

B16 Melanoma 세포에서 Citrus Essential Oil이 Melanin 생성에 미치는 영향

임혜원* · 조남영* · 윤미연* · 차상복* · 김경원* · 박영미* · 이지윤 · 이진희 · 김창종 · 심상수[#]

중앙대학교 약학대학, *의약식품대학원

(Received November 28, 2002; Revised December 16, 2002)

Effects of Citrus Essential Oils on Melanin Production in B16 Melanoma Cells

Hye Won Lim, Nam Young Cho, Mi Yun Yoon, Sang Bok Cha, Kyoung Won Kim,
Young Mi Park, Ji Yun Lee, Jin Hee Lee, Chang Jong Kim and Sang Soo Sim[#]

College of Pharmacy, The Graduate School of Food and Drug Administration*,
Chung-Ang University, 221 Huksuk-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

Abstract — This study is performed to investigate the effects of citrus essential oils on melanin production in B16 melanoma cells. Five kinds of citrus essential oils (Bergamot, Grapefruit, Lemon, Mandarin, Petigrain) did not have any influence on DPPH radical scavenger activity, cell growth and cytotoxicity in B16 melanoma cells. Both mandarin and petigrain essential oils dose-dependently inhibited purified tyrosinase activity, but bergamot did not. In 1 μ M MSH-stimulated B16 melanoma cells, all of 5 citrus essential oils inhibited melanin production in a dose dependent manner. From the above results, it is possible that citrus essential oils may be developed to be an anti-melanogenesis agent on the basis of their inhibitory effect on MSH-induced melanin production.

Keywords □ Melanin, tyrosinase, citrus essential oil

표피에 존재하는 melanin은 태양 광선으로부터 들어오는 자외선을 차단하는 색소로서 멜라닌이 국소적으로 과도하게 합성되거나 노화 등에 의해 피부의 생리기능이 떨어지게 되면 멜라닌이 표피표면에 침착되어 기미, 주근깨 및 다양한 색소침착을 유발하게 된다. 피부에 있어서 멜라닌의 생성은 melanocyte에서 cascade 효소 반응에 의해 생성된다.¹⁾ Tyrosinase 효소는 tyrosine을 DOPA quinone으로 전환시키는 효소로서 melanin 생성시 rate-limiting step에 관여하며 melanin 생성을 조절하는 중요한 단계로 알려져 있다.¹⁾ Tyrosinase는 tyrosine에 hydroxylation을 일으켜 L-DOPA를 생성하는 tyrosine hydroxylase와 L-DOPA를 산화시켜 DOPA quinone을 생성하는 DOPA oxidase의 복합체로 구성되어 있다. 현재 멜라닌 생성을 억제하는 미백 화장품에는 arbutin, kojic acid, vitamin C, hydroquinone 등과 상백피 추출물, 감초 추출물, 반하 추출물, 백조각 같은 식물 추출물이 사용되고 있다.²⁻⁵⁾

식물로부터 분리한 정유는 다양한 생리활성을 갖는 물질로서 예로부터 향균, 살균 등 방부 효과가 뛰어나고, 후각을 통해 대뇌 변연계(기억, 감정들을 관장하는 부분)에 자극을 주기 때문에 스트레스로 인한 긴장을 완화시키고 기억력과 면역력을 증가시키는 것으로 알려져 왔다.⁶⁾ 변연계에 미치는 영향 중 chamomilla recutia의 essential oil이 비만세포에서 histamine 유리를 차단하지만⁷⁾, eucalyptus와 rosemary oil은 흰쥐에서 족부종을 일으키는 물질로 보고되었다.⁸⁾ 또한 essential oil은 radical scavenger⁹⁾ 및 항산화제로서 작용한다는 보고도 있다.^{10,11)} 식물에서 유래된 hydroquinone 배당체는 melanin 생성에 의한 색소 침착에 대한 외용 치료제로서 ascorbate와 복합체를 이루며 이는 melanin 생성 억제 및 생성된 melanin 파괴의 분해를 촉진하는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ 이와 같이 정유는 다양한 생리활성을 갖고 있어 우리 생활 주변에서 일반적으로 사용되어 왔지만 아직 이들의 생리 기전에 대해서는 알려진 바가 거의 없는 실정이다. 그러므로 이 실험에서는 5종류의 citrus essential oil을 이용하여 melanin 생성에 미치는 영향을 관찰하였고, 기능성화장품의 천연미백제로서의 이용 가능성을 구명하고자 하였다.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5615 (팩스) 02-816-7338
(E-mail) simss@cau.ac.kr

