

어성초(*Houttuynia cordata*) 추출물이 Tyrosinase 유전자 발현에 미치는 효과 - 연구노트 -

진종연^{1*} · 조남철²

¹동강대학 피부미용과

²동강대학 호텔조리영양과

Effect of *Houttuynia cordata* Extracts on Tyrosinase Gene Expression

Jong-Eon Chin^{1*} and Nam-Chul Cho²

¹Dept. of Cosmetology and ²Dept. of Hotel Culinary Arts & Nutrition,
Dongkang College, Gwangju 500-714, Korea

Abstract

The methanol extract of *Houttuynia cordata* repressed the expression of tyrosinase gene of B16 mouse melanoma cell containing tyrosinase promoter. The extract repressed expression of tyrosinase gene by about 13% and 45% at 10 µg/mL and 100 µg/mL, respectively. In the MTT assay, the same extract exhibited very low cytotoxicity at 1 µg/mL, 10 µg/mL, and 100 µg/mL, respectively. The fractions of ethyl acetate, butyl alcohol, and water did not showed the repressive effect on the expression of tyrosinase gene, but methylene chloride fraction layer repressed highly at 10 µg/mL and 100 µg/mL.

Key words: *Houttuynia cordata*, tyrosinase gene, B16 mouse melanoma cell

서 론

사람의 피부색을 결정하는 동시에 유해한 자외선이나 유리기(free radical)로부터 인체를 보호하는 역할을 담당하고 있는 멜라닌 색소의 생합성은 tyrosinase 효소를 비롯하여 DHICA oxidase(TRP1), DOPAchrome tautomerase(TRP2), catechol-O-methyltransferase(COMT) 등의 효소에 의하여 조절되고 있는 것으로 알려져 있다. 특히, tyrosinase 효소는 리보솜에서 합성되어져 소포체를 거쳐 골지체로 운반되어 당화된 다음 멜라노솜(melanosome)의 소낭형태로 전달되어지며(1), 그리고 이 효소는 멜라닌 색소의 생합성 과정 중 L-tyrosine을 DOPA(3,4-dihydroxyphenylalanine)으로, DOPA에서 DOPAquinone으로의 초기반응을 조절하는 것으로 널리 알려져 있다(2-4). 오늘날까지 멜라닌 색소의 생합성을 억제하기 위한 한 방법으로 tyrosinase 효소의 활성을 중심으로 이를 저해하는 천연물에 대한 연구들이 매우 활발하게 이루어져 왔다. 그 결과 많은 식물 및 해조류들이 tyrosinase 활성 저해효과가 있는 것으로 보고되었으며(5-9), 또한 그 식물들로부터 tyrosinase 활성 저해효과가 있는 성분들이 분리되었다(10-14). 그러나 이러한 연구들의 대부분은 tyrosinase 효소의 활성 저해에 대한 연구로서 멜라닌 색소의 생합성 억제효과가 낮고 지속성이 짧다는 단점이 있

다. 따라서 보다 근본적이면서도 효과적으로 멜라닌 색소의 생합성을 억제하기 위하여 멜라닌 색소 생합성 효소의 유전자 발현억제 물질, 멜라닌 색소 생성 관련 유전자 발현 억제기작, 멜라닌 생성 활성을 제어하는 사이토카인 네트워크에 관한 연구들이 진행되고 있으나 특히, 천연물으로부터 멜라닌 생합성 관련 효소의 유전자 발현을 억제 물질에 대한 탐색이나 분리에 관한 연구는 아직까지 Chin 등(15,16)과 Cho 등(17)의 연구 결과를 제외하고는 거의 없어 매우 미흡한 실정이다.

어성초(*Houttuynia cordata*)는 삼백초과(*Saururaceae*)에 속한 다년생 초본 식물로서 decanoyl acetaldehyde, methyl-n-nonylketone, α -pinene, linalool, camphene, δ -limonene, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, reynoutrin, hyperin 등 다양한 구성성분들을 함유하여 있어 예로부터 항산화(18-20), 항균(21), 과산화지질 생성억제(22), 면역력 증진(23) 항알러지(24) 등의 효능·효과가 우수한 것으로 알려져 있다. 따라서 어성초는 항암, 대장염, 아토피 피부염과 같은 질병 예방 및 치유의 목적으로 오늘날 한약재, 식품, 건강보조식품에 널리 이용되고 있다.

