanocyte의 melanin 생성의 증가 때문이다. UV 노출 등의 외부 자극을 통해 melanocyte는 L-tyrosine으로부터 melanin을 합성하는데 이때 여러 효소들이 관여한다. Tyrosinase는 rate-limiting 효소로서 L-tyrosine을 L-dihydroxy phenylalanine(L-

DOPA)으로, L-DOPA를 DOPAquinone으로 변화시킨다. DOPAchrome tautomerase(DCT)와 tyrosinase-related protein-1(TRP-1)은 black과 brown색소인 eumelanin 생성에 관여한다. Melanin 생성 관련 효소들은 외부자극에 발현량이 증가된다. Melanocyte에  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone( $\alpha$ -MSH)를 처리하면 tyrosinase 발현량이 증가한다.  $\alpha$ -MSH는 melanocortin-1-receptor(MC1R)를 통해 cyclic AMP(cAMP)를 증가시키고 이것은 cAMP responsive element binding protein(CREB)를 활성화 시켜 micro-phthalmia-associatedtranscription factor(MITF)의 발현량을 증가시킨다. MITF는 멜라닌 생성에 관여하는 Tyrosinase과 Tyrosinase-related protein-1(TRP-1)등의 발현에 관여하는 전사인자로 이를 효소의 유전자 발현을 증가시킨다(Abdel-Malek et al., 1995; Ohguchi et al., 2005; Schwahn et al., 2001; Suzuki et al., 1996). Melanin의 생성 및 분포에 의한 피부 흑화는 UV 노출 등의 외부환경에 대한 피부 방어 기작이다(Miyamura et al., 2006; Yamaguchi et al., 2007). 그러나 미용과 관련되어 미백

\*교신저자(E-mail) : pjlee1@semyung.ac.kr

화장품은 화장품산업에서 관심을 받고 있으며 따라서 미백 효과를 나타내는 원료를 찾기 위한 노력을 하고 있다.

미백 효과를 나타내는 물질들은 크게 두 가지 기전을 통해 멜라닌 생성을 억제한다. Tyrosinase의 효소 활성 혹은 발현량 증가 억제이다. 이미 포도씨 추출물은 B16세포에서 멜라닌 생성을 저해한다고 보고된바 있으나 품종별로 확인되지 않았고 그 기전에 있어 Tyrosinase 효소활성 억제 중심으로 보고되었다(Yamakoshi *et al.*, 2003).

본 실험에서는 한국에서 주요하게 생산되는 3 가지 포도 품종의 껍질과 씨 총추출물을  $\alpha$ -MSH로 자극한 B16 세포에 처리하여 멜라닌 생성 억제 효과를 측정하였고 이 중 유의하게 멜라닌 생성을 억제한 머루포도씨 추출물이 Tyrosinase 효소의 발현량에 미치는 영향을 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구에서는 캠벨(Campbell early), 청포도(Neo Muscat), 머루포도(Muscot Bailey A) 3 가지 품종의 포도를 선별하여 실험에 사용하였다. 캠벨은 2007년 7월 말 경상북도 김천시에서 수확된 특급을, 청포도는 2007년 7월 말 경상남도 함안군에서 수확된 특급을 12 kg 씩 산지 구입하여 사용하였다. 머루포도는 수확시기가 다른 품종에 비해 늦어 2007년 9월 중순에 경상북도 영천시에서 수확된 특급을 12 kg 산지 구입하여 시료로 사용하였다.

