

## 왕지네의 유기용매 추출물을 이용한 멜라닌 합성 저해효과

김인우 · 이준하 · 권용남 · 김상희 · 윤은영 · 남성희 · 안미영 · 황재삼\*  
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

### Inhibitory effect of melanin synthesis using organic solvent extracts from *Scolopendra subspinipes mutilans*

In-Woo Kim, Joon Ha Lee, Yong-Nam Kwon, Sang-Hee Kim,  
Eun-Young Yun, Sung-Hee Nam, Mi-Young Ahn and Jae-Sam Hwang\*

Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, South Korea

(Received March 19, 2014, Accepted May 02, 2014)

#### ABSTRACT

This study was performed to determine the whitening effect of organic solvent extracts from the centipede, *Scolopendra subspinipes mutilans*. We prepared different concentrations (50%, 70% and 100%) of ethanol, methanol, 100% ethyl acetate and water extracts. We tested melanin inhibitory effect and tyrosinase activity using B16/F10 melanoma cell. As a result, treatment of organic solvent extracts is decreased the biosynthesis of melanin and tyrosinase activity to 36 ~ 86%. Especially the 70% ethanol extracts was the most effective in B16/F10 melanoma cells. In the study on melanogenic protein expression, 70% ethanol extracts of *Scolopendra subspinipes mutilans* blocked glycosylation of tyrosinase. Therefore this result suggests that 70% ethanol extracts could be developed as skin whitening agents.

**Key words :** *Scolopendra subspinipes mutilans*, Glycosylation, Tyrosinase, Melanin, Organic solvent extracts

#### 서 론

피부가 자외선의 노출로 인해 자극을 받게 되면 멜라닌을 생성하여 자외선으로 야기되는 손상으로부터 피부를 보호한다(Hwang et al. 2013). 하지만 오늘날 과도한 자외선의 노출로 인해 멜라닌(melanin)이 과다 생성되면서 기미, 주근깨 등의 피부 반점이 형성되고 더 나아가서는 피부 노화, 피부암 등을 야기시켜 피부 건강을 위협하고 있다(You et al. 2009). 따라서 최근 식물, 곰팡이 등 여러 천연물 추출물들을 이용한 멜라닌 합성 저해를 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Oh et al. 2007).

멜라닌은 적, 노랑색의 페오멜라닌(pheomelanin)과 흑, 갈색의 유멜라닌(eumelanin)으로 구분되는데(Ko and Kim 2010) 이는 티로시나아제(tyrosinase) 효소에 의해 조절되며(Jeon et al. 2009), 특히 유멜라닌의 경우 티로시나아제와 함께 TRP-1, TRP-2 효소에 의해 조절된다고 알려져

있다(Kim et al. 2011). 멜라닌의 구체적인 합성경로는 멜라닌 형성세포내의 멜라노좀(melanosome)에 의해 만들어지며(Sim et al. 2008) 형성된 멜라닌은 피부에 축적되어 색소 침착 현상이 일어나게 되는데 이는 L-티로신(tyrosine)을 기질로 티로시나아제에 의해 L-DOPA, DOPA quinone, DOPA chrome을 거쳐 최종 단계로 멜라닌 polymer를 형성한다(Kim et al. 2010). 따라서 멜라닌 합성 저해제의 개발은 티로시나아제의 활성 억제가 중요한 부분을 차지하고 있으며 지금까지 알려진 티로시나아제 억제제로는 알부틴(albutin), kojic acid 등이 있다(Sim et al. 2008). 또한 fatty acid, glucosamine 등은 티로시나아제의 glycosylation을 저해하여 멜라닌의 합성을 저해하는 저해제로 알려져 있다(Jeon et al. 2009).

