

Depigmenting Effects of Mistletoe (*Viscum album var. coloratum*) Extracts

Young-Sool Hah¹, Eun-Ji Kim¹, Young Min Goo², Young Sook Kil², Seung Mi Sin², Sang Gon Kim², Ha Eun Kang³ and Tae-Jin Yoon^{3*}

¹Biomedical Research Institute, Gyeongsang National University Hospital, Jinju 52727, Korea

²Anti-Aging Research Group, Gyeongnam Oriental Anti-Aging Institute, Sancheong 52215, Korea

³Department of Dermatology and Institute of Health Sciences, School of Medicine, Gyeongsang National University & Hospital, Jinju 52727, Korea

Received February 15, 2022 / Revised April 19, 2022 / Accepted April 20, 2022

Melanin pigments are the main cause of skin color. They are produced in melanocytes and then transferred to keratinocytes, which eventually gives the skin surface a variety of colors. Although many skin-lightening or depigmenting agents have been developed, the demand for materials to reduce pigmentation is still increasing. Here, we tried to find materials for skin-lightening or depigmentation using natural compounds and found that mistletoe (*Viscum album var. coloratum*) extracts (ME) had an inhibitory effect on tyrosinase activity. As a result, ME significantly reduced pigmentation in human primary melanocytes. In addition, a promoter reporter assay revealed that ME inhibited the transcription of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), melanophilin (MLPH), tyrosinase-related protein-2 (TRP-2), and tyrosinase (TYR) genes in HM3KO melanoma cells. In addition, ME decreased the protein level for pigmentation-related molecules, such as TYR and TRP-1. Furthermore, it markedly inhibited the melanogenesis of zebrafish embryos, an *in vivo* evaluation model for pigmentation. To elucidate the action mechanism of ME, we investigated its effects on intracellular signaling. Eventually, the ME dramatically decreased the phosphorylation of the cAMP responsive element binding protein (CREB), AKT, and ERK. The data suggest that ME may inhibit the melanogenesis pathway by regulating the signaling pathway related to pigmentation. Taken together, these data propose that ME can be developed as a depigmenting or skin-lightening agent.

Key words : Pigmentation, tyrosinase, *Viscum album var. coloratum*, whitening, zebrafish

서론

피부색은 표피 각질형성세포(epidermal keratinocyte)의 멜라닌 색소 침착에 의해 결정된다. 멜라닌 색소는 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌 세포(melanocyte)에 의해 생성되고, 식세포 작용(phagocytosis)을 포함한 메커니즘을 통해 이웃한 각질형성세포로 전달된다[1, 2]. 피부는 지속적으로 자외선에 노출되고 자외선은 색소 침착을 유발할 수 있기 때문에 멜라닌 세포의 주요 역할은 자외선에 대한 물리적 필터 역할을 하는 멜라닌 색소를 합성하여 자외선으로부터 표피 세포를 보호하는 것으로 여겨진다[17].

멜라닌 세포의 성장과 분화에 대한 여러 연구가 진행되

었으며, 멜라닌 합성은 세포 내 다양한 분자와 신호전달 경로를 통하여 조절된다[10]. 자외선 조사는 표피 각질형성세포에서 DNA 손상을 유도하여 p53 의존성 유전자인 proopiomelanocortin (POMC)의 발현을 유도하고, 그런 다음 POMC 유전자 산물은 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)과 같은 작은 펩티드 리간드로 절단된다. 멜라닌 생성을 유도하는 α -MSH는 멜라닌 세포의 원형질막에 있는 melanocortin 1 receptor (MC1R)에 결합하여 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)의 증가를 유도하고, 결과적으로 멜라닌 세포에서 protein kinase A (PKA) 신호 전달 경로를 활성화한다. 그 결과 멜라닌 세포에서 microphthalmia-associated transcription factor (MITF), tyrosinase (TYR), tyrosinase-related proteins (TRPs)를 비롯한 색소침착 관련 유전자의 발현이 증가하여 멜라닌 합성이 증가한다[9, 16].

피부과 및 미용적 관점에서 탈색소 및 피부 미백제의 개발은 기초연구로서 뿐만 아니라 상업적인 응용연구로서도 여전히 중요한 문제이다. 이를 위해 많은 연구자들이 색소 생성 흑색종 세포주, 기니피그, 제브라피쉬 등 다양한 실험 모델을 사용하여 대규모 스크리닝 및 검증 테스트를 수행하고 있다[5, 7, 18]. 우리는 천연화합물 소

*Corresponding author

Tel : +82-55-750-8183, Fax : +82-55-750-9277

E-mail : yoontj@gnu.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.

