

Effect of *Rhynchosia Nulubilis* Ethanolic Extract on DOPA Oxidation and Melanin Synthesis

JaeRyeon Kim¹ and Moon-Moo Kim^{2*}

¹Department of Chemistry, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

²Department of Applied Chemistry, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received September 29, 2017 / Revised January 8, 2018 / Accepted January 17, 2018

Melanin is a polymer substance that plays an important role in the determination of hair growth and skin color *in vivo*. However, melanin, which is over-produced by reactive oxygen species, is known to cause stains, freckles, and hypercholesterolemia, which are associated with aging. Previous studies have shown that polyphosphate, one of the components of *Rhynchosia Nulubilis*, inhibits skin aging induced by ultraviolet rays. The aim of this study is to investigate the direct effect of *Rhynchosia Nulubilis* ethanolic extract (RNEE) on melanin synthesis. In this study, RNEE showed no antioxidant effects on scavenging activity of DPPH radical in addition to reducing power. The cytotoxicity of RNEE was increased in a dose-dependent manner in an MTT assay. In addition, RNEE increased tyrosinase activity and melanin synthesis in DOPA-oxidation experiments. RNEE did not promote the conversion L-DOPA into melanin in live cells, but melanin production was promoted in the RNEE-treated group after H₂O₂ pretreatment compared to the control group in which melanin production was reduced by treatment with H₂O₂. In addition, RNEE increased the expression level of tyrosinase related protein-2 (TRP-2) and increased the expression level of tyrosinase related protein-1 (TRP-1) at a concentration of 16 µg/ml. In particular, it was found that RNEE increased the expression level of SOD-3, by which superoxide anion is converted to hydrogen peroxide, higher than the control and α-MSH used as a positive control at a concentration of more than 16 µg/ml. The results suggest that RNEE can induce melanogenesis related to black hair.

Key words : Melanin, *Rhynchosia Nulubilis*, tyrosinase, TRP-1, TRP-2

서 론

'100세 시대'라 불리는 시대에 사는 21세기 사람들은 노화 예방 및 방지에 관심을 쏟고 있다. 노화란 나이가 들면서 생기는 몸의 변화로, 주름이 생기고 검버섯이 생기는 피부 노화와 머리카락이 흑색에서 회색으로 변하는 증상이 나타나며, 눈으로 쉽게 확인할 수 있다. 인체의 머리카락, 동공, 피부색 등을 결정하는 고분자 물질인 멜라닌(melanin)은 생체 내 피부 속에 존재하며 자외선에 의해 손상되는 피부를 보호하는 중요한 역할을 한다[15, 18]. 그러나 체내의 호흡과정에 의해 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 멜라닌을 과도하게 생성하게 하며 노화와 관련된 기미, 주근깨와 과색소 침착증 등을 야기시킨다[17]. 또한, 산화적 스트레스를 일으켜 세포나 기관을 손상시켜 암, 당뇨와 같은 질병을 유발시킨다고 보

고되고 있다[10]. Melanin 합성의 전구물질인 tyrosine으로부터 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), dopaquinone, 5,6-dihydroxy-indole (DHI), 5,6-dihydroxy-indole-2-carboxylic acid (DHICA)는 촉매작용을 하는 Tyrosinase, Tyrosinase-related protein 1 (TRP-1), TRP-2에 의해서 멜라닌이 합성된다[11]. Tyrosinase, TRP-1과 TRP-2의 활성이 증가할수록 멜라닌 합성도 증가한다[12, 16]. 이리하여 최근에 멜라닌 합성 촉진 기전을 바탕으로 하여 *Auricularia auricular* 및 Rice Bran Extracted Minerals와 같은 흑모 촉진 천연물에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[9, 21]. 그러나 현재까지 실제로 흑모를 촉진할 수 있는 생리활성소재는 개발되고 있지 않는 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 멜라닌 생성 촉진 물질을 발굴하는 과정에서 효능이 탁월한 서목태(*Rhynchosia Nulubilis*)를 발굴하였다.

서목태(*Rhynchosia Nulubilis*)는 겉은 검은색이고 속은 파란색이며 한방에서 약용으로 널리 쓰이며 근래에 몸에 좋다는 이유로 그 수요가 늘어나고 있다. 특히, 서목태 성분 중 cyanidin-3-glucoside는 활성산소를 제거하여 피부와 신체의 노화를 예방시켜주며, 지질단백질 산화의 우수한 억제제로 알려져 있다[2]. 선행연구에서 서목태는 tyrosinase 활성을 촉진시킨다는 연구보고가 있지만[8], 다른 단백질 발현에 영향을 미쳐

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1510, Fax : +82-51-890-2620

E-mail : mmkim@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

흑모 생성을 촉진시킨다는 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구의 목적은 흑색종 B16F1 cell을 이용하여 흑모 생성을 촉진할 수 있는 멜라닌 합성에 대한 RNEE의 직접적인 효과를 밝히는 것이다.

