

# 한약재 12종의 열수추출물이 $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone에 의해 유도된 B16F10 흑색종 세포의 멜라닌형성에 미치는 영향

이수진 · 최영현<sup>1</sup> · 이용태<sup>2</sup> · 최병태\*

동의대학교 한의과대학 해부학교실, 1: 생화학교실, 2: 생리학교실

## Effects of Aqueous Extracts from Twelve Herbs on $\alpha$ -melanocyte Stimulating Hormone-induced Melanogenesis in B16F10 Mouse Melanoma Cell

Soo Jin Lee, Yung Hyun Choi<sup>1</sup>, Yong Tae Lee<sup>2</sup>, Byung Tae Choi\*

Departments of Anatomy, 1: Biochemistry 2: Physiology, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

We investigated the effects of aqueous extracts from twelve medical herbs on  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)-induced melanogenesis in B16F10 mouse melanoma cell. The cells were incubated with  $\alpha$ -MSH and aqueous extracts 5 days and 2 days and then analysed melanin amount and tyrosinase activities, respectively. Nine aqueous extract of herbs examined at 1 mg/ml level decreased melanin synthesis in B16F10 cell, especially in Agastache rugosa, Leonurus sibiricus and Murus bombycis. The significant decrease of released extracellular melanin were also observed in treated cells with aqueous extract from Leonurus sibiricus, Murus bombycis and Ledebouria seselioides. The  $\alpha$ -MSH-induced activation of tyrosinase was inhibited in cells treated with aqueous extract from Cuscuta semen, Angelica tenuissima and Agastache rugosa. These results suggest that herbs inhibiting melanogenesis through tyrosinase activity may apply to develop whitening drugs and cosmetics.

Key words : oriental herb, melanin, tyrosinase, whitening

### 서 론

멜라닌은 동물, 식물 및 미생물에 널리 존재하며 멜라닌세포에 의해 방출되는 페놀류의 고분자 물질로 피부와 머리카락의 색을 결정하는 중요한 인자이다<sup>1)</sup>. 이는 L-tyrosine이 멜라닌형성과정을 거쳐 생성되는 최종산물로 인체에서 자외선에 대해 세포손상을 막아주는 기능과 함께 독성약물의 흡수 등 여러 중요한 기능을 수행한다<sup>2,3)</sup>. 멜라닌형성(melanogenesis)은 중요한 역할을 수행하는 tyrosinase라는 효소를 함유한 멜라닌세포내에서 멜라닌이 생합성되는 생리화학적 연쇄적이며 특이적인 효소반응반응 과정을 말한다<sup>4)</sup>. 포유동물의 tyrosinase는 여섯 개의 N-glycosylation site를 가진 type I membrane glycoprotein으로 melanosome내에서만 관찰되며, L-tyrosine을 hydroxylation을 거쳐 L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)로 전환시키며, L-DOPA를 oxidation을 거쳐 dopaquinone

으로 전환시키는 과정에 관여한다<sup>5)</sup>. 멜라닌형성이 tyrosinase라는 효소의 발현과 합성에 의해 조절됨으로 미백을 목적으로 하는 다양한 제제개발에 있어 이에 대한 많은 연구가 이루어지고 있으며 지금까지 알려진 tyrosinase저해제로 hydroquinone, ascorbic acid, kojic acid, azelaic acid, retinole, arbutin 등이 있다<sup>6)</sup>.

최근 천연물로부터 tyrosinase활성저해를 나타내는 제제에 대한 연구와 이를 이용한 제품이 상용화되고 있다. B16F10세포는 마우스의 흑색종세포로  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)에 의해 tyrosinase의 활성을 유도를 통해 멜라닌합성이 시작된다<sup>7,8)</sup>. 본 연구는 미백에 효과가 있다고 알려진 한약재를 중심으로  $\alpha$ -MSH자극에 의한 B16F10세포계의 멜라닌합성에 미치는 영향을 세포내 멜라닌생성과 세포의 멜라닌분비 및 tyrosinase 활성을 통해 살펴보았다

