

MSH에 의해 자극된 B16F10세포에서 사간(射干)의 멜라닌 합성 억제 효과

김대성¹ · 성병곤¹ · 이장천² · 이부균³ · 우원홍^{1,4*} · 임규상^{1,4}

¹ 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

² 부산대학교 한의학전문대학원 약물학부

³ 세명대학교 본초방제학교실

⁴ 원광대학교 한국전통의학연구소

Inhibitory Effect of *Belamcandae Rhizoma* on the Melanogenesis in MSH-stimulated B16F10 cells

Dae-Sung Kim¹ · Byung-Gon Sung¹ · Jang-Cheon Lee² · Boo-Kyun Lee³ · Won-Hong Woo^{1,4*} · Kyu-Sang Lim^{1,4}

Objective : The present study was designed to assess the potential inhibitory activity of an ethanol extract of *Belamcandae Rhizoma* (EBR) on the alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-induced melanogenesis signal pathway in B16F10 melanoma cells.

Methods : Several experiments were performed in B16F10 melanoma cells. We studied tyrosinase activity, melanin content, cell-free tyrosinase activity and DOPA stain, and performed Western blots and RT-PCR for proteins and mRNA involved in melanogenesis.

Results : α -MSH-induced tyrosinase activity and melanin content were inhibited significantly by EBR. EBR markedly suppressed the protein expression level of tyrosinase in B16F10 melanoma cells. On the other hand, the expression of tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) and -2 (TRP-2; DCT) were not affected by EBR. To elucidate the mechanism of the depigmenting property of EBR, we examined the involvement EBR in cAMP response element binding (CREB) protein phosphorylation and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) signalling induced by α -MSH. EBR did not regulate CREB phosphorylation and MITF expression by α -MSH. Nevertheless, the mRNA expression of tyrosinase was significantly attenuated by EBR treatment without changes in the expression of TRP-1 and -2 mRNA.

Conclusion : Our study suggested that EBR inhibits α -MSH-induced melanogenesis by suppressing tyrosinase mRNA.

Key words : *Belamcandae Rhizoma*, melanin, tyrosinase, α -MSH

서 론

멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 멜라닌세포의 멜라닌소체(melanosome)에서 합성되어 수상돌기를 통해 표피의 각질화세포(keratinocyte)로 이동되어 피부의 색을 나타내고, 자외선이나 외부자극으로부터 피부를 보호하는 긍정적인 기능을 하고 있다. 그러나 과도한 멜라닌 생성과 비정상적인 분포는 기미와 주근깨를 형성하거나 노화로 인한 반점 같은 비정상적인 과색소침착의 원인이 될 수 있다.

멜라닌 합성은 tyrosinase에 의해 아미노산의 일종인 tyrosine이 dopaquinone으로 전환되는 반응에 의해 시작된다. Dopaquinone은 티올 그룹(thiol group) 존재 하에서 dopachrome으로 전환되고, tyrosinase related protein(TRP)-2에 의해 dopachrome을 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid로, TRP-1에 의해 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 전환되는 일련의 반응을 거쳐 멜라닌이 형성된다^{1,2)}. 주요한 세포 내 신호전달 경로는 cyclic monophosphate/protein kinase A(cAMP/PKA) 경로로서, cAMP는 PKA, cAMP responsive element binding protein 1(CREB1)을 경유하여 Microphthalmia-associated transcription factor(MITF)의 발현을 촉진한다. MITF는 멜라닌 합성 과정에서 중요한 전사 조절 인자로 tyrosinase, TRP-1와 TRP-2의 전사를 촉진하는 것으로 알려져 있다^{3,4)}.

cAMP 유도 물질인 α -Melanocyte stimulating hormone(α -MSH)은 proopiomelanocortin(POMC)에서 기인하는 신경 펩티드로 뇌하수체뿐만 아니라 피부를 포함한 여러 장기에서 생성되며 피부에서는 각질형성세포, 멜라닌세포, 랑거한스세포, 섬유아세포 및 내피세포 등에서 생성된다. α -MSH

는 Melanocortin-1 receptor(MC1R)를 통해 세포 내 cAMP를 증가시킨다⁵⁾.

Tyrosinase의 기능 억제제는 비정상적인 멜라닌 합성을 개선하거나 예방하기 위한 중요한 표적으로 인식 되고 있다. Tyrosinase는 구리를 포함하고 있는 당단백질로서 그 기능을 조절하기 위해 경쟁적-비경쟁적 tyrosinase 활성 억제, tyrosinase의 성숙과정 방해 및 분해, 안정성의 감소, 전사인자 및 mRNA 조절 등 많은 접근방법이 제시되고 있다.