재료 및 방법

실험 재료

세포배양을 위한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Trypsin-EDTA, penicillin (10,000 U/ml) / streptomycin (10,000 µg/ml) / amphotericin (2,500 µg/ml), fetal bovine serum (FBS) 시약은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)로 부터 구입하였다. B16F1 cell line은 ATCC (American Type Culture Collection, USA)로부터 구입하였다. α -MSH, Imatinib mesylate(IMAT), IBMX, MTT reagent와 기타시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

시료의 제조

서목태 주정추출물은 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 먼저, 서목태를 흐르는 물에 깨끗이 세척한 다음 완전히 자연 건조시켰다. 세척·건조된 서목태를 믹서기로 분쇄하여 분말로 제조 후 주정에 3일간 추출하고 여과하였다. 각 여과된 여액을 감압 농축하여 분말 형태의 서목태 주정추출물(*Rhynchosia Nulubilis* ethanolic extract, RNEE)을 획득하였다. 제조된 분말 형태의 시료들을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 시험 농도로 희석하여 본 연구에 사용하였다.

총 폴리페놀 함량

시료 내 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Ciocalteu 방법[22]을 변형하여 Gallic acid를 이용해 표준 물질로 사용하였다. 분광광도계의 측정 가능한 범위 안에서 시료를 희석하여 사용하였다. 시료 희석액 0.1 ml에 1N Folin-Ciocalteu 1.0 ml 첨가하고 잘 혼합하여 3분간 방치한 후 20% Na₂CO₃ 2 ml 가하였다. 암실에서 45분 동안 실온 방치한 후 1,600× g에서 8분 동안 원심분리 하였다. 회수한 상등액은 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 표준 곡선을 이용하여 µg/ml 값으로 환산하였다.

DPPH radical scavenging assay

Brand-Williams [5] 실험방법을 변형하여 RNEE의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능력을 측정하였다. 각 시료를 시험농도로 처리하고 10초 동안 잘 혼합한 다음, 실온에서 20분 동안 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 함량은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

Reducing power Assay

Oyaizu [13]의 방법에 따라 측정하였다. RNEE 1 ml에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충용액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1 ml씩 차례로 가하여 교반 한 후 50°C의 수욕상에서 20 분 동안 반응시켰다. 여기에 10% TCA 용액 1 ml를 가하여 13,500× g에서 15분 동안 원심분리하여 얻은 상등액 1 ml에 증류수 및 ferric chloride 각 1 ml를 가하여 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 vitamin C 100 µl를 사용하였다. 시료의 환원력은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

In vitro tyrosinase 활성 측정

시험관에 0.1 M 인산염완충액(pH 6.5) 220 µl와 시료액 20 µl 그리고 mushroom tyrosinase (1,500 U/ml)액 20 µl를 순서대로 넣는다. 이 용액에 1.5 mM tyrosine 액 40 µl를 넣고 37°C에서 10~15분 동안 반응시킨다. 그리고 이것을 ELISA reader (ELISA processor II. Behring, Germany)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 tyrosinase 활성도는 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

In vitro L-DOPA 산화에 의한 melanin 생성력 측정

시험관에 0.1 M 인산염완충액(pH 6.5) 480 µl와 3 mM L-DOPA 20 µl를 첨가한 다음 시험농도 되게 RNEE 5 µl를 넣고, 마지막으로 2,000 U/ml mushroom tyrosinase 40 µl를 첨가한다. 이 혼합액을 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 그리고 ELISA reader (ELISA processor II. Behring, Germany)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 L-DOPA 산화에 의한 melanin 생성력을 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 % 값으로 환산하여 나타내었다.

세포배양

B16F1 세포는 5% CO₂ 및 37°C에서 95% 이상의 습도를 유지한 배양기에서 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine과 100 µg/ml penicillin-streptomycin을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 배양하였다.

MTT assay

Hansen [4]의 방법에 따라 RNEE의 세포독성을 측정하였다. 세포독성평가는 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 시약을 사용하여 실험을 진행하였다. 독성평가에는 melanoma cell인 B16F1을 사용하였으며, 7.5×10⁵ cells/well 만큼의 세포를 96-well plate에 주입한 후 하루 동안 배양하였다. 하루 뒤 배지를 제거하고 적당 농도로 시료를 총 200 µl만큼 투여하고 CO₂ 배양기에서 다시 한 번 24시간 동안 배양한

다. 24시간 후 처리한 시료를 제거하고, MTT 용액을 200 µg/ml의 농도로 하여 96-well plate에 첨가하고 빛을 차단한 채 37°C에서 3시간 배양한다. 3시간 뒤 PBS buffer로 세척한 뒤 DMSO를 각 well에 200 µl 만큼 주입하고 20분 후 microplate reader로 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다

DCF fluorescence assay

DMEM 배지에 DCFH-DA를 20 µM 농도로 제조하여 B16F1 세포에 처리한 후 37°C에서 20분 방치하여 DCFH-DA를 세포 내로 침투시킨다. 여기에 음성대조군인 vitamin C 1,000 µl와 RNEE를 시험농도로 1시간 동안 처리하였다. PBS로 4번 세척 후 과산화수소를 250 µM 농도를 함유한 HBSS 완충용액 100 µl를 세포에 처리하였다. 세포 내에서 과산화수소는 DCFH-DA와 반응하여 형광을 띄는 DCF를 생성한다. 이를 multi-detection microplate reader (SynergyHtx)를 이용하여 excitation: 488 nm, emission: 530 nm 조건에서 형광정도를 측정하였다.