### 재료 및 방법

#### 1. 시료의 제조

한약재 12 종은 동의대학교 한의과대학 부속병원에서 공급

\* 교신저자 : 최병태, 부산시 진구 양정 2동 산 45-1, 동의대학교 한의과대학

· E-mail : choibt@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8653

· 접수 : 2006/08/24 · 수정 : 2006/09/18 · 채택 : 2006/10/04

받았으며 천화분 (*Trichosanthes kirilowii*, AETK), 곱향 (*Agastache rugosa*, AEAR), 길경 (*Platycodi Radix*, AEPR), 익모초 (*Leonurus sibiricus*, AELSL), 오매 (*Prunus mume*, AEPM), 상지 (*Morus bombycis*, AEMB), 나복자 (*Raphanus sativus*, AERS), 행인 (*Prunus armeniaca*, AEPA), 오향 (*Saussurea lappa*, AESL), 고본 (*Angelica tenuissima*, AEAT), 방풍 (*Ledebouriella seseioides*, AELS), 토사자 (*Cuscutae semen*, AECS)를 사용하였다. 약재 100 g을 증류수 2,000 ml에 넣어 90℃에서 2시간 동안 열수 추출하여, 3,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. Pore size가 0.45 μm인 여과지로 부유물을 제거한 다음 동결건조 하였다. 시료로 사용하기 위해 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL)과 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL)을 이용하여 100 mg/ml의 농도가 되도록 하였다.

2. B16F10 세포의 배양

B16F10세포는 90% DMEM에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 포함되어 있는 배지를 사용하였으며 5% CO<sub>2</sub>와 37℃가 유지되는 humidity incubator내에서 배양하였다. 배양한 B16F10세포를 trypsin-EDTA (Gibco BRL)를 이용하여 부유시킨 뒤 각 실험에 사용하였다.

3. 세포내 멜라닌의 생성 측정

B16F10세포 0.4×10<sup>5</sup>개를 60 mm 배양용기에 분주한 다음 24시간 안정화시킨 후 각 추출물과 [N1e4,D-Phe7] α-MSH (Sigma, CA, USA)를 처리하여 5일간 세포를 배양하였다. 세포를 scraper로 분리하여 phosphate-buffered saline (PBS)으로 3번 수세하여 수거하였으며 5,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 10% DMSO가 포함된 1 N NaOH를 처리하여 80℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 합성 멜라닌 (Sigma, CA, USA)을 이용하여 농도별 표준곡선을 작성한 후 멜라닌 농도를 495 nm에서 측정된 흡광도를 이용하여 구하였다.

4. 세포의 멜라닌의 농도 측정

세포내 멜라닌의 농도 측정과 동일한 조건으로 세포를 처리한 뒤 배양 상층액을 취하여 404 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 수를 계수하여 한 개의 세포가 분비한 멜라닌의 양을 계산하여 대조군을 100%로 놓고 상대적인 값을 측정하였다.

5. 세포내 tyrosinase활성 측정

Tyrosinase활성 측정은 Martinez-Esparza 등<sup>9)</sup>의 방법을 수정하여 사용하였다. B16F10세포 2.5×10<sup>5</sup>개를 100 mm 배양용기에 분주한 다음 동일 조건에서 24시간 안정화 시킨 뒤 한약재 추출물과 α-MSH를 처리하여 2일간 배양하였다. PBS로 수세 후 5000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. Lysis buffer (1% Triton X-100, 0.1 M sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM PMSF, 1 mM NaF)를 첨가하여 30분간 얼음에서 반응시켜 세포들을 녹인 후 14,500 rpm에서 25분간 원심분리하여 상층액을 취

하여 tyrosinase활성 측정에 사용하였다. 50 μg의 단백질을 취하여 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0)과 0.05% L-DOPA (Sigma, CA, USA)를 첨가한 뒤 37℃에서 반응시키면서 30분 및 50분에 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

1. 한약재 추출물이 세포내 멜라닌형성에 미치는 영향

열수 추출물을 0.1 mg/ml에서 2 mg/ml의 농도 범위 내에서 처리하고 200 nM의 농도로 α-MSH를 함께 처리한 후 5일간 배양하여 세포내의 멜라닌 농도를 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 천화분, 곱향, 길경, 익모초, 상지, 고본, 방풍 등이 1 mg/ml의 농도로 처리한 실험군에서 α-MSH만 처리한 대조군에 비해 멜라닌형성이 억제되고 있는 것으로 나타났으며, 특히 곱향, 익모초 및 상지를 처리한 군에서 현저한 멜라닌 생성의 억제를 보였다.