왕지네(*Scolopendra subspinipes mutilans*)는 왕지네목 왕지네과의 절지동물로 한국, 중국, 일본 등지에 많이 분포하며, 몸 빛깔은 흑록색이고 머리는 붉은색이며, 몸은 수

\*Corresponding author. E-mail: hwangjs@korea.kr

많은 마디로 이루어져 있으며 마디마다 1쌍 또는 2쌍의 다리가 있다. 이러한 왕지네는 예로부터 한방에서 대나무 막대기로 머리와 꼬리를 묶어서 말린 것을 사용하였으며, 이는 오공(蜈蚣), 토충(土蟲), 천룡(天龍)이라 하며, 거풍, 진경, 소종, 청혈(淸血)의 효능이 있어서 중풍, 경간(驚癇), 관절염, 림프선염, 암종(癌腫)등에 처방되기도 한다(Choi 1997). 이와 같이 왕지네는 보통 항염증활성 또는 항암활성제로써 많이 사용되어 왔지만 피부 기능성 소재로의 연구는 미비한 실정이다(Kim et al. 2008).

따라서 본 실험은 B16/F10 melanoma 세포를 이용하여 유기용매로 추출한 왕지네 추출물의 멜라닌 합성 억제와 티로시나아제의 효소 활성을 측정하고 이를 단백질 수준에서 검정하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 제조

본 실험에 사용한 왕지네는 경상남도 산청군에 있는 지리산산업곤충연구소로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 24시간 동결건조시킨 왕지네 시료를 마쇄 한 후 50, 70, 100%의 메탄올, 에탄올 그리고 에틸아세테이트와 증류수(distilled water, D/W)를 각각 1 g / 10 mL 비율로 첨가 후 24시간 37°C에서 추출하였다. 추출된 물질을 filter로 거른 뒤 감압 농축한 후 100 µL의 DMSO에 녹여 -70°C에 보관, 사용하였다.

### 2. 세포 배양

마우스 유래 세포주인 B16/F10 melanoma(KCLB 80008) 세포를 한국세포주은행으로부터 분양 받아 실험을 진행하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 항생제(100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin)와 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 영양 배지를 Gibco 사에서 구입하여 배양하였다.

### 3. MTS assay를 이용한 세포 생존율 측정

B16/F10 melanoma 세포에 대한 세포 생존율을 확인하기 위해 MTS assay 방법으로 분석하였다. 상기 MTS assay 방법은, 살아있는 미토콘드리아의 탈수소효소(dehydrogenase)에 의해 노란색의 MTS tetrazolium이 갈색 빛을 띠는 보라색의 formazan으로 전환될 때의 흡광도를 측정하는 방법이다. 96-well 배양용기에  $2 \times 10^4$  cells/well 농도의 세포를 100 µL씩 분주한 후 왕지네 추출물을 0, 100, 300 그리고 500 µg/mL 농도로 각 세포에 24시간 동안 처리하였다. 이후 10 µL CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Reagent (MTS) (Promega, USA)를 첨가하고 3~4시간 반응시켰다.

세포생존율의 저해 정도는 multi detector(Beckman, DTX 8800)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. 세포내 멜라닌 생성량 측정

왕지네 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과를 확인하기 위해 추출물 처리시 멜라닌의 생성량을 측정하는 실험을 실시하였다(Kim and Kim 2008, Yoon et al. 2010). B16/F10 melanoma 세포를 6-well plate에  $10^6$  cells/well 로 분주하고 각각의 well에 왕지네 추출물을 500 µg/mL 처리한 뒤 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하였다. 세포를 수집하고 세포 수를 측정한 뒤 3000 g 값으로 3분간 원심분리하여 침전시켜 pellet을 얻었으며 1 N NaOH(10% DMSO)를 첨가하고 60°C에서 1시간 반응하여 pellet을 녹였다. 그 후 multi detector(Beckman, DTX8800)를 이용하여 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. 세포내 티로시나아제 활성 측정

세포내 티로시나아제 활성을 측정하기 위하여 우선 멜라닌 생성량 측정 실험과 동일한 조건으로 B16/F10 melanoma 세포를 6-well plate에  $10^6$  cells/well로 분주하고 각각의 well에 왕지네 추출물을 500 µg/mL 처리한 뒤 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하였다. 그 후 homogenization buffer(0.1 mM sodium phosphate buffer, 1% triton X-100)를 각 100 µL 첨가한 뒤 sonicator를 이용하여 1시간 동안 세포를 용해시켰으며 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였다. 0.1 M sodium phosphate buffer 500 µl에 10 mM L-DOPA와 상등액을 처리하고 37°C 1~3시간 반응시켜 multi detector(Beckman, DTX8800)를 이용하여 470 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다(Dung et al. 2007).