### 추출

수집된 시료는 중류수로 세척 후 껍질과 씨를 각각 분리하여 물기를 제거하고 분쇄 하였다. 80% 에탄올을 사용하여 1시간씩 3회 반복하여 상온에서 초음파를 이용하여 추출하였다. 얻어진 추출액은 여과지로 여과하고 회전 감압 농축기(EYELA, Japan)를 이용하여 완전 농축시켰다. -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 세포배양 및 샘플처리

B16 세포는 dulbecco's modified eagle medium(DMEM) 배지에서 10% fetal bovine serum(FBS)와 1% antibiotics에서 배양하였다. 배양조건은 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> 조건이었다.  $\alpha$ -MSH는 최종 농도가 10 nM이 되도록 하였으며 sample은 최종농도가 10, 50, 100  $\mu$ g/ml 이 되도록 하였다. Sample은

stock solution 농도가 10%인 dimethyl sulfoxide(DMSO)에서 20 mg/ml 이었으며 세포에 처리할 때 DMSO는 최대 농도가 0.05% 이었다. DMSO 0.05%는 세포 생존과 Melanin 생성에 아무런 영향을 주지 않았다. 3일간 세포를 방치하였으며 처리 후 3일간 매일  $\alpha$ -MSH와 sample을 새로 처리하였다. Western blotting에 사용할 단백질을 얻기 위해 세포를 100 cmm<sup>2</sup> culture dish에서 배양하였고  $\alpha$ -MSH (10 nM)과 머루포도 씨 sample을 10, 25, 50  $\mu$ g/ml 처리하였다. 먼저  $\alpha$ -MSH와 sample 처리 후 3일간 매일  $\alpha$ -MSH와 sample을 새로 처리하였다.

### Melanin 생성량 측정

Melanin 생성량 측정은 Hosoi의 약간 변형된 방법을 이용하였다(Hosoi *et al.*, 1985). B16 세포가 confluent 하게 자라게 되면 24 well plate에 1  $\times$  10<sup>5</sup> 세포/well 농도로 분주하였다. 24시간동안 안정화 시킨 후에  $\alpha$ -MSH와 sample을 처리하였다. 3일후 배지 제거한 다음 phosphate-buffered saline(PBS)로 washing 하였다. 1 N NaOH(10% DMSO) 1 ml를 가하여 80°C에서 1시간동안 melanin을 녹인 후에 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. Melanin 생성 억제는 control에 대한 생성량을 퍼센트로 표시하여 평균치로 나타내었다. 실험은 독립적으로 3번 반복하였다.

### Cell viability

세포 생존은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)를 이용하여 측정하였다. B16 세포가 confluent 하게 자라게 되면 96 well plate에 4  $\times$  10<sup>3</sup> 세포/well 농도로 분주하였다. 24시간동안 안정화 시킨 후에  $\alpha$ -MSH와 sample을 처리하였다. 3일후 배지를 제거한 다음 PBS로 washing 하였다. 50  $\mu$ l MTT(1 mg/ml, PBS)를 넣어주고 37°C에서 2시간동안 방치하였다. MTT 제거 후 150  $\mu$ l 0.04 N HCl/isopropanol 를 넣어 녹인 다음 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 control에 대한 퍼센트로 표시하여 평균치로 나타내었다. 실험은 독립적으로 3번 반복하였다.

### Western blotting

배지를 걷어 낸 후에 PBS로 washing 해준 후에 Trypsin을 처리하여 세포를 걷어내었다. 원심분리로 세포를 모은 후에

2차례 PBS로 washing을 하였다. Lysis buffer(50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.02% sodium azide, 0.5% sodium deoxycholate, 100  $\mu$ g/ml PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin)를 넣고 30분간 ice에서 방치 한 후에 13,000 rpm에서 원심분리 한 후 상층액을 걷어내어 단백질 시료로 사용 하였다. 정량을 통해 각 sample 처리군 80  $\mu$ g의 단백질을 10% polyacrylamide gel에 전기 영동 하였다. Nitrocellulose 막에 blotting 시킨 후에 5% skim milk로 blocking 해주었다. Tyrosinase(1:500 회석, Santacruz), 그리고  $\alpha$ -tubulin(1:3,000 회석, Sigma) primary antibody와 함께 배양한 후에 secondary antibody(Amersham Pharmacia)에 배양하고 ECL kit를 이용하여 band를 확인하였다.

