

Effect of Ethanolic Extracts Mixed with Grains and *Fallopia multiflora* on Melanogenesis

Eunbeen Lee¹ and Moon-Moo Kim^{2*}

¹Department of Chemistry, Dong-Eui University, 176, Eomgwang-ro, Busanjin-gu, Busan 47340, Korea

²Department of Applied Chemistry, Dong-Eui University, 176, Eomgwang-ro, Busanjin-gu, Busan 47340, Korea

Received April 4, 2018 / Revised July 23, 2018 / Accepted March 4, 2019

The aim of this study was to investigate the effect of a mixture of ethanol extracts of *Black oryzasativa*, *Sesamum indicum*, *Oryza sativa*, *Rhynchosia Nulubilis*, and *Polygoni multiflori radix* (MIXEE) on melanogenesis to develop a natural product for black hair growth. An accumulation of hydrogen peroxide (H_2O_2) in hair follicles, which reduces melanin synthesis, is responsible for hair graying. In the present study, MIXEE showed scavenging activity against DPPH radicals and reducing power. In addition, it reduced the cellular H_2O_2 level, indicating that it could inhibit oxidation and promote melanin synthesis, which was decreased by H_2O_2 . On the other hand, it did not affect tyrosinase activity *in vitro* but promoted the turnover of L-DOPA into melanin. MIXEE promoted melanin synthesis at the cellular level in B16F1 cells. Furthermore, MIXEE increased the expression levels of superoxide dismutase 2 (SOD2) and SOD3 in western blot analysis. In addition, MIXEE increased the expression levels of tyrosinase-related protein (TRP)-2, which promoted melanin synthesis from L-DOPA. The results suggested that MIXEE could promote melanogenesis. Therefore, MIXEE may have potential as a natural product for promotion of melanin production and reversal of gray hair to black hair.

Key words : *Black oryzasativa*, *Oryza sativa*, *Polygoni multiflori radix*, *Rhynchosia Nulubilis*, *Sesamum indicum*

서 론

흑모는 노화됨에 따라 모발의 모낭 세포에 있는 멜라닌 함량이 감소하면서 결국 백색으로 변한다. 그러므로 백모를 다시 흑모로 되돌리기 위해서는 모낭에 있는 melanocyte가 melanin색소를 생성해야 한다. 뿐만 아니라 피부 기저층에 있는 melanocyte는 자외선과 같은 유해한 자극으로부터 피부를 보호하기 위하여 방어기전으로 melanin을 합성한다[2]. Melanin 합성 기전에서 tyrosinase 효소는 melanin 합성반응의 초기속도를 결정하는 중요한 촉매효소이다[26]. Melanin을 합성하기 위해 tyrosinase는 tyrosine에 hydroxyl 작용기를 결합시켜 3,4-dihydroxy phenylalanine (DOPA)를 생성하고 동시에 DOPA를 산화시켜 dopaquinone으로 전환시킨다. 그 다음 단계로 dopaquinone이 산화되어 생성된 dopachrome은 두번째 효소인 tyrosinase related protein-2 (TRP-2)에 의하여 5,6-Dihydroxy-2-indolylcarboxylic acid (DHICA)로 전환된다. 이러한

DHICA는 세번째 효소인 tyrosinase related protein-1 (TRP-1)에 의해 indole-5,6-quinone carboxylic acid로 전환되고 이것이 산화되어 eumelanin을 생성한다[5]. 또 다른 melanin 합성기전으로는 hydrogen peroxide, superoxide ion, hydroxyl radical등과 같은 불안정한 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)의 산화반응에 의해 melanin이 합성된다[10, 16]. 한편 다른 선행연구에서는 모낭 주위에는 고농도의 H_2O_2 가 축적되어 melanin 생성을 감소시켜 백발을 유발시키는데, 그 기전은 H_2O_2 에 의하여 tyrosinase의 활성이 상실되어 melanin 합성이 감소된 것으로 보고되었다[38]. 그러므로 모낭세포에 있는 melanocyte에 의해서 melanin생성이 촉진되면 백모가 흑모로 전환 될 수 있다. 최근에 Melanin 생성을 증가시키는 물질로서는 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), imatinib mesylate, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)가 알려져 있다. α -MSH는 피부 색소 침착 조절에 중요한 메신저 역할을 하는 cAMP를 증폭시키고 protein kinase A (PKA)가 활성화시킨다[21]. protein kinase A (PKA)가 활성화 시킨다. 이에 따라 tyrosinase 활성을 조절해 melanin 세포의 증식과 색소증가에 영향을 미친다[18, 42]. Imatinib mesylate는 tyrosine kinase에 의해 유발되는 만성 골수성 백혈병(CML)의 치료제로 알려져 있는 tyrosine kinase 억제제이다. Imatinib mesylate는 또한 c-kit tyrosinase kinase를 억제하며 c-kit와 그 리간드 줄기 세포 인자의 melanin 세포의 생존과 발생에 관여한다[14, 30]. IBMX는 cAMP phosphodiesterase를 억제함으로써 세포

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1511, 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.