과산화수소 존재 유무에 따른 B16F1에서 Melanin 생성 측정

6-well plate에 3×10⁵cells/well로 세포를 분주하여 과산화수소의 존재 유무에 따라 실험을 진행하였다. 과산화수소 처리군에서는 250 µM 과산화수소를 처리한 후 24시간 방치 후 시료를 처리하고 1시간 후에 L-DOPA로 melanin 생성을 자극 후 48시간 동안 세포를 배양 하였다. 시료를 처리하고 1시간 후에 L-DOPA로 melanin 생성을 자극 후 48시간 동안 세포를 배양 하였다. 세포를 수집하여 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 침전한 후, 1 ml homogenization buffer (50 mM sodium phosphate pH 6.5, 1% Triton X-100, 2 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride)로 용해시켰다. 여기서 얻은 pellet에 1N NaOH (10% DMSO) 200 µl를 첨가하고 vortex 후 405 nm에서 흡광도를 측정 하였다. melanin 표준품(Sigma, USA)으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 멜라닌 양을 산출하였다. 멜라닌은 단위세포(10⁴ cells)에서의 멜라닌 생성량을 비교하였다.

Western blot analyses

B16F1 세포에 용출 완충용액(50 mM Tris - HCl, pH 7.5, 0.4% Nonidet P-40, 120 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 80 µg/ml leupeptin, 3 mM NaF and 1 mM DTT)을 첨가하여 4°C에서 30분 동안 처리하였다. 10 µg의 세포 용출액을 10% Tris - HCl gel에서 전기영동 후 단백질을 전기적으로 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 그 다음 10% skim milk를 nitrocellulose membrane에 전처리하고 목적 단백질에 대한 1차 항체(anti-tyrosinase, anti-TRP -1, anti-TRP -2, anti-SOD -3, anti-catalase, anti-beta-

actin (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA))를 처리한 다음 2차 항체를 처리 후, chemiluminescent ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA)를 사용하여 목적단백질을 검출하였다. Western blot의 band는 LAS3000 @image analyzer (Fuji film Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다.

통계처리

각 실험은 3회 이상 반복실험을 통하여 그 결과를 얻어 각각의 시료농도에 대해 평균±표준편차로 나타내었다. 각 시료농도에 대한 유의차 검정은 대조군과 비교하여 Student's t test 한 후 p<0.05 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다.

결 과

RNEE의 총 폴리 페놀 함량

서목태 주정추출물로부터 항산화 효능을 나타내는 RNEE의 총 폴리페놀함량을 측정하였다. Fig. 1A는 gallic acid를 이용한 표준 곡선을 보여주었다. Fig. 1B에서 보는 바와 같이

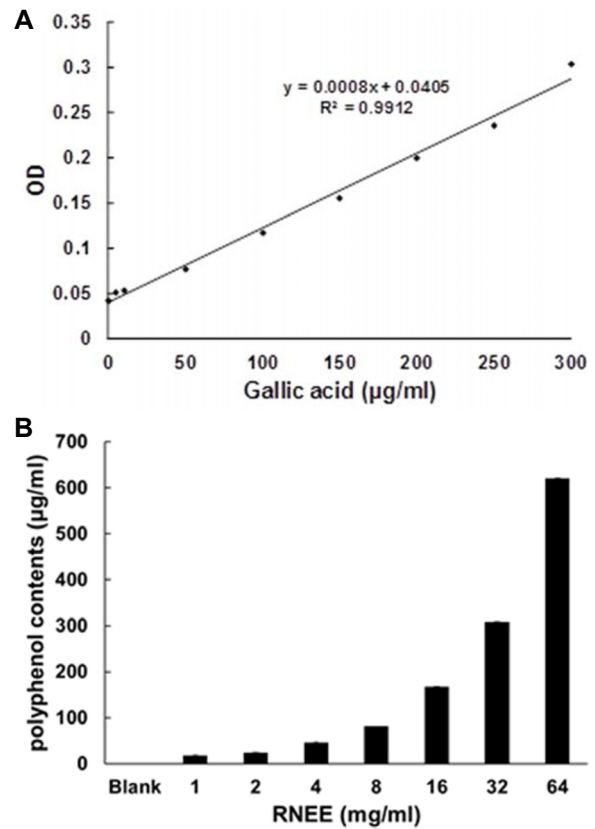


Fig. 1. Standard curve and total polyphenol content of RNEE. (A) Standard curve was plotted using gallic acid as a standard. (B) Total polyphenols of RNEE at 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 mg/ml were measured.

공시험군에 비해 RNEE의 최고 농도인 64 mg/ml에서 621.25 µg/ml의 폴리페놀이 함유되어 있다.

RNEE의 항산화 활성

RNEE가 항산화 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 DPPH radical 소거 실험과 reducing power 실험을 진행하였다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이 DPPH radical의 소거능력에 대하여 RNEE의 효과를 조사하였다. DPPH radical 소거법은 항산화 물질에 의한 DPPH radical의 색 변화를 통해 산화억제 정도를 예측할 수 있다. 양성 대조군으로 사용한 vitamin C는 100 µg/ml에서 공시험군과 비교하였을 때 78%의 소거활성을 나타냈으나, RNEE처리군에서는 DPPH radical에 대한 소거능이 나타나지 않았다. Fig. 2B에서 보는 바와 같이 RNEE의 환원력을 조사하기 위해 potassium ferricyanide와 ferric chloride를 이용하여 환원력을 조사하였다. 양성 대조군으로 사용된 vitamin C는 100 µg/ml에서 264.4%의 환원력을 나타낸 반면, RNEE 처리군은 최고농도인 64 µg/ml이하에서 환원