## 통 계

데이터는 mean  $\pm$  S.D.로 표시하였다. 통계처리는 Student's

t-test를 사용하였으며  $p$ -value < 0.05을 유의한 것으로 정하였다.

## 결과 및 고찰

피부 흑화는 피부에 존재하는 melanocyte가 UV 노출 등의 외부적 환경에 대응하여 melanin의 생성을 증가하기 때문이다. 미용과 관련되어 흑화를 억제하는 미백관련 화장품 개발이 관심을 끌면서 미백효과를 가지는 원료에 대한 연구 또한 활발하게 이뤄지고 있다. 원료 및 물질의 미백효능을 확인하기 위해 melanin 생성 효소인 Tyrosinase의 효소활성 억제 탐색이 주요하게 이용되어 왔으나 최근 효소활성 억제와 더불어 미백 원료가 melanocyte에서 tyrosinase와 관련 효소 발현을 증가시키는 환경에서 신호전달 체계를 교란시키는 기전 연구에 대한 보고가 매우 많아졌다(Solano *et al.*, 2006). B16 세포에  $\alpha$ -MSH를 처리함으로서 tyrosianse

Table 1. Effect of grapes on cell viability and melanin production in  $\alpha$ -MSH-stimulated B16 cell

	Sample	Concentration ( $\mu$ g/ml)	Melanin contents (% of control) mean $\pm$ SD	Cell viability (% of control) mean $\pm$ SD
Skin	Campbell early	10	90.2 $\pm$ 1.6	103.0 $\pm$ 2.8
		50	100.2 $\pm$ 2.2	99.9 $\pm$ 4.1
		100	103.7 $\pm$ 0.6	92.2 $\pm$ 3.3
		10	96.9 $\pm$ 1.8	102.4 $\pm$ 1.1
		50	99.1 $\pm$ 0.7	103.1 $\pm$ 2.6
	Muscat Bailey A	100	102.9 $\pm$ 2.7	101.2 $\pm$ 1.6
		10	95.2 $\pm$ 1.9	98.05 $\pm$ 4.4
		50	95.9 $\pm$ 2.6	97.6 $\pm$ 4.2
		100	100.7 $\pm$ 1.9	98.2 $\pm$ 6.9
		10	93.6 $\pm$ 2.5	98.2 $\pm$ 6.2
Seed	Campbell early	50	15.5 $\pm$ 8.2	48.8 $\pm$ 9.3
		100	18.8 $\pm$ 3.1	23.0 $\pm$ 3.9
		10	98.8 $\pm$ 2.4	100.9 $\pm$ 2.2
		50	<b>51.6 <math>\pm</math> 20.5***</b>	<b>90.4 <math>\pm</math> 11.3</b>
		100	32.2 $\pm$ 15.9	62.3 $\pm$ 15.5
	Muscat Bailey A	10	79.5 $\pm$ 5.9	100.9 $\pm$ 1.0
		50	9.4 $\pm$ 4.0	39.7 $\pm$ 11.0
		100	2.5 $\pm$ 0.8	15.4 $\pm$ 0.1
		10		
		50		

\*\*\* $p$  < 0.005, compared with control

증가를 유도 한 후 melanin 생성에 미치는 영향을 조사하는 실험방법이 많이 이용된다. B16세포에  $\alpha$ -MSH를 처리하게 되면  $\alpha$ -MSH는 해당 수용체에 특이적으로 결합하여 cAMP의 량을 증가 시킨다. cAMP는 PKA를 매개로 하여 CREB의 활성화시키며 CREB은 MITF의 발현을 유도한다. MITF는 tyrosinase를 비롯한 melanin 생성 관련 효소 발현의 전사 인자로서 발현량이 늘어난 melanin 생성효소는 흑화에 기여하게 되는데 *Cimicifuga heracleifolia* 의 dichloromethane 분획물(Jang *et al.*, 2008), 2-Imino-1,3-thiazoline Derivative(Kim *et al.*, 2007), *Arnica montana*에서 분리한 triterpene(Maeda *et al.*, 2007), 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone(Lee *et al.*, 2007), piperlonguminine (Kim *et al.*, 2005) 등이  $\alpha$ -MSH로 인한 melanin 생성효소의 발현 증가에 관여하는 신호전달 단백질의 활성화를 차단함으로서 melanin 생성을 억제한다고 보고되었다.

