

Studies of Inhibitory Mechanism on Melanogenesis by Partially Purified *Asiasari radix* in α -MSH Stimulated B16F10 Melanoma Cells

Ji Yeon Jang¹, Ha Neui Kim¹, Yu Ri Kim¹, Byung Woo Kim^{2,4}, Yung Hyun Choi^{3,4} and Byung Tae Choi^{1,4*}

¹Division of Meridian and Structural Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University, Yangsan 626-870, Korea

²Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Sciences, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

³Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Donggeui University, Busan 614-851, Korea

⁴Blue-Bio Industry RIC, 995 Eomgwangro Busanjin-gu, Busan 614-714, Korea

Received July 20, 2010 / Accepted November 3, 2010

Recently, it has been found that *Asiasari radix* showed a hypopigmenting effect on melanogenesis through activation of mitogen-activated protein kinase (MEK)/extracellular signal-activated kinase (ERK) in B16F10 melanoma cells. However, the hypopigmenting effect of *A. radix* on the α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-stimulated melanogenesis has remained unknown. The purpose of this study was to investigate the inhibitory mechanism of the partially purified *A. radix* (PPAR)-induced hypopigmenting effects on α -MSH-stimulated melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cells. PPAR strongly inhibited tyrosinase activity and leads to decreased melanin synthesis in α -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells. PPAR also decreased the α -MSH-induced over-expression of the melanogenic enzymes, tyrosinase, tyrosinase-related protein (TRP)-1, dopachrome tautomerase (Dct) and microphthalmia-associated transcription factor (MITF). We further showed that PPAR inhibits α -MSH-induced melanogenesis via phosphorylation of MEK/ERK and PI3K/Akt, and that their activation was blocked by MEK inhibitors, PD98059 and PI3K inhibitors, LY294002 in α -MSH-stimulated B16F10 melanoma cells. These results suggest that PPAR inhibits α -MSH-induced melanogenesis by activation of MEK/ERK and PI3K/Akt through MITF degradation, which may lead to down-regulation of tyrosinase.

Key words : *Asiasari Radix*, α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), microphthalmia-associated transcription factor (MITF), mitogen-activated protein kinase (MEK)/extracellular signal-activated kinase (ERK), PI3K/Akt

서 론

멜라닌은 동식물계에 널리 분포하는 갈색 혹은 흑색의 고분자 색소로서 인간의 피부색을 결정하고 외부자극 인자인 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할을 한다. 멜라닌생성을 조절하는 것으로 자외선, cytokine, growth factor 및 호르몬 등이 있으며 중요한 역할을 하는 호르몬으로 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)이 있다[6,8]. α -MSH는 뇌하수체 중엽에서 분비되며 멜라닌세포에서만 발현 되는 막수용체인 MC1R (melanocortin 1 receptor)과 결합하여 adenylyl cyclase를 활성화시키고, 세포내 cAMP신호를 증폭시켜, protein kinase A (PKA)의 활성화를 유도하며, 세포내 cAMP response element binding protein (CREB)을 활성화시킴으로써 멜라닌 세포에 특이적 전사인자인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 발현을 증가시킨다[1,3,4].

MITF는 melanogenic enzyme인 tyrosinase와 TRP (Tyrosinase-Related Protein)의 발현을 자극하여, 멜라닌세포의 멜라닌 생성을 조절하는 것으로 알려져 있다[2,7,26]. α -MSH에 의한 멜라닌 생성에 관한 연구는 Schwahn 등[23]이 사람의 melanoma 세포에서 α -MSH가 tyrosinase 활성을 조절함으로써 멜라닌세포의 증식과 색소증가에 관여하는 것으로 보고하였으며, 또한 Hunt 등[12]의 보고에 의하면 α -MSH 유사물질인 $\text{Nle}^4\text{DPhe}^7\alpha$ -MSH에 의해 tyrosinase 활성이 증가 하고 멜라닌 세포의 dendrite 발달 등 형태적으로 멜라닌세포를 증가시킨다고 보고하였다.

최근 피부 착색에 대한 관심이 높아지면서 멜라닌 생성을 억제시키는 물질을 찾기 위한 다양한 연구가 이루어지고 있으며 특히 안정적이고 효과적인 미백 소재인 천연물로부터 멜라닌 생성을 억제시키는 물질을 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. Lee 등[19]은 α -MSH에 의한 과색소생성 유도 실험에서 딸기향과 같은 Sweet계 화합물 혹은 솔잎의 항산화 성분으로 알려진 furanone이 α -MSH에 의해 활성화된 cAMP 생성을 억제시키고, CREB의 인산화를 억제시킴으로써 tyrosinase

*Corresponding author

Tel : +82-510-7379, Fax : +82-510-1020

E-mail : choibt@pusan.ac.kr

및 MITF의 발현을 억제시킨다고 보고하였다. Kumar 등[17]은 비목나무의 열매 추출물인 lucidone이 B16 melanoma 세포에서 α -MSH에 의한 melanin 생성을 억제시키는데 이는 MITF 발현의 억제로 인하여 tyrosinase의 mRNA 발현과 활성 감소로 이어지는 결과로 추론하였다.

지금까지 미백효과를 나타내는 천연물에 관한 실험이 주로 α -MSH에 의해 유발된 멜라닌생성조건을 이용하여 이루어져 왔지만 이러한 천연물이 α -MSH에 의해 유도된 과색소생성 조건에서 어떠한 기전에 의해 이를 억제하는지에 대한 연구는 명확하게 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 선행 연구에서 hypopigmenting effect를 나타낸 세신추출물을 이용하여 α -MSH에 의해 유도된 멜라닌생성 조건에서 멜라닌생성 억제 효과와 관련 기전을 규명하는데 알아보려고 한다.