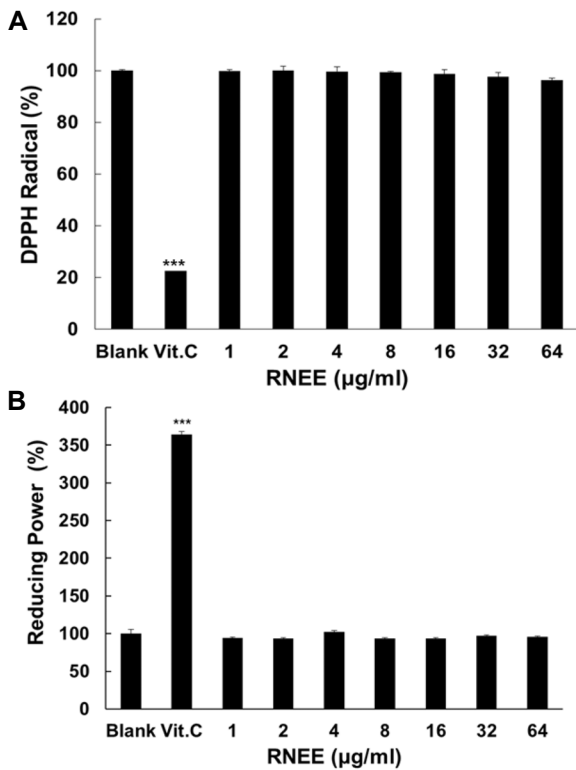


Fig. 2. Antioxidant activity of RNEE. (A) DPPH Radical scavenging activity was measured in the presence of RNEE. Vitamin C at 100 µg/ml (Vit. C) was used as a positive control. (B) Reducing power was evaluated in the presence of RNEE. Vitamin C at 10 µg/ml was used as a positive control. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test (***)*p*<0.001).

력이 나타나지 않았다.

In vitro tyrosinase 활성 증가 및 DOPA 산화에 의한 멜라닌 생성에 미치는 RNEE의 영향

Tyrosinase는 인체내의 멜라닌 생합성 경로에서 가장 중요한 초기 속도결정단계에 관여하는 효소이다. 이 실험은 *in vitro*에서 tyrosinase의 활성 증가 정도를 평가할 수 있다. 먼저 실험의 정확성을 평가하기 위하여 tyrosinase 활성 실험으로 음성 대조군으로 vitamin C 100 µg/ml 와 arbutin 2,000 µg/ml 을 사용하였다. Fig. 3A에서 보는 바와 같이 음성 대조군은 tyrosinase 활성을 억제한 반면에 RNEE는 공시험군에 비해 농도 32 µg/ml에서 16%의 tyrosinase 효소 활성을 촉진하였다.

3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)와 tyrosinase 효소가 반응하여 산화된 dopaquinone은 melanin 합성 기전에 나타

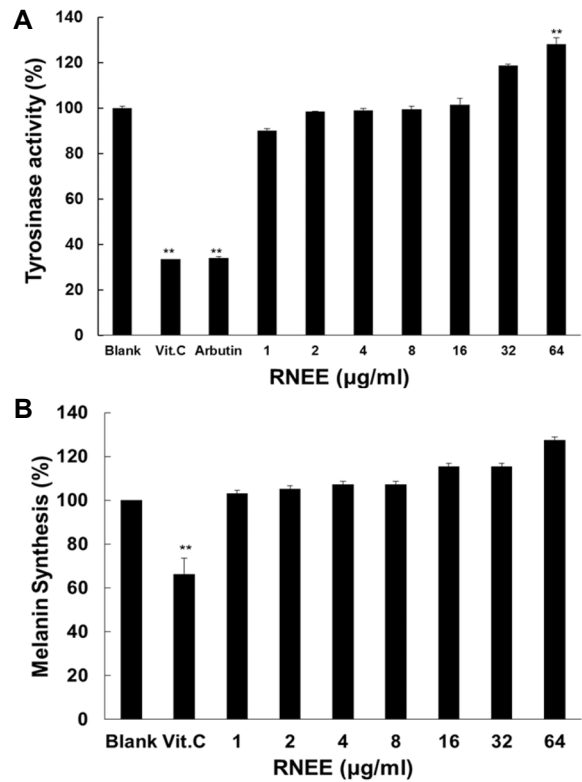


Fig. 3. Effect of RNEE on tyrosinase activity and melanin production by L-DOPA oxidation. (A) Tyrosinase activity was measured in the presence of RNEE. Arbutin at 2,000 µg/ml was used as a negative control. (B) The effect of RNEE on melanin production by L-DOPA oxidation was evaluated in the presence of RNEE. Vitamin C (Vit. C) 1,000 µg/ml was used as a negative control. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test (**p*<0.05, ***p*<0.01).

난다. 이 실험은 *in vitro*에서 DOPA 산화에 관련된 melanin 생성 증가를 평가할 수 있다. 먼저 실험의 정확성을 평가하기 위하여 melanin 생성 증가를 평가하기 위해 음성 대조군으로 vitamin C 100 µg/ml가 사용되었다. Fig. 3B에서 보는 바와 같이 음성 대조군은 tyrosinase 활성을 억제한 반면에 RNEE는 16 µg/ml 이상의 농도에서부터 15% 효소 활성 촉진효과를 나타내었다.

세포 독성 및 세포 내 과산화수소 생성 소거능에 미치는 RNEE의 영향

RNEE가 B16F1 세포 독성에 영향을 주는 농도를 조사하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. Fig. 4A에서 보는 바와 같이 대조군과 비교하였을 때 RNEE는 32 µg/ml 이상의 농도에서 12%의 독성 효과가 나타났으나, 80% 이상의 세포가 생존하였다.