내 cAMP 함량을 증가시켜 PKA를 활성화 시키며, PKA는 전사인자인 CREB를 인산화시키고 melanin 생성촉진과정의 주요 효소인 tyrosinase와 MITF를 상향 조절할 수 있다[21]. 본 연구에서는 흑모의 발생을 촉진하는 천연물을 발굴하는 과정에서 민간에서 흑모발생에 효능이 있다고 알려진 천연물을 대상으로 melanin 생성 효능연구를 수행하여 5가지 천연물을 발굴하였다. 첫째, 흑미는 α , β , γ , δ -tocopherol, 식물성 스테롤, 그리고 다양한 페놀성 화합물이 함유되어 있고, 특히 흑미의 겨층에는 다른 곡류에 비하여 flavonoid 와 anthocyanin이 더 풍부하다[24]. 흑미는 혈전 용해 활성, 노화방지, 생리활성 기능이 있는 것으로 알려져 있다[6, 31]. 둘째, 적하수오는 emodin을 함유하고 있으며[36], emodin은 항산화 활성[40], 항염증작용[4], 항균 활성[15], 항암활성[3]이 있다고 알려져 있다. 셋째, 흑임자는 필수지방산인 palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid 와 아미노산, 무기질, 토코페롤, β -sitosterol의 함량이 높으며, 주된 활성 성분인 sesaminol과 lignan glucosides이 세포모델과 동물 실험 결과에서 t-butylhydroperoxide, carbon tetrachloride 의 독성 화합물에 의한 산화 손상을 억제하는 것으로 보고되었다[32, 34, 35]. 넷째, 현미는 식물성 단백질을 비롯한 지방, 칼슘, 인, 나트륨, 철분 등의 무기질, 비타민 B, E, 니코틴산, 엽산, 판토텐산 등의 비타민류 및 필수아미노산인 영양소가 다량 함유되어 있다[12, 23, 27-29] 또한 섬유질 함량이 높은 현미는 만성질환에 한방효과가 있고, 콜레스테롤 농도를 낮추는 효과가 있다[1, 22, 25, 37]. 마지막으로 isoflavone이 함유된 서목태(*Rhynchosia nulubilis*)는 해독성과 청혈작용이 있으며, 골질환 예방 및 치료에 사용되며 신체 기능을 강화하는 약제로 고혈압, 당뇨병, 노인성 치매를 예방하며 신장에 좋다고 보고되어 있다[12, 20]. 따라서 본 연구에서는 양성대조군으로 α -MSH, Imatinib mesylate, IBMX와 비교하여 흑미, 현미, 적하수오, 흑임자, 서목태의 에탄올 추출물 혼합물의 melanin 생성 촉진효과에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 시료의 제조

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

시료의 제조

흑미 에탄올추출물, 적하수오 에탄올추출물, 흑임자 에탄올추출물, 현미 에탄올추출물, 서목태 에탄올추출물은 다음과 같은 방법으로 추출하였다. 먼저, 흑미, 적하수오, 흑임자, 현미, 서목태를 흐르는 물에 깨끗이 세척한 다음 완전히 자연 건조시켰다. 세척·건조된 흑미, 적하수오, 흑임자, 현미, 서목태를 믹서기로 분쇄하여 분말로 제조 후 에탄올에 3일간 추출하고 여과하였다. 각 여과된 여액을 감압 농축하여 분말 형태의 흑미, 적하수오, 흑임자, 현미, 서목태 에탄올추출물을 획득하였다. 제조된 분말형태의 시료들을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 시험농도로 희석하여 본 연구에 사용하였다.

DPPH radical assay

Brand-Williams [11] 실험방법을 변형하여 MIXEE의 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.

환원력 Assay

Oyaizu [23]의 방법에 따라 측정하였다. MIXEE 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 20분 동안 반응시켰다. 여기에 10% TCA 용액 1 ml를 가하여 13,500 \times g에서 15분 동안 원심분리하여 얻은 상등액 1 ml에 증류수 및 ferric chloride 각 1 ml를 가하여 혼합한 후 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 0.01% vitamin C를 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 μ l와 시료액 20 μ l 그리고 mushroom tyrosinase (1,500 U/ml)액 20 μ l를 순서대로 넣는다. 이 용액에 1.5 mM tyrosine 액 40 μ l를 넣고 37°C에서 10~15분 동안 반응시킨다. 그리고 이것을 ELISA reader (ELISA processor II. Behring, Germany)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

In vitro L-dopa 활성 측정

시험관에 0.1 M 인산염완충액(pH 6.5) 480 μ g/ml와 L-DOPA 20 μ g/ml 그리고 시료액 5 μ g/ml을 넣고 2,000 U/ml의 mushroom tyrosinase 40 μ g/ml를 순서대로 넣은 다음 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 그리고 ELISA reader (ELISA processor II. Behring, Germany)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

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 [9]의 방법에 따라 B16F1 세포에 대한 MIXEE의 세포독성을 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하여 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 0.1% vitamin C와 MIXEE를 시험농도로 1 시간 동안 처리하였다. PBS로 4번 세척 후 H₂O₂를 250 µM 농도를 함유한 HBSS 완충용액 100 µl를 세포에 처리하였다. 세포내에서 H₂O₂는 DCFH-DA와 반응하여 형광을 띄는 DCF를 생성한다. 이를 multi-detection microplate reader (SynergyHtx)를 이용하여 excitation: 488 nm, emission: 530 nm 조건에서 형광정도를 측정하였다.

B16F1에서 Melanin 생성 측정

6-well plate에 3×10⁵ cells/well로 세포를 분주하였고, 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 1 N 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.

H₂O₂를 처리한 B16F1에서 Melanin 생성 측정

6-well plate에 3×10⁵ cells/well로 세포를 분주하였고, 250 µM H₂O₂를 처리한 후 24시간 방치 후 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 1 N 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 세포용출액을 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 -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 시료농도군에 대한 유의차 검정은 대조군과 비교하여 Student's *t* test 한 후 *p*<0.05 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 간주하였다.

결 과

DPPH radical 소거능과 환원력에 대한 MIXEE의 효과

본 실험에서는 MIXEE의 항산화 효과를 알아보기 위해 먼저 MIXEE의 DPPH radical의 소거능력을 조사하였다. Fig. 1A에서 보는 바와 같이 공시험군에 비하여 양성대조군인 0.01% vitamin C는 DPPH radical을 80% 감소시켰고 MIXEE를 처리한 군은 8 µg/ml 이상의 농도에 비례하여 DPPH radical 소거능이 증가하였다. MIXEE는 최고농도인 64 µg/ml에서 DPPH radical이 40%까지 소거시켰다. 다음으로 MIXEE 환원력을 조사하기 위해 potassium ferricyanide와 ferric chloride를 이용하여 reducing power test 를 수행하였다. Fig. 1B에서 보는 바와 같이 양성 대조군으로 사용된 0.001%의 농도의 vitamin C는 공시험군에 비하여 약 337%의 환원력을 보여주었고 MIXEE를 처리한 군에서 16 µg/ml 이하의 농도에서는 환원력이 나타나지 않았으나 32 µg/ml 이상의 농도부터 20%의 환원력을 보여주었다.