재료 및 방법

실험 재료

세신(*Asiasarum sieboldii*) 건조중량 300 g에 8 l의 증류수를 넣고 2시간 30분씩 2번 재탕하여 4,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후, 0.2 μ m 여과지로 여과하여 40°C에서 감압농축 하여 농축물을 얻었다. 이 건조농축물(102.3 g)을 증류수에 현탁 시킨 다음 에틸아세테이트(EtoAc), 부탄올(BuOH), 증류수의 순서로 분획하여 각각 21.6 g, 41.2 g, 37.1 g을 얻었다. 이중 미백활성을 나타낸 에틸아세테이트 층을 감압 증류하여 반고형 조추출물 얻었다. 이 조추출물 중 2.0 g을 소량의 증류수에 녹인 후 ODS (octadecylsilane) open column chromatography를 이용하여 여러 개의 분획으로 나누었다. 칼럼은 유리필터 칼럼 50×183 mm (내경×길이), 고정상은 ODS (YMC gel silica, 50 μ m, YMC CO., LTD.)를 사용하고, 용리액은 100% 증류수에서 시작하여 메탄올을 20%씩 증가시켜 사용하였다. 100% 메탄올 이후에는 dichloromethane으로 잔류물질을 세척하였다. 이와 같이 하여 얻은 7개의 분획을 감압농축하고 동결 건조 시켜 건조무게를 측정 후, 활성 실험을 실시하였다. 최종적으로 60% MeOH 분획(109.2 mg)을 세신추출물(partially purified *Asiasari radix*, PPAR)로 사용하였다.

시약 및 항체

Arbutin, α -MSH, 합성 melanin, L-DOPA, PD98059, LY294002 및 β -actin 항체 등은 Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA)에서, MITF (H-50)항체는 Millipore (Bedford, MA, USA)에서, phospho-MEK (pMEK, #9154), MEK (#9122), phospho-CREB (pCREB, 1B6), CREB (48H2) 항체 등은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서, phospho-Akt (pAkt, sc-7985), Akt (C-20), phospho-ERK1/2 (pERK1/2, E-4), ERK1/2 (K-23), phospho-p38 (pp38, D-8), p38 (H-147), tyrosinase (C-19), TRP1 (G-17), Dct

(D-18) 항체 등은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포 배양

B16F10 mouse melanoma 세포(CRL 6323, Manassas, VA, USA)는 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 및 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL) 등이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양한 B16F10 세포를 trypsin-EDTA (Gibco BRL)를 이용하여 적절한 수의 세포를 부유시킨 뒤 각 실험에 사용하였다.

세포내 멜라닌의 생성 측정

B16F10 세포에 α -MSH와 세신추출물을 함께 처리하여 5일간 배양하고 세포를 수거하여 Phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 수세하여 수확하였다. 10% dimethylsulfoxide (DMSO, Ameresco, Solon, Ohio, USA)가 첨가된 1 N NaOH 용액을 처리하여 80°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 멜라닌 정량은 합성멜라닌을 이용하여 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 475 nm에서 각각의 흡광도를 측정하여 농도별 표준곡선을 작성한 후 작성된 표준곡선에서 각 시료의 멜라닌 농도를 구하였다.

세포내 tyrosinase 활성 측정

B16F10 세포에 α -MSH와 세신추출물을 함께 처리하여 3일간 배양한 세포를 수확하여 lysis buffer (1% Triton X-100, 0.1 mM PMSF, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0)를 첨가하여 30분간 얼음에서 반응시켜 세포들을 용해시킨 후 원심 분리하여 상층액을 수집하였다. 수집한 용액에서 50 μ g의 단백질을 취하여 lysis buffer와 L-DOPA (2 mg/ml)를 첨가한 뒤 37°C에서 반응시키면서 흡광도의 변화를 1시간 동안 관찰하면서 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot 분석

B16F10 세포에 α -MSH와 세신추출물을 함께 처리하여 배양한 세포를 수확하여 적당량의 lysis buffer [50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, 100 units/ml aprotinin, 10 mM NaF, and 1 mM Na₃VO₄]를 첨가하여 30분간 얼음에서 반응시켜 세포들을 용해시킨 후 원심분리하여 상층액을 회수하였다. Bio-Rad 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Richmond, CA, USA)을 이용하여 단백질농도를 정량하였으며, 동량의 단백질(30 μ g)을 10~12% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel을 이용해 전기영동하고 이를 nitrocellulose membrane (Whatman, Germany)으로 전이시켰다. Membrane을 5% skim milk를 함유한 PBST (0.1% Tween 20

in PBS)에 1시간 반응시켜 비특이적 단백질에 대한 반응을 차단시킨 후, 각각의 1차 항체를 처리하여 실온에서 1시간 이상 또는 4°C에서 over night 시킨 다음 PBST로 세척하고 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit 이나 anti-mouse 혹은 anti-goat 2차 항체를 사용하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL, Perce Biotech, Rockford, IL, USA) 용액을 가하여 발색시켜서 단백질 발현을 확인하였다.