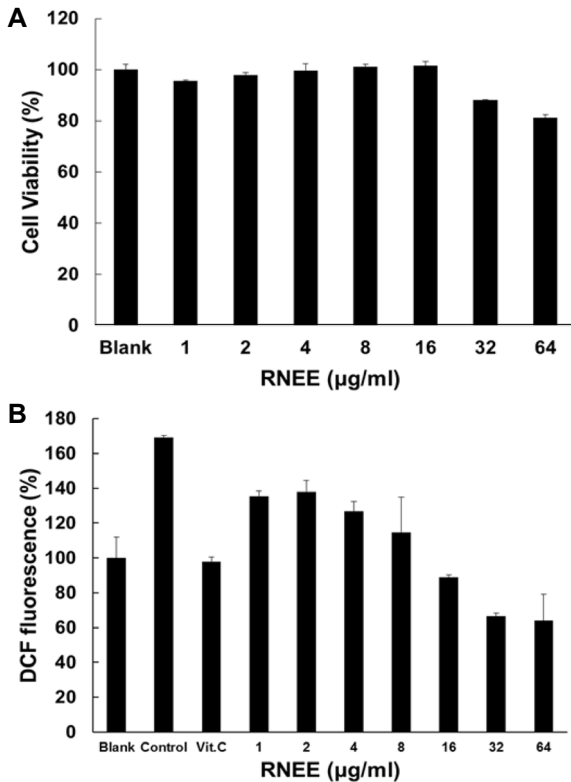


Fig. 4. The Effect of RNEE on cell viability and scavenging activity of intracellular H₂O₂. (A) The viability was evaluated in cells treated with RNEE at 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 µg/ml. (B) B16F1 cells were loaded with 20 µM DCFH-DA for 20 minutes. The cells were pre-treated with RNEE at concentrations indicated for 1 hr, and were exposed to H₂O₂ in HBSS buffer for 1 hr. The fluorescence intensities were measured with 488 nm and 530 nm of excitation and emission frequencies, respectively. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test.

DCFH-DA가 세포 내에서 과산화수소와 반응하게 되면 DCF를 생성하며 형광을 띄게 된다. 실험을 통해 RNEE가 세포내의 과산화수소를 얼마나 소거하는지를 확인해 보았다. Fig. 4B에서 공시험군과 비교하였을 때, 과산화수소만 첨가한 대조군은 DCFH-DA 형광이 69% 증가하였다. 공시험군에 비하여 RNEE 16 µg/ml 농도에서 세포 내 과산화수소를 12% 소거 능력을 나타내었다.

살아있는 세포 내에서 melanin 생성을 촉진시키는 RNEE의 효능

DOPA자극을 통한 melanin 생성조절효과를 조사하기 위해 B16F1 세포를 사용하여 melanin 함량을 측정 하였다. 공시험군과 음성대조군 vitamin C 1,000 µg/ml를 비교한 결과 Fig. 5A에서 보는 바와 같이 음성대조군인 vitamin C 1,000 µg/ml는 공시험군에 비해 80% 이상 억제 시켰다. RNEE는 L-DOPA에 의한 melanin 촉진 효과는 없는 것으로 나타났으나, Fig. 5B에서 보는 바와 같이 과산화수소를 처리하여 melanin 생성을 감소시킨 대조군에 비하여 과산화수소 전처리 후 RNEE를 처리한 군에서는 melanin 생성 촉진 효과가 있는 것으로 나타났다.

B16F1 세포에서의 항산화와 흑모 생성 기전에 관련된 단백질인 SOD-3, TRP-1, -2의 발현에 미치는 RNEE의 영향

Melanin 생성의 중요한 효소인 tyrosinase와 melanin 생성 신호 전달 기전과 관련된 tyrosine hydroxylase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2)와 항산화 효소 중에서 가장 중요한 catalase와 superoxide dismutase (SOD) 중 하나인 SOD-3의 단백질 발현을 조사하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 양성 대조군으로 사용된 α-MSH와 IBMX는 특히 TRP-2의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. RNEE는 tyrosine에서 DOPA로 전환하는 tyrosine hydroxylase의 발현을 감소시켰으나, tyrosinase related protein-2 (TRP-2)의 발현을 대조군에 비하여 농도 8 µg/ml 이상에서 농도에 비례하여 현저하게 증가시키는 것으로 나타났다. tyrosinase related protein-1 (TRP-1)의 단백질 발현은 대조군과 비교시 16 µg/ml의 농도에서 증가되는 것으로 나타났다. 몸 속 과산화수소(과산화수소)를 제거시켜주는 항산화 효소인 catalase의 발현을 조사한 결과 대조군과 같은 발현수준을 나타내었다. Superoxide (O₂⁻)를 제거시켜 과산화수소로 변환시키는 SOD 중, SOD-3의 발현을 조사한 결과 농도 16 µg/ml 이상에서 대조군과 양성 대조군인 α-MSH보다 단백질 발현이 증가하는 것으로 나타났다.