실험방법

재료

Citrus essential oils(Bergamot, Grapefruit, Lemon, Mandarin, Petigrain)은 Eve Taylor Co.(London, UK)로부터 구입하였으며, α -melanocyte stimulating hormone, tyrosinase, L-DOPA, melanin들은 Sigma chemical Co.로부터 구입하였다. B16 melanoma 세포는 서울대학교 세포주 은행으로부터 구입하였다.

세포 배양

B16 melanoma 세포는 10% fetal bovine serum과 penicillin/streptomycin(100 IU/50 μ g/ml)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 용액으로 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. B16 세포를 이용한 melanin 측정시 phenol red가 없는 DMEM을 사용하였다. 24 well plate에 5 × 10⁴ cells/ml로 분주하고 12시간이 지난 뒤 세포가 plate에 완전히 부착된 것을 확인한 후 citrus essential oil을 10분간 전처리 하였다. melanin 생성을 촉진하기 위하여 1 μ M α -melanocyte stimulating hormone(MSH)를 처리하고 48시간 지난 뒤에 melanin을 정량하였다.

Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase는 DOPA를 DOPA quinone을 통해 DOPA chrome으로 전환시키는 효소이다. 정제된 tyrosinase를 여러 농도의 essential oil과 혼합하여 실온에서 30분간 배양한 후 96 well plate에 각각의 tyrosinase(2 unit/ 40 μ l)를 분주하였다. 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.2)에 녹인 2 μ g/ml L-DOPA 200 μ l를 가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하고 tyrosinase에 의해 생성된 DOPA chrome은 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹³⁾

Melanin 정량

Melanin 정량을 위해 10% FBS가 함유된 phenol red가 없는 DMEM 용액에서 배양한 B16 melanoma 세포를 24 well plate에 5 × 10⁴ cells/ml로 분주하고 12 시간 경과 후 essential oil을 전처리하고 α -melanocyte stimulating hormone(MSH) 1 μ M를 처리하여 48 시간 배양하였다. 배양이 끝나면 1%(w/v) Triton X-100을 함유한 10 μ M phosphate buffer(pH 6.8)를 100 μ l를 가하고 5분간 shaking 한 후에 eppendorf tube로 옮기고 원심분리하여 얻은 cell pellet에 1 N NaOH 100 μ l와 증류수 200 μ l를 가하고 60°C에서 1시간 배양하여 melanin을 완전히 녹인 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Melanin 표준품으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 각 well에서 생성된 melanin 양을 산출하였다. Melanin 생성량은 각 well에서 측정된 단백질 농도를 기준으로 μ g/mg protein으로 표기하였으며 각각의 약물 효과는 대조군과

비교하여 % inhibition으로 나타내었다.

Sulforhodamine assay

B16 melanoma 세포를 96 well plate에 200 μ l (10⁴ cells/ml)씩 가한 후 citrus essential oil을 처리하고 48 시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 얼음에 보관한 50% TCA 용액을 50 μ l를 상층액 위에 가볍게 가하며, 최종농도가 10% 되게 하였다. 4°C에서 1시간 방치한 후 수돗물로 5회 세척하고 물기를 제거하여 공기 중에서 건조시켰다. 1% acetic acid에 0.4%(w/v) sulforhodamine (SRB)을 녹인 용액 100 μ l 가하고 실온에서 30분간 방치하였다. 염색액을 버리고 1% acetic acid로 4회 세척한 후 물기를 제거하여 공기 중에서 완전히 건조 시켰다. 10 mM unbuffered Tris base (pH 10.5)를 200 μ l 가하고 침전물을 완전히 녹인 후에 564 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항산화 활성 측정

96 well plate에 에탄올에 녹인 0.1 mM DPPH 용액 180 μ l와 각 농도별로 조제한 citrus essential oil 20 μ l를 가하고 37°C에서 30분간 배양한 후 FL 600 spectrofluorometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조 약물로서는 ascorbic acid를 사용하였으며 결과는 대조군에 대한 % change로 표기하였다.