본 연구에서는 유전자 발현조절 수준에서 멜라닌 색소 생합성 억제물질을 탐색하고자 다양한 효능·효과를 지닌 어성초로부터 유용성 물질을 추출·분획하여 형질전환된 B16

*Corresponding author. E-mail: jechin@dongkang.ac.kr
Phone: 82-62-520-2348, Fax: 82-62-520-2392

mouse melanoma cell에 처리하여 tyrosinase 유전자의 발현 및 세포독성에 미치는 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 어성초는 2004년 9월 전남 보성 삼백초 영농조합법인에서 구입하여 감정한 후 사용하였으며, 표준 품은 동강대학 향토산업 지원센터에 보관하였다.

추출 및 분획

시료의 추출은 건조된 생약을 세절하여 0.1 kg씩을 취한 다음 메탄올을 가하여 실온에서 1주일 동안 정치시킨 후 3회 추출·여과하였다. 여과액은 감압·농축하여 동결·건조시킨 후 분말 형태로 제조하였다. 용매분획은 농축된 메탄올 추출물을 증류수로 현탁한 다음, 극성도가 다른 methylene chloride, ethyl acetate, butyl alcohol, 물을 이용하여 4개의 층으로 분획하여 메탄올 추출물과 같은 방법으로 농축하였다. 그리고, 이 농축물은 동결·건조하여 분말 형태로 제조하였다.

시료 제조

분말로 된 추출물 및 분획물 100 mg에 에탄올과 디메틸설포아이드(dimethyl sulfoxide)가 1:1로 혼합된 용매 1 mL씩을 가하여 완전히 용해시킨 후 여과하여 tyrosinase 유전자 발현율과 세포독성 측정에 이용하였다.

세포배양

B16 mouse melanoma cell은 10%(w/v)의 fetal bovine serum(FBS, GibcoBRL), 1%(w/v) antibiotic(GibcoBRL), 그리고 2 mM의 L-glutamine이 포함된 RPMI Medium 1640 (GibcoBRL, RPMI Medium 1640 완전배지)에서 CO₂ 분압을 5%로 조절하여 37°C에서 배양하였으며, 세포는 36~48 시간 주기로 계대배양하여 유지하였다.

Tyrosinase 프로모터를 도입하여 형질전환 된 B16 mouse melanoma cell은 위의 RPMI Medium 1640 완전배지에 Geneticin(200 µg/mL)을 가한 선택배지를 이용하여 유지하였다.

세포내 유전자 도입(Stable Transfection)

B16 mouse melanoma cell 내에 tyrosinase 프로모터가 삽입된 유전자를 도입하기 위해 LipofectAMINE(Life Technologies Inc.)을 이용한 다음과 같은 방법으로 stable transfection을 실시하였다.

세포내 유전자 도입 : B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 평판배지에 세포수가 3~4×10⁵이 되도록 접종한 후 24시간 배양한 다음, 배양액 1 mL에 6 µL lipofectamine과 2 µg의 total plasmid DNA를 5시간 처리함으로써 형질전환을 실시하였다. Plasmid DNA는 luciferase gene을 지닌 pGL2-vector(Promega)의 *SamI* site에 1.5 Kb의 neomycin 저항성 유전자를 삽입한 다음 1 Kb의 사람 tyrosinase

프로모터를 *EcoRI/KpnI* site에 클로닝을 하였다.

형질전환된 세포의 선별 : Stable transfection 처리 5시간 후 B16 mouse melanoma cell로부터 Lipofectamine 시약과 재조합된 DNA가 함유된 배지를 제거한 후 콜로니가 형성될 때까지 Geneticin(600 µg/mL)이 들어있는 선택배지에서 배양한 후 형질전환 된 B16 mouse melanoma cell을 선별하였다.