### 6. Western blot을 통한 미백 관련 단백질 발현 검정

왕지네 추출물 500 µg/mL로 48시간 처리된 세포를 20 분간 30 µL NP40 buffer(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% NP40 or Triton X-100, 150 mM NaCl, Protease inhibitor cocktail)로 lysis한 후 Protein assay(Bio-rad)를 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 각각의 세포 추출물을 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)에서 진행하였고 gel에 존재하는 단백질을 250 mA로 2시간 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Membrane은 비 특이적인 반응의 방지를 위하여 5% skim milk 용액으로 실온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 그 후 티로시나아제 rabbit 항체(Santa Cruz, USA), β-actin 항체(Sigma, USA)를 각각 1차 항체로 사용하여 4°C에서 밤새 반응시키고 여기에 HRP가 결합된 항-rabbit 항체(Promega, USA), 항-mouse 항체(Promega, USA)를 2차 항체로 1시간 동안 반응하였다. 다

음 ECL system(Amersham, USA)으로 발색한 후 각각의 표지 단백질을 FluorChem(Alpha Innotech, USA)으로 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 세포 생존율

50, 70, 100%의 에탄올과 메탄올 그리고 100% 에틸아세테이트와 증류수(D/W)로 추출된 왕지네 추출물을 이용하여 B16/F10 melanoma 세포에서의 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 사용한 최대 농도인 500 µg/mL에서 90% 이상의 세포가 생존하는 것을 확인하였다(그림 1). 이는 왕지네 추출물이 500 µg/mL 농도까지는 세포 독성이 미미함을 나타내는 것이다. 따라서 본 실험은 왕지네 추출물의 농도를 500 µg/mL로 선정하여 멜라닌 생성과 티로시나아제 효소 활성실험을 진행하였다.

### 2. 세포내 멜라닌 생성량

유기용매로 추출된 왕지네 추출물을 이용하여 B16/F10 melanoma 세포에서의 멜라닌 생성량을 확인한 결과, 증류수(D/W) 추출물을 포함하여 유기용매로 추출된 왕지네의 추출물은 무처리에 비해 멜라닌 생성량이 약 36~67%로 감소됨을 확인할 수 있었다(그림 2). 특히 추출물 중 70% 에탄올 추출물을 처리한 경우 무처리에 대비해서 36%의 멜라닌 생성량을 보였으며 이는 왕지네 추출물을 처리한 세포들 중 가장 낮은 멜라닌 생성량을 보였다. 이 결과를 바탕으로 70% 에탄올로 추출된 왕지네 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과가 가장 우수함을 확인하였다.

### 3. 세포내 티로시나아제 활성 검정

티로시나아제는 L-티로신으로 시작되는 멜라닌 생성 경로에서 가장 중요하게 작용되는 효소이다. 따라서 티로시

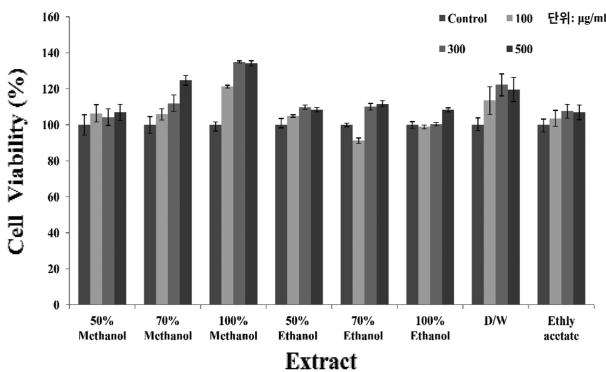


Fig. 1. Cell viability of B16/F10 melanoma cell after treatment with organic solvent extracts from *Scolopendra subspinipes mutilans*.