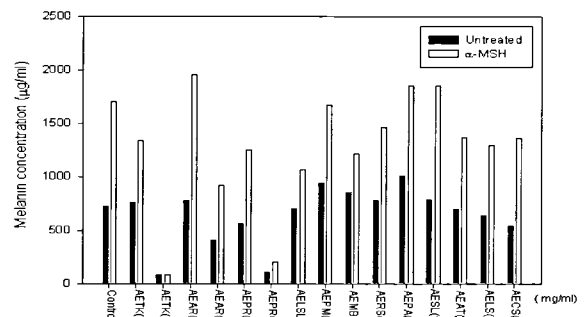


Fig. 1. Effects of water extraction of natural products on α-MSH-induced melanin contents in B16F10 cells. Cells were seeded at 1×10<sup>5</sup> cells per dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of aqueous extracts from 12 herbs in presence or absence of 200 nM α-MSH, and cultured for 5 days. Data are means±S.E. of three experiments performed in duplicate. Abbreviations: AETK, *Trichosanthes kirilowii*, AEAR, *Agastache rugosa*, AEPR, *Platycodi Radix*, AELSL, *Leonurus sibiricus*, AEPM, *Prunus mume*, AEMB, *Morus bombycis*, AERS, *Raphanus sativus*, AEPA, *Prunus armeniaca*, AESL, *Saussurea lappa*, AEAT, *Angelica tenuissima*, AELS, *Ledebouriella seseioides*, AECS, *Cuscutae semen*.

2. 한약재 추출물이 세포의 멜라닌 양에 미치는 영향

B16F10 세포외의 배양액으로 분비되는 멜라닌의 양을 비교하기 위해 세포내 멜라닌 생성과 동일한 조건으로 처리한 다음 5일간 배양하였으며 배양액을 취하여 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 한약재 추출물 0.1 mg/ml 농도에서 익모초, 상지, 방풍, 고본 등이 α-MSH만을 처리한 대조군에 비해 세포의 멜라닌 양이 적었으며, 특히 익모초와 상지에서 현저하였다. 그러나 곱향과 길경의 추출물을 처리한 경우에 α-MSH만 처리한 대조군에 비해 그 양이 오히려 증가하였다.

3. 한약재 추출물이 tyrosinase활성에 미치는 영향

멜라닌형성에 억제 효과를 보이는 한약재를 중심으로 세포 성장을 억제하는 것으로 사료되는 농도의 한약재 추출물 (데이터 미 제시)을 제외하고 tyrosinase활성도를 측정하였다. 추출물 처리 후 α-MSH를 처리하여 2일간 배양하여 tyrosinase활성도를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 대조군에 비해 α-MSH를 처리한 실험군에서 tyrosinase활성이 약 6.6배 증가하였으나 추출물 1 mg/ml

농도에서 광항 추출물은 3.8%, 고본 추출물은 12.8%, 토사자 추출물은 15.4%의 tyrosinase활성 감소를 보였다.

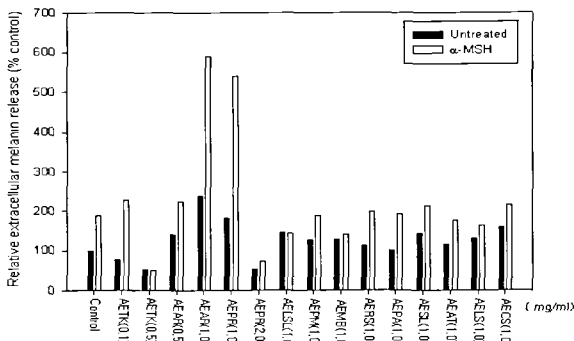


Fig. 2. Effects of water extraction of natural products on  $\alpha$ -MSH-induced extracellular melanin accumulation in B16F10 cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells per dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of aqueous extracts from 12 herbs in presence or absence of 200 nM  $\alpha$ -MSH, and cultured for 5 days. Data are means  $\pm$  S.E. of three experiments performed in duplicate. Abbreviations are given in Fig. 1.