자료분석 및 통계적 검정

실험 결과는 평균±표준오차로 표기하였으며, 실험 성적은 non-paired Student's t-test로 검정하였고 P 값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

실험결과 및 고찰

Citrus essential oil의 항산화 효과

Citrus essential oils(Bergamot, Grapefruit, Lemon, Mandarin, Petigrain)의 항산화 작용을 확인하기 위하여 DPPH를 이용하여 항산화 작용을 측정하였다. 양성 대조군으로는 항산화 작용이 있는 것으로 알려진 vitamin C를 이용하여 citrus essential oil의 항산화 효과를 비교하였다. Vitamin C는 10 M에서 100 M까지 농도 의존적으로 DPPH 유리기를 소거하였다(Fig. 1). Citrus essential oils(Bergamot, Grapefruit, Lemon, Mandarin, Petigrain)는 2 mg/ml까지 농도를 증가시켰으나 DPPH radical 소거에 있어서 약 10% 정도 제거하는 효과를 나타내었다(Fig. 1). 이러한 결과로 미루어 볼 때 citrus essential oil 자체는 항산화 작용이 미약한 것으로 사료된다. Choi 등은 citrus essential oil을 이용한 DPPH 항산화 활성을 측정한 실험에서 60%의 효과를 나타내는 citrus essential oil의 농도는 166.2 μ g/ml 이상의 농도에서 나타난다는 보고하였다.⁹⁾ 그러나 이 연구에서는 B16

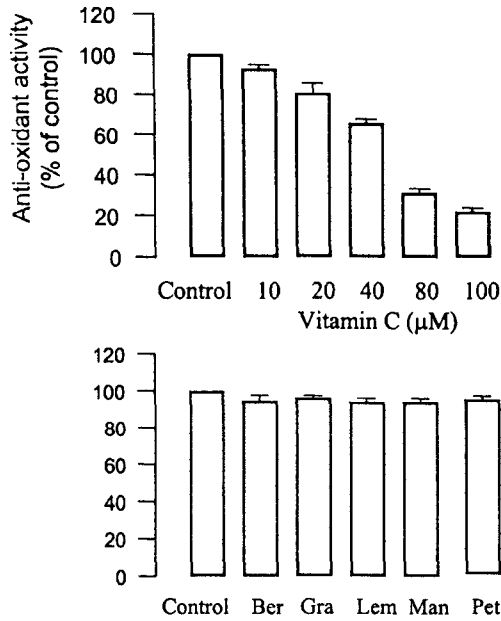


Fig. 1 – Anti-oxidant effects of vitamin C and citrus essential oils in the DPPH assay. A solution of 180 μl of 100 μM DPPH solution in ethanol was gently mixed with 20 μl of citrus essential oils (final concentration: 2 mg/ml; bergamot (Ber), grapefruit (Gra), lemon (Lem), mandarin (Man) and petigrain (Pet) for 30 min and the absorbance was measured at 517 nm. Results are means ± SD from 4 separate experiments.

melanoma 세포에 처치하여 melanin 생성에 미치는 영향을 관찰하는 것이 주목적이기 때문에 고농도에서의 항산화 효과는 측정하지 않았다. 또한 세포에 처치하는 농도는 50 μg/ml 이하의 농도를 사용하였으며, DPPH 항산화 효과를 측정할 농도는 2 μg/ml에서 20배나 높은 농도로 이 농도에서 항산화 작용이 없는 것은 세포에서 나타나는 essential oil의 효과는 항산화 작용이 아닌 다른 작용에 의한 것으로 추정할 수 있다.

Citrus essential oil이 세포증식에 미치는 영향

Citrus essential oil이 세포 독성이 있는지를 확인하기 위하여 citrus essential oil(50 μg/ml)를 B16 melanoma 세포에 처치한 후 48시간 배양하고 단백질 정량 및 sulforhodamin 정량을 하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 citrus essential oil 5가지 모두 단백질 정량과 sulforhodamin 정량에 있어서 대조군과 비교하여 이렇다 할 변화를 나타내지 않았다. Citrus essential oil 50 μg/ml 농도에서 B16 melanoma 세포의 증식에 영향을 주지 않는 것으로 보아 세포 성장이나 세포 독성에 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

Tyrosinase 활성과 melanin 생성에 미치는 영향

Tyrosinase 활성과 melanin 생성을 억제하는 것으로 잘 알려진 vitamin C, arbutin, kojic acid는 정제된 tyrosinase의 활성을