제를 사용하여 멜라닌 생성 억제제를 스크리닝하려고 시도했으며 겨우살이 추출물이 멜라닌 세포의 색소 침착에 대한 탁월한 억제 효능을 가지고 있음을 발견하였다. 이 연구에서 우리는 겨우살이 추출물이 멜라닌 세포와 제브라피쉬에서 색소 침착을 억제한다는 증거와 작용 기전을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출물 제조

본 연구에서 사용된 겨우살이(*Viscum album var. coloratum*)는 (재)경남한방향노화연구원(Sancheong, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 건조한 한국산 겨우살이를 믹서기로 분쇄하여 분말 상태로 만든 후 시료 중량의 10배에 해당하는 양의 70% 에탄올을 추출 용매로 하여 30분간 초음파 세척기(Ultrasonic Cleaner, DAIHAN, Korea)로 추출하여 여과지로 여과하였다. 이후 회전식 증발농축기(Rotary Evaporator, EYELA, Japan)를 이용하여 농축시켜 시험용액으로 이용하였다.

세포 배양

HM3KO 인간 흑색종 세포는 10% 우태혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco, Carlsbad, CA, USA)과 항생제(Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA)가 보충된 Minimum Essential Medium (MEM; Gibco, Carlsbad, CA, USA)으로 37°C, 5% CO₂가 유지되는 조건하에서 배양하였다. 인간 멜라닌 세포 배양을 위한 모든 foreskin 샘플은 경상국립대학교병원의 윤리 위원회 승인 절차에 따라 기증자의 서면 동의 하에 얻어졌다. Foreskin 샘플을 70% 에탄올에서 살균하고 잘게 자른 후 4°C에서 하룻밤 동안 dispase로 처리하였다. 표피를 0.05% 트립신 및 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Gibco, Carlsbad, CA, USA)을 함유하는 용액에 담가 37°C에서 30분 동안 두었다. 격렬한 피펫팅 후, 세포를 원심분리하여 Medium 254와 human melanocyte growth supplement (HMGS; Cascade Biologics, Portland, OR, USA)로 구성된 성장 배지에 재현탁하였다. 인간 멜라닌 세포의 1차 배양 동안 200 µg/ml의 G418 (geneticin sulfate; Duchefa, Haarlem, The Netherlands)을 성장 배지에 첨가하여 섬유아세포의 증식을 억제하였다[20].

세포독성 시험

겨우살이 추출물 처리에 따른 인간 멜라닌 세포의 세포 생존율을 측정하기 위하여 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo, Kumamoto, Japan)을 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 인간 멜라닌 세포는 24-well plate에 1×10⁵ cell/well로 분주한 다음 세포 부착을 위하여 37°C, CO₂ 배양기에

서 24시간 배양하였다. 그 후 추출물을 10, 20, 40, 80, 100 µg/ml 농도로 24시간 처리한 후에 각 well에 CCK-8 반응액을 첨가하여 2시간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하고 무처리군을 100%로 하여 세포생존율을 계산하였다.

Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase inhibitor screening kit (#K575-100; BioVision, Inc., Milpitas, CA, USA)을 사용하여 tyrosinase 저해 활성을 평가하였다. 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 진행하였다. Multimode microplate reader로 510 nm에서 흡광도를 30분 동안 kinetic mode로 측정하고 흡광도 차이 값을 시간으로 나누어 slope를 계산하였다. Tyrosinase 저해 활성 측정을 위한 계산 방법은 다음과 같다.

$$\% \text{ Relative inhibition} = \frac{\text{Slope of EC} - \text{Slope of S}}{\text{Slope of EC}} \times 100$$

(EC = Tyrosinase Enzyme Control, S = test inhibitors (Sample, S), IC = Inhibitor Control)

세포 내 멜라닌 함량 측정

인간 멜라닌 세포는 Medium 254 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)에 HMGS가 첨가된 성장배지를 포함하는 100 mm dish에 1×10⁶ cell/dish 로 seeding 하여 37°C CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 추출물의 미백 효과를 확인하기 위해 20 µg/ml 농도로 인간 멜라닌 세포 배지에 함께 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 멜라닌 합성 억제능을 비교하기 위해 미백 표준물질로 잘 알려진 kojic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 600 µM 농도로 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 처리가 완료된 100 mm dish의 배지를 모두 제거한 뒤, 5 ml의 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척하고 성장배지로 세포를 회수하여 e-tube로 옮긴 후 10분간 원심분리(12,000×g, 4°C)를 실시하였다. Pellet 색상을 제대로 확인하기 위해 상층액을 제거하고 PBS 용액으로 한 번 더 세척한 후 10분간 원심분리(12,000×g, 4°C)하여 상층액을 제거한 후 pellet을 디지털 카메라로 촬영하였다. 세포 내 멜라닌 함량을 측정하기 위해 상층액이 제거된 pellet에 1 M NaOH를 500 µl씩 주입한 후 교반기로 pellet을 잘 섞었다. 37°C에서 24시간 동안 정치시킨 후, 100°C에서 30분동안 가열하여 멜라닌을 충분히 용해한 후 microplate reader를 이용하여 400 nm에서 흡광도를 측정하였다.