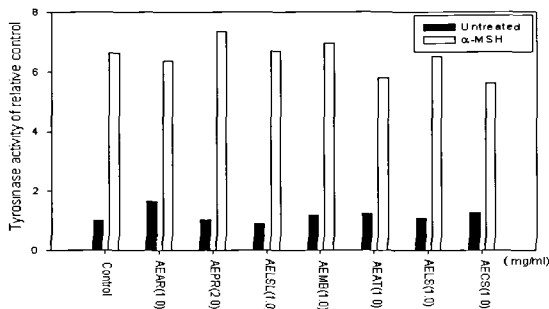


Fig. 3. Effects of water extraction of natural products on tyrosinase activity in  $\alpha$ -MSH-treated B16F10 cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells per dish. After 24 hours, cells were treated with 1 or 2 mg/ml concentrations of aqueous extracts from 7 herbs in presence or absence of 200 nM  $\alpha$ -MSH, and cultured for 3 days. Data are means  $\pm$  S.E. of three experiments performed in duplicate. Abbreviations are given in Fig. 1.

## 고찰

한약재 추출물이  $\alpha$ -MSH에 의해 유도된 B16F10세포의 멜라닌합성에 미치는 영향에 대해 조사한 결과 한약재의 종류와 농도에 따라 세포내 멜라닌 생성 억제 정도에 차이를 보였다. 이 중 특히 광항, 익모초 및 상지가 다른 현저한 효과를 보여 주었다. 그러나 0.5 mg/ml농도의 천화분에서 현저한 감소를 보여 주었다 (Fig. 1). 이는 천화분이 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 볼 수 있으나 Hela세포와 leukemia K562세포 등에서 apoptosis를 유발하는 것으로 보고되어 있어 세포의 apoptosis로 인한 멜라닌 생성의 상대적 감소로 짐작된다<sup>10,11)</sup>. 길경 2.0 mg/ml의 농도에서도 현저한 감소를 보였으나 일반적으로 한약재의 열수추출물의 처리 농도가 이를 넘지 않아 약재의 단독 처리에 의한 세포 사멸 등의 가능성이 있어 배제하였다.

세포의 배양액에 있는 멜라닌의 양을 측정된 결과 익모초, 상지, 방풍 등이  $\alpha$ -MSH만을 처리한 대조군에 비해 적은 양을 나타내었다. 이는 멜라닌생성저하에 따른 분비 멜라닌 양의 감소로

유추할 수 있다. 그러나 1 mg/ml농도의 광항과 길경을 동일한 조건으로 처리한 경우 멜라닌 양이 현저히 증가하는 것을 볼 수 있다 (Fig. 2). 멜라닌세포에서 멜라닌 분비과정에 각질세포의 도움 없이 세포외로 분비된다는 연구 보고는 많지 않으나 최근 p38 mitogen-activated protein kinase가 관여한다는 보고가 있다<sup>12)</sup>. 이들 한약재의 단독처리가 B16F10세포의 멜라닌형성 유도에 의한 멜라닌 분비량의 증가를 생각해 볼 수 있으나 Fig. 1에서 이들 추출물 단독처리가 멜라닌 생성에 영향을 미치지 않는 것으로 보아 멜라닌 분비 기전에 관여할 가능성이 있는 것으로 보여진다.

한약재 추출물이 세포내 멜라닌형성에 억제효과를 나타내는 결과와 분비되어 세포의 배양액에 축적된 멜라닌 양에 대한 결과가 일부 불일치를 보여 주고 있다. 이러한 결과는 세포내 멜라닌형성 과정과 멜라닌의 분비과정은 서로 독립적인 별개의 과정으로 미백에 대한 두 가지 접근이 가능하다<sup>13)</sup>. 멜라닌세포내 멜라닌형성양을 조절하는 방법과 세포내 생성된 멜라닌의 분비를 촉진하는 방법이 그것이다. 본 실험에서는 멜라닌 생성양에 초점을 맞추어 다음 단계로 tyrosinase 활성을 살펴보았다.

멜라닌세포에 의한 멜라닌합성에 있어 가장 중심적인 요소는 tyrosinase-related protein (TRP)s라 통칭되는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등의 효소활성을 지닌 단백질의 발현과 활성화이다<sup>5)</sup>. 이 중 주목받고 있는 단백질은 tyrosinase이며, tyrosinase의 발현과 활성화를 조절할 수 있는 약물을 개발함으로써 멜라닌형성조절을 통하여 피부 미백 및 melanin에 의한 피부 이상에 적합한 치료약을 개발하고자 많은 연구가 이뤄지고 있다.