In vitro tyrosinase 활성 및 melanin합성에 대한 MIXEE의 효과

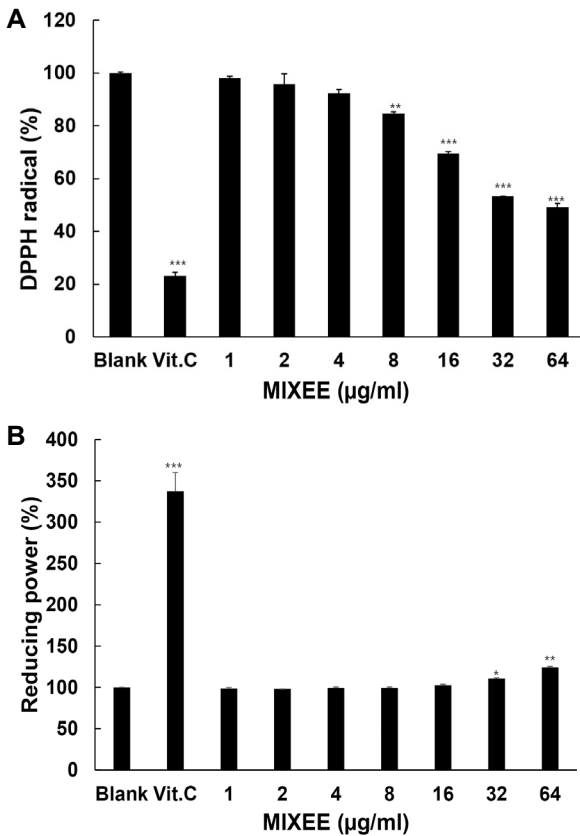


Fig. 1. Effect of MIXEE on DPPH radical Scavenging activity and reducing power. (A) Scavenging activity of MIXEE on DPPH radical. Vitamin C (Vit C) at 100 µg/ml was used as a positive control. (B) Reducing power of MIXEE. Vitamin C (Vit C) at 10 µg/ml was used as a positive control. Data are given as means of values ± SD from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) using Student's *t* test.

본 실험에서는 *in vitro* 상에서 melanin 생성을 촉진시키는 tyrosinase의 활성과 L-dopa에서 melanin합성에 대한 MIXEE의 효과를 측정하는 실험을 수행 하였다. 먼저 Tyrosinase 활성에 대한 MIXEE의 효과를 조사하기 위하여 tyrosinase activity를 측정 한 결과 Fig. 2A에서 보는 바와 같이 공시험군에 비해서 음성대조군인 0.1% vitamin C는 80%의 tyrosinase 활성을 억제시켰다. MIXEE군은 tyrosinase 활성에는 영향을 주지 않았지만 Fig. 2B에서 보는 바와 같이 MIXEE는 8 µg/ml 부터 L-dopa에서 melanin합성을 농도에 비례하여 촉진시켰다.

세포성장에 대한 MIXEE의 효과

MIXEE가 세포 독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. B16F1세포독성에 대한 MIXEE의 효과를 측정 한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 MIXEE는 32 µg/ml 이상의 농도에서부터 30% 이상 세포독성을 나타내었다.

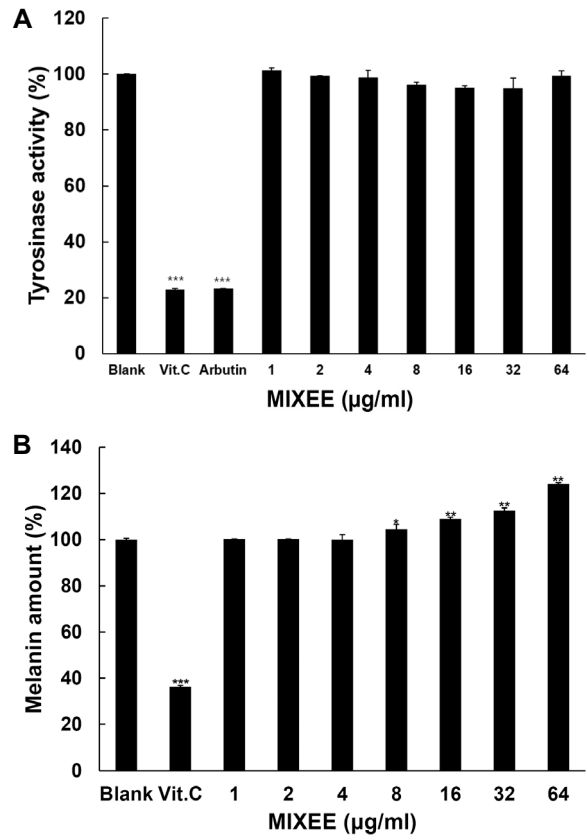


Fig. 2. Effect of MIXEE on tyrosinase activity and melanin synthesis *in vitro*. (A) Effect of MIXEE on tyrosinase activity. (B) Effect of MIXEE on melanin synthesis. Vitamin C at 1,000 µg/ml was used as a negative control in these experiments. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) using Student's *t* test.

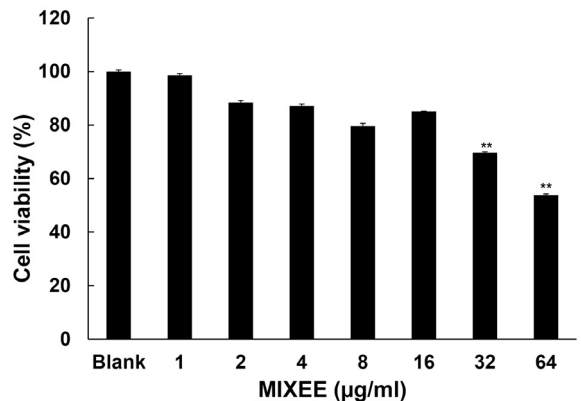


Fig. 3. Effect of MIXEE on viability in B16F1 cells. The cells were treated with MIXEE at 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 µg/ml. Cell viability was determined by MTT assay after 24 hr of incubation. Data are given as means of values ± S.D. from three independent experiments. Level of significance was identified statistically (** $p < 0.01$) using Student's *t* test.