본 실험에서는 포도의 품종별로 껍질과 포도씨가 melanin 생성 억제 효과가 있는지  $\alpha$ -MSH 처리한 B16세포에 melanin 생성 억제효능을 측정하고 Tyrosinase의 발현량을 western blotting으로 확인하였다. 포도 품종은 생산량이 비교적 많은 세 종류를 선택하였다. melanin 생성 억제가 세포독성으로 인한 결과임을 피하기 위해 melanin 생성과 세포생존율을 같이 측정하여 비교하였고 이를 표-1과 같이 표시 하였다. 3종의 껍질에서는 세포 독성을 보이지 않았으나 Melanin 생성 억제 또한 보이지 않았다. 3종의 씨에서는 머루포도, 캠벨, 청포도 품종 모두 100  $\mu$ g/ml에서 독성을 보여 원료로서 적당치 않다고 보인다. 캠벨과 청포도 씨는 50  $\mu$ g/ml에서 각각 control 대비 48.8 ± 9.3%와 39.7 ± 11.0%의 세포 생존율을 보여 높은 독성을 보였으나 머루포도 씨 추출물은 대조구 대비 90.4 ± 11.3%의 세포 생존율을 보이면서 Melanin 생성을 50% 가까이 줄이는 효과를 보여 약간의 세포 독성을 보이기는 하나 세포 독성을 통한 melanin 생성 억제라기보다 다른 mechanism으로 melanin 생성을 억제하는 것으로 생각되어 melanin 생성 억제 신호기전을 연구하기 위한 sample로 결정하였다. Fig. 1의 Western blotting 결과에서 보이듯  $\alpha$ -MSH 처리 후 Tyrosinase의 발현량은 증가 하였고 머루포도 씨를 처리 하게 되면 농도의존적으로 Tyrosinase 발현량이 감소함을 확인하였다. 이미 포도씨 추출물이 B16세포의 melanin 생성을 억제한다는 보고가 있었다(Yamakoshi *et al.*, 2003). 그러나 품종별로 확인한 경우가 없어 본 실험을 통해 에는 한국에서 재배되는 대

표 세 품종을 통해 머루포도 씨 추출물이 세포독성이 약하면 서 Tyrosinase 발현량 증가를 억제함을 in vitro에서 확인하였다. 포도는 anthocyanins이 풍부한 것으로 알려져 있다. 서로 다른 anthocyanins는 다양한 생리활성 기능을 보이는데 포도의 품종별 혹은 부위별로 다른 anthocyanins의 함유와 함유량의 차이는 생리활성 기능에 있어서도 다를 것으로 생각해 볼 수 있다(Oh *et al.*, 2008). Yamakoshi의 논문에서는 procyanidins를 42.5와 54.4% 함유한 *Vitis vinifera* 추출물을 사용하였고(Yamakoshi *et al.*, 2003) 미백 효능을 보였다. 본 실험 system에서 세 종류의 포도 중 머루포도 씨가 유의하게 효능이 있는 것으로 나타났다. 머루포도 씨 성분 분석과 미백효능 평가를 통해 활성 성분에 대한 정보를 얻을 수 있을 것이며 미백 원료로서의 사용 가능성에 대해 고려해 볼 수 있을 것으로 생각된다. 좀 더 실