본 실험에 사용된 사간(*Belamcandae Rhizoma*)은 붓꽃과(Iridaceae)의 다년생 초본인 범부채(*Belamcanda chinensis*)의 뿌리를 건조한 것으로 mangiferin, irishfloreantin belamcandin, belamcandol A, B, tectoridin, tectorigenin, iridin 등의 성분이 있으며, tectoridin와 tectorigenin은 항암 작용과 항염 작용이 있음이 보고되었다^{6,7)}. 선행된 연구에서 사간 에탄올추출물만 처리하였을 때 tyrosinase 활성이 증가됨을 보고하였으나⁸⁾, α -MSH에 의한 과색소침착에 미치는 영향에 관해선 아직 보고되지 않았다. 본 연구에서는 α -MSH에 의해 멜라닌 합성이 활성화된 세포에서 사간 에탄올추출물의 미백 효과를 조사하였으며, CREB 및 MITF의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시료 추출

실험에 사용된 사간(射干, *Belamcandae Rhizoma*)은 한약재시장에서 구입한 것을 원광대학교 한의학전문대학원의 약재보관 냉동고에 보관하며 사용하였다. 사간 200 g에 100% 에탄올 2000 ml를 가하고 밀봉하여 24시간 동안 실온에서 진탕하고 1시간 초음파분쇄기로 처리하였으며, 동일한 과정을 3회 반복하였다. 이를 거르로 여과하여 감압농축하고, 동결건조하여 시료 9.91g(수득률: 4.96%)

교신저자 : 우원홍, 전라북도 익산시 신용동 344-2번지, 원광대학교
한의학전문대학원 한약자원개발과(Tel : 063-850-5963,
Fax : 063-850-5195, e-mail : whwoo@wku.ac.kr)
• 접수 2011/03/04 • 수정 2011/03/29 • 채택 2011/04/05

을 얻어 냉동 보관하였다. 시료는 DMSO에 녹여 사용하였다.

2. 시 약

Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS)은 Gibco사(USA) 제품을, dimethylsulfoxide (DMSO), α -melanocyte stimulating hormone(α -MSH), ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA), phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF), triton X-100, L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA), thiazolyl blue tetrazolium bromide는 Sigma사(USA) 제품을, protein assay 시약은 Bio-rad사(USA) 제품을 사용하였고, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) 시약은 Sigma사(USA) 제품을 사용하였다.

3. 세포주 및 세포배양

실험에 사용한 세포주는 B16/F10 멜라닌 세포주를 사용하였으며, 5% fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)을 사용하여 CO₂ incubator(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

4. 세포독성 측정

세포생존을 측정은 Mosmann의 방법⁹⁾에 의하여 실시하였다. 24-well plate에 B16/F10 세포를 5×10³ 개를 분주하여 24시간동안 배양한 후 시간 에탄올추출물을 농도별로 처리하고 24시간 배양하였다. 배양완료 후 0.5 mg/ml MTT용액을 넣어 3시간 37°C에서 배양한 다음 상층액을 제거하고 formazan을 DMSO 1ml를 넣어 30분간 실온에서 방치한 후 570 nm의 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 측정하였다.

5. Tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 등의 방법¹⁰⁾으로 측정하였다. B16/F10 세포를 6-well 배양용기에 8×10⁴ cells/well씩 분주하여 24시간 동안 배양한 후 시간 에탄올추출물과 α -MSH(100 nM)을 처리하고 3일간 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 PBS로 세척하고, lysis buffer(5 mM EDTA, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8), 1%(V/V) Triton X-100, 0.1 mM PMSF)로 세포를 용해하였다. 4°C, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리를 하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성 측정 용액으로 사용하였고, Bradford 법으로 595 nm에서 흡광도를 측정, 동량의 단백질 양을 계산하였다. 시료 50 μ l와 0.1 M sodium phosphate buffer 150 μ l, 0.1%(W/V) L-DOPA 50 μ l를 분주하여 혼합한 후 ELISA reader기로 37°C에서 405 nm의 파장으로 1시간동안 30분 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다. 활성율은 대조군의 흡광도를 기준으로 한 백분율로 환산하여 결과로 나타내었다.

6. 세포내 멜라닌 합량 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등의 방법¹¹⁾을 변형하여 사용하였다. B16/F10 세포를 직경 10 cm 배양용기에 3×10⁵ cells/dish로 분주하여 24시간 동안 부착시킨 후, 시간 에탄올추출물과 α -MSH(100 nM)를 각각 처리하여 3일 동안 배양하였다. 각 군당 2×10⁶ 개의 세포를 수거하여 멜라닌을 측정하였다. Lysis buffer(5 mM EDTA, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8), 1%(V/V) Triton X-100)로 세포를 용해하고 원심 분리하여 얻은 세포침전물에 알코올을 가하여 세척한 후 건조시켰다. 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액을 첨가하여 95°C에서 1시간 동안 멜라닌을 용해시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. Cell-free tyrosinase 측정

B16/F10 세포를 배양하여 PBS로 세척하고 lysis buffer(5 mM EDTA, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8), 1%(V/V) Triton X-100, 0.1 mM PMSF)로 세포를 용해하였다. 4℃, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리를 하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성측정 용액으로 사용하였다. 시료 50 μ l와 0.1M sodium phosphate buffer 150 μ l, 0.1%(W/V) L-DOPA 50 μ l를 각각 분주하여 혼합한 후 ELISA reader기로 37℃에서 405 nm의 파장으로 1시간동안 30분 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다. tyrosinase 활성도는 대조군의 흡광도를 기준으로 한 백분율로 환산하여 결과로 나타내었다.