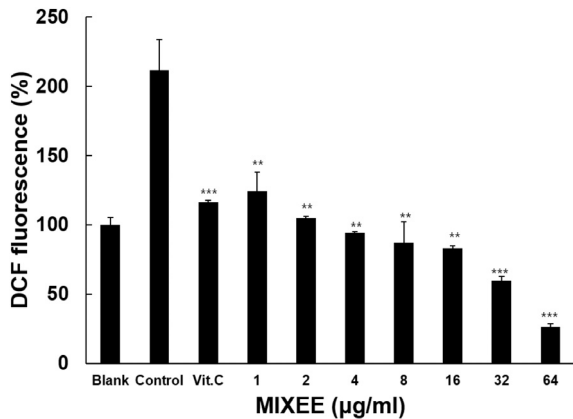


Fig. 4. Scavenging effect of MIXEE on intracellular H₂O₂. B16F1 cells were loaded with 20 µM DCFH-DA for 20 minutes. The cells were pre-treated with MIXEE at concentrations indicated for 1 hr, and were exposed to H₂O₂ in HBSS buffer for 1 hr. The fluorescence intensities were measured with 488 nm and 530 nm of excitation and emission frequencies, respectively. Level of significance was identified statistically (** *p*<0.01, *** *p*<0.001) using Student's t test.

세포내 H₂O₂ 생성억제에 대한 MIXEE의 효과

DCFH-DA가 B16F1세포 내에서 H₂O₂와 반응하게 되면 DCF가 생성되면서 형광을 띄게 된다. 형광 측정을 통해 MIXEE가 세포내의 H₂O₂를 얼마나 소거하는지를 확인해 보았다. Fig. 4에서 공시험군에 비하여 대조군의 형광이 100% 이상 증가하였음을 볼 수 있고, H₂O₂만 첨가한 대조군에 비하여 MIXEE군은 64 µg/ml에서 형광이 180% 감소되어 MIXEE의 농도가 증가함에 따라 세포 내 H₂O₂를 제거하는 효과가 증가한 것을 확인 할 수 있었다.

B16F1 세포 내 melanin 생성에 대한 MIXEE의 효과

DOPA자극을 통한 melanin 생성에 대한 MIXEE의 효과를 조사하기 위해 B16F1 세포를 사용하여 melanin 함량을 측정하였다. Fig. 5A에서 보는 바와 같이 MIXEE는 32 µg/ml농도 이상에서 공시험군에 비해 melanin 합성을 30% 이상 증가시켰다. 다음으로 모발의 노화를 유발시키기 위한 조건을 모방하여 백모발생에서 주요원인으로 알려져있는 H₂O₂를 250 µM 농도로 24시간 동안 처리하여 B16F1 cell에서 melanin 합성을 감소시키고 DOPA자극을 통한 melanin 생성에 대한 MIXEE의 효과를 조사하였다. Fig. 5B에서 보는 바와 같이 H₂O₂를 처리한 대조군은 공시험군에 비하여 melanin 합성이 약 40%정도 감소되었다. MIXEE는 대조군에 비해 4 µg/ml 이상의 농도에서부터 유의성이 나타났으며 32 µg/ml 이상의 농도에서 melanin 합성을 60%이상 증가시켰다. 비록 MIXEE의 세포독성이 8 µg/ml부터 64 µg/ml까지 최고40%의 세포사멸을 나타내지만 이러한 결과는 MIXEE의 농도가 증가함에 따라

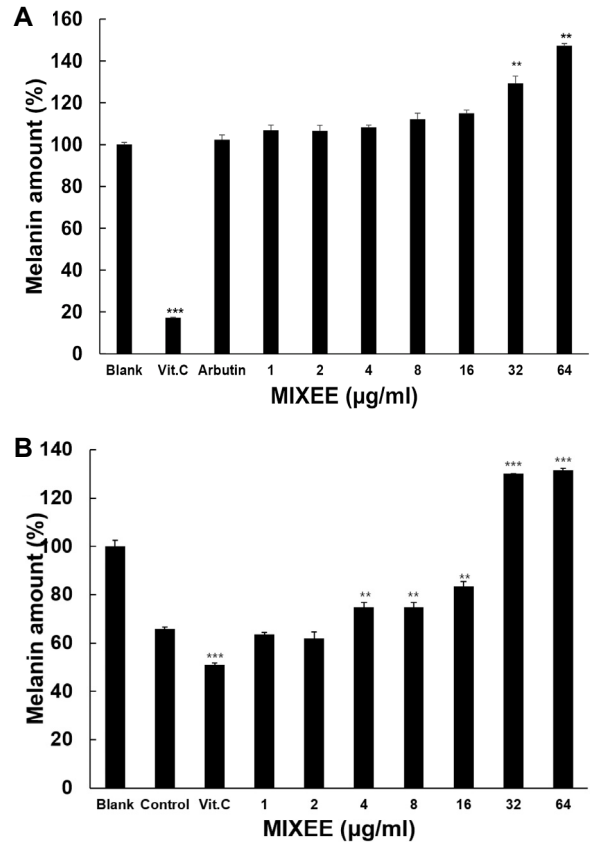


Fig. 5. Effect of MIXEE on melanin production in B16F1 treated without or with 250 µM H₂O₂. (A) The amount of intracellular melanin were analyzed in B16F1 cells treated with MIXEE. (B) The amount of intracellular melanin were analyzed in B16F1 cells treated with MIXEE after H₂O₂ stimulation. Vit.C 1,000 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 (** *p*<0.01, *** *p*<0.001) using Student's t test.

melanin 생성을 촉진시키는 유효성분과 세포독성을 유발하는 물질이 같이 증가함을 알 수 있다. 이러한 결과는 MIXEE가 백모진행을 억제하는 효과가 있음을 나타낸다.