아데노바이러스 제작 및 루시페라아제(luciferase) 활성도 측정

MITF, *TRP2*, *TYR*, *MLPH* (melanophilin) 프로모터의 활성을 측정하기 위하여 이들 유전자의 프로모터와 루시페라아제 유전자를 아데노바이러스 리포터 벡터에 클로닝

하였다(MITF-Luc, MLPH-Luc, TRP2-Luc, and TYR-Luc). 아데노바이러스를 제조하기 위하여 상기에서 클로닝 된 벡터를 Lipofectamine 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 293A 세포에 삽입하였다. 37°C에서 10일 동안 배양하여 아데노바이러스를 제조하였다. 제조된 아데노바이러스의 발광단백질인 루시페라아제의 발현을 측정하기 위하여 24-well plate에 배양된 HM3KO 세포에 아데노바이러스를 감염시킨 후 24시간 경과 후 겨우살이 추출물을 24시간 처리하였다. Luciferase lysis buffer를 처리하고 20분간 교반한 다음 용해된 세포를 수확하였다. 세포 현탁액을 원심분리하여 상등액에 루시페라아제 활성 분석용 기질 시약을 첨가하고 루시페라아제 활성을 Glomax Multi Detection System (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 측정하였다.

웨스턴 블롯

멜라닌 합성 관련 유전자들의 발현을 단백질 수준에서 비교하기 위하여 준비된 세포를 차가운 PBS 완충액으로 2회 세척 후, protease & phosphatase inhibitor cocktail (1861281; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 섞어 제조한 radioimmunoprecipitation assay buffer (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 넣고 얼음속에서 10분간 세포들을 용해시켰다. 다시 초음파분쇄기를 이용하여 균질화 하였다. 균질액은 4°C에서 13,000×g으로 15분간 원심분리 한 후 상등액을 BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 총 단백질을 정량하였다. 정량된 단백질은 동일한 농도(30 µg)로 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동 후 nitrocellulose membrane으로 옮기고 나서 5% skim milk (Difco, Detroit, MI, USA)가 첨가된 Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20 (TBST) 완충액으로 1시간 실온에서 blocking 하였다. TRP1 (sc-166857, Santa Cruz Biotechnology), TRP2 (sc-25544, Santa Cruz Biotechnology), Tyrosinase (sc-20035, Santa Cruz Biotechnology), MITF (sc-515925, Santa Cruz Biotechnology), phospho-Akt (4060s, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), Akt (2972s, Cell Signaling Technology), phospho-CREB (9198s, Cell Signaling Technology), CREB (9197s, Cell Signaling Technology), phospho-Erk1/2 (9101s, Cell Signaling Technology), Erk1/2 (9102s, Cell Signaling Technology)에 대한 1차 항체를 5% skim milk에 희석하여 4°C 냉장고에서 overnight시켰다. 다음날 horseradish peroxidase (HRP)가 결합되어 있는 2차 항체와 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 TBST 완충액으로 10분간 3회 세척한 후 Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc., Berkeley, CA, USA)로 1분간 반응시킨 뒤 ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc.)을 사용하여 band를 검출했으

며, β-actin (Sigma, St Louis, MO, USA)을 loading control로 사용하였다.

제브라피쉬 모델

제브라피쉬를 사용한 평가는 이전에 보고된 방법대로 수행하였다[5]. 배아는 아침에 불을 켜서 유도된 자연 산란에서 얻었다. 배아의 수집은 30분 이내에 완료되었다. 동기화된 배아를 피펫으로 수집하고 웰당 200 µl의 배아 배지를 포함하는 96-well plate의 각 웰에 3~4 마리의 배아를 넣었다. ME는 0.1% DMSO에 녹이고 20 또는 200 µg/ml의 농도로 수정 후 9시간에서 55시간까지 처리하였다(46시간 노출). 화합물의 균일한 분포를 보장하기 위해 때때로 배지를 교체하고 교반하였다. 모든 실험에서 0.2 mM 1-phenyl 2-thiourea (PTU)를 양성 대조군으로 사용하였다[11]. 관찰을 위해 배아를 집게로 dechoriation하고 tricaine methanesulfonate 용액(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 마취하였다. 슬라이드(Aquatic Eco-Systems, Apopka, FL, USA)에 3% methyl cellulose에 mounting하여 입체현미경(MZ16; Leica Microsystems, Ernst-Leitz-Strasse, Germany)을 사용하여 이미지를 얻었다.