8. DOPA 염색

B16/F10 세포를 chamber slide에 배양하고 시료와 α -MSH를 처리한 후 3일간 배양하였다. 배양한 배지를 버리고 PBS로 3회 세척하고 5%(V/V) formalin 용액으로 고정하였다. 0.1%(W/V) L-DOPA 용액으로 실온에서 4시간 염색하고 탈수하여 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다.¹²⁾

9. Western blot 분석

B16/F10 세포를 10 cm 배양용기에 3×10^5 개의 세포를 부착시키고 시료를 처리한 후 3일 동안 배양하였다. 배양된 세포를 모두 수거하여 lysis buffer(1 \times RIPA buffer 1 ml, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 2 mM DTT)로 30분간 용해시킨 후, 4℃ 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 총 단백질량은 Bradford 방법을 이용하여 정량하였고, 40 μ g 단백질과 2X sample buffer(1 ml of glycerol, 0.5 ml of β -mercaptoethanol, 3 ml of 10%

(W/V) SDS, 1.25 ml of 1 M Tris-HCl, 1~2 μ g of bromophenol blue)를 동량으로 혼합한 후 7.5% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. Nitrocellulose membrane에 전이시키고 5%(W/V) non-fat skim milk로 blocking 시킨 후, tyrosinase, actin, TRP-1, TRP-2의 일차항체(antibody)를 1:1000으로 희석하여 각각 실온에서 3시간 반응시켰다. TBST로 3회 세척한 후, tyrosinase는 anti-rabbit HRP로, actin, TRP-1 및 TRP-2는 goat polyclonal IGG로 2차 antibody를 1:3000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. TBST로 세척한 후, Enhanced chemiluminescence (ECL) 용액으로 발광 후 image analysis 기기 (ChemidocXRS)를 이용하여 band의 사진을 촬영하였다.

10. RT-PCR

B16F10 세포를 6 cm 배양 용기에 5×10^5 개씩 분주한 후 24시간 배양한 다음 시간 에탄올추출물 25, 50, 100 μ g/ml 씩을 처리하고 24시간 배양한 후 easy-BlueTM Total RNA extraction kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 mRNA를 추출하여 mRNA 함량을 측정하였다. 측정된 mRNA는 Maxime RT PreMix Oligo dT primer(iNtRON Biotechnology, Korea)에 넣어 최종 부피 20 μ l가 되게 DEPC가 처리된 물을 넣어 혼합하고, RT-PCR 기계를 사용하여 45℃에서 1시간, 95℃에서 5분, 1회 반응시킴으로써 역전사를 수행하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 2 μ l와 tyrosinase primer(1,191 bp)의 염기서열은 forward; (5')-CATTTTTGATTTGAGTGTCT-(3')와 reverse; (5')-TGTGGTAGTCGTCITTTGCC-(3'), TRP-1 primer(784 bp)의 염기서열은 forward; (5')-CTTTCTCCCTTCCTTACTGG-(3')와 reverse; (5')-TGGCTTCATTCITGGIGCTT-(3'), TRP-2 primer (518 bp)의 염기서열은 forward; (5')-TGAGAAG

AAACAAAGTAGGCACAA-(3')와 reverse; (5')-CAACCCAAGAGCAAGACGAAAGC-(3'), 그리고 actin primer(500 bp)의 염기서열은 forward; (5')-TCAGAAAGGACTCCTATGTGG-(3')와 reverse; (5')-TCTCTTTGATGTCAGCAGC-(3')이다. 각각의 forward 1 μ l(10 pM)와 reverse 1 μ l(10 pM)를 I-Master mix PCR kit(iNtRON Biotechnology, Ko- rea)를 사용하여 섭씨 94℃에서 20초, 55℃에서 10초, 72℃에서 40초로 모두 30~40 회 반복 하였고, 2% agarose gel에 전기영동 하였다.

11. 통계처리

실험 결과는 student's t-test를 이용하여 p-value를 구하였으며, p<0.05인 경우 *, p<0.01인 경우 **로 유의성이 있다고 표시하였다.

실험 결과

1. 세포독성

사간 에탄올추출물이 B16/F10세포의 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 25, 50, 100 μ g/ml 농도로 처리하고 24시간 후 MTT assay 방법으로 세포독성 조사하였다. 실험 결과 사간 에탄올추출물 25, 50, 100 μ g/ml 농도에서 B16/F10 세포의 생존율이 대조군을 100%로 했을 때 각각 100.5%, 87.1%, 72.6%로 나타났다(Fig. 1).