B16F1에서 항산화 관련 단백질 발현에 대한 MIXEE의 효과

본 실험에서는 MIXEE가 항산화 관여하는 단백질 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 Western blot을 수행하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 melanin 합성을 감소시키기 위하여 250 µM의 H₂O₂를 처리한 대조군은 공시험군에 비하여 SOD-2와 SOD-3의 단백질 발현은 감소된 반면에 catalase의 발현은 증가되었다. 양성대조군으로 사용된 6 µM의 α-MSH, 2.5 µM의 imatinib mesylate, 160 µM의 IBMX는 대조군에 비하여 항산화 단백질인 SOD-2의 발현이 증가되었고, SOD-3의 단백질 발현은 차이가 없는 반면에 catalase의 발현은 IBMX 처리

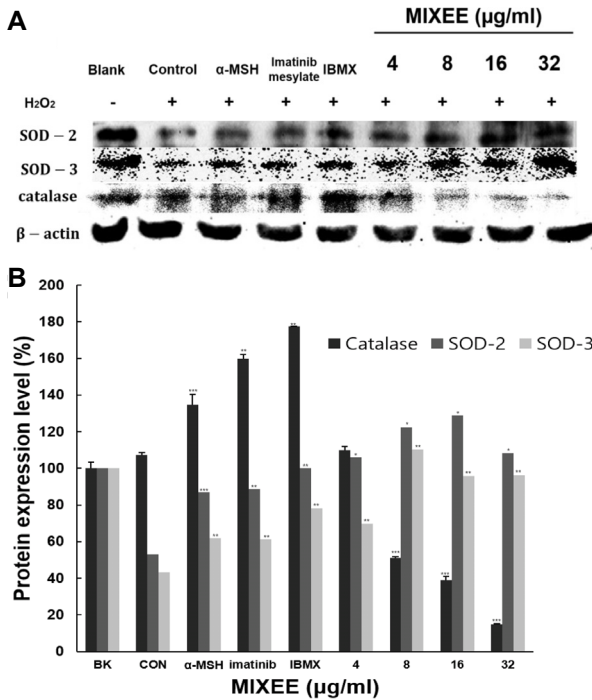


Fig. 6. Effect of MIXEE on protein expressions of SOD-2, SOD-3, catalase in B16F1 cells. The cells were treated with MIXEE at 4, 8 and 16 μg/ml. Western blot analysis of cell lysates was performed using antibodies as indicated. The expression of β-actin was used as a control for normalization of target proteins. Level of significance was identified statistically (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) using Student's t test

군에서만 증가되었다. 한편 MIXEE 처리군에서는 SOD-2 및 SOD-3의 단백질 발현은 증가된 반면 catalase의 발현은 감소되었다. 이러한 결과는 MIXEE의 항산화 활성에 의하여 H₂O₂를 제거함으로써 이를 분해하는 catalase의 필요성이 감소되어 발현이 줄어들었다는 것을 나타낸다.

B16F1에서 melanin 생성에 관여하는 단백질의 발현에 대한 MIXEE의 효과

본 실험에서는 MIXEE가 melanin 합성에 관여하는 단백질 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여 Western blot을 수행하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 세포 내에서 melanin 합성에 영향을 미치는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현을 분석한 결과 같이 melanin 합성을 감소시키기 위하여 250 μM의 H₂O₂를 처리한 대조군은 공시험군에 비하여 TRP-2의 단백질 발현만 감소되었다. 양성대조군으로 사용된 6 μM의 α-MSH, 2.5 μM의 imatinib mesylate, 160 μM의 IBMX는 대조군에 비하여 tyrosinase와 TRP-2의 발현을 증가시켰고, TRP-1의 단백질 발현은 α-MSH의 존재하에서만 증가되었다. MIXEE는 특히 TRP-2의 단백질 발현을 증가시켰으나 TRP-1의 단백질 발현은 차이가 없었고, tyrosinase는 단백질 발현이 감소되었

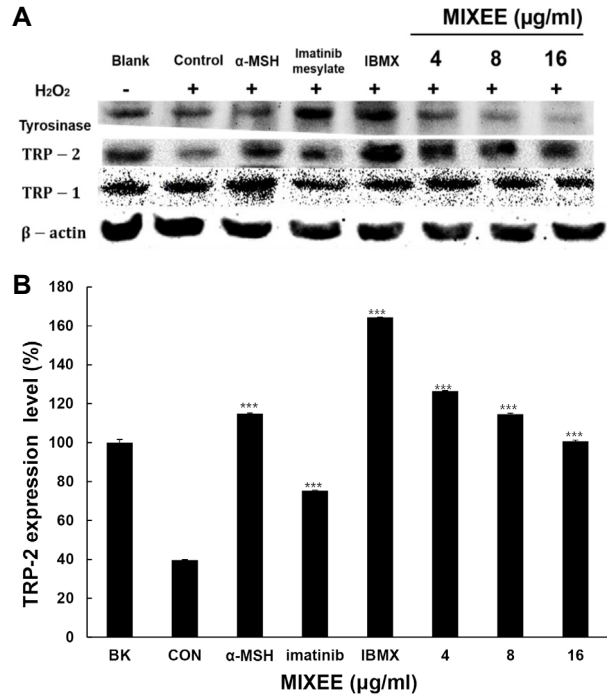


Fig. 7. Effect of MIXEE on protein expressions of TRP-1, TRP-2, tyrosinase in B16F1 cells. The cells were treated with MIXEE at 4, 8, 16 and 32 μg/ml. Western blot analysis of cell lysates was performed using antibodies as indicated. The expression of β-actin was used as a control for normalization of target proteins. Level of significance was identified statistically (* $p < 0.05$) using Student's t test.