통계분석

GraphPad Prism (버전 5.01; GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 통계 분석에 사용하였다. 데이터는 평균±표준편차로 표시하였다. 그룹 간 차이를 분석하기 위해 one-way ANOVA를 통해 통계적 유의성을 5% 수준에서 분석하였고, 사후검정으로 Mann-Whitney test를 수행하였다.

결과 및 고찰

겨우살이 추출물이 색소침착에 미치는 영향

겨우살이 추출물(mistletoe extracts, ME)에 의한 tyrosinase 저해 효과를 측정하기 위하여 tyrosinase에 의한 L-티로신의 산화 정도를 측정하였다. Tyrosinase는 멜라닌 합성 과정에서 티로신을 DOPA로 전환하는 tyrosine hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPA quinone으로 산화반응을 촉매하는 DOPA oxidase 활성을 가진 반응속도 제한 효소이다[8]. ME의 tyrosinase 활성 저해 효과를 측정된 결과, tyrosinase 활성을 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 1A). 다음으로 세포 내 tyrosinase의 활성 저해 효과를 확인하기 위하여 먼저 ME의 농도 변화에 따른 인간 멜라닌 세포의 생존율을 확인한 결과, 20 µg/ml의 농도까지는 97.4% 이상의 세포 생존율을 확인하였으나 그 이상의 농도에서 세포 독성이 나타났다(Fig. 1B). 따라서 세포를 이용한 이후 추가 실험에서는 ME가 독성을 보이지 않는 20 µg/ml 이하의 농도에서 실험을 진행하였다. 인간 멜라닌 세포를

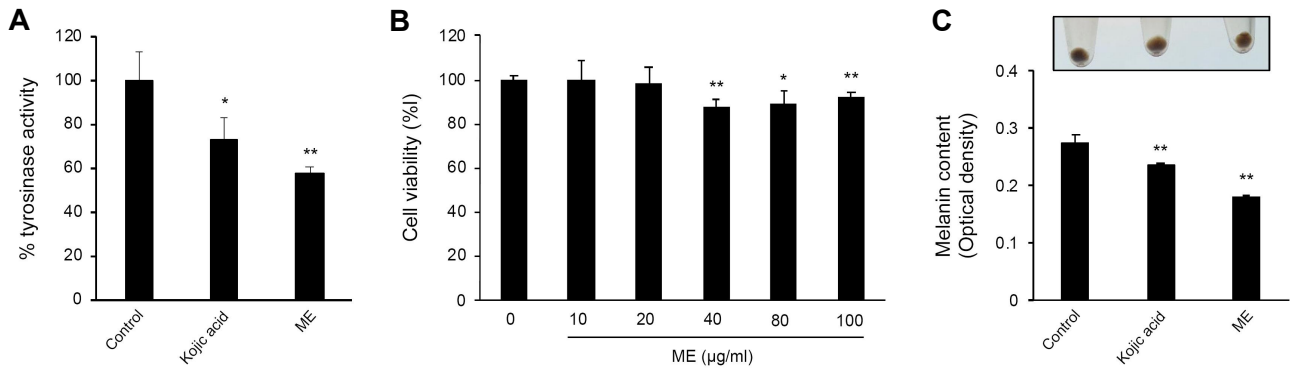


Fig. 1. Effect of mistletoe extract (ME) on pigmentation. (A) Inhibitory effect of ME on mushroom tyrosinase activity. ME (20 µg/ml) or Kojic acid (0.75 mM) was incubated with the same units of mushroom tyrosinase. Following incubation, the amount of dopachrome produced was determined at 510 nm. Data are the means ± SD. **p<0.01, *p<0.05 vs. control. (B) Cytotoxicity of ME in primary melanocytes. Cells were treated with the indicated concentrations of ME for 24 hr. Cytotoxicity was measured by CCK-8 assay. The data are represented as percent of control (vehicle-treated). The mean values ± SD are averages of triplicate measurements. **p<0.01, *p<0.05 vs. control. (C) Cells were treated with ME (20 µg/ml) for 72 hr. Cells were harvested by centrifugation, and pellet color was shown (image). Cells were lysed and melanin was dissolved in 1 N NaOH at 100°C for 30 min. Melanin content was determined by spectrometer (bars). Data are the means ± SD. **p<0.01 vs. control.

ME로 처리한 결과 세포 펠릿 색상과 멜라닌 함량은 유의하게 감소하였다(Fig. 1C). 이러한 결과는 ME가 tyrosinase 활성 및 멜라닌 합성 억제 효과에 직접적으로 관여하는 것으로 사료된다.