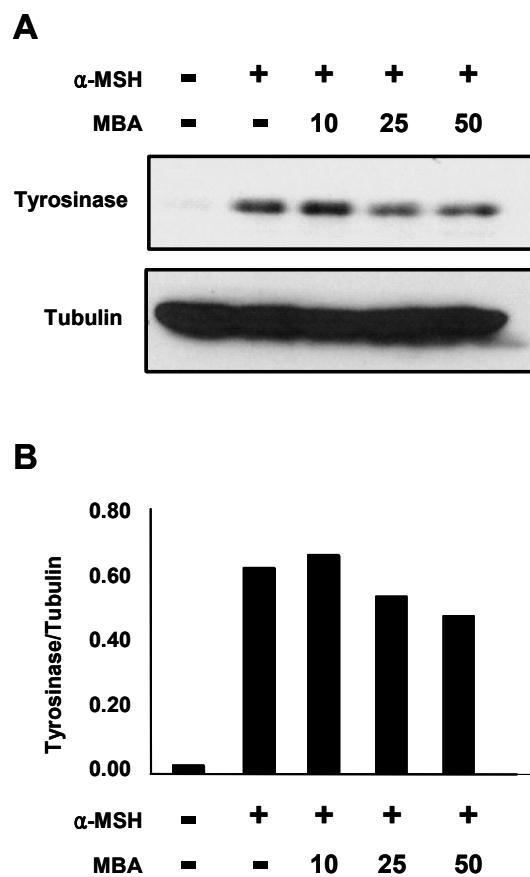


Fig. 1. Effect of Seed extract of Muscat Bailey A (10, 25 and 50  $\mu$ g/ml) on tyrosinase expression in  $\alpha$ -MSH (10 nM)-stimulated B16 cell. A. Western blotting B. Comparison of intensity (tyrosinase/tubulin).

힘이 필요한 내용은 1) 머루포도 씨 추출물의 어느 성분이 유효한 효능이 있는지 2) 추출물과 단일성분이  $\alpha$ -MSH에 의한 Tyrosinase 증가 신호전달과정에서 어느 부분에 영향을 주는지이며 실험을 계속 진행 중에 있다.

## 적 요

한국에서 주요하게 재배되는 세 개의 품종(캠벨, 청포도, 머루포도)을 대상으로 껍질과 씨 추출물의 미백효능을 검색하였다. Mouse melanoma인 B16세포에  $\alpha$ -MSH와 샘플을 처리하여 melanin 생성을 측정하였다. 세 품종의 껍질은 효과가 없었으며 캠벨과 청포도의 씨 추출물은 세포독성이 매우 강하였다. 머루포도 씨 추출물은 50  $\mu$ g/ml에서 대조구에 비해 melanin 생성은 51.6 ± 20.5% 이었으며 세포 생존율은 90.4 ± 11.3% 이어서 약간의 세포 독성에도 불구하고 melanin 생성 억제 효과가 뚜렷하였다. 머루포도 씨 추출물은 B16세포에서  $\alpha$ -MSH에 의한 tyrosinase 발현량 증가를 억제하였다. 이후 연구는 1) 머루포도 씨의 생리활성 단일물질 검색과 2)  $\alpha$ -MSH의 신호전달 과정에 추출물 및 생리활성 단일물질이 어떻게 영향을 미치는지를 하는 점이고 현재 실험에 진행 중에 있다.