다. 본 연구결과에서 MIXEE는 TRP-2의 단백질 발현을 증가시켜 melanin 합성을 촉진시키는 것으로 나타났다.

고 찰

최근 연구의 흑모기전을 살펴보면, 노화가 진행됨에 따라 흑모가 백모로 변화되는 원인으로 catalase, methionine sulf-oxide reductase A 및 B 단백질 발현이 감소함으로써 H₂O₂가 모낭주위에 축적되어 melanin 합성에 관여하는 tyrosinase의 methionine 잔기를 산화시킴으로써 효소구조를 변형시켜 melanin 합성이 저하되어 백모가 유발되는 것으로 보고되었다[38]. 그러므로 본 연구에서는 항산화 효능이 탁월하고 tyrosinase 활성을 촉진하여 melanin 합성을 증가시키는 천연소재를 발굴하고자 하였다. 민간에서 백모발생을 억제하고 흑모유발을 촉진하는 소재로 흑미, 흑임자, 서목재, 현미, 적하수오가 가장 잘 알려져 있었다. 그리하여 이들 소재의 혼합물이 melanin 생성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위하여 항산화 활성 및 melanin 생성 촉진효과에 대한 연구를 수행하였다.

기존 문헌조사에서 곡물의 일종인 흑미, 흑임자, 현미, 서목

태는 각각 DPPH radical scavenging 효과가 있었고[8, 13, 17, 39] 적하수오도 DPPH radical scavenging 효과가 있어[26] 이들 혼합물인 MIXEE이 항산화 효과를 실험한 결과 항산화 활성의 감소없이 8 µg/ml부터 농도의 증가에 비례하여 DPPH radical 소거능을 증가시켰다. 뿐만 아니라 환원력도 32 µg/ml 이상에서 나타나는 것을 보여주었다. 특히 5가지 소재중에서 적하수오가 항산화 활성에 중요한 역할을 하고 있었으며, 이러한 효능은 적하수오에 함유되어 있는 flavonoid 성분인 emodine, chrysophanol에 기인되는 것으로 추정된다[19, 41].

일반적으로 피부 melanocyte에서는 tyrosine에서 melanin으로 생성되는 전체과정이 산화과정이므로 활성산소로 자극하면 melanin생성이 증가된다. 그러므로 항산화제를 처리하면 환원과정을 일으켜 melanin 생성을 억제하여 피부 미백 효과를 볼 수 있다. 반면에 모발 melanocyte에서는 활성산소의 자극 여부와 상관없이 지속적으로 melanin이 생성되어 흑모가 발생된다. 노화되면 모낭세포에 H₂O₂가 축적됨으로 인하여 tyrosinase의 효소활성이 저해됨으로 인하여 melanin 합성이 감소하여 백모로 전환됨으로 항산화제를 백모에 처리하면 H₂O₂를 제거하여 백모가 흑모로 전환 될 수 있는 가능성이 있다. 본 연구에서 MIXEE는 모낭에 축적된 H₂O₂를 제거하여 tyrosinase 효소를 정상적으로 작동시켜 melanin 생성을 촉진시켰다. 이러한 추론을 뒷받침하기 위하여 세포내에 H₂O₂를 처리하여 MIXEE의 항산화 효능을 세포내에서 조사한 결과 탁월한 H₂O₂ 제거 효능을 확인하여 이상의 추론이 입증됨을 확인하였다. 다음으로 MIXEE가 *in vitro* 상에서 melanin 생성을 촉진하는 tyrosinase 활성과 L-dopa에서 melanin생성 측정 실험을 수행 한 결과 MIXEE는 tyrosinase 활성에는 영향을 주지 않았지만 L-dopa에서 melanin 합성은 촉진 시켰다. 이 결과로 유추해보아 melanin을 합성하는 첫 번째 단계인 tyrosine에서 tyrosinase가 작용하여 hydroxyl 작용기를 결합시켜 3,4-dihydroxy phenylalanine (DOPA)가 생성되는 과정에서의 tyrosinase 활성에는 MIXEE가 관여하지 않았지만 두 번째 과정인 DOPA에서 dopaquinone을 거쳐 melanin 이 생성되는 과정에 관여하는 효소인 TRP-2 활성에 크게 영향을 미치는 것으로 판단된다. 기존 연구에서 서목태는 tyrosinase 활성을 증가시키는 연구결과가 알려져 있으며[17], 적하수오는 *in vitro* L-DOPA 실험에서 melanin 생성을 증가시켜 흑모의 발생을 촉진시킨다고 보고되었다[7]. 본 연구에서 MIXEE가 단백질 발현에 미치는 영향을 분석한 결과 항산화 단백질인 SOD-2, SOD-3 단백질의 발현은 증가하였지만 H₂O₂를 가수분해시키는 catalase의 발현은 단백질 발현이 감소하였다. 이러한 결과는 MIXEE의 항산화 활성에 의하여 H₂O₂를 제거함으로써 이를 분해하는 catalase의 필요성이 감소되어 발현이 줄어든 것으로 추론된다. 세포 내에서 melanin 합성에 영향을 미치는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현을 분석한 결과 MIXEE는 tyrosinase의 발현을 감소시키고 TRP-1의 발현에는 영향을

주지 않았으나, dopachrome이 DHICA로 전환될 때 촉매하는 효소인 TRP-2의 발현은 증가시켰다. 그러므로 MIXEE는 tyrosine에서 DOPA로의 전환은 촉매할 수 없었으나 melanin 합성의 중간 매개물인 DOPA에서 melanin 합성은 촉진한 것으로 추론된다.

결론적으로 MIXEE는 세포 내 H₂O₂를 소거하는 효과가 있었을 뿐만 아니라 H₂O₂에 의한 tyrosinase 효소의 불활성화를 차단시켜 melanin 생성을 촉진하는 것으로 나타났다. 비록 MIXEE는 고농도에서 세포독성을 나타내었으나 동시에 melanin 생성을 촉진시키는 유효성분의 농도도 함께 증가함을 알 수 있다. 한편 MIXEE에 의하여 감소된 tyrosinase의 발현수준이 MIXEE에 의한 tyrosinase 활성 증가로 인한 melanin 합성 촉진에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 그러므로, 이상의 결과는 MIXEE가 백발화과정을 가역화시키는 과정에서 주요한 역할을 하는 melanin 생성을 촉진하는 하나의 약학 소재로 응용될 수 있다는 것을 시사하고 있다.