자료분석 및 통계방법

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였고 SigmaPlot (San Jose, CA, USA)을 이용하여 Student t-test를 이용하여 통계적 유의성을 얻었다. P 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

세신추출물의 α-MSH 자극에 의해 유도된 멜라닌생성 억제 효과

α-MSH에 의해 유도된 멜라닌생성 조건에서 세신추출물의 억제효과를 확인하기 위하여 B16F10 세포에 α-MSH와 세신추출물을 함께 처리하여 세포내 멜라닌 생성과 tyrosinase 활성을 조사하였다. Fig. 1A에서 보는 바와 같이 α-MSH만 처리한 경우에는 멜라닌 함량이 대조군에 비하여 뚜렷하게 증가한 것을 확인 할 수 있었으며, 세신추출물을 같이 처리한 경우에는 α-MSH 단독 처리한 경우에 비하여 멜라닌생성이 현저하게 억제되는 것으로 나타났다. 또한 세신추출물에 의한 억제효과는 기존의 tyrosinase inhibitor로 알려진 양성 대조군인 arbutin보다 뛰어난 것으로 보여 진다. 이러한 억제효과는 tyrosinase의 활성을 측정된 결과에서도 유사한 양상을 보였다 (Fig. 1B). 따라서 세신추출물은 α-MSH에 의해 유도된 멜라닌 생성과 tyrosinase 활성에 억제효과를 나타내는 것으로 사료 된다.

α-MSH 자극에 의해 과 발현된 멜라닌 합성 관련단백질 발현 억제 효과

세신추출물이 α-MSH 자극에 의해 유도된 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성을 억제 시키는 것을 확인하여 멜라닌합성 관련 단백질 발현에 대한 영향을 확인하기 위하여 Western blot으로 tyrosinase, TRP1, Dct 및 MITF 발현을 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 α-MSH를 단독 처리한 경우에 각 단백질의 발현이 현저하게 증가한 것을 확인 할 수 있었으며, 반면 세신추출물 처리한 경우에는 양성 대조군인 알부틴보다 각 단백질의 발현이 매우 뚜렷하게 억제된 것을 확인 할 수 있었다. 이는 세신추출물이 α-MSH에 의해 유도된 단백질의 발현을 억제하는 것을 보여주며 Fig. 1의 결과와 연관성이 있음을

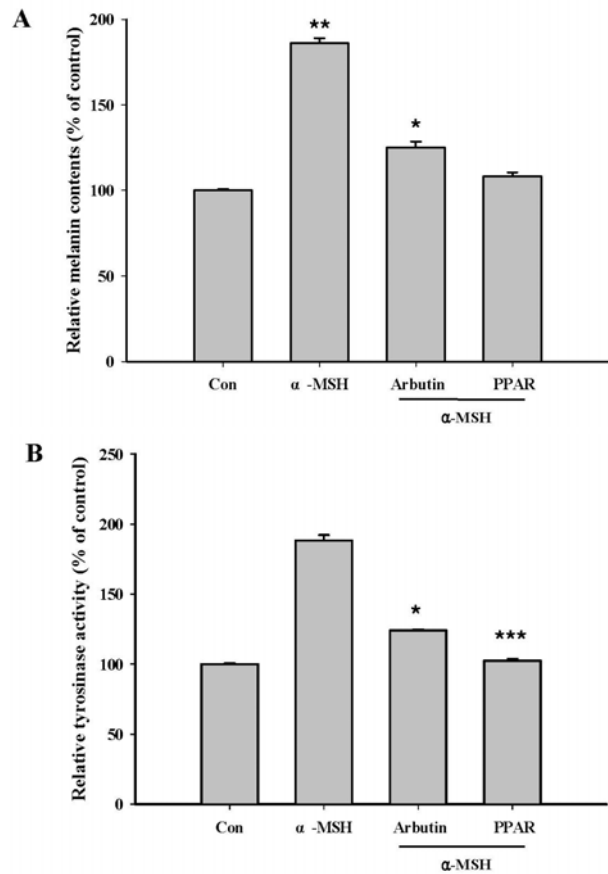


Fig. 1. Effect of PPAR on cellular melanin synthesis (A) and tyrosinase activity (B) in B16F10 cells. The cells were exposed to 200 nM α-MSH in the presence of 20 µg/ml of PPAR or 50 µg/ml arbutin. Each percentage value for the treated cells was reported relative to that of the control cells. The results shown are the means±SEM and are representative of three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to control.

시사한다. 또한 세신추출물은 tyrosinase 발현을 조절하는 전사인자인 MITF의 발현을 억제시키는 것으로 보아 α-MSH에 의해 유도된 tyrosinase의 발현 억제에는 세신추출물에 의한 MITF 발현의 감소가 영향을 미치는 것으로 사료된다.

α-MSH 자극조건에서 세신추출물의 melanogenesis 억제 신호 경로 조사

세포내 신호전달 경로 중 ERK 신호와 PI3K/Akt 신호는 세포내 신호전달 단백질로써 유전자 발현을 조절하는 인자로 알려져 있으며, ERK 신호와 PI3K/Akt 신호의 발현이 저해되면 멜라닌 생성이 증가한다고 알려져 있다[14-16]. 또한 앞선 연구에서 세신추출물에 의해 활성화된 MEK/ERK 신호에 의해 멜라닌 생성이 저해되었음을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 α-MSH 자극에 의한 멜라닌 생성 조건에서 세신추출물의 멜라닌 생성 억제 효과가 ERK 신호와 PI3K/Akt 신호와

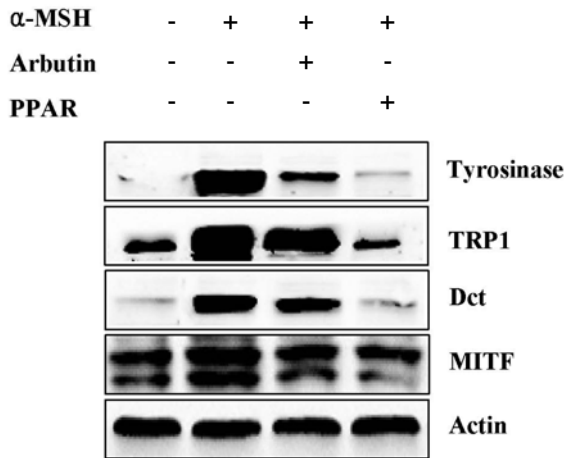


Fig. 2. Effect of PPAR on the expression of melanogenesis-related proteins in B16F10 cells. The cells were exposed to 200 nM α-MSH in the presence of 20 μg/ml of PPAR or 50 μg/ml arbutin for 48 h. The expression levels of tyrosinase, TRP1, Dct, MITF proteins were examined by Western blot. Equal protein loading was confirmed by β-actin expression.