Luciferase 활성도 측정

세포내 유전자 도입을 통해 얻은 B16 mouse melanoma cell의 형질전환 유무를 확인하기 위하여 luciferase 활성도를 측정하였다. 형질전환을 통하여 얻은 콜로니들을 trypsin-EDTA를 처리하여 떼어낸 후 24 well plate에 세포수가 well당 6×10⁴되게 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 세포들은 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)으로 세척한 다음 1% triton X-100, 2 mM EDTA, 그리고 2 mM dithiothreitol이 함유되어 있는 pH 7.8의 25 mM tris-phosphate 완충용액으로 용해하였다. 용해된 세포들을 취하여 원심분리한 다음 얻어진 상등액에 대해 luminometer(Lumat LB 9507, Berthold)를 이용하여 luciferase 활성도를 측정하였으며 luciferase 활성도가 가장 높게 나타난 B16 mouse melanoma cell을 선별하여 이용하였다.

Tyrosinase 유전자의 발현 효과 측정

형질전환된 B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 완전배지가 들어 있는 24 well plate에 세포수가 well당 6×10⁴ 되게 접종한 다음 24시간 동안 배양하였다. 그 후 각각의 well에 어성초 메탄올 추출물과 용매 분획물을 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 500 µg/mL의 농도로 6시간 동안 처리한 다음 luciferase 활성도를 측정하여 tyrosinase 유전자 발현에 미치는 효과를 조사하였다.

세포독성 측정

B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 완전배지가 들어 있는 96well plate well에 세포수가 well당 1~1.2×10⁴ 되게 접종한 다음 24시간 동안 배양하였다. 그 후 어성초 메탄올 추출물을 각각의 well에 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 그리고 500 µg/mL의 농도로 6시간 동안 처리한 다음 Mosmann(25)의 방법에 따라 MTT assay를 실시하여 세포독성을 평가하였다.

결과 및 고찰

어성초 메탄올 추출물의 tyrosinase 유전자 발현 효과

세포내 유전자 도입을 통하여 제조된 B16 mouse melanoma cell에 어성초 메탄올 추출물을 처리하여 tyrosinase 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 어성초 메탄올 추출물은 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 효과를 나타냈다(Fig. 1). 어성초 메탄올 추출물을 각각 10 µg/mL와 100

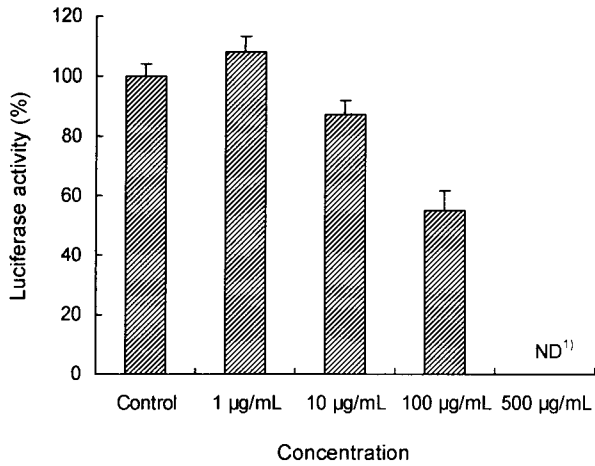


Fig. 1. Effect of *Houttuynia cordata* extract on the tyrosinase gene in B16 mouse melanoma cells.

Transfected B16 melanoma cells were incubated in RPMI 1640 medium for 24 hr and treated *Houttuynia cordata* extract for 6 hr. Then, the cells were solubilized with lysis buffer and centrifuged at 13,000×g for 2~3 min. The supernatants were used for luciferase assay. Values are the means of results from triplicate experiments.

¹⁾Not detected.