감사의 글

이 논문은 2019년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No.2017R1D1A3B06028000).

References

1. Akiba, Y. and Matsumoto, T. 1980. Effects of several types of dietary fibers on lipid content in liver and plasma, nutrient retentions and plasma transaminase activities in forced growing chicks. *J. Nutr.* **110**, 1112-1121.
2. Böhm, M. and Hill, H. Z. 2016. Ultraviolet B, melanin and mitochondrial DNA: Photo-damage in human epidermal keratinocytes and melanocytes modulated by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *F1000Res.* **5**, 881.
3. Chan, T., Chang, C., Koonchanok, N. and Geahlen, R. 1993. Selective inhibition of the growth of ras-transformed human bronchial epithelial cells by emodin, a protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 1152-1158.
4. Chang, C. H., Lin, C. C., Yang, J. J., Namba, T. and Hattori, M. 1996. Anti-inflammatory effects of emodin from *Ventilago leiocarpa*. *Am. J. Chin. Med.* **24**, 139-142.
5. Choi, H. R., Kang, Y. A., Lee, H. S. and Park, K. C. 2016. Disulfanyl peptide decreases melanin synthesis via receptor-mediated ERK activation and the subsequent down-regulation of MITF and tyrosinase. *Int. J. Cosmet. Sci.* **38**, 279-285.
6. Fardet, A., Rock, E. and Révész, C. 2008. Is the *in vitro* antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected *in vivo*? *J. Cereal Sci.* **48**, 258-276.
7. Feng, G. Y., Shi, L. Y., Cui, B. D., Li, D. K. and Sun, Z. X. 2015. Effect of water extract and main monomer components of processed *Polygonum multiflorum* on intracellular ty-

- rosinase and their antioxidant activity. *Nat. Prod. Res. Dev.* **4**, 007.
8. Furumoto, T. and Nishimoto, K. 2016. Identification of a characteristic antioxidant, anthrasesamone F, in black sesame seeds and its accumulation at different seed developmental stages. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 350-355.
 9. Gan, E., Haberman, H. and Menon, I. 1974. Oxidation of NADH by melanin and melanoproteins. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Enzymol.* **370**, 62-69.
 10. Hachinohe, M. and Matsumoto, H. 2005. Involvement of reactive oxygen species generated from melanin synthesis pathway in phytotoxicity of L-DOPA. *J. Chem. Ecol.* **31**, 237-246.
 11. 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.
 12. Han, S. H. and Shin, M. K. 2002. Effects of methanol extracts from *Rhynchosia nulubilis* on serum lipid concentrations in rats fed high fat and high cholesterol diet. *J. Kor. Soc. Food Cul.* **17**, 64-69.
 13. Han, S. J., Ryu, S. N. and Kang, S. S. 2004. A new 2-arylbenzofuran with antioxidant activity from the black colored rice (*Oryza sativa* L.) bran. *Chem. Pharm. Bull.* **52**, 1365-1366.
 14. Hasan, S., Dinh, K., Lombardo, F., Dawkins, F. and Kark, J. 2003. Hypopigmentation in an African patient treated with imatinib mesylate: a case report. *J. Natl. Med. Assoc.* **95**, 722.
 15. Hatano, T., Uebayashi, H., Ito, H., Shiota, S., Tsuchiya, T. and Yoshida, T. 1999. Phenolic constituents of Cassia seeds and antibacterial effect of some naphthalenes and anthraquinones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chem. Pharm. Bull.* **47**, 1121-1127.
 16. Herrling, T., Jung, K. and Fuchs, J. 2008. The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair. *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **69**, 1429-1435.
 17. Hong, S. H., Sim, M. J. and Kim, Y. C. 2016. Melanogenesis-promoting effects of *Rhynchosia nulubilis* and *Rhynchosia volubilis* ethanol extracts in melan-a cells. *Toxicol. Res.* **32**, 141.
 18. Jang, J. Y., Kim, H. N., Kim, Y. R., Kim, B. W., Choi, Y. H. and Choi, B. T. 2010. Studies of inhibitory mechanism on melanogenesis by partially purified Asiasari radix in α -MSH stimulated B16F10 melanoma cells. *J. Life Sci.* **20**, 1617-1624.
 19. Jie, Y., Jie, X., Xiao-Jian, M., Hua, W., Sheng-Lan, Z., Ya-Ge, M., Na, L. and Rong-Hua, Z. 2012. Comparison of laxative and antioxidant activities of raw, processed and fermented *Polygoni Multiflori* radix. *Chin. J. Nat. Med.* **10**, 63-67.
 20. Kang, S. and Han, J. 2004. Acetylcholinesterase inhibiting effect and free radical scavenging effect of soybean (*Glycine max*) and Yak-Kong (*Rhynchosia nolubilis*). *J. East. Asian Soc. Diet Life* **14**, 64-69.
 21. Kim, K. S., Kim, J. A., Eom, S. Y., Lee, S. H., Min, K. R. and Kim, Y. 2006. Inhibitory effect of piperlonguminine on melanin production in melanoma B16 cell line by down-regulation of tyrosinase expression. *Pigment Cell Res.* **19**, 90-98.
 22. Kim, M. K. and Won, E. J. 1984. Effects of feeding polished or brown rice diet with different kinds of lipids on the lipid metabolism in rats. *J. Nutr. Health* **17**, 154-162.
 23. 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.
 24. Kong, S. Y., Choi, Y. M., Lee, S. M. and Lee, J. S. 2008. Antioxidant compounds and antioxidant activities of the methanolic extracts from milling fractions of black rice. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 815-819.
 25. Kritchevsky, D. 1982. Dietary fiber and disease. *Bull. N. Y. Acad. Med.* **58**, 230.
 26. Lee, S. C., Chen, C. H., Yu, C. W., Chen, H. L., Huang, W. T., Chang, Y. S., Hung, S. H. and Lee, T. L. 2016. Inhibitory effect of *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira ethanol extracts on melanin synthesis via repression of tyrosinase expression. *J. Biosci. Bioeng.* **123**, 263-269.
 27. Musa, A. S., Umar, M. and Ismail, M. 2011. Physicochemical properties of germinated brown rice (*Oryza sativa* L.) starch. *Afr. J. Biotechnol.* **10**, 6281-6291.
 28. Park, J. D., Cho, B. K., Kum, J. S. and Lee, H. Y. 2005. Quality properties of cooked germinated-brown rice. *J. Food Preserv.* **12**, 101-106.
 29. Park, J. D., Choi, B. K., Kum, J. S. and Lee, H. Y. 2006. Physicochemical properties of brown rice flours produced under different drying and milling conditions. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **38**, 495-500.
 30. Park, Y. J., Min, S. K., Min, S. I., Kim, S. J. and Ha, J. 2015. Effect of imatinib mesylate and rapamycin on the preformed intimal hyperplasia in rat carotid injury model. *Ann. Surg. Treat. Res.* **88**, 152-159.
 31. Park, Y. S., Kim, S. J. and Chang, H. I. 2008. Isolation of anthocyanin from black rice (Heuginjubyeo) and screening of its antioxidant activities. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 55-60.
 32. Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H. and Kawakishi, S. 1995. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 75-82.
 33. Seagle, B.-L. L., Rezai, K. A., Gasyana, E. M., Kobori, Y., Rezaei, K. A. and Norris, J. R. 2005. Time-resolved detection of melanin free radicals quenching reactive oxygen species. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 11220-11221.
 34. Shim, Y., Cha, G. and Sin, J. 1995. Studies on the experimental cookery and the preservation of the *Huginja Dashik*. *J. Nat. Sci. Inst. Seoul Worman's Univ.* **6**, 13-26.
 35. Shyu, Y. S. and Hwang, L. S. 2002. Antioxidative activity of the crude extract of lignan glycosides from unroasted Burma black sesame meal. *Food Res. Int.* **35**, 357-365.
 36. Stickel, F., Seitz, H., Hahn, E. and Schuppan, D. 2001. [Liver toxicity of drugs of plant origin]. *Z. Gastroenterol.* **39**, 225-232, 234-237.
 37. Trowell, H. 1975. Letters to the editor: Coronary heart disease and dietary fiber. *Am. J. Clin. Nutr.* **28**, 798-800.
 38. Wood, J. M., Decker, H., Hartmann, H., Chavan, B., Rokos,