## 사 사

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업지원 연구 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Abdel-Malek, Z., V.B. Swope, I. Suzuki, C. Akcali, M.D. Harriger, S.T. Boyce, K. Urabe and V.J. Hearing. 1995. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotrophic peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:1789-1793.
- 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.
- Jang, J.Y., J.H. Lee, B.W. Kang, K.T. Chung, Y.H. Choi and B.T. Choi. 2008. Dichloromethane fraction of *Cimicifuga heracleifolia* decreases the level of melanin synthesis by activating the ERK or AKT signaling pathway in B16F10 cells. Exp. Dermatol. 18:232-237.
- Kar, P., D. Laight, K.M. Shaw and M.H. Cumming. 2006. Flavonoid-rich grapeseed extracts: a new approach in high cardiovascular risk patients? Int. J. Clin. Pract. 60:1484-1492.
- Kim, D.S., Y.M. Jeong, I.K. Park, H.G. Hahn, H.K. Lee, S.B. Kwon, J.H. Jeong, S.J. Yang, U.D. Sohn and K.C. Park. 2007. A New 2-Imino-1,3-thiazoline Derivative, KHG22394, Inhibits Melanin Synthesis in Mouse B16 Melanoma Cells. Biol. Pharm. Bull. 30:180-183.
- Lee, J., E. Jung, J. Lee, S. Huh, Y.C. Boo, C.G. Hyun, Y.S. Kim and D. Park. 2007. Mechanism of melanogenesis inhibition by 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. Br. J. Dermatol. 157:242-248.
- Maeda, K., T. Naitou, K. Umishio, T. Fukukara and A. Motoyama. 2007. A Novel Melanin Inhibitor: Hydroperoxy Traxastane-Type Triterpene from Flowers of *Arnica montana*. Biol. Pharm. Bull. 30:873-879.
- Miyagi Y., K. Miwa and H. Inoue. 1997. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. Am. J. Cardiol. 80:1627-31.
- Miyamura, Y., S.G. Coelho, R. Wolber, S.A. Miller, K. Wakamatsu, B.Z. Zmudzka, S. Ito, C. Smuda, T. Passeron, W. Choi, J. Batzer, Y. Yamaguchi, J.Z. Beer and V.J. Hearing. 2006. Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. Pigment. Cell Res. 20:2-13.
- Oh Y.S., J.H. Lee, S.H. Yoon, C.H. Oh, D.S. Choi, E. Choe and M.Y. Jung. 2008. Characterization and Quantification of Anthocyanins in Grape Juices Obtained from the Grapes Cultivated in Korea by HPLC/DAD, HPLC/MS, and HPLC/MS/MS. J. Food Sci. 73:378-389.
- Ohguchi, K., Y. Akao and Y. Nozawa. 2005. Involvement of calpain in melanogenesis of mouse B16 melanoma cells. Mol. Cell. Biochem. 275:103-107.
- Schwahn, D.J., W. Xu, A.B. Herrin, E.S. Bales and E.E. Medrano. 2001. Tyrosine levels regulate the melanogenic response to alpha-melanocyte-stimulating hormone in human melanocyte: Implications for pigmentation and proliferation. Pigment. Cell Res. 14:32-39.
- Solano, F., S. Brigandt, M. Picardo and G. Ghanem. 2006. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. Pigment Cell Res. 19:550-571.
- Suzuki, I., R.D. Cone, S. Im, J. Nordlund and Z.A. Abdelmalkek. 1996. Binding of Melanotrophic Hormones to the Melanocortin Receptor MC1R on Human Melanocytes

- Stimulates Proliferation and Melanogenesis. *Endocrinology*. 137:1627-1633.
- Vitseva, O., S. Varghese, S. Chakrabarti, J.D. Folts and J.E. Freedman. 2005. Grapeseed and skin extracts inhibits platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 46:445-451.
- Yamaguchi, Y., M. Brenner and V.J. Hearing. 2007. The Regulation of Skin Pigmentation. *J. Biol. Chem.* 282:27557-27561.
- Yamakoshi, L., F. Otsuka, A. Sano, S. Tokutake and M. Saito. 2003. Lightening Effect on Ultraviolet-Induced Pigmentation of Guinea Pig Skin by Oral Administration of a Proanthocyanidin-Rich Extract from Grape Seeds. *Pigment. Cell Res.* 16:629-638.

(접수일 2009.6.17; 수락일 2009.8.11)