유의하게 억제하였으며, 또한 B16 melanoma 세포에서 1 μM MSH에 의한 melanin 생성도 유의하게 억제하였다(Fig. 3). citrus

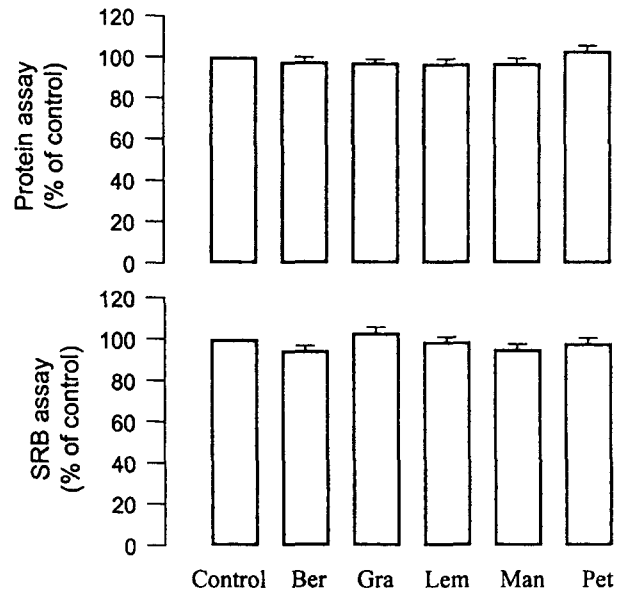


Fig. 2 – Effects of citrus essential oils on cell growth and cytotoxicity in B16 melanoma cells. B16 melanoma cells were incubated with citrus essential oils (50 μg/ml), such as bergamot (Ber), grapefruit (Gra), lemon (Lem), mandarin (Man) and petigrain (Pet) for 48 hrs in 5% CO₂ incubator at 37°C. Results are means ± SD from 4 separate experiments.

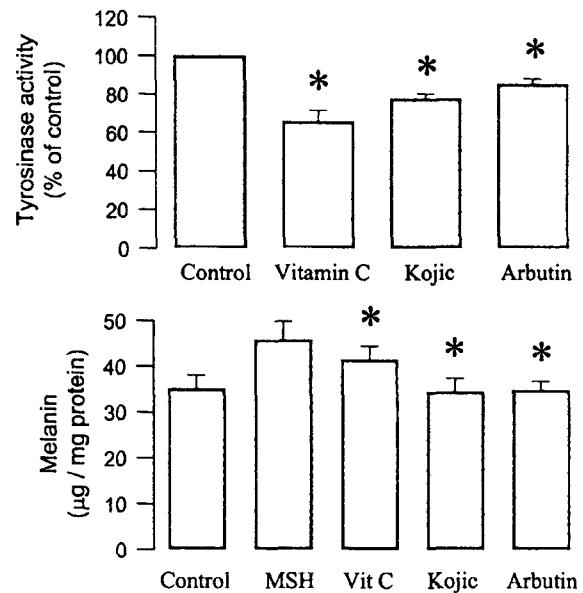


Fig. 3 – Effects of vitamin C (1 mg/ml), kojic acid (500 μM) and arbutin (100 μM) on purified tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells stimulated by 1 μM MSH. Results are means ± SD from 4 separate experiments. * Significantly different from control or MSH alone (p<0.05).

essential oil 중 bergmot은 정제된 tyrosinase 효소 활성에는 별 다른 영향을 미치지 않았지만 B16 melanoma 세포에서 1 μ M MSH에 의한 melanin 생성은 약 20% 정도 억제하였다(Fig. 4). Grapefruit와 lemon essential oil은 tyrosinase 효소 활성을 약 6% 정도 억제하였으며, melanin 생성도 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 5, 6).