2. 세포내 tyrosinase 활성도

α -MSH는 생체 내에서 다양한 생리적 기능에 관여하는데, 특히 자외선이나 염증에 의해 국소적으로 분비되는 호르몬으로써 멜라닌세포를 자극하여 tyrosinase 활성을 증가시켜 멜라닌 합성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 사간

에탄올추출물이 α -MSH로 유도된 tyrosinase 활성을 억제하는지 조사하였다. 실험 결과 α -MSH 처리군은 tyrosinase 활성이 $484 \pm 43\%$ 로 대조군보다 약 5배 증가하였으나, 사간 에탄올추출물과 α -MSH를 병용 처리군의 경우 50과 100 μ g/ml 농도에서 각각 $461 \pm 45\%$, $313 \pm 30\%$ 로 감소하였다(Table 1).

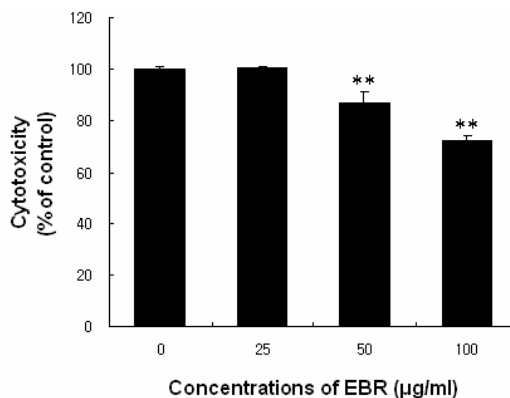


Fig. 1. Effect of EBR on cell viability.

B16/F10 cells were serum-starved for 24 hours and EBR was added to serum-free medium at 25 ~ 100 μ g/ml for 24 hours. Cell viabilities were measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.D. of three experiments performed in triplicate. **p<0.01: compared to control.

Table 1. Effect of EBR on Tyrosinase Activity in α -MSH Stimulated Cells.

α -MSH (nM)	Ethanol extract of <i>Belamcandae Rhizoma</i> (EBR)	
	50	100
100	461 ± 45	313 ± 30
	484 ± 43	

3. Cell-free tyrosinase 활성도

사간 에탄올추출물은 α -MSH로 증가된 tyrosinase 활성을 유의성 있게 억제하였다. 이러한 효과가 직접적으로 tyrosinase 효소의 활성을 억제하였기 때문인지 조사하기 위하여 배양된 B16/F10 세포에서 얻은 효소 액에 사간 에탄올추출물을 직접 처리하

였다. 실험 결과 시간 에탄올추출물 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 $93.9 \pm 2\%$, $92.1 \pm 1\%$, $93.2 \pm 2\%$ 로 나타났다(Table 2).

Table 2. Effect of EBR on Tyrosinase Activity in Cell-free System.

Ethanol extract of <i>BelamcandaeRhizoma</i> ($\mu\text{g/ml}$)		
25	50	100
93.9 ± 2	92.1 ± 1	93.2 ± 2

4. 세포내 멜라닌 함량 측정

본 연구에서 시간 에탄올추출물이 B16/F10 세포의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 α -MSH와 시간 에탄올추출물을 50 $\mu\text{g/ml}$ 와 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하여 3일간 배양한 후 총 멜라닌 양을 측정하였다. 실험 결과 α -MSH 처리군은 총 멜라닌 양이 $513 \pm 55\%$ 로 대조군의 약 5배 증가하였으며, 시간 에탄올추출물과 병용 처리군의 경우 50 $\mu\text{g/ml}$ 와 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 $370 \pm 52\%$, $252 \pm 30\%$ 로 감소하였다(Fig. 2).

5. DOPA 염색

본 연구에서 DOPA 염색을 통하여 시간 에탄올추출물의 멜라닌합성 억제 효과를 형태적으로 관찰하기 위하여 시간 에탄올추출물과 α -MSH를 병용처리하고 3일간 배양한 후 대조군과 비교하였다. Tyrosinase의 DOPA oxidase 활성을 관찰한 결과 α -MSH 처리군은 대조군에 비하여 활성이 현저히 증가하였으며, α -MSH와 시간 에탄올추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 병용처리군은 α -MSH군에 비해 tyrosinase의 활성이 크게 감소하였다. 또한 α -MSH군은 대조군에 비하여 수지상 가지돌기가 현저히 발달하였고, α -MSH와 시간 병용처리군의 경우 α -MSH군에 비하여 수지상 돌기가 감소하였음을 관찰 할 수 있었다(Fig. 3).