나아제의 활성을 저해함으로써 멜라닌 생성량을 감소시킬 수 있으며 이는 다양한 피부 미백 소재로 활용되고 있다 (Hwang et al. 2013). 이를 바탕으로 왕지네 추출물의 B16/F10 melanoma 세포내 티로시나아제 활성 저해 여부를 확인하였으며 그 결과 메탄올과 에탄올로 추출된 왕지네 추출물이 처리된 세포는 무처리 대비 약 38~86% 정도의 티로시나아제 활성을 보였다(그림 3). 이는 유기용매로 추출된 왕지네 추출물이 티로시나아제 활성을 저해하여 결과적으로 멜라닌 생성을 억제한다고 추측할 수 있다. 특히 70% 에탄올 추출물의 경우 무처리 대비 약 38% 정도

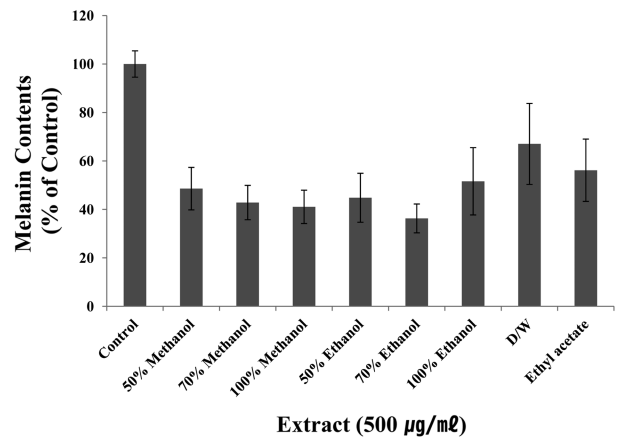


Fig. 2. Melanin synthesis of organic solvent extracts from *Scolopendra subspinipes mutilans*.

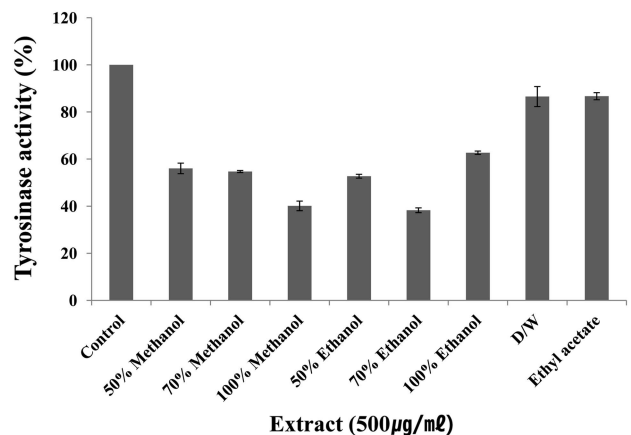
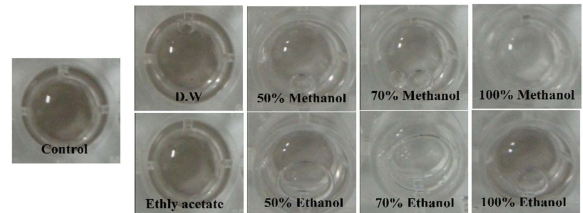


Fig. 3. Intracellular tyrosinase activity of organic solvent extracts from *Scolopendra subspinipes mutilans*.

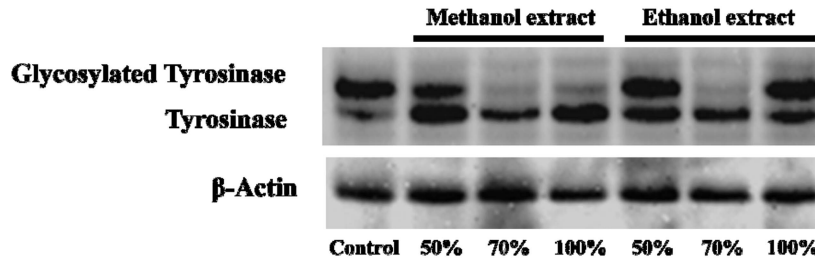


Fig. 4. Tyrosinase expression of organic solvent extracts using western blot analysis from *Scolopendra subspinipes mutilans*.