연관 되어 있는지를 확인하기 위하여 특이적 억제제를 처리하여 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성 변화를 관찰하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 ERK의 특이적 억제제인 PD98059와 세신추출물을 함께 처리한 경우와 세신추출물을 단독으로 처리한 경우를 비교하였을 때 세신추출물에 의해 억제되었던 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성이 PD98059 처리에 의하여 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 세신추출물에 의해 활성화 되었던 ERK 신호가 PD98059에 의해 활성이 차단됨으로써 멜라닌 생성 억제 효과가 상대적으로 감소된 것으로 보인다. 이는 α-MSH 자극에 의한 멜라닌 생성 조건에서 세신추출물의 멜라닌 생성 억제 효과가 MEK/ERK 신호 활성화와 연관되어 있음을 시사한다. 또한 세신추출물의 멜라닌 생성 억제 효과가 PI3K/Akt 신호와 관련되어 있는지 확인하기 위해 Akt 신호 특이적 억제제인 LY294002와 세신추출물을 함께 처리하여 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성 변화를 관찰하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 LY294002와 세신추출물을 함께 처리한 경우에 세신추출물에 의해 억제되었던 멜라닌 함량과 tyrosinase 활성이 다시 증가된 것이 관찰되었다. 즉 α-MSH 자극에 의한 멜라닌 생성 조건에서 세신추출물의 멜라닌 생성 억제 효과는 PI3K/Akt 신호 활성화와도 관련되어 있음을 알 수 있었다.

Melanogenesis 억제 신호전달단백질의 발현에 대한 세신추출물의 영향

α-MSH 자극에 의해 유도된 멜라닌 생성조건에서 ERK 신호와 PI3K/Akt 신호 각각의 억제제를 이용하여 세신추출물이 ERK 신호와 PI3K/Akt 신호의 활성화를 통하여 멜라닌 생성과 tyrosinase 활성을 억제하는 것을 확인하였다. 다음으로 세신

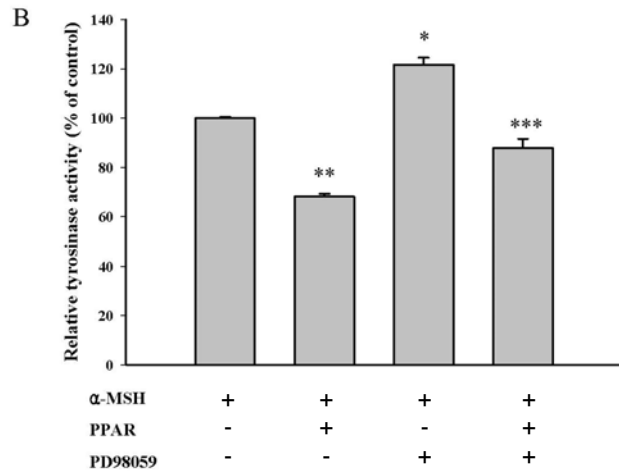
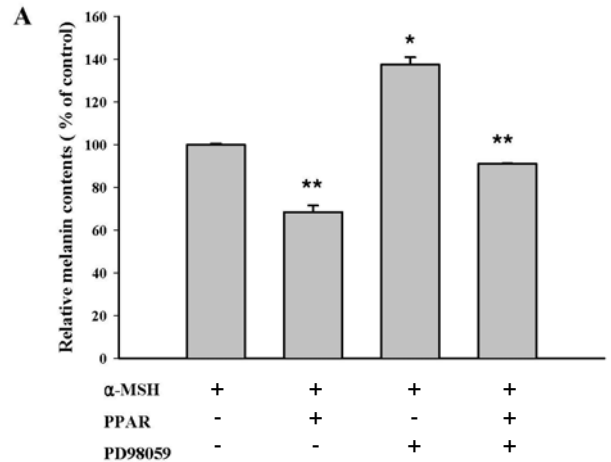


Fig. 3. Effect of PD98059 pretreatment on cellular melanin synthesis (A) and tyrosinase activity (B) in B16F10 cells. The cells were exposed to 200 nM α-MSH in the presence of 20 μg/ml of PPAR and 20 μM of PD98059. The results shown are the means±SEM and are representative of three independent experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared to control.