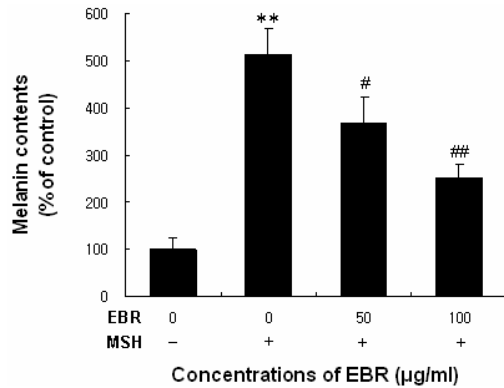


Fig. 2. Effect of EBR on melanin contents in α -MSH stimulated cells.

B16/F10 cells were seeded at 1×10^5 cells/dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of EBR and α -MSH for 3 days. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.D. of three experiments performed in triplicate. ** $p < 0.01$: compared to control group, # $p < 0.05$: compared to the α -MSH treated group, ## $p < 0.01$: compared to the α -MSH treated group.

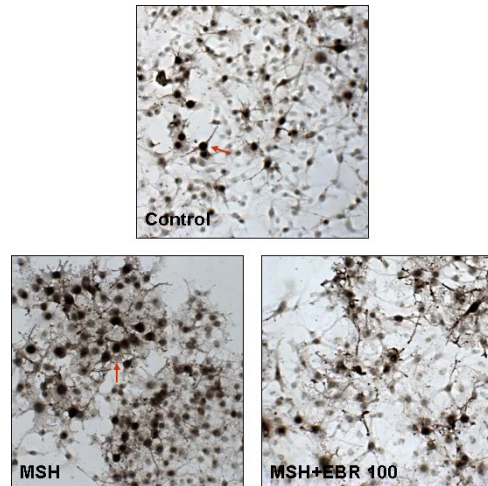


Fig. 3. Observation of tyrosinase activity by DOPA stain after treatment with EBR and α -MSH.

Cells were incubated with EBR and α -MSH. After 3 days, cells were stained with DOPA as described in Materials & Methods. Control: untreated group, α -MSH: α -MSH 100 nM treated group, α -MSH+EBR: α -MSH and EBR (100 $\mu\text{g/ml}$) treated group. Arrows: dendritic process, ($\times 200$)

6. 멜라닌 합성 관련 단백질 발현

본 연구에서 Western blot을 이용하여 사간 에탄올추출물이 α -MSH에 의한 과색소침착시 세포 내 tyrosinase 효소의 단백질발현에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 결과 α -MSH 처리군은 대조군에 비하여 tyrosinase 발현이 현저히 높아졌고, α -MSH와 사간 에탄올추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 병용처리한 군은 tyrosinase 발현이 효과적으로 감소하였다 (Fig. 4). 그러나 TRP-1, -2의 발현은 큰 변화가 없었다.

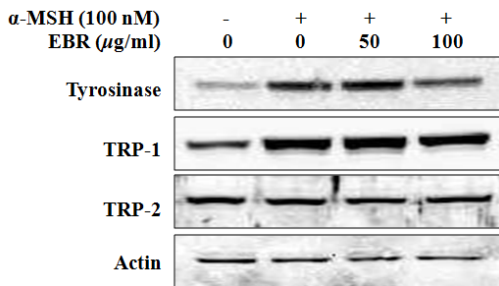


Fig. 4. Effects of EBR and α -MSH on tyrosinase protein expression.

Cells were incubated with EBR and α -MSH. After 3 days, whole cell lysates were then subjected to Western blot analysis using antibodies against tyrosinase as described in Materials & Methods.

7. mRNA 발현과 전사인자에 미치는 영향

사간 에탄올추출물이 tyrosinase 단백질 발현을 조절하였기 때문에 멜라닌 합성 관련 유전자에는 어떠한 영향을 주는지 조사 하였다. Tyrosinase mRNA는 α -MSH 단독 처리 시 대조군보다 증가하였고, 사간 에탄올추출물을 함께 처리하였을 때 대조군과 유사한 수준으로 억제되었지만 TRP-1, -2는 조절하지 못하였다(Fig. 5). Tyrosinase mRNA의 전사는 MITF와 CREB에 의해 조절되므로 사간 에탄올추출물이 α -MSH에 의해 증가된 MITF와 p-CREB의 발현에 영향을 미치는지 조사하였

다. 실험 결과 사간 에탄올추출물은 전사인자 발현에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 6). 이상의 결과로 볼 때 사간 에탄올추출물은 tyrosinase mRNA에 작용하여 멜라닌 합성을 조절하는 것으로 생각된다.

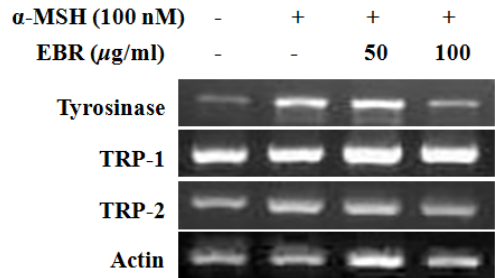


Fig. 5. Effect of EBR on mRNA of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2.

