

## B16F10 Murine Melanoma 세포에서 멜라닌생성억제에 대한 타우린의 효과

정효숙 · 송경희 · 김안근<sup>#</sup>

숙명여자대학교 약학대학

(Received September 28, 2007; Revised October 16, 2007)

### Antimelanogenic Effect of Taurine in Murine Melanoma B16F10 Cells

Hyo Sook Joung, Kyung Hee Song and An Keun Kim<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

**Abstract** — Taurine has been shown to be tissue-protective against oxidant-induced injury and is a powerful regulator of the immune system. However, there is no study on the antimelanogenic effect of taurine. In this study, we investigated the whitening effect of taurine in B16F10 mouse melanoma cells. Cell viability was measured by MTT assay. We examined melanin contents and tyrosinase activity according to time and concentration. Extracellular signal regulated kinase (ERK) is an important regulator of melanogenesis. It has been reported that activated ERK induced microphthalmia associated transcription factor (MITF) phosphorylation and its subsequent degradation and thus reduced melanin synthesis. In our B16F10 cell culture system, taurine led to decrease melanin contents by 21% at 48 hr. We then observed taurine effects on ERK-P, MITF and tyrosinase by Western blot. ERK was activated at 18 hr and 24 hr, whereas MITF reduced. We could not observe any differences in the levels of tyrosinase. These results suggested that taurine inhibited melanogenesis by ERK signal pathway via MITF degradation. We expect that taurine has potential skin whitening agents in cosmetics.

**Keywords** □ taurine, ERK, MITF, tyrosinase, melanogenesis

타우린은 semiessential 아미노산이지만 단백질로는 합성되지 않는다. 포유동물조직에서 타우린은 백혈구에 50 mM 농도로 가장 많고, 심장 망막, 근육격에도 함유 되어 있으며 조직에서 여러 반응에 관여 하는 중요한 성분으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 산화적 손상에 조직방어기능<sup>2)</sup>이 있는 것으로 연구되어져 있을 뿐만 아니라 면역학적 측면,<sup>3)</sup> 산화억제작용, 항염작용<sup>4,5)</sup> 등 생물학적 작용기능이 다양하게 연구되고 있어, 최근에는 건강 식품에도 많이 첨가 하여 응용되고 있다.<sup>6)</sup> 특히 고양이과에서는 꼭 필요한 아미노산으로서 타우린이 부족하게 되면 망막의 손실로 시력에 영향을 미친다고 보고되었다.<sup>7)</sup> 또한 항장학에서는 타우린이보습에 효과가 있는 것으로 발표되어 있으나, 미백이나 노화 방지에 초점을 둔 타우린에 대한 연구는 아직 미미하다.

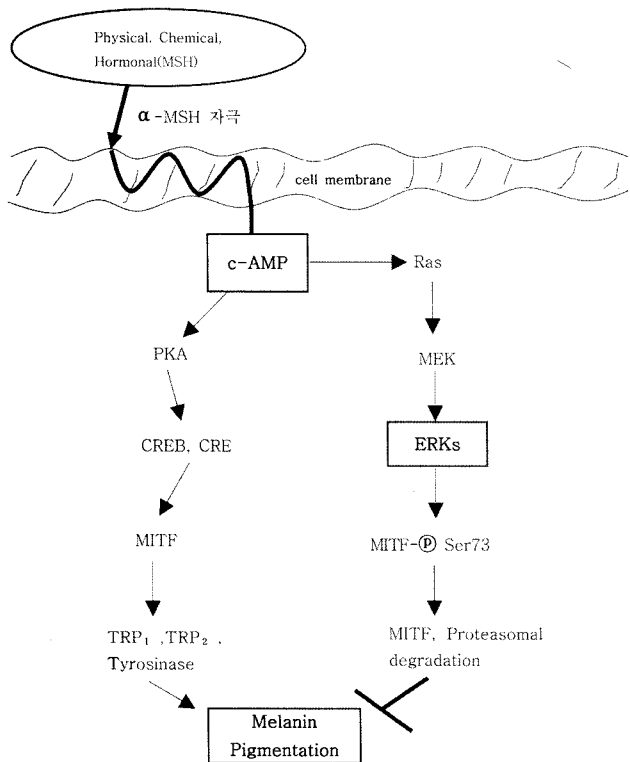
자외선이나 환경오염 그 밖의 외부 요인의 자극에 대해 피부 세포는 방어 기전으로 멜라닌을 생성한다. 멜라닌이 많이 생성