µg/mL의 농도를 달리하여 형질전환된 세포에 처리하였을 때 유전자 발현 억제 효과는 대조군에 비해 각각 약 13%와 45%로서 추출물의 농도에 비례하는 경향을 나타냈다. 이는 tyrosinase 효소 활성 저해효과가 있다고 알려진 인진쑥은 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하기 보다는 증진시키는 결과를 나타내었지만(16), 어성초 메탄올 추출물은 Cho 등(17)에 의해 보고된 양과 추출물과 같이 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 효과를 보여주었다. 따라서 어성초 메탄올 추출물내에는 효소 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 성분들이 함유되어 있어 멜라닌 색소의 생합성을 효과적으로 제어할 수 있는 천연물질이라 판단된다.

어성초 메탄올 추출물의 세포독성

B16 mouse melanoma cell에 어성초 메탄올 추출물을 처리한 결과 세포독성은 낮게 나타났다(Fig. 2). 어성초 메탄올 추출물을 처리하였을 때 농도의 증가에 세포의 생존율이 감소하는 결과를 보여주었으나 1 µg/mL, 10 µg/mL, 그리고

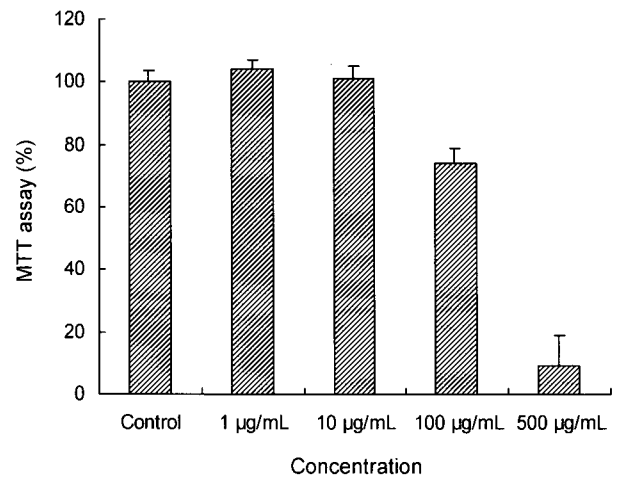


Fig. 2. Cytotoxicity of *Houttuynia cordata* extracts on B16 mouse melanoma cells.

B16 melanoma cells were incubated with $1.0\sim 1.2 \times 10^4$ in RPMI 1640 medium for 24 hr and treated with *Houttuynia cordata* extract for 6 hr. Then, the cells were used for MTT assay. Values are the means of results from triplicate experiments.

100 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 각각 약 104%, 101%, 74%로 매우 낮은 세포독성을 나타내었다. 그러나 500 µg/mL의 농도로 처리하였을 때 세포의 생존율이 대조군에 비해 각각 약 9% 이하로서 매우 높은 세포독성을 나타내 측정이 어려웠다. 이는 어성초 메탄올 추출물을 고농도 세포에 처리하였을 때 그의 효과는 세포독성과 밀접한 관련이 있는 것으로 판단된다. 따라서 tyrosinase 유전자의 발현을 효율적으로 억제하기 위해서는 어성초 메탄올 추출물을 고농도로 이용하기보다는 100 µg/mL 이하의 저농도로 이용하는 것이 보다 효과적이라 생각된다.

어성초 용매 분획물의 tyrosinase 유전자 발현 효과

형질전환된 B16 mouse melanoma cell에 각각의 어성초 용매 분획물을 처리한 바 tyrosinase 유전자의 발현율은 용매 분획물에 따라 다양한 결과를 나타냈다(Table 1). 극성도가 낮은 methylene chloride 용매로 분획하여 얻은 어성초 추출물은 10 µg/mL와 100 µg/mL의 농도에서 각각 약 18%와 52%의 tyrosinase 유전자의 발현 억제효과를 보여주었

Table 1. Effect of solvent fraction layer of *Houttuynia cordata* on the tyrosinase gene in B16 mouse melanoma cells

Solvent fraction layer	Luciferase assay (%)			
	1.0 µg/mL	10.0 µg/mL	100.0 µg/mL	500.0 µg/mL
Methylene chloride layer	116±5.4 ¹⁾	82±6.5	48±7.6	N.D. ²⁾
Ethyl acetate layer	104±3.8	105±8.2	93±4.9	68±9.2
Butanol layer	112±7.7	110±1.8	110±6.2	97±8.5
Water layer	102±6.5	114±3.7	121±3.3	95±7.8

Transfected B16 melanoma cells were incubated with 6×10^4 in RPMI 1640 medium for 24 hr and treated solvent fractions of *Houttuynia cordata* for 6 hr. Then, the cells were solubilized with lysis buffer and centrifuged at 13,000×g for 2~3 min. The supernatants were used for luciferase assay.