B16F10 mouse melanoma cells were cultured with EBR for 24 hours, mRNA was isolated and amplified using RT-PCR as described in Materials and Methods.

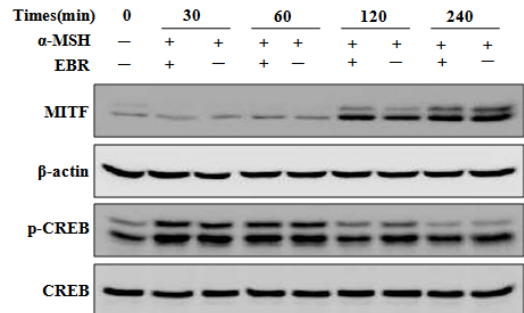


Fig. 6. Effect of EBR on MITF in B16F10 cells.

Cells were treated with EBR at the times indicated. Whole cell lysates were then subjected to Western blot analysis using antibody against MITF, p-CREB, CREB and β -actin.

고 찰

피부는 자외선으로부터 인체를 보호하기 위하여 멜라닌세포 내에서 멜라닌을 합성하고, 합성된 멜라닌은 각질형성세포로 이동한 후 일정 시간이 지

나면 각질층의 탈락과 함께 배출된다. 피부의 멜라닌 색소 침착을 일으키는 대표적인 요인은 일광이며, 피부를 구성하고 있는 각질형성세포, 멜라닌세포, 섬유아세포는 염증세포의 출현, prostaglandin, cytokine, α -MSH의 변화 등이 서로 연관되어 종합적으로 색소침착이 조절 된다^{13,14}.

최근 기미, 주근깨 등의 색소침착을 예방하거나 제거하려는 목적으로 tyrosinase 활성 및 생합성을 억제하는 새로운 소재를 개발하기 위하여 활발히 연구하고 있으며, 그 중에서도 환경 친화적이고 피부 안정성이 우수한 한방화장품의 개발이 활발히 진행 중이다. 현재까지 tyrosinase 억제제로 알려진 물질로는 4-hydroxyanisole, 5-hydroxyindole 및 hydroquinone와 kojic acid, arbutin, oxyresveratrol 등이 있으며, 그 외에도 stilbene계 화합물인 α -viniferin, isoflavonoid류인 ferulic acid가 알려져 있다^{15,16}. 이밖에도 감초^{17,18}, 더덕¹⁹, 천화분²⁰, 백출²¹, 사삼²² 등의 식물추출물이 멜라닌 합성 억제 효능이 있다고 보고되었다. 본 실험에서는 사간 에탄올추출물이 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성을 조절하는지 조사하였다.

멜라닌은 eumelanin과 pheomelanin의 2종류로 구분되는데, 일반적으로 DOPAchrome에서 DH1, DHICA를 거쳐 eumelanin이 생성되고, 세포내 cysteine, glutathione 농도가 높은 경우 pheomelanin이 생성된다. 자외선(UV)은 인체에서 과도한 피부색소 침착을 일으키는 주요 원인으로, 각질형성세포와 멜라닌세포는 자외선에 대하여 α -MSH(melanocyte stimulating hormone)와 부신피질자극호르몬(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)과 같은 melanocortin peptide를 분비하는데, 이때 α -MSH는 멜라닌세포의 주변분비(paracrine)와 자가분비(autocrine) 인자로서 피부의 색소침착에 관여하고 있다. 또한 α -MSH는 뇌하수체 및 피부를 포함한 여러 가지 말초조직에서 분비되는 다면발현성 분자(pleiotropic molecule)로써 표피세포의

성장과 증식, 국소조직의 면역 조절, 멜라닌 색소 생성 등 다양한 생리적 기능에 관여한다. 본 실험에서 과색소생성시 사간 에탄올추출물의 효과를 알아보기 위하여 α -MSH로 멜라닌 합성을 자극하고 사간 에탄올추출물이 미치는 영향을 조사하였다. α -MSH는 B16/F10세포의 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성을 증가시켰고, 사간 에탄올추출물은 α -MSH에 의해 증가된 tyrosinase와 멜라닌 생성을 매우 효과적으로 감소시켰다. 또한 tyrosinase의 활성을 직접적으로 억제하는지 조사한 결과에서는 전혀 영향을 주지 않았다. 이는 사간 에탄올추출물이 멜라닌세포의 정보전달계를 조절함으로써 tyrosinase와 멜라닌 합성을 조절하고 있음을 시사한다.