고 찰

멜라닌(Melanin)은 자외선에 의해 손상되는 세포를 보호해

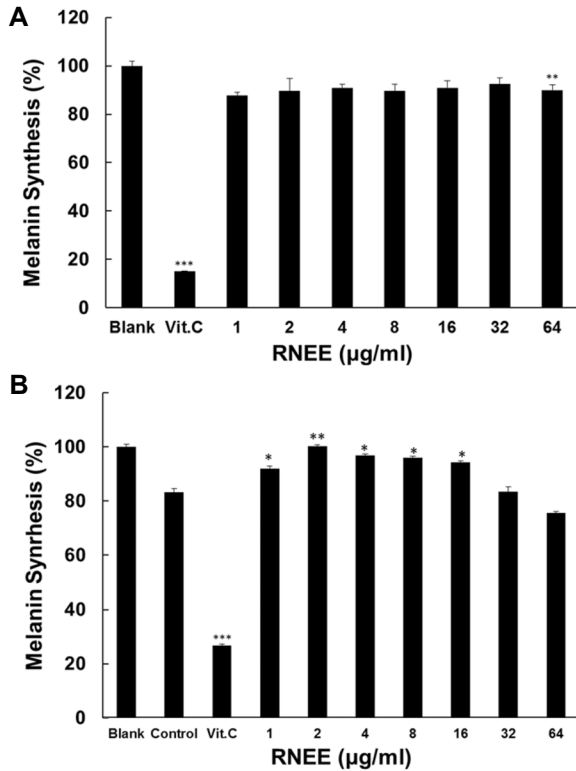


Fig. 5. Effect of RNEE on melanin production in B16F1 treated without or with 250 µM H2O2. (A) The amount of intracellular melanin were analyzed in B16F1 cells treated with RNEE. (B) The amount of intracellular melanin were analyzed in B16F1 cells treated with RNEE after H2O2 stimulation. Vit.C 1,000 µg/ml was used as a positive control. In these experiments Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001).

주며 모발 및 피부색을 결정하는 고분자 물질이다. 그러나 체내의 호흡과정에서 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해 멜라닌이 과도하게 생성되면 노화와 관련된 기미, 주근깨와 과색소 침착증 등을 야기시킨다[7]. 또한, 산화적 스트레스로 인해 세포나 기관을 손상시켜 암, 당뇨와 같은 질병을 유발시킨다고 보고되었다[20]. 본 연구는 노화의 원인 중 한가지인 ROS 생성 억제효과와 melanin 합성 촉진 효과를 조사하여 서목태가 흑모 촉진제로서 적용가능함을 조사하였다. 피부에서 melanin을 합성하는 melanocyte의 한 종류인 B16F1 cell을 이용하였으며 독성이 없는 농도에서 진행되었다. RNEE의 활성산소종(reaction oxygen species, ROS) 소거 기능을 조사한 결과 RNEE는 DPPH radical assay와 reducing power test에서는 항산화 효과를 나타내지 않았으나, 세포 내 과산화수소 생성을 측정할 수 있는 DCF-DA 실험에서는 RNEE가 과산화수소의 발생을 억제하는 것으로 나타났으며, 이러한 항산화 효능은 RNEE에 함유되어 있는 폴리 페놀에

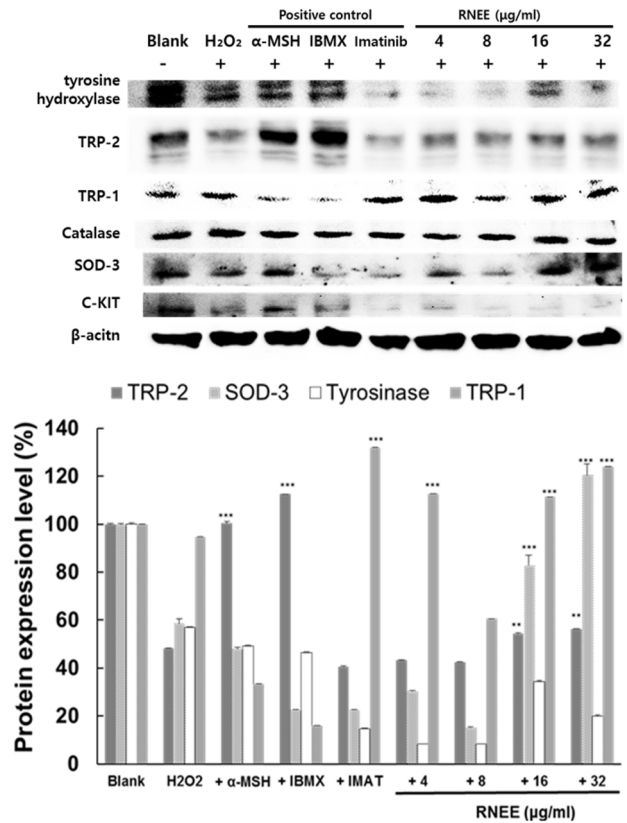


Fig. 6. Effect of RNEE on protein expressions of TRP-1, TRP-2, tyrosinase, SOD-3 in B16F1 cells. The cells were treated with RNEE at 4, 8, 16 and 32 µg/ml. Western blot analysis of cell lysates was performed using antibodies as indicated. Level of significance was identified statistically using Student's t test (***p*<0.01, ****p*<0.001).