추출물에 의해 억제되었던 멜라닌 합성에 관련된 단백질 발현이 ERK 신호와 PI3K/Akt 신호 차단제인 PD98059와 LY294002에 의해 변화를 보이는지를 조사하였다. Fig. 5A에서 보는 바와 같이 ERK의 특이적 억제제인 PD98059와 세신추출물을 같이 처리한 경우에는 세신추출물에 의해 억제되었던 tyrosinase, TRP1, Dct 및 MITF 단백질의 발현이 다시 증가되는 것을 확인하였고, Fig. 5B는 세신추출물에 의해 MEK/ERK 활성이 증가하며 저해제 처리에 의해 감소하나 세신추출물과 저해제를 함께 처리하면 다소 회복되는 경향을 보였다. 이상의 결과는 Akt 신호 특이적 억제제인 LY294002를 처리하였을 경우에도 유사한 결과를 나타내었다. 그리고 멜라닌 생성 과정에서 α-MSH가 PKA를 활성화 통해 CREB를 인산화 시켜 멜라닌 생성을 촉진시키는 경로와 또 다른 멜라닌 생성을 촉진하는 신호경로로 알려진 p38 MAPK 경로를 확인하였으나

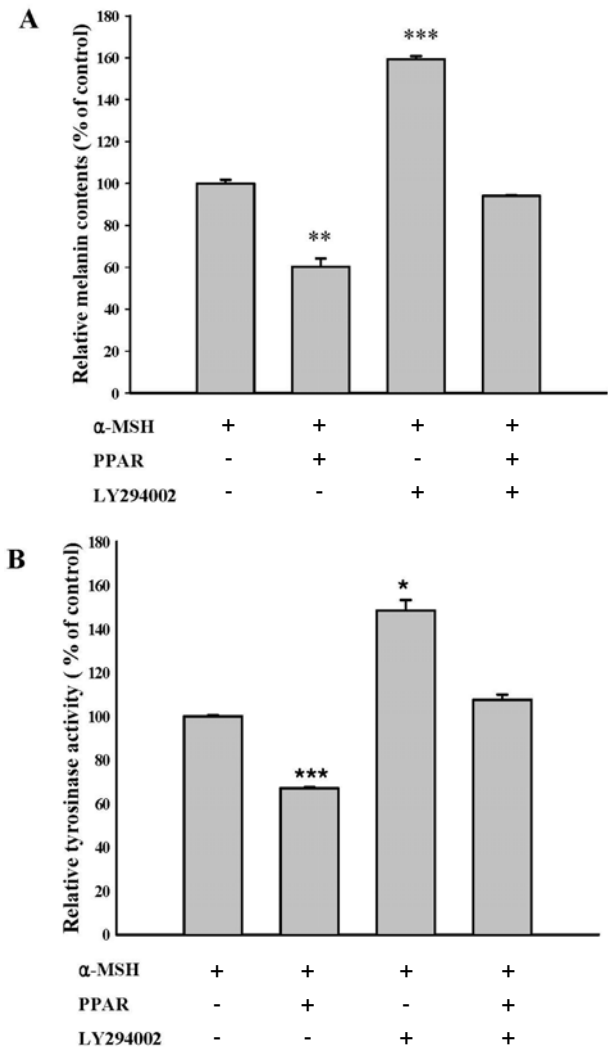


Fig. 4. Effect of LY294002 pretreatment on cellular melanin synthesis (A) and tyrosinase activity (B) in B16F10 cells. The cells were exposed to 200 nM α-MSH in the presence of 20 μg/ml of PPAR and 20 μM of LY294002. The results shown are the means±SEM and are representative of three independent experiments. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 compared to control.

CREB 활성이 저해제에 의해 증가되나 현저한 변화는 보여주지 않았다.

고 찰

세신은 족두리풀의 뿌리를 건조시킨 것으로 오랜 기간 동안 두통, 천식, 관절염, 신경통, 해열작용 및 항균작용 등에 이용되어 왔으며, 피부의 색소침착 등에 처방되어 왔다[9,18,24]. 최근의 선행 연구를 통해 세신으로부터 분리한 ethyl acetate의 60% MeOH ODS분획물이 멜라닌 생성 억제 효과가 있는 것으로 조사되었으며, 이러한 멜라닌생성 억제 효과가

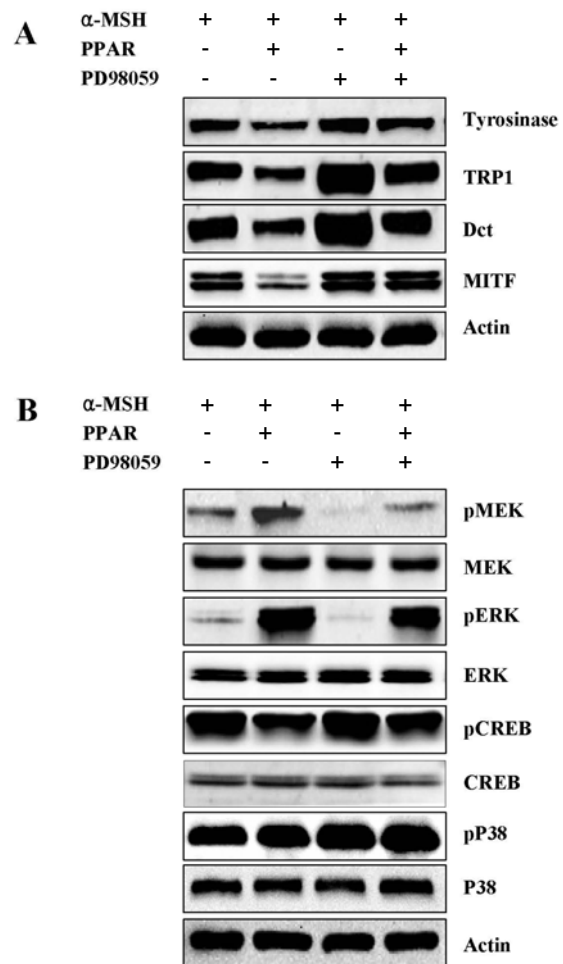


Fig. 5. Effect of PD98059 on the expression of melanogenesis-related proteins (A) and MEK/ERK, CREB, p38 MAPK phosphorylation (B) in PPAR-treated B16F10 cells. The cells were exposed to 200 nM α-MSH in the presence of 20 μg/ml of PPAR and 20 μM of PD98059 for 48 hr. The expression levels of phosho-MEK, MEK, phosho-ERK, ERK, phosho-CREB, CREB, phosho-p38, p38 proteins were examined by Western blot. Equal protein loading was confirmed by β-actin expression.