겨우살이 추출물이 MITF, TRP-2, TYR, MLPH 유전자 프로모터 활성에 미치는 영향

멜라닌 생성은 생체 내 티로신으로부터 산화적 반응에 의해서 일어나는데 이때 작용하는 주요 효소는 tyrosinase이다. 하지만 최근에는 tyrosinase 뿐만 아니라 MITF, TRP-1, TRP-2 등과 같은 단백질을 이용하여 멜라닌 합성 억제에 대한 연구가 이루어지고 있다. 본 연구에서는 ME가 멜라닌 생성에 관계된 주요 유전자인 MITF, TRP-2, TYR, 및 MHPH 프로모터에 미치는 영향을 알아보기 위하여 흑색종 세포(HM3KO)에 리포터 유전자로 루시페라아제를 지닌 아데노바이러스를 감염시키고 ME를 처리한 후 24 시간 뒤에 리포터 활성을 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 ME (20 µg/ml)를 처리한 HM3KO군에서는 MITF-luc, TRP2-luc, TYR-luc, MLPH-luc의 루시페라아제 활성이 ME를 처리하지 않은 군보다 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

TRP-2는 dopachrome을 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)으로 재배열하는 것을 촉매하는 반면, TRP-1은 DHICA를 카르복실화된 indole-quinone으로 산화시키고, 이는 결국 멜라닌으로 전환된다[6, 22, 23]. Tyrosinase는 멜라닌 생성의 마스터 전사 인자인 MITF에 의해 조절된다. 또한 TRP-1 및 TRP-2는 MITF에 의해 유도되는 주요한 멜라닌 생성 효소이다. 따라서 MITF의 억제는 ty-

rosinase의 발현억제를 통하여 멜라닌 색소 생성을 억제할 수 있다[19]. 또한, Kudo 등[15]은 황금(*Scutellaria baicalensis* Georgi)에서 추출한 Wogonin과 같은 O-methylated flavone이 액틴 필라멘트의 melanosome 수송과 관련된 운반 단백질인 MLPH를 분해하여 세포 내 melanosome 수송을 억제할 수 있다고 보고하였다. 따라서 ME가 HM3KO 세포에서 MITF, TRP-2, TYR 및 MLPH 유전자의 프로모터 활성 억제 효과를 가지고 있는 것으로 보임에 따라 이들 단백질의 발현 억제를 통하여 색소 생성을 억제할 수 있음을 시사 하였다.

겨우살이 추출물이 멜라닌 합성 관련 유전자 발현 및 신호전달계에 미치는 효과

ME가 인간 멜라닌 세포에서 멜라닌 색소 침착을 감소 시킴에 따라 ME가 색소 침착과 관련된 유전자 발현에 영향을 미치는지 조사하였다. 예상대로 ME는 인간 멜라닌 세포에서 tyrosinase 및 TRP-1과 같은 색소 침착 관련 분자에 대한 단백질 수준을 감소시켰지만 TRP-2 및 MITF 수준은 크게 영향을 받지 않았다(Fig. 3A). 멜라닌 생성은 다양한 신호 전달 경로가 함께 관여하는 과정이기 때문에 [4, 21], 다음으로 세포 내 신호 전달 경로에 대한 ME의 효과를 평가했다. 먼저 cAMP/PKA 신호 전달의 잘 확립된 하위 신호 전달 경로인 CREB의 활성화에 대한 ME의 효과를 평가하였다. ME의 처리는 CREB의 인산화를 감소시켰다(Fig. 3B). 또한, 멜라닌 세포에서 AKT 및 ERK의 인산화도 ME에 의해 감소하였다(Fig. 3B). 이러한 결과는 ME가 AKT와 ERK 경로의 억제를 통해 멜라닌 세포의 색소 침착을 억제함을 시사한다. 앞서 언급했듯이 cAMP/