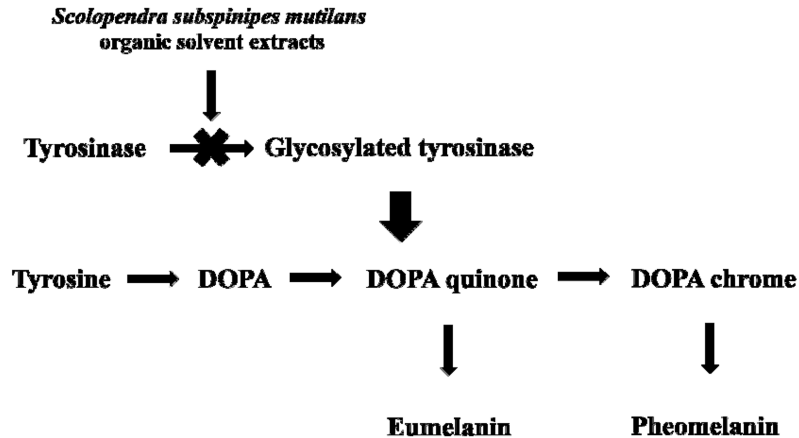


Fig. 5. Schematic diagram of action mechanism of the extracts in the melanin biosynthesis pathway.

로 왕지네 추출물을 처리한 세포 중 티로시나아제의 활성이 가장 낮음을 확인하였다. 이는 앞선 멜라닌 생성량 실험과 유사한 결과이며 70% 에탄올을 이용한 왕지네 추출물이 피부 미백 기능성소재로의 활용 가능성이 높다는 것을 시사하는 바이다.

#### 4. Western blot을 이용한 티로시나아제 활성 검정

멜라닌 생성시 티로시나아제 효소의 작용은 glycosylation 된 티로시나아제가 멜라노솜으로 이동하여 멜라닌 생성에 관여하는 것으로 보고되고 있다(Jeon et al. 2009, Park et al. 2009). 그림 4를 참조하면, 무처리된 세포는 glycosylation 된 티로시나아제의 발현량이 일반 티로시나아제보다 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 세포내 티로시나아제가 glycosylation 되어 정상적으로 멜라닌이 생성되었음을 의미한다. 그에 비해 멜라닌 생성과 티로시나아제 활성측정 실험 시 가장 효과가 높았던 70% 에탄올 농도로 추출된 왕지네 추출물을 처리한 경우는 glycosylation된 티로시나아제의 발현량이 미미함을 보였으며 무처리 세포의 glycosylation된 티로시나아제의 발현량과 비교했을 때 확연히 낮은 발현량을 보임을 확인할 수 있었다. 이 결과로 미루어 봤을 때 세포에서 멜라닌이 생성되는 초기 단계인 티로시나아제 효소가 glycosylation 되는 과정을 70%

에탄올을 이용한 왕지네 추출물이 방해하여 결과적으로 멜라닌 생성이 감소되는 것으로 생각된다(그림 5).

## 적 요

피부는 자외선과 같은 외부자극으로부터 피부를 보호하기 위해 멜라닌을 생성한다. 하지만 과도한 멜라닌의 생성은 기미, 주근깨와 같은 색소 침착을 유발하며 미관상 좋지 않을 뿐 아니라 피부 질환을 유발할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 왕지네 추출물이 멜라닌 생성에 영향을 미치는지 여부를 B16/F10 melanoma 세포를 이용한 실험을 통해 확인하였다. 그 결과 유기용매를 이용한 왕지네 추출물의 멜라닌 생성량은 무처리 대비 36~67%로서 멜라닌 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었으며 특히 70% 에탄올을 이용한 왕지네 추출물의 멜라닌 생성량은 36%로 실험을 진행했던 추출물들 중에서 가장 낮음을 확인하였다. 이는 세포내 티로시나아제 효소 활성 측정에서도 유사한 결과를 얻었으며 이에 70% 에탄올로 추출한 왕지네 추출물은 피부 미백 기능성소재로서의 가능성이 높을 것으로 사료된다. 또한 티로시나아제 효소 활성을 단백질 수준에서 검정한 결과, 앞선 실험에서 티로시나아제 효소 활성이 가장 낮았던 70% 에탄올로 추출한 왕지