의해서 기인된 것으로 추정된다. 이전 연구에서도 서목태가 산화적 스트레스에 대한 세포 손상 억제 효과를 보고하였다 [3]. RNEE의 흑모 생성 촉진 효과를 조사하기 위해 melanin 합성 기전에서 중요한 효소인 tyrosinase 활성 측정과 RNEE는 멜라닌 생성을 촉진시키는 것으로 나타났다. 이는 RNEE가 체내에 melanin이 합성되는 과정인 tyrosine이 tyrosinase에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)로 전환되는 과정에서 tyrosinase 활성을 증가시켜 DOPA 합성도 증가시키며 흑모 생성 촉진 효과를 나타내는 것을 의미한다. 이전 연구에서도 RNEE가 melan-a 세포에서 멜라닌 생성 합성 과정을 촉진한다고 보고되었다[8]. 다음으로 RNEE의 tyrosinase 효소 활성 증가 효과를 보다 자세히 조사하기 위해 western blot을 이용하여 단백질 발현 수준을 조사하였다. 본 연구에서는 멜라닌 생성을 촉진시키는 양성 대조군으로 사용된 α-MSH는 특히 TRP-2의 발현을 증가시키는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 TRP-2가 멜라닌 생성 촉진에 중요한 역할을 한다는 것을 암시 하고 있다. 이전 연구에서도 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)로부터 유래된 펩타이드의 멜라닌

생성에 대한 연구에서 양성 대조군으로 사용된 α -MSH가 TRP-2의 발현을 촉진시킨다는 연구 보고가 있었고[1, 14], *Kaempferia galanga*의 핵산 추출물의 멜라닌 생성 촉진 효능 실험에서 사용된 IBMX도 TRP-2의 발현을 촉진시켰다고 보고되었다[8]. 그러므로 IBMX는 TRP-2 발현을 증가시켜 멜라닌 생성을 촉진시켰으나 c-kit 억제제로 멜라닌 생성을 촉진시킨다고 알려진 IMAT [19]는 과산화수소 처리군에 비하여 TRP-1의 발현을 증가시켜 멜라닌 생성을 촉진시키는 것으로 나타났다. 본 연구에서 사용된 RNEE는 tyrosine에서 DOPA로 전환하는 tyrosine hydroxylase의 발현을 감소시켰으나, dopachrom을 산화시켜 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)를 생성시키는 tyrosinase related protein-2 (TRP-2)의 발현을 증가시켜 양성 대조군과 유사한 효능을 나타내어 멜라닌 생성을 촉진시킨다는 것을 발견하였다. 더욱이 RNEE는 동시에 tyrosinase related protein-1 (TRP-1)의 단백질 발현도 증가시켜 멜라닌 합성과정에서 중요한 효소의 발현 조절에 관여함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 MITF의 전사인자에 의해 TRP-1와 TRP-2의 발현 조절이 촉진된다는 보고와 일치한다. 그러나 RNEE는 과산화수소를 제거시켜주는 항산화 효소인 catalase의 발현에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났는데, superoxide를 제거시켜 과산화수소로 변환시키는 SOD 중 SOD-3의 발현은 증가되는 것을 발견하였다. 이러한 결과는 RNEE가 모낭 내에 축적되는 과산화수소의 생성을 감소시켜 멜라닌 생성을 촉진할 수 있다는 가능성에 대한 증거를 제시한다. 이전 보고에서도 서목태가 Nrf2로 중재된 NADPH Dehydrogenase Quinone 1 (NQO1) 항산화 효소의 발현을 촉진시킨다는 연구결과와 일치하였다[6]. 그러므로 RNEE가 멜라닌 생성을 촉진시키는 기전은 tyrosinase 활성을 촉진시킬 뿐만 아니라 L-DOPA 산화를 촉진시켜 멜라닌 생성을 증가시킨다. 더욱이, RNEE는 TRP-1, -2의 발현을 증가시킬 뿐만 아니라 과산화수소의 발현을 감소시키므로 세포 내 멜라닌 생성을 촉진시켜 흑모제로서의 개발이 가능한 소재로서 향후에 개발의 여지가 남아있어 모발 제품 개발 분야에 활용 가치가 높을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No.2017R1D1A3B06028000).