Essential oil이 melanin 생성에 미치는 영향에 대한 보고는 지금까지 별로 보고된 바가 없는 실정이다. 식물에서 유래된 hydroquinone 배당체는 melanin 생성에 의한 색소 침착에 대한 외용 치료제로서 ascorbate와 복합체를 만들어 사용시 melanin 생성 억제 및 생성된 melanin 과립의 분해를 촉진하는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ 이 실험에서 사용한 5종류의 citrus essential oil 중 정제한 tyrosinase 효소 활성을 유의하게 억제하는 것은 mandarin과 petigrain essential oil이었으며, tyrosinase 억제 정도는 약 17% 정도로 나타났다. 이러한 억제 정도는 arbutin이나 kojic acid의 억제 효과와 유사한 정도로 억제하는 것으로 보인다. 또한 B16 melanoma 세포에서 1 M MSH에 의한 melanin 생성도 농도의존적으로 억제하였다(Fig. 7, 8). Tyrosinase 억제제인 arbutin은 tyrosinase 효소의 기질 결합 부위(L-tyrosine 혹은 L-DOPA)에 경쟁적 억제제로서 작용하는 것으로 알려져 있으며,¹⁴⁾ kojic acid도 tyrosinase의 경쟁적 억제제로 작용한다는 것이 보고되었다.¹⁵⁾ 이 결과로 미루어 볼 때 mandarin과 petigrain essential oil이

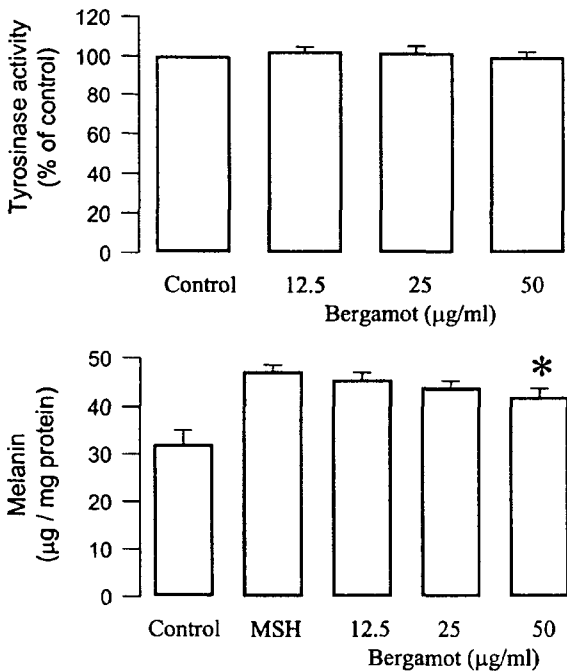


Fig. 4 – Effect of bergamot essential oil on purified tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells stimulated by 1 μ M MSH. Results are means \pm SD from 4 separate experiments. *Significantly different from MSH alone ($p < 0.05$).

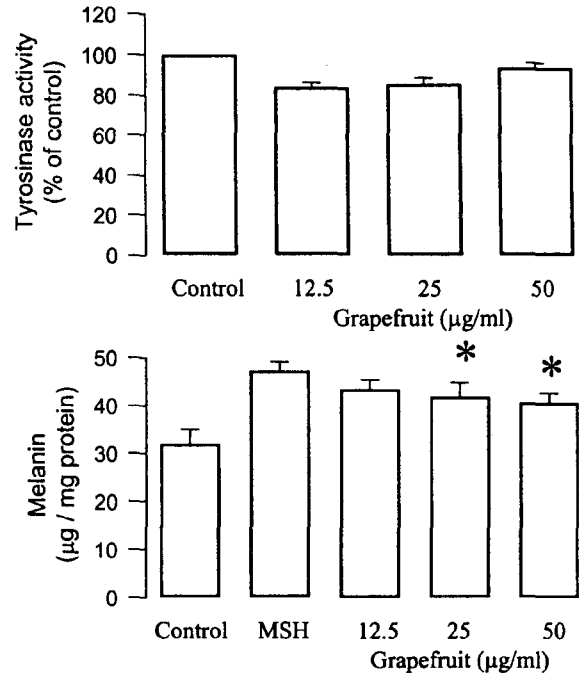


Fig. 5 – Effect of grapefruit essential oil on purified tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells stimulated by 1 μ M MSH. Results are means \pm SD from 4 separate experiments. *Significantly different from MSH alone ($p < 0.05$).