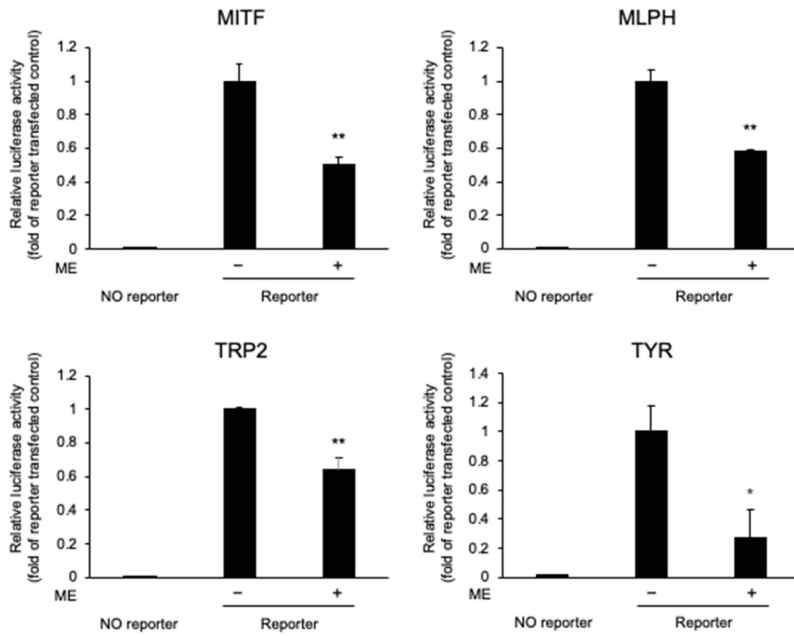


Fig. 2. Effect of ME on the promoter activity of pigmentation-related genes. Luciferase reporter assay with ME. HM3KO melanoma cells were infected with adenoviruses carrying various reporter genes (MITF-Luc, MLPH-Luc, TRP2-Luc, and Tyrosinase-Luc). Twenty-four hr after infection, the cells were treated with ME (20 µg/m) for 24 hr and luciferase reporter activity was measured. The experiment was performed at least in triplicate, and the data are represented as relative luciferase activity of vehicle-treated control (ME-). ***p*<0.01, **p*<0.05 vs. vehicle-treated control.

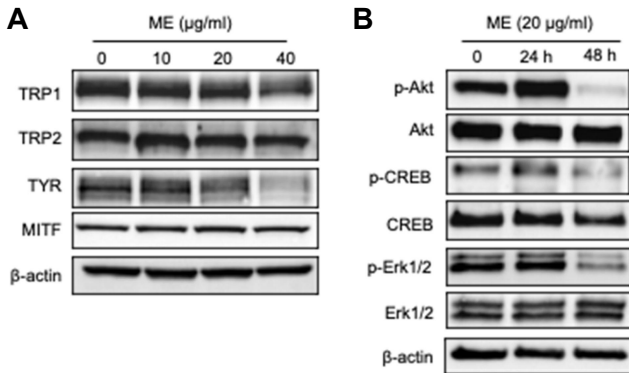


Fig. 3. Effect of ME on the expression of pigmentation-related genes and intracellular signaling in primary melanocytes. (A) The protein level of the pigmentation-related genes was assessed by Western blotting. β-actin was used as a loading control. (B) Primary melanocytes were treated with ME for the indicated time points. The phosphorylation of AKT, CREB, and Erk1/2 was determined by Western blot.

PKA 신호전달 분자는 멜라닌 생성의 중심 역할을 하며, 이는 α-MSH와 같은 외부 자극을 전사 인자 MITF에 연결한다[5]. CREB는 MITF에 대한 유전자 발현과 관련된 잘 확립된 cAMP/PKA 신호전달의 하위 신호 전달 경로이다. 따라서 ME에 의한 CREB 활성화 억제는 색소 침착에 대한 이 화학물질의 작용 방식을 설명할 수 있다. 멜라닌 생성에서 AKT 신호 전달의 억제는 glycogen synthase kinase 3β (GSK3β)의 활성화를 유도하고 활성화된 GSK3β는 tyrosinase 프로모터에 대한 MITF 결합을 촉진한다. 이것은 멜라닌 생성을 자극한다. 반대로, AKT의 활성화는 GSK3β 활성화의 방지로 이어져 결과적으로 멜라닌 생성 과정을 억제한다[3]. 또한, ERK는 멜라닌 생성과 관련이 있다. 많은 연구에서 ERK의 활성화가 MITF의 분해와 연결되어 색소 침착 감소의 표현형이 나타난다는 것이 밝혀졌다[13, 14]. 이와 대조적으로 본 연구에서 ME는 AKT와 ERK의 인산화를 감소시켰다. 따라서 인간 멜라닌 세포에서 ME 처리에 의한 AKT와 ERK의 활성 억제가 색소 침착

을 저해할 수 있을 것이라 사료되며, 이는 지속된 AKT와 ERK 활성화는 인간 멜라닌 세포의 증식을 억제하여 멜라닌 합성을 감소시킬 수 있음을 제시한 선행연구 결과와 일치한다[12]. AKT 및 ERK 활성화의 다른 역할에 따른 색소 침착의 차이점과 관련 기전 연구는 추후 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

겨우살이 추출물이 제브라피쉬 피부 색소침착에 미치는 영향

제브라피쉬는 색소 침착에 대한 실험 모델로 사용될 수 있는 작은 열대어로 인간과 유사한 기관 시스템 및 유전자 서열로 인해 매우 유리한 척추동물 모델 유기체이다[9, 17]. 조작의 단순성 외에도 제브라피쉬 모델은 유기체 기반의 화합물 독성 동시 측정과 같은 추가 이점이 있다. 본 연구에서는 동물모델로 제브라피쉬를 사용하여 제브라피쉬 배아를 ME로 처리하고 색소 침착에 미치는 영향을 확인하였다. Tyrosinase 억제제인 PTU를 양성대조군으로 사용하였고, PTU 처리는 0.2 mM의 투여량에서