References

- Akihisa, T., Yokokawa, S., Ogihara, E., Matsumoto, M., Zhang, J., Kikuchi, T., Koike, K. and Abe, M. 2017. Melanogenesis inhibitory and cytotoxic activities of limonoids, alkaloids, and phenolic compounds from phellodendron amurense bark. *Chem. Biodivers.* **14**, 1-11.
- Bae, G. J. and Ha, B. J. 2015. Antioxidative effect of fermented rhynchosia nulubilis in obese rats. *J. Food Hyg. Saf.* **30**, 383-389.
- Choi, Y. H. 2016. Berberine hydrochloride protects C2C12 myoblast cells against oxidative stress induced damage via induction of Nrf2 mediated HO-1 expression. *Drug Dev. Res.* **77**, 310-318.
- Gan, E. V., Haberman, H. F. and Menon, I. A. 1974. Oxidation of NADH by melanin and melanoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **370**, 62-69.
- Han, K. H., Oh, J. C. and Ryu, C. H. 2004. A study on the optimization for preparation conditions of germinated brown rice gruel. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 1735-1741.
- Han, M. H., Park, C., Lee, D. S., Hong, S. H., Choi, I. W., Kim, G. Y., Choi, S. H., Shim, J. H., Chae, J. I. and Yoo, Y. H. 2017. Cytoprotective effects of esculetin against oxidative stress are associated with the upregulation of Nrf2-mediated NQO1 expression via the activation of the ERK pathway. *Int. J. Mol. Med.* **39**, 380-386.
- Huang, H. C., Hsieh, W. Y., Niu, Y. L. and Chang, T. M. 2014. Inhibitory effects of adlay extract on melanin production and cellular oxygen stress in B16F10 melanoma cells. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 16665-16679.
- In, M. H., Jeon, B. K., Mun, Y. J. and Woo, W. H. 2016. Hexane Extract of *Kaempferia galanga* L. Suppresses Melanogenesis via p38, JNK and Akt. *Kor. J. Ori. Med. Physiol. Pathol.* **30**, 47-53.
- Jang, H. J. and Seo, Y. K. 2016. Pigmentation effect of rice bran extracted minerals comprising soluble silicic acids. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2016**, 3137486.
- Jenkins, N. C. and Grossman, D. 2013. Role of melanin in melanocyte dysregulation of reactive oxygen species. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 908797.
- Joo, D. H., Lee, S. Y., Yoo, D. H. and Lee, J. Y. 2014. Inhibition effect of gamisoyo-san on MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase mRNA expression in melanoma cells (B16F10). *Kor. J. Herbology* **29**, 157-163.
- Kim, B.-H., Park, K. C., Park, J. H., Lee, C. G., Ye, S. K. and Park, J. Y. 2016. Inhibition of tyrosinase activity and melanin production by the chalcone derivative 1-(2-cyclohexylmethoxy-6-hydroxy-phenyl)-3-(4-hydroxymethyl-phenyl)-propenone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **480**, 648-654.
- Kim, S. R., Ahn, J. Y., Lee, H. Y. and Ha, T. Y. 2004. Various properties and phenolic acid contents of rices and rice brans with different milling fractions. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **36**, 930-936.
- Kyeong, H. P., Hahn, J. H. and Lim, D. Y. Microphthalmia-associated transcription factor-derived peptide and composition containing same: Google Patents, 2016.
- Le, K. T., Schachter, J. and Quigley, M. G. 2014. The role of melanin in protecting the skin and the retina from light damage: A comparative biological framework for age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 627.
- Lee, S. H., Kang, S. M., Sok, C. H., Hong, J. T., Oh, J. Y. and Jeon, Y. J. 2015. Cellular activities and docking studies

- of eckol isolated from *Ecklonia cava* (Laminariales, Phaeophyceae) as potential tyrosinase inhibitor. *Algae* **30**, 163.
17. Lee, Y. C., Kim, S. R., Im Kim, D. and Kim, S. H. 2016. Interaction between mitochondrial ROS and ER stress on PHMG-induced pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* **48**, PA3886.
 18. Marrot, L. 2016. The Cutaneous melanocyte as a target of environmental stressors: molecular mechanisms and opportunities. 175-196. *Skin Stress Response Pathways*: Springer.
 19. Pancholi, N. and Taneja, P. 2016. Intraoral hyperpigmentation due to imatinib mesylate. A review of the literature. *Oral Surg.* **9**, 206-214.
 20. Sabharwal, S. S. and Schumacker, P. T. 2014. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer* **14**, 709-721.
 21. Sun, S., Zhang, X., Sun, S., Zhang, L., Shan, S. and Zhu, H. 2016. Production of natural melanin by *Auricularia auricula* and study on its molecular structure. *Food Chem.* **190**, 801-807.
 22. Waterman, P. G. and Mole, S. 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*, pp 45-66, Blackwell Scientific Publications: Oxford, England, UK.

초록 : 서목태 주정 추출물이 DOPA 산화와 멜라닌 합성에 미치는 영향

김재련¹ · 김문무^{2*}

(¹동의대학교 화학과, ²동의대학교 응용화학과)

멜라닌은 생체 내에서 발모 및 피부색을 결정하는데 중요한 역할을 하는 고분자 물질이다. 하지만 활성산소에 의해 과도하게 생성된 멜라닌은 노화와 관련된 기미, 주근깨와 과색소 침착증 등을 야기한다고 알려져 있다. 이와 관련된 천연물 중 서목태 성분의 하나인 polyphosphate는 자외선에 의해 손상되는 피부 노화를 억제한다고 보고되고 있다. 본 연구의 목적은 멜라닌 합성에 대한 RNEE의 직접적인 효과를 조사한 것이다. 본 연구에서 RNEE는 DPPH radical의 소거효과 및 환원력과 같은 항산화 효과는 없는 것으로 나타났다. MTT 실험을 수행한 결과, RNEE는 농도 의존적으로 세포독성을 증가시켰다. 또한, RNEE는 tyrosinase 활성과 DOPA-oxidation 실험 결과에서 멜라닌 합성을 증가시켰다. RNEE는 살아있는 세포에서 L-DOPA에 의한 유발되는 melanin 생성 촉진 효과는 없는 것으로 나타났으나, 과산화수소를 처리하여 melanin 생성을 감소시킨 대조군과 비교시 과산화수소 전처리 후 RNEE를 처리한 군에서는 melanin 생성 촉진 효과가 있는 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 RNEE는 tyrosinase related protein-2 (TRP-2)의 발현을 증가시키는 것으로 나타났으며, tyrosinase related protein-1 (TRP-1)의 단백질 발현도 대조군과 비교시 16 µg/ml의 농도에서 증가되는 것으로 나타났다. 특히 superoxide anion을 과산화수소로 변환시키는 SOD-3의 발현을 조사한 결과 16 µg/ml 이상의 농도에서 대조군과 양성 대조군인 α-MSH보다 단백질 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 그러므로, 이상의 결과는 서목태가 흑모와 관련 있는 멜라닌 생성을 촉진하는 기능적인 잠재성을 가지고 있다는 것을 암시한다.