네 추출물의 경우 세포내 glycosylation 된 티로시나아제의 발현이 감소함을 확인할 수 있었으며, 이는 70% 에탄올로 추출된 왕지네 추출물이 세포내 티로시나아제의 glycosylation을 억제하여 결과적으로 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 추측할 수 있다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 어젠다사업(과제번호: PJ008706)의 지원에 의해 이루어 졌으며, 이에 감사드립니다.

### References

- Choi JS (1997) Studies on the purification, characterization and structure of antibiotics from centipeds *Scolopendra subspinipes mutilans*. Mol Biol **46**, 508~513.
- Dung H Nguyen, Duc T M Nguyen, Lianhua Luo, Yang SH, Lee HB, Kim HJ, Shin JH, Kim DM, Kim EK (2007) Depigmenting effect of *Cinnamomum cassia* Presl in B16F10 melanoma cells. Korean J Chem Eng **24**, 827~830.
- Hwang JY, Park TS, Son JH (2013) Whitening effect of extracts and fractions from *Diospyros kaki* calyx. J Life Sci **23**, 377~382.
- Jeon Min, Lee KM, Lim YH, Kim JK (2009) Rhapontigenin production by bioconversion and inhibition of melanin Synthesis. Kor J Microbiol Biotechnol **37**, 49~54.
- Kim DH, An BJ, Lee JY (2011) Whitening activities of the *Agri-monia pilosa* L. extracts. J Appl Biol Chem **54**, 284~289.
- Kim DS, Han GS, Jeon BK, Woo WH, Mun YJ (2010) Inhibitory effect of fructus *Ligustri Lucidi* hexane extract on melanin bio-synthesis. Korean J Oriental Physiol Pathol **24**, 674~680.
- Kim KN, Kim SB, Yoon WJ, Yang KS, Park SY (2008) Induction of apoptosis by *Scolopendra subspinipes mutilans* in human leukemia HL-60 cells through Bcl-xL regulation. J Korean Soc Food Sci Nutr **37**, 1408~1414.
- Kim SH, Kim IC (2008) Antioxidative properties and whitening effects of the *Eucommiae cortex*, *Salviae miltiorrhizae radix*, *Aurantii nobilis pericarpium* and *Cnidii rhizome*. J East Asian Soc Dietary Life **18**, 618~623.
- Ko JY, Kim YC (2010) Effectiveness of *Scirpi rhizoma* Ethanol Extract on skin whitening using *in vitro* test. J Environ Toxicol **25**, 69~77.
- Oh SM, Mun YJ, Woo WH (2007) Effects of *Rubus coreanus* Miquel on the expressions of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in B16 melanoma cells. Korean J Oriental Physiol Pathol **21**, 1456~1461.
- Park SH, Lee BY, Lee SH, Han CS, Kim JG, Kim KT, Kim KH, Kim YH (2009) Whitening effect of dayflower (*Commelina communis* L.) extract by inhibition of N-Linked glycosylation process and melanogenesis. J Soc Cosmet Scientists Korea **35**, 73~78.
- Sim GS, Kim JH, Lee BC, Lee DH, Lee GS, Pyo HB (2008) Inhibitory effects on melanin production in B16 melanoma cells of *Sedum sarmentosum*. Yakhak Hoeji **52**, 165~171.
- Yoon WJ, Kim MJ, Koh HB, Lee WJ, Lee NH, Hyun CG (2010) Effect of korean red sea cucumber (*Stichopus japonicas*) on melanogenic protein expression in murine B16 melanoma. Int J Pharmacol **6**, 37~42.
- You JK, Chung MJ, Kim DJ, Seo DJ, Park JH, Kim TW, Choe MY (2009) Antioxidant and tyrosinase inhibitory effects of *Paeonia suffruticosa* water extract. J Korean Soc Food Sci Nutr **38**, 292~296.