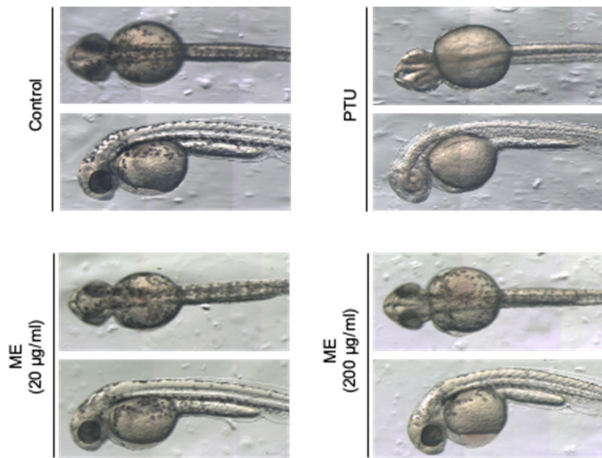


Fig. 4. Effect of ME on the pigmentation of zebrafish embryo. Synchronized embryos were treated with ME at the indicated concentrations. ME was dissolved in 0.1% DMSO, then added to the embryo medium. The effect on the pigmentation of zebrafish were observed under the stereomicroscope. PTU was used as a positive control. Pictures are dorsal and lateral views of embryos at 55 hr post-fertilization (hpf).

색소침착을 현저하게 억제하였다. 제브라피쉬 배아에 ME를 처리했을 때, 200 µg/ml의 투여량에서는 상당한 색소침착 억제가 관찰된 반면, 20 µg/ml 투여량에서는 색소침착 억제 가능성이 거의 검출되지 않았다. 또한, 제브라피쉬 배아의 발달 단계에서 ME에 의한 눈에 띄는 부작용은 없었다(Fig. 4). 본 연구에서 ME는 눈에 띄는 부작용 없이 200 µg/ml의 용량에서 제브라피쉬의 색소 침착에 대한 현저한 억제 가능성을 보여주었다. 따라서 이러한 결과는 ME가 피부 미백제로 개발될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 (재)경남한방향노화연구원 연구사업(연구개발과제명: 피부 미백 유효성분 발굴 및 기존 허가 의약품 활용한 색소 조절 약물 발굴)의 지원에 의해 이루어진 연구이며 지원에 감사드립니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Ando, H., Niki, Y., Ito, M., Akiyama, K., Matsui, M. S., Yarosh, D. B. and Ichihashi, M. 2012. Melanosomes are transferred from melanocytes to keratinocytes through the

- processes of packaging, release, uptake, and dispersion. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 1222-1229.
2. Bastonini, E., Kovacs, D. and Picardo, M. 2016. Skin pigmentation and pigmentary disorders: focus on epidermal/dermal cross-talk. *Ann. Dermatol.* **28**, 279-289.
3. Chan, C. F., Huang, C. C., Lee, M. Y. and Lin, Y. S. 2014. Fermented broth in tyrosinase- and melanogenesis inhibition. *Molecules* **19**, 13122-13135.
4. Chen, H., Weng, Q. Y. and Fisher, D. E. 2014. UV signaling pathways within the skin. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2080-2085.
5. Choi, T. Y., Kim, J. H., Ko, D. H., Kim, C. H., Hwang, J. S., Ahn, S., Kim, S. Y., Kim, C. D., Lee, J. H. and Yoon, T. J. 2007. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res.* **20**, 120-127.
6. Costin, G. E. and Hearing, V. J. 2007. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* **21**, 976-994.
7. Fujii, T., Ikeda, K. and Saito, M. 2011. Inhibitory effect of rose hip (*Rosa canina* L.) on melanogenesis in mouse melanoma cells and on pigmentation in brown Guinea pigs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 489e495.
8. Hearing, V. J. 1999. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **4**, 24-28.
9. Im, S., Moro, O., Peng, F., Medrano, E. E., Cornelius, J., Babcock, G., Nordlund, J. J. and Abdel-Malek, Z. A. 1998. Activation of the cyclic AMP pathway by alpha-melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer Res.* **58**, 47-54.
10. Jeong, S. M. and Yoon, T. J. 2021. Development of pigmentation-regulating agents by drug repositioning. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3894.
11. Karlsson, J., von Hofsten, J. and Olsson, P. E. 2001. Generating transparent zebrafish: a refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. *Mar. Biotechnol.* **3**, 522-527.
12. Kim, D. S., Kim, S. Y., Chung, J. H., Kim, K. H., Eun, H. C. and Park, K. C. 2002. Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cell Signal.* **14**, 779-785.
13. Kim, D. S., Hwang, E. S., Lee, J. E., Kim, S. Y., Kwon, S. B. and Park, K. C. 2003. Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *J. Cell Sci.* **116**, 1699-1706.
14. Kim, Y. M., Cho, S. E. and Seo, Y. K. 2016. The activation of melanogenesis by p-CREB and MITF signaling with extremely low-frequency electromagnetic fields on B16F10 melanoma. *Life Sci.* **162**, 25-32.
15. Kudo, M., Kobayashi-Nakamura, K. and Tsuji-Naito, K. 2017. Bifunctional effects of O-methylated flavones from *Scutellaria baicalensis* Georgi on melanocytes: Inhibition of melanin production and intracellular melanosome transport. *PLoS One* **12**, e0171513.