- H., Spencer, J., Hasse, S., Thornton, M., Shalhaf, M. and Paus, R. 2009. Senile hair graying: H₂O₂-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulf-oxide repair. *FASEB J.* **23**, 2065-2075.
39. Yang, Z., Nakabayashi, R., Mori, T., Takamatsu, S., Kitanaka, S. and Saito, K. 2016. Metabolome analysis of *Oryza sativa* (Rice) using liquid chromatography-mass spectrometry for characterizing organ specificity of flavonoids with anti-inflammatory and anti-oxidant activity. *Chem. Pharm. Bull.* **64**, 952-956.
40. Yen, G. C., Chen, H. W. and Duh, P. D. 1998. Extraction and identification of an antioxidative component from Jue Ming Zi (*Cassia tora* L.). *J. Agric. Food Chem.* **46**, 820-824.
41. Zhaohuan, L., Guiyuan, L. V. and Jingjing, Y. U. 2014. Review on the research of the components, pharmacological actions and toxicity of *Polygonum multiflorum* Thunb (Heshouwu). *J. Zhejiang Chinese Medical University* **4**, 495-500.
42. Kang, K. K., Lee, Y. E., Woo, W. H. and Mun, Y. Z. 2014. *Commelina communis* Ledeb inhibits melanin synthesis in alpha-MSH-stimulated B16F10 cells. *J. Pathool. Pathol. Kor. Med.* **28**, 506-511.

초록 : 곡물과 적하수오를 혼합한 에탄올 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향

이은빈¹ · 김문무^{2*}

(¹동의대학교 화학과, ²동의대학교 응용화학과)

본 연구의 목적은 흑모 성장과 관련 있는 천연물을 개발하기 위하여 흑미, 흑임자, 현미, 서목태 및 적하수오의 에탄올 추출혼합물의 melanin 합성에 대한 효능을 조사한 것이다. 흑모가 백모로 변화되는 원인으로 H₂O₂가 모낭 주위에 축적되어 melanin 합성이 저하되어 백모가 유발되는 것으로 보고된 바 있다. MIXEE는 DPPH radical에 대한 소거능력과 활성산소에 대한 환원력이 있는 것으로 관찰되었다. 뿐만 아니라 세포내 H₂O₂ 수준을 감소시켰는데, 이러한 결과는 MIXEE는 산화를 억제하여 H₂O₂에 의하여 감소된 melanin 합성을 촉진 시킬수 있다는 것을 나타내었다. 한편 *in vitro*에서 MIXEE는 tyrosinase 활성에는 영향을 주지 않았지만 L-dopa에서 melanin 합성을 촉진하였다. 더욱이, B16F1세포에서 MIXEE는 melanin 생성을 세포수준에서 촉진하였다. Western blot을 이용한 단백질 발현 분석에서 MIXEE는 SOD-2 및 SOD-3. 특히 DOPA에서 melanin 이 생성되는 과정에 관여하는 효소인 TRP-2 발현에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 입증되었다. 이상의 결과는 MIXEE가 백발화과정을 가역화시키는 과정에서 주요한 역할을 하는 melanin 생성을 촉진하는 하나의 약학 소재로 응용될 수 있다는 것을 시사하고 있다.