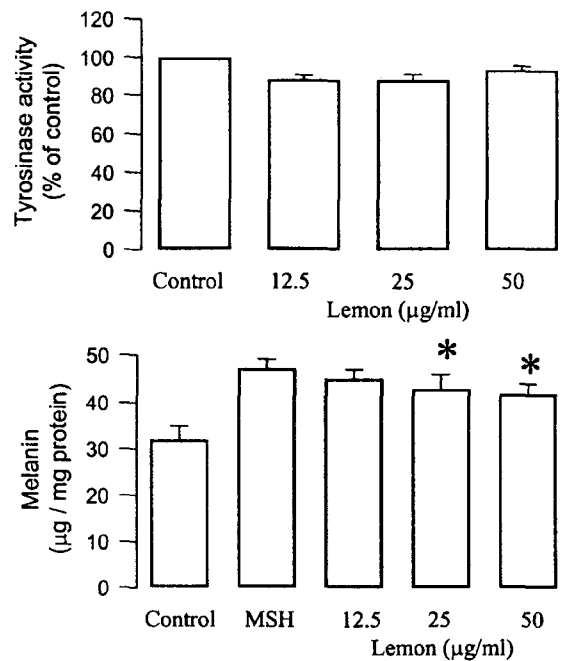


Fig. 6 – Effect of lemon essential oil on purified tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells stimulated by 1 μ M MSH. Results are means \pm SD from 4 separate experiments. *Significantly different from MSH alone ($p < 0.05$).

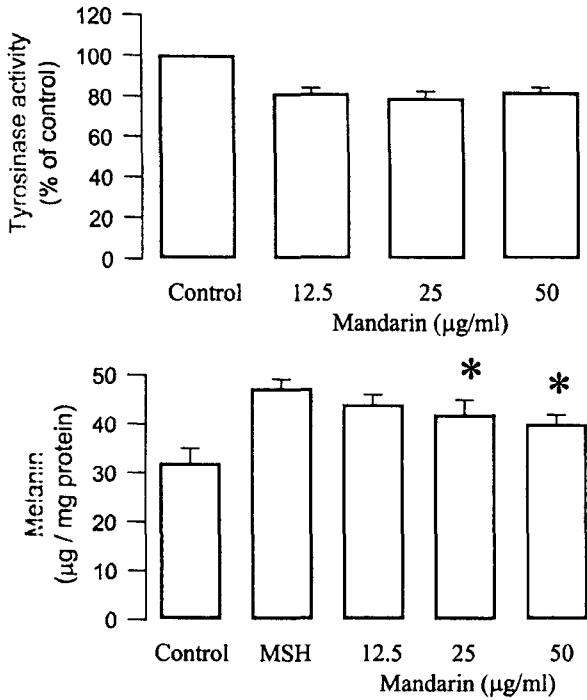


Fig. 7 - Effect of mandarin essential oil on purified tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells stimulated by 1 µM MSH. Results are means ± SD from 4 separate experiments. *Significantly different from MSH alone (p<0.05).

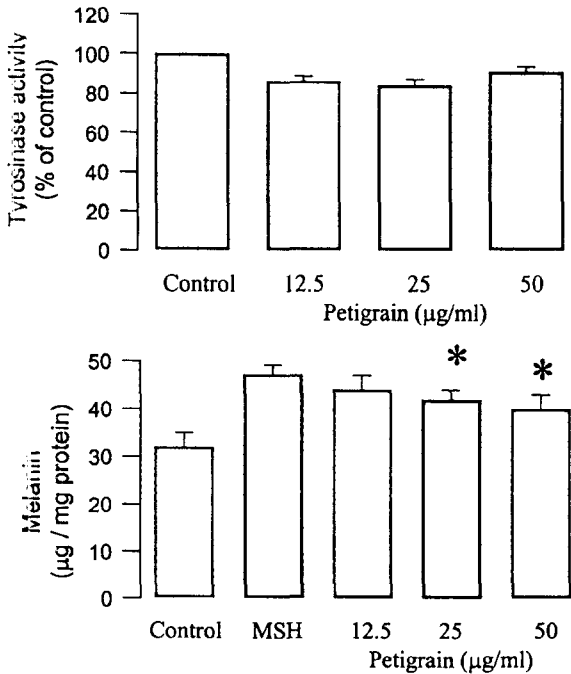


Fig. 8 - Effect of petigrain essential oil on purified tyrosinase activity and melanin production in B16 melanoma cells stimulated by 1 µM MSH. Results are means ± SD from 4 separate experiments. *Significantly different from MSH alone (p<0.05).

tyrosinase 효소 억제 기전은 설명하지 못하지만 tyrosinase 효소에 직접적으로 작용하여 억제하는 것으로 보인다.