MEK/ERK 신호의 활성화에 의해서 일어나는 것을 확인 하였다[13]. 현재까지 세신의 멜라닌생성 억제 기전을 탐색하기 위한 연구가 진행되고 있으나, 멜라닌 생성을 촉진하는 것으로 알려진 α-MSH와 관련되어 세신의 멜라닌합성 억제기전에 관한 연구는 아직까지 많이 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 α-MSH로 멜라닌 생성을 자극한 B16F10 세포에 세신추출물을 함께 처리하여 멜라닌 생성량과 tyrosinase 활성을 조사하고, α-MSH 자극으로 유도된 멜라닌 생성을 억제하는데 관련된 분자생물학적 억제기전을 조사하였다. 먼저 세신추출물이 α-MSH 자극으로 유도된 멜라닌 생성을 억제시키는지 조사하기 위하여 B16F10

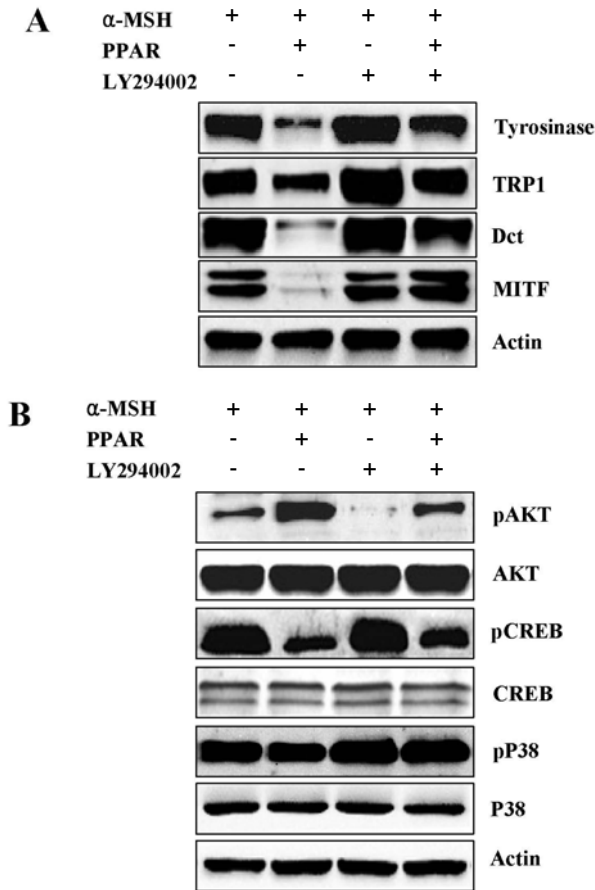


Fig. 6. Effect of LY294002 on the expression of melanogenesis-related proteins (A) and Akt, CREB, p38 MAPK phosphorylation (B) in PPAR-treated B16F10 cells. The cells were exposed to 200 nM α -MSH in the presence of 20 μ g/ml of PPAR and 20 μ M of LY294002 for 48 hr. The expression levels of phosho-Akt, Akt phosho-CREB, CREB, phosho-p38, p38 proteins were examined by Western blot. Equal protein loading was confirmed by β -actin expression.

mouse melanoma 세포에 α -MSH와 세신추출물을 함께 처리하여 멜라닌 생성과 tyrosinase 활성을 조사하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 세신추출물은 α -MSH에 의해 현저하게 증가된 멜라닌 생성과 tyrosinase 활성을 모두 유의성 있게 억제시키는 것으로 나타났으며 이러한 억제 효과는 전형적인 tyrosinase inhibitor로 알려진 arbutin보다 억제효과가 뛰어난 것으로 보인다.

일반적으로 멜라닌 생성을 유도하는 것으로 알려진 α -MSH는 멜라닌 합성에 있어서 가장 중심적인 요소인 tyrosinase의 활성을 촉진시킬 뿐만 아니라 멜라닌 합성에 관여하는 또 다른 효소인 tyrosinase-related protein (TRP)에 작용하여 멜라닌을 합성하도록 유도하는 것으로 알려져 있다[2,12]. 따라서 세신추출물이 α -MSH 자극에 의해 발현되는 멜라닌 합성 관련

단백질을 억제하는지를 밝히기 위해 melanogenesis 관련 단백질의 발현 변화를 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 세신추출물은 α -MSH 자극에 의해 과발현 된 tyrosinase, TRP1, Dct 단백질의 발현을 매우 강하게 억제시키는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 tyrosinase 발현을 조절하는 전사인자인 MITF의 발현도 강하게 억제시키는 것을 확인하였다. 이상의 결과에서 세신추출물은 α -MSH에 의하여 유도된 멜라닌 합성을 저해하는 것으로 보여지며, 이러한 억제효과는 멜라닌 생성 관련 단백질의 발현을 조절함으로써 나타나는 것으로 사료된다.

한편 멜라닌 생성 신호전달경로는 cAMP/PKA를 비롯하여 diacylglycerol/ protein kinase C (DAG/PKC) 경로와 Ras 활성화에 의존적인 mitogen activated protein kinase (MAPK) 등의 경로가 존재한다[10,21,22]. cAMP/PKA 및 PKC 신호가 MITF의 발현을 증가시켜 tyrosinase의 발현을 증가시키며 멜라닌 생성을 촉진시키는 반면에, 주로 세포의 증식, 분화에 관여하는 것으로 알려진 MAPK 경로에 속하는 ERK 신호는 MITF의 인산화를 유도하여 MITF의 ubiquitination이 이루어져 proteosomal degradation을 일으키게 됨으로써 멜라닌 생성을 감소시키는 것으로 알려져 있다[14,25].