멜라닌세포는 신경능선(neural crest)에서 유래한 세포로서 가지돌기(dendritic process)를 갖고 있으며 약 30-40개의 각질형성세포와 연결되어 표피-멜라닌 단위(epidermal-melanin unit)를 형성하는데, 이 돌기를 통하여 멜라노솜이 각질형성세포로 이동된다. 멜라닌세포의 돌기형성(dendricity)과 인접한 각질형성세포 사이의 연결은 멜라노솜의 수송에 중요한 역할을 하고 있으며, 자외선과 α -MSH에 의해 이러한 epidermal-melanin network이 확장된다²³. Hunt 등²⁴은 α -MSH에 의해 tyrosinase 활성, 멜라닌 합성, tyrosinase와 TRP-1 mRNA의 발현이 증가되었으며 가지돌기의 발달 등 형태적으로도 멜라닌 합성이 촉진되었다고 보고하였다. 또한 Busca 등²⁵은 cAMP 증가는 Rac과 Rho를 통하여 actin의 재배열(disorganization)을 일으키고, 결과적으로 멜라닌세포의 가지돌기가 증가한다고 하였다. 본 실험 결과 α -MSH에 의하여 B16F10 세포의 가지돌기가 증가하였으나, 사간 에탄올추출물을 투여하였을 때 가지돌기의 형성이 억제되었을 뿐만 아니라 DOPA oxidase 활성 또한 감소되었음을 관찰 할 수 있었다.

α -MSH는 세포막 수용체(melanocortin receptor

1, MC1R)와 결합하여 Gs 단백질을 활성화시키고, 이차적으로 adenylate cyclase 활성화에 의해 cAMP가 증가되고 연속적으로 protein kinase A(PKA), CREB을 거쳐 MITF의 발현을 증가시킨다. MITF는 tyrosinase mRNA의 전사를 유도하고 tyrosinase 단백질 합성을 증가시켜 멜라닌 생성을 촉진시킨다^{26,27)}. Lerner(1993)²⁸⁾는 인체에 MSH를 주입한 결과 피부의 tanning 현상을 관찰하였고, Ranson 등(1988)²⁹⁾은 배양 멜라닌세포에서 cAMP와 tyrosinase 활성이 증가되었으며, 임 등³⁰⁾은 색소성 질환인 기미(melasma) 부위에서 α -MSH의 발현이 증가되었음을 보고 하였다. 최근 C₂-ceramide가 사람 멜라닌 세포에서 ERK 활성을 연장시켜 멜라닌 생성을 조절한다고 보고하였다. C₂-ceramide는 ERK 의존적으로 MITF의 Ser-73을 인산화 함으로써 proteasome을 경유한 MITF 분해를 유도하고 전사 수준에서 tyrosinase 발현을 억제시킨다³¹⁾. 본 실험에서는 α -MSH에 의해 증가된 tyrosinase 단백질 발현이 시간 에탄올추출물에 의해 유의하게 감소하였으며, tyrosinase mRNA의 발현도 감소하였다. 그러나 전사인자인 MITF 발현과 상위 신호 전달 인자인 CREB의 활성은 조절되지 않았다.

이상의 결과로 미루어보아 시간 에탄올추출물은 tyrosinase mRNA를 조절함으로써 tyrosinase 단백질 발현을 억제하고 최종적으로 멜라닌 합성을 감소시키는 것으로 생각된다.

결 론

시간 에탄올추출물이 α -MSH로 과색소침착을 유도한 B16F10 세포에서 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 조사하였고, 형태학적 변화, 단백질 발현, mRNA 발현, 전사인자를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 시간 에탄올추출물을 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 결과 α -MSH로 유도된 멜라닌 합성과 tyrosinase 활성을 유의성 있게 억제하였으며, 증가된 가지돌기와 DOPA oxidase 활성을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다.
2. 시간 에탄올추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군은 α -MSH에 의해 증가된 tyrosinase 단백질 발현과 mRNA의 발현이 현저하게 억제되었다.
3. 시간 에탄올추출물은 CREB의 활성화와 MITF의 발현에 관여하지 않았다.

이상의 결과로 볼 때 시간 에탄올추출물은 α -MSH에 의해 증가된 tyrosinase mRNA를 조절함으로써 멜라닌 합성을 효과적으로 억제하였다. 따라서 시간 에탄올추출물은 미백화장품을 개발에 응용할 수 있는 좋은 소재가 될 것이다.

감사의 글

본 논문은 2010년 원광대학교 교내연구비지원에 의해 수행된 것임.

참고문헌

1. Tsukamoto K, Jackson IJ, Urabe K, Montague PM, Hearing VJ. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPACHROME tautomerase. EMBO J. 1992;11(2):519-26.
2. Boissy RE, Sakai C, Zhao H, Kobayashi T, Hearing VJ. Human tyrosinase related protein-1 (TRP-1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1. Exp Dermatol. 1998;7(4):198-204.