한약재가  $\alpha$ -MSH에 의해 유도된 멜라닌합성과정에 나타나는 tyrosinase활성을 보면 세포내 멜라닌형성을 현저한 억제를 보인 익모초와 상지에 비해 낮은 억제 효과를 보이는 광항이 경우 3.8%, 고본이 12.8%, 토사자가 15.4%를 보여 주었다. 그러나 2 mg/ml농도의 길경은 오히려 11% 정도 tyrosinase 활성이 증가하였다. 이는 tyrosinase활성과는 관계없이 B16F10 melanoma내에서 진행되는 멜라닌합성에 관여하는 여러 인자 중 특정 인자의 영향으로 인해 멜라닌 생성이 억제되는 것으로 사료된다. 이상의 결과에서 tyrosinase활성저하를 통한 멜라닌생성을 억제하는 한약재를 미백관련 제제개발에 대한 기초 자료로 사용할 수 있을 것으로 보여진다.

## 결론

미백에 효과가 있다는 한약재 12종이 멜라닌형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 B16F10 세포에서  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone와 한약재 열수추출물을 처리하여 5일 및 2일간 배양한 후 각각 멜라닌형성과 tyrosinase활성을 분석하였다. 사용한 한약재 중 9종이 멜라닌형성을 저해하였으며 특히 광항, 익모초, 상지가 현저하였다. 세포외 멜라닌 분비는 익모초, 상지, 방풍에서 가장 낮게 나타났다. 그러나 멜라닌합성 억제를 나타내는 약재에 대한 tyrosinase활성억제를 살펴 본 결과 토사자, 고본, 광항이 현저하였다. 이상의 멜라닌형성 억제와 tyrosinase활성을 저해하는 결과를 나타내는 약재는 미백관련 약재 및 화장품개발

에 대한 기초자료로 활용가능 할 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업 (현장적용기술개발)의 연구비 지원에 의해 이루어 졌음을 밝히며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Kim, D.S., Park, S.H., Kwon, S.B., Youn, S.W., Park, K.C. Effects of lysophosphatidic acid on melanogenesis. *Chem and Phy of Lipid*, 127: 199-206, 2004.
2. Prota, G. The chemistry of melanins and melanogenesis. *Fortschr Chem Org Naturst*, 64: 93-148, 1995.
3. Ito, S., The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Res*, 16: 230-236, 2003.
4. Hearing, V.J., Tsukamoto, K. Ezymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J*, 5: 2902-2909, 1991.
5. Rescigno, A., Sollai, F., Pisu, B., Rinaldi, A., Sanjust, E. Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 17: 207-218, 2002.
6. No, J.K., Soung, D.Y., Kim, Y.J., Shim, K.H., Jun, Y.S., Rhee, S.H., Yokozawa, T., Cuhung, H.Y. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sci*, 65: 241-246, 1999.
7. Abdel-Malek, Z., Swope, V.B., Suzuki, I., Akcali, C., Harriger, M.D., Boyce, S.T., Urabe, K., Hearing, V.J. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 1789-1793, 1995.
8. Abdel-Malek, Z., Suzuki, I., Tada, A., Im, S., Akcali, C. The melanocortin-1 receptor and human pigmentation. *Ann N Y Acad Sci*, 885: 117-133, 1999.
9. Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J.A., Garcia-Borrón, J.C. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem*, 255: 139-146, 1998.
10. Kong, M., Ke, Y.B., Zhou, M.Y., Ke, X.Y., Lu, B., Nie, H.L. Study on Trichosanthin induced apoptosis of leukemia K562 cells. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, 31: 233-243, 1998.
11. Dou, C.M., Li, J.C. Preliminary study on effects of Trichosanthes kiriwii root on hela cells. *Zhongguo Zhong Xi Ti Jie He Za Zhi*, 23: 848-851, 2003.
12. Smalley, K., Eisen, T. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. *FEBS Lett*, 474: 198-202, 2000.
13. Slominski, A., Tobin, D.J., Shibahara, S., Wortsman, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev*, 84: 1155-228, 2004.