16. Lo, J. A. and Fisher, D. E. 2014. The melanoma revolution: from UV carcinogens to a new era in therapeutics. *Science* **346**, 945-949.
17. Maresca, V., Flori, E. and Picardo, M. 2015. Skin phototype: a new perspective. *Pigment Cell Melanoma Res.* **28**, 378-389.
18. Murata, K., Takahashi, K., Nakamura, H., Itoh, K. and Matsuda, H. 2014. Search for skin-whitening agent from Prunus plants and the molecular targets in melanogenesis pathway of active compounds. *Nat. Prod. Commun.* **9**, 185-188.
19. Oh, H. C., Lim, K. S., Hwang, C. Y., Youn, I. H. and Kim, N. K. 2007. A study on the melanin synthesis inhibition and whitening effect of *Bombaxis corpus*. *J. Kor. Orient. Med. Ophthalmol. Otolaryngol. Dermatol.* **20**, 1-13.
20. Shin, J. M., Kim, M. Y., Sohn, K. C., Jung, S. Y., Lee, H. E., Lim, J. W., Kim, S., Lee, Y. H., Im, M., Seo, Y. J., Kim, C. D., Lee, J. H., Lee, Y. and Yoon, T. J. 2014. Nrf2 negatively regulates melanogenesis by modulating PI3K/Akt signaling. *PLoS One* **9**, e96035.
21. Speeckaert, R., Van Gele, M., Speeckaert, M. M., Lambert, J. and van Geel, N. 2014. The biology of hyperpigmentation syndromes. *Pigment Cell Melanoma Res.* **27**, 512-524.
22. Tachibana, M. 2000. MITF: a stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Res.* **3**, 230-240.
23. Yen, F. L., Wang, M. C., Liang, C. J., Ko, H. H. and Lee, C. W. 2012. Melanogenesis inhibitor(s) from *Phylla nodiflora* extract. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2012**, 867494.

초록 : 겨우살이 추출물의 미백 효과

하영술^{1,3} · 김은지¹ · 구영민² · 길영숙² · 신승미² · 김상곤² · 강하은³ · 윤태진^{3*}

(¹경상국립대학교병원 의생명연구원, ²(재)경남한방항노화연구원, ³경상국립대학교 의과대학 피부과학교실 건강과학연구원 경상국립대학교병원)

멜라닌 색소는 피부색의 주요 원인이다. 멜라닌 색소는 멜라닌 세포에서 생성된 다음 각질 세포로 전달되어 결국 피부 표면에 다양한 색상을 부여한다. 많은 탈색제 및 피부 미백제가 개발되었지만, 색소 침착을 감소시키기 위한 재료에 대한 수요는 여전히 증가하고 있다. 본 연구에서 천연 화합물을 사용하여 탈색 및 피부 미백에 대한 재료를 찾으려고 시도한 결과 겨우살이(*Viscum album var. coloratum*) 추출물이 색소 침착을 억제할 수 있음을 발견하였다. 인간 멜라닌 세포에 겨우살이 추출물(mistletoe extracts, ME)을 처리했을 때 색소 침착이 극적으로 감소하였다. 프로모터 리포터 분석은 ME 처리가 HM3KO 흑색종 세포에서 microphthalmia-associated transcription factor (*MITF*), melanophilin (*MLPH*), tyrosinase related protein 2 (*TRP-2*), and tyrosinase (*TYR*) 유전자의 전사를 억제한다는 것을 보여주었다. 일관되게 ME는 *MITF*, *TRP-1* 및 *TYR*과 같은 색소 침착 관련 분자의 단백질 수준을 감소시켰다. 또한 ME는 cAMP Responsive Element Binding Protein (*CREB*), *AKT* 및 *ERK*의 인산화를 감소시켰다. 이러한 결과는 ME가 색소 침착과 관련된 세포 내 신호 전달의 조절을 통해 멜라닌 생성을 억제한다는 것을 시사한다. 끝으로 ME는 색소 침착에 대한 생체 내 평가 모델인 제브라피쉬 배아의 멜라닌 생성을 현저하게 억제하였다.