3. Buscà R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* 2000;13(2):60-9.
4. Saha B, Singh SK, Sarkar C, Bera R, Ratha J, Tobin DJ, Bhadra R. Activation of the Mitf promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB. *Pigment Cell Res.* 2006;29(6):595-605.
5. Chakraborty AK, Funasaka Y, Slominski A, Ermak, G, Hwang J, Pawelek JM, Ichihashi M. Production and release of pro-opiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1313:130-8.
6. Pan CH, Kim ES, Jung SH, Nho CW, Lee JK. Tectorigenin inhibits IFN-/LPS-induced inflammatory responses in murine macrophage RAW 264.7 Cells. *Arch Pharm Res.* 2008;31:1447-056
7. Thelen P, Scharf JG, Burfeind P, Hemmerlein B, Burfeind P W, Spengler B, Christoffel V, Ringert RH, Wuttke DS. Tectorigenin and other phytochemicals extracted from leopard lily *Belamcanda chinensis* affect new and established targets for therapies in prostate cancer. 2005;26:1360-7.
8. 申佶求. 申氏本草學, 서울:수문사. 1987:708-9.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxic assay. *J Immun Methods.* 1983;65:55-63.
10. Martinez - Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA., Garcia - Borron JC. Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor - alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem.* 1998;255:139-46.
11. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 1985;45:1474-8.
12. 전국임상병리교수협의회. 조직검사학, 서울:고려의학. 제3판, 1998;343-4.
13. Ranson M, Psen S, Mason RS. Human melanocytes as a target tissue for hormones : in vitro studies with 1α -25 dihydroxyvitamine D3, α -melanocyte stimulating hormone, and beta estradiol. *J Invest Dermatol.* 1988;91:593-8.
14. Prota G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J Invest Dermatol.* 1980;75:122-7.
15. Dawley RM, Flurkey WH. 4-hexylresocinol, a potent inhibitor of mushroom tyrosinase. *J Food Sci.* 1993;58:609-10.
16. Maeda K., Fukuda M. In vivo effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem.* 1991;42:361-8.
17. 이주상, 김정아, 조세훈, 손애량, 장태수, 소명숙, 정시련, 이승호. 감초의 tyrosinase 활성 억제 성분. *Kor J Pharmacogn.* 2003;34(1):33-9.
18. 문연자, 김진, 임난영, 이승연, 광섭, 황충연, 우원홍. 감초 물추출물의 멜라닌 형성 억제효과. *동의생리병리학회지.* 2002;16(6):1230-5.
19. 이승연, 김진만, 오현철, 임숙정, 황충연, 문연

- 자, 우원홍. 더덕추출물이 멜라닌생성에 미치는 영향. 대한한의학 방제학회지. 2002;10(2): 199-211.
20. 문연자, 이성원, 임숙정, 송채석, 이관순, 임규상, 우원홍. 천화분 수추출물이 B16 흑색종 세포의 멜라닌 생성 억제 효과. 한국전통의학지. 2000;10(2):149-590.
 21. 천현자, 최은영, 윤성찬, 남향우, 백승화, 우원홍. 백출의 에탄올 추출물에 의한 melanin 생성 억제 효과. 약학회지. 2001;45(3):269-75.
 22. 임난영, 권강주, 김윤석, 백순기, 임주락, 문연자, 우원홍. 사삼메탄올 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과. 동의생리병리학회지. 2004;18(3): 747-53.
 23. Provance DW, Jr, Wei M, Ipe V, Mercer JA. Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:14554-8.
 24. Hunt G, donatien PD, Lunec J. Cultured human melanocytes respond to MSH peptides and ACTH. Pigment Cell Res. 1994;7:217-21.
 25. Busca R, Bertolotto C, Abbe P, Englaro W, Ishizaki T, Narumiya S, Boquet P, Ortonne JP, Ballotti R. Inhibition of Rho is required for cAMP-induced melanoma cell differentiation. Mol Biol Cell. 1998;9:1367-78.
 26. De Leeuw SM, Smit NP, Van Veldhoven M, Pennings EM, Pavel S, Simons JW, Schothorst AA. Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. J Photochem Photobiol B. 2001;61(3):106-13.
 27. Englaro W, Bahadoran P, Bertolotto C, Busca R, Derijard B, Livolsi A, Peyron JF, Ortonne JP, Ballotti R. Tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition of melanogenesis is dependent on nuclear factor kappa B activation. Oncogene. 1999;18:1553-9.
 28. Lerner AB. The discovery of the melanotropins:a history of pituitary endocrinology. Ann NY Acad Sci. 1993; 680:1-12.
 29. Ranson M, Psen S, Mason RS. Human melanocytes as a target tissue for hormones : in vitro studies with 1 α -25 dihydroxyvitamine D₃, α -melanocyte stimulating hormone, and beta estradiol. J Invest Dermatol. 1988;91:593-8.
 30. Im S, Kim J, On WY, Kang WH. Increased expression of α -Melanocyte-stimulating hormone in the lesion skin of melasma. Br J Dermatol. 2002;146:165-7.
 31. Kim DS, Kim SY, Chung JH, Kim KH, Eun HC, Park KC. Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. Cell Signal. 2002;14:779-85.