앞선 선행 연구에서 세신추출물의 멜라닌 생성 억제에는 ERK의 활성화가 관련되어 있음을 확인 하였다[13]. 그러므로 α -MSH 자극에 의해 유도된 멜라닌 생성조건에서도 세신추출물에 의해 나타나는 ERK의 활성화가 연관되어 있는지를 알아보기 위하여 ERK 신호에 특이적 억제제인 PD98059를 사용하여 멜라닌 생성과 tyrosinase 활성을 조사하였다. ERK 신호가 차단됨으로써 세신추출물에 의해 억제되었던 멜라닌 생성과 tyrosinase 활성이 다시 증가되는 것이 관찰 되었으며(Fig. 3), 또한 세신추출물에 의해 억제되었던 tyrosinase, TRP 및 MITF 발현도 PD98059에 의해 회복되며 세신추출물에 의한 MEK/ERK 활성화도 저해하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

한편 또 다른 멜라닌생성 관련 신호로써 PI3-kinase/Akt 신호의 활성화가 멜라닌 생성 억제 기작과 관련 있는 것으로 알려져 있다[20]. 세포내 신호전달경로에 있어서 Akt 신호는 ClassIA PI3-kinase 하부 시그널로 알려져 있으며 CREB 등과 함께 세포의 성장 및 anti-apoptotic 신호를 조절하는 단백질로 알려져 있다[5,11]. 그러나 최근 Kim [16] 등의 보고에 의하면 C₂-ceramide에 의해 Akt/PKB신호 활성화에 의해 멜라닌세포의 증식이 억제되며 더욱이 멜라닌형성을 억제한다고 보고 하였다. 즉, 멜라닌생성 과정에서 PI3-kinase/Akt 신호의 활성화는 MEK/ERK 신호와 마찬가지로 멜라닌생성 억제기작과 연관되어 있는 것으로 보여 진다. Akt에 특이적 억제제인 LY294002 처리는 세신추출물에 의해 억제되었던 멜라닌생성과 tyrosinase 활성을 다시 증가시켰으며(Fig. 4), 또한 세신추출물에 의해 억제되었던 tyrosinase, TR1, Dct 및 MITF 발현을 회복하며 세신추출물에 의한 Akt 활성화도 저해하는 것을 확인

할 수 있었다(Fig. 6).

멜라닌생성과 연관된 또 다른 경로인 CREB와 p38 MAPK 활성을 보면 p38 MAPK 변화는 없었으나 CREB 활성에 다소 영향을 주고 있어 이의 연관 가능성이 있다. 그러나 α -MSH 자극에 의해 유도된 멜라닌 생성에서 세신추출물에 의한 멜라닌 생성 억제 기전에는 주로 MEK/ERK 및 PI3K/Akt 활성을 통해 조절되는 것으로 보여 진다. 따라서 본 연구는 천연물을 이용한 미백제제 개발에 있어 중간 신호전달 기전을 제어함으로써 tyrosinase 활성을 억제 할 수 있는 새로운 미백제에 대한 좋은 예로 활용할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부·부산광역시 지원 지역혁신센터사업 동의대학교 블루바이오소재개발 및 실용화지원센터(RIC08-06-07) 지원에 의하여 이루어진 결과입니다.