결론

Citrus essential oils(Bergamot, Grapefruit, Lemon, Mandarin, Petigrain)이 B16 melanoma 세포에서 tyrosinase 활성과 melanin 생성에 미치는 영향을 관찰하였다. 5종류의 citrus essential oil은 DPPH radical 소거와 세포 증식 및 독성에서 대조군에 비해 유의한 변화를 일으키질 않았다. 정제된 tyrosinase 활성에 있어서 mandarin과 petigrain essential oil은 유의하게 tyrosinase 활성을 억제하였으나 bergamot은 전혀 억제하지 않았다. B16 melanoma 세포에서 MSH에 의한 melanin 생성이 5종류의 citrus essential oil에 의해 모두 농도 의존적으로 억제되었다. Bergamot essential oil은 tyrosinase 효소 활성을 직접적으로 억제하지는 못했지만 melanoma 세포에서 MSH에 의한 melanin 생성은 억제하는 것으로 나타났다. 다른 4종류의 citrus essential oil도 모두 tyrosinase 효소 활성을 억제하였으며, MSH에 의한 melanin 생성도 억제하였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 citrus essential oil은 MSH에 의한 melanin 생성을 억제하는 것으로 보아 미백제로서의 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다.

문헌

- Hearing, V. J. and Tsukamoto, K. : Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 5, 2902 (1991).
- Higuchi, M., Miura, Y., Boohena, J., Kinoshita, Y., Yamamoto, Y., Yushimura, I. and Yamaha, Y. : Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts. *Planta Med.* 59, 253 (1993).
- Ryu, K. Y., Kang, W. S., Kim, Y. H., Jang, H. D., Hong, J. T., Yoo, H. S. and Yun, Y. P. : Antioxidative effects of the rhizome of *Rhodiola sachalinensis*. *Yakhak Hoeji.* 42, 312 (1998).
- Park, J. H., Shin, Y. G., Shin, U. K., Baek, S. K., Lee, S., K, Hee. Chung, M. H. and Park, Y. I. : Tyrosinase inhibition activity of some herbal drugs. *Yakhak Hoeji* 41, 518 (1997).
- Lee, S. H., Park, J. S., Kim, S. Y., Kim, J. J. and Chung, S. R. : Isolation of inhibitory components on tyrosinase activity from the bark of *paeonia moutan*. *Yakhak Hoeji* 42, 353 (1998).
- Tisserand, R. : The art of Aromatherapy. Daniel Co Ltd, Saffron *United Kingdom* (1988).
- Miller, T., Wittstock, U., Lindequist, U. and Teuscher, E. : Effects of some components of the essential oil of chamomile, *Chamomilla recutita*, on histamine release from rat mast cells. *Planta Med.* 62, 60 (1996).

- 8) Santos, F. A. and Rao, V. S. : Mast cell involvement in the rat paw oedema response to 1,8-cineole, the main constituent of eucalyptus and rosemary oils. *Eur. J. Pharmacol.* **23**, 253 (1997).
- 9) Choi, H. S., Song, H. S., Ukeda, H. and Sawamura, M. : Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J. Agric Food Chem.* **48**, 4156 (2000).
- 10) Burits, M. and Bucar, F. : Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res.* **14**, 323 (2000).
- 11) Grassmann, J., Hippeli, S., Dornisch, K., Rohnert, U., Beuscher, N. and Elstner, E. F. : Antioxidant properties of essential oils. Possible explanations for their anti-inflammatory effects. *Arzneimittelforschung.* **50**, 135 (2000).
- 12) Clarys, P. and Barel, A. : Efficacy of topical treatment of pigmentation skin disorders with plant hydroquinone glucosides as assessed by quantitative color analysis. *J. Dermatol.* **25**, 412 (1998).
- 13) Ohkura, T., Yamashita, K., Mishima, Y. and Kobata, A. : Purification of hamster melanoma tyrosinases and structural studies of their asparagine-linked sugar chains. *Arch. Biochem. Biophys.* **15**, 63 (1984).
- 14) Maeda, K. and Fukuda, M. : Arbutin mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 765 (1996).
- 15) Smith, C. N. and Lindsay, C. D. : Kojic acid reduces the cytotoxic effects of sulfur mustard on cultures containing human melanoma cells in vitro. *J. Appl. Toxicol.* **21**, 435 (2001).