¹⁾Values are the means of results from triplicate experiments.

²⁾Not determined.

다. 그러나 500 µg/mL의 농도에서는 세포가 분해될 정도로 심한 세포 독성을 나타내 tyrosinase 유전자의 발현을 측정할 수 없었다. Ethyl acetate 용매로 분획하여 얻은 어성초 추출물은 100 µg/mL 이하의 저농도에서는 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 효과가 없었지만 500 µg/mL의 고농도에서는 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 효과를 보여주었다. 한편, butyl alcohol과 물 용매로 분획하여 얻은 어성초 추출물은 methylene chloride 용매로 분획하여 얻은 것과는 달리 100 µg/mL의 저농도에서 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하기보다는 오히려 약 10~20% 정도 증진시키는 효과를 나타내었다. 그러나 이 분획물들은 500 µg/mL의 농도로 처리하였을 때만 대조군에 비해 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 효과를 보여 주었으며, 이 때의 세포독성은 매우 낮게 나타났다. 이와 같이 용매분획을 통하여 얻은 어성초 추출물들의 tyrosinase 유전자의 발현 억제효과는 주로 methylene chloride 용매 분획층에서만 볼 수 있었으며, 그의 효과는 메탄올 추출물과 유사하였다. 그리고 이 효과는 Cho 등(17)에 의해 보고된 양파 추출물과 유사한 결과를 보여주는 것으로서 어성초 추출물내에도 양파 추출물과 유사한 특성을 지닌 성분들이 함유되어 있어 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 것으로 보여진다. 따라서 어성초 추출물내에 함유되어 있는 tyrosinase 유전자의 발현 억제 성분들은 비교적 극성도가 낮은 물질들이라 생각되어진다.

본 연구에서 어성초 추출물 내에는 멜라닌 색소 생합성에 관여하는 효소 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 효과가 높은 성분도 함유하고 있다는 것이 확인되었으며, 앞으로 보다 많은 연구를 통하여 어성초 추출물이 피부를 희고 아름답게 가꾸어주는 미백 화장품 및 의약품의 천연원료로서 보다 널리 이용될 것으로 기대된다.

요 약

멜라닌 색소 생성에 관여하는 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 물질을 탐색하고자 tyrosinase 프로모터를 지닌 B16 mouse melanoma cell에 어성초 메탄올 추출물을 처리한 결과 메탄올 추출물은 10 µg/mL와 100 µg/mL의 농도에서 대조군에 비해서 약 13%와 45%의 억제효과를 나타냈으며, 세포생존율은 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL의 농도에서 약 104%, 101%, 74%로서 세포독성이 낮게 나타났다. Butyl alcohol과 물 분획물은 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 효과가 없었지만 methylene chloride 분획물은 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 효과를 나타내었으며, 특히 methylene chloride 분획물은 10 µg/mL와 100 µg/mL의 농도에서 각각 약 82%와 48%의 발현율을 나타냄으로써 대조군에 비해 tyrosinase 유전자의 발현을 크게 억제하였다.