References

- Bertolotto, C., P. Abbe, T. J. Hemesath, K. Bille, D. E. Fisher, J. P. Ortonne, and R. Ballotti. 1998. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J. Cell Biol.* **142**, 827-835.
- Bertolotto, C., R. Buscà, P. Abbe, K. Bille, E. Aberdam, J. P. Ortonne, and R. Ballotti. 1998. Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol. Cell Biol.* **18**, 694-702.
- Chakraborty, A. K., Y. Funasaka, A. Slominski, G. Ermak, J. Hwang, J. M. Pawelek, and M. Ichihashi. 1996. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim. Biophys. Acta.* **1313**, 130-138.
- Cheli, Y., F. Luciani, M. Khaled, L. Beuret, K. Bille, P. Gounon, J. P. Ortonne, C. Bertolotto, and R. Ballotti. 2009. Alpha-MSH and Cyclic AMP elevating agents control melanosome pH through a protein kinase A-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **284**, 18699-18706.
- Coffer, P. J., J. Jin, and R. Woodgett. 1998. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem. J.* **335**, 1-13.
- Costin, G. E. and V. J. Hearing. 2007. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* **21**, 976-994.
- Fuller, B. B., J. B. Lunsford, and D. S. Iman. 1987. Alpha-melanocyte-stimulating hormone regulation of tyrosinase in Cloudman S-91 mouse melanoma cell cultures. *J. Biol. Chem.* **262**, 4024-4033.
- Funasaka, Y. A., K. Chakraborty, Y. Hayashi, M. Komoto, A. Ohashi, M. Nagahama, Y. Inoue, J. Pawelek, and M. Ichihashi. 1998. Modulation of melanocyte-stimulating hormone receptor expression on normal human melanocytes: evidence for a regulatory role of ultraviolet B, interleukin-1 α , interleukin-1 β , endothelin-1 and tumour necrosis factor- α . *Br. J. Dermatol.* **139**, 216-224.
- Han, Y. and S. J. Kim. 2003. Memory enhancing actions of *Asiasari radix* extracts via activation of insulin receptor and extracellular signal regulated kinase (ERK) I/II in rat hippocampus. *Brain Res.* **974**, 193-201.
- Hemesath, T. J., E. R. Price, C. Takemoto, T. Bagdalian, and D. E. Fisher. 1998. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-kit signaling in melanocytes. *Nature* **391**, 298-301.
- Hemmings, B. A. 1997. Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions. *Science* **275**, 628-630.
- Hunt, G., C. Todd, J. E. Cresswell, and A. J. Thody. 1994. Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle⁴DPhe⁷alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J. Cell Sci.* **107**, 205-211.
- Jang, J. Y., J. H. Lee, H. K. Shin, Y. H. Choi, J. D. Lee, and B. T. Choi. 2010. Partially purified *Asiasari radix* inhibits melanogenesis through extracellular signal-regulated kinase signaling in B16F10 cells. *Int. J. Mol. Med.* **25**, 287-292.
- Kim, D. S., E. S. Hwang, J. E. Lee, S. Y. Kim, S. B. Kwon, and K. C. Park. 2003. Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *J. Cell Sci.* **116**, 1699-1706.
- Kim, D. S., S. Y. Kim, J. H. Chung, K. H. Kim, H. C. Eun, and K. C. Park. 2002. Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cell Signal* **14**, 779-785.
- Kim, D. S., S. Y. Kim, S. J. Moon, J. H. Chung, K. H. Kim, K. H. Cho, and K. C. Park. 2001. Ceramide inhibits cell proliferation through Akt/PKB inactivation and decreases melanin synthesis in Mel-Ab cells. *Pigment Cell Res.* **14**, 110-115.
- Kumar, K., J. C. Yang, F. H. Chu, S. T. Chang, and S. Y. Wang. 2010. Lucidone, a novel melanin inhibitor from the fruit of *Lindera erythrocarpa* Makino. *Phytother. Res.* **24**, 1156-1165.
- Lee, J. Y., S. S. Moon, and B. K. Hwang. 2005. Isolation and antifungal activity of kakuol, a propiophenone derivative from *Asarum sieboldii* rhizome. *Pest. Manag. Sci.* **61**, 821-825.
- Lee, J., E. Jung, J. Lee, S. Huh, Y. C. Boo, C. G. Hyun, Y. S. Kim, and D. Park. 2007. Mechanisms of melanogenesis inhibition by 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *Br. J. Dermatol.* **157**, 242-248.
- Lee, J., K. Jung, Y. S. Kim, and D. Park. 2007. Diosgenin inhibits melanogenesis through the activation of phosphatidylinositol-3-kinase pathway (PI3K) signaling. *Life Sci.* **81**, 249-254.
- Park, H. Y., C. Wu, L. Yonemoto, M. Murphy-Smith, H. Wu, C. M. Stachur, and B. A. Gilchrist. 2006. MITF mediates cAMP-induced protein kinase C-beta expression in human melanocytes. *Biochem. J.* **395**, 571-578.
- Price, E. R., H. F. Ding, T. Badalian, S. Bhattacharya, C.

- Takemoto, T. P. Yao, T. J. Hemesath, and D. E. Fisher. 1998. Lineage-specific signaling in melanocytes. C-kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia. *J. Biol. Chem.* **273**, 17983-17986.
23. 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 melanocytes: implications for pigmentation and proliferation. *Pigment Cell Res.* **14**, 32-39.
24. Suzuki, Y., M. Yuzurihara, T. Hibino, S. Yano, and Y. Kase. 2009. Aqueous extract of *Asiasari radix* inhibits formalin-induced hyperalgesia NMDA receptors. *J. Ethnopharmacol.* **123**, 128-133.
25. Xu, W., L. Gong, M. M. Haddad, O. Bischof, J. Campisi, E. T. Yeh, and E. E. Medrano. 2000. Regulation of Microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugation enzyme hUBC9. *Exp. Cell Res.* **255**, 135-143.
26. Yokoyama, K., H. Suzki, K. Yasumoto, Y. Tomita, and S. Shibahara. 1994. Molecular cloning and functional analysis of a cDNA coding for human DOPachrome tautomerase/tyrosinase-related protein-2. *Biochem. Biophys. Acta.* **1217**, 317-321.

초록 : 세신추출물이 α -MSH 자극에 의한 B16F10 세포의 멜라닌생성에 미치는 영향

장지연¹ · 김하늬¹ · 김유리¹ · 김병우^{2,4} · 최영현^{3,4} · 최병태^{1,4*}

(¹부산대학교 한의학전문대학원 경락구조의학부, ²동의대학교 자연과학대학 생명응용과학과, ³동의대학교 한의과대학 생화학교실, ⁴동의대학교 블루바이오소재개발 및 실용화지원센터)

α -MSH는 세포내 cAMP를 증폭시켜 멜라닌세포의 증식과 색소 증가에 관여한다. 본 연구에서는 α -MSH로 자극한 B16F10 세포에서 세신추출물의 hypopigmenting 효과를 조사하고 그 억제기전에 대하여 조사하였다. 세신추출물은 α -MSH에 의해 유도된 tyrosinase 활성과 멜라닌생성을 효과적으로 억제시켰으며, 이는 tyrosinase 발현을 조절하는 전사인자인 MITF의 발현억제와 연관성이 있었다. 즉 세신추출물은 MEK/ERK와 PI3K/Akt의 활성화를 통하여 MITF를 조절함으로써 α -MSH에 의해 유도되는 tyrosinase, TRP-1, Dct 등 멜라닌생성관련 단백질을 억제함으로써 멜라닌생성을 저해하는 것으로 사료된다.