문 헌

- Burchill SA, Bennett DC, Holmes A, Thody AJ. 1991. Tyrosinase expression and melanogenesis in melanotic and amelanotic B16 mouse melanoma cells. *Pathobiology* 59: 335-339.
- Aroca P, Urabe K, Kobayashi K, Taskamoto K, Hearing VJ. 1993. Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation. *J Biol Chem* 268: 25650-25655.
- Paval S. 1993. Dynamics of melanogenesis intermediates. *J Invest Dermatology* 100: 162S-165S.
- Jimenez-Cervantes C, Solano F, Kobayashi T, Urabe K, Hearing VJ, Lozano J, Garcia-Borrón C. 1994. A new enzymatic function in the melanogenic pathway. *J Biol Chem* 269: 17993-18001.
- Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han DS. 1995. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J Food Sci Technol* 27: 891-896.
- Lee SH, Park JS, Kim SY, Kim JJ, Chung SR. 1997. The screening of the inhibitory compounds on tyrosinase activity from the natural product. *Yakhak Hoeji* 41: 456-461.
- Jeong H, Park YG, Shin UK, Shin SK, Baek SK, Lee MH, Park YI. 1997. Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs. *Yakhak Hoeji* 41: 518-523.
- Choi BW, Lee BH, Kang KJ, Lee ES, Lee NH. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Korean J Pharm* 29: 237-242.
- Baurin N, Arnoult E, Scior T, Do QT, Bernard P. 2002. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J Ethnopharmacology* 82: 155-158.
- Yokota T, Nishino H, Kubota Y, Mizoguchi M. 1998. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Research* 11: 355-361.
- Shin NH, Ryu SY, Choi EJ, Kang SH, Chang IM, Min KR, Kim YS. 1998. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on the dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 801-803.
- Lee SH, Choi SY, Kim HC, Hwang JS, Lee BG, Gao JJ, Kim SY. 2002. Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull* 25: 1045-1048.
- Lee KT, Lee KS, Jeong JH, Jo BK, Heo MY, Kim HP. 2003. Inhibitory effects of ramulus mori extracts on melanogenesis. *J Cosmet Sci* 54: 133-142.
- Kubo I, Kinoshita H. 1999. 2-Hydroxy-4-methoxy-benzaldehyde a potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants. *Planta Medica* 65: 19-22.
- Chin JE, Sun HS, Lee KJ, Choi TJ, Ko YS, Sohn HJ, Kim JJ, Jeon BH, Lee BH. 2000. Inhibitory effects of some medicinal plant extracts on the tyrosinase promoter activity on B16 mouse melanoma cells. *International J Oriental Medicine* 1: 6-13.
- Chin JE, Cho NC. 2000. Effects of *Artemisia capillaris* herba extracts on the tyrosinase gene activity. *Dongkang College* 23: 293-307.
- Cho NC, Yoon YH, Lee HJ, Shon HJ, Kim YK, Choi KH, Ra MS, Cho YK, Lee BH, Chin JE. 2001. Effect of onion (*Allium cepa* L.) extract on tyrosinase gene expression. *Korean J Food & Nutr* 14: 228-232.
- Chung CK, Ham SS, Lee SY, Oh DH, Choi SY, Kang IJ, Nam SM. 1999. Effects of *Houttuynia cordata* ethanol extracts on serum lipids and antioxidant enzymes in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 205-211.
- Ha BJ. 2003. Effects of *Houttuynia cordata* thubn on anti-

- oxidative activity against TCDD damage. *J Environ Sci* 12: 599-603.
20. Chen YY, Liu JF, Chen CM, Chao PY, Chang TJ. 2003. A study of antioxidative and antimutagenic effects of *Houttuynia cordata thunb* using an oxidized frying oil-fed model. *J Nutr Sci Vitaminol* 49: 327-333.
21. Song JH, Kim MJ, Kwon HD, Park IH. 2003. Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia cordata* root. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1053-1058.
22. Cho EJ, Yokozawa T, Rhyu DY, Kim HY, Shibahara N, Park JC. 2003. The inhibitory effects of 12 medicinal plants and their component on lipid peroxidation. *Am J Chin Med* 31: 907-917.
23. Kim J, Ryu HS, Shin JH, Kim HS. 2005. In vitro and ex vivo supplementation of *Houttuynia cordata* extract and immunomodulating effect in mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 167-175.
24. Rho BG, Shin MK, Song HJ. 1998. Studies on the antiallergic reactions of the herba *Houttuynia* extract. *Kor J Herbology* 13: 77-89.
25. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 65: 55-63.

(2005년 7월 1일 접수; 2005년 8월 5일 채택)