되면 결과적으로 피부암을 유발할 수 있다. 이처럼 멜라닌이 피부암을 유발할 수 있다는 점과 사람들의 미적 욕구 증가로 인해 항장학계에서는 멜라닌의 생성의 억제에 대한 관심이 점점 높아지고 있다. 따라서 인체에 부작용이 적으면서 멜라닌을 억제하는 기능을 가진 새로운 물질의 개발이 요구되고 있는 실정이다. 멜라닌은 산화적 스트레스나 NO 등에 의한 자극에 의해서도 생성이 되는데, 이미 밝혀진 인체의 다른 부위에서 타우린의 항산화나 항염증 효과는 피부의 멜라닌과도 관련이 있으리라 판단되어 타우린의 멜라닌 생성 억제에 대하여 실험을 하고자 하였다.

최근 melanogenesis의 signal로써 ERK pathway의 억제는 MITF와 tyrosinase의 활성을 증가시켜 결과적으로 멜라닌의 pigmentation을 높여주며, 한편으로 ERK의 활성은 MITF의 ubiquitination(MITF- $\text{P-Ser73}$ )으로 MITF가 degradation되어 melanin의 형성 억제를 유도한다는 연구결과가 보고되었다.<sup>8-11)</sup> 멜라닌 형성 과정 중 ERK pathway는 Fig. 1에 나타내었다.<sup>12-15)</sup>

이에 본 연구에서는 타우린의 멜라닌 억제 효과를 알아보기 위하여 B16F10에서 농도와 시간에 따라 멜라닌의 양을 측정하고, tyrosinase activity를 확인하고자 하였다. 또한 ERK pathway

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-710-9566 (팩스) 02-710-9871  
(E-mail) akkim@sookmyung.ac.kr



**Fig. 1** - ERK signal pathway regulating melanogenesis. ERK is an important regulator of melanogenesis. Activated c-AMP stimulates ERK. Since ERK activation induces MITF phosphorylation and its subsequent degradation and thus reduces melanin synthesis.

에 관련하여 ERK-P, MITF, tyrosinase의 단백질 발현을 관찰하여 비교하였다.

### 실험 방법

#### 시약 및 기기

DMEM(4500 mg/l D-glucose, L-glutamine, 25 mM HEPES, sodium bicarbonate), FBS(fetal vobine serum), taurine(ACROS A013763101)는 웰진에서 구입하였다.

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium-bromide), antibiotics(10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 µg/ml streptomycin sulfate), L-DOPA, mushroom tyrosinase는 Sigma(Saint, Louis, Mo), tryphan blue는 Gibco BRL Life Technologies Inc., RIPA buffer는 Sigma(R0278), protease inhibitor cocktail은 Roche(complete mini) 제품을 사용하였다.

Antibody는 phospho-specific ERK 1/2(Thr 202/Tyr 204, number 9101s), tatalophosphorylated and non-phosphorylated ERK 1/2(number 9102)은 Cell Signaling Technology/ MITF

(H-50) : sc-25386, tyrosinase(H-109) : sc-15341, TRP<sub>1</sub>(H-90) : sc-25543, TRP<sub>2</sub>(H-150) : sc-25544, actin(I-19), antibody는 Santa Cruz CA, 2차 antibody는 Cell Signaling에서 구입하였다.

기기로는 ELISA reader (Bio-Tek instrument Inc), cytofluor 2350 plate reader(Millipore, Bedford, MA, USA), CO<sub>2</sub> incubator(Forma Science), table top centrifuge(Hanil Science Industrial Co. Ltd), centrifuge(Supra 21K, Hanil Science Industrial Co. Ltd), inverted microscope(Olympus CK2), UV/visible spectrophotometer(Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech), semi dry transfer cell(Bio Rad)을 사용하였다.

#### 세포배양

Mouse melanoma cell로부터 유래된 B16F10 cell은 ATCC 세포주 은행으로부터 분양받았다. 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 항생제(10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 µg/ml streptomycin sulfate), 1 mM sodium pyruvate를 포함하는 DMEM 배지를 배양액으로 하여 37°C, humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 25 cm<sup>3</sup> tissue culture flask나 75 cm<sup>3</sup> tissue culture flask에서 계대 배양하고 confluent되었을 때 cell dissociation solution을 처리하여 실험에 이용하였다.

#### 시료의 조제

타우린은 PBS에 녹여 0.2 µm pore size syringe filter로 여과하여 stock solution을 만들었다.

#### 세포생존율 측정

B16F10 cell suspension을 1×10<sup>5</sup> cells/ml의 농도로 96-well plate의 well에 100 µl씩 가하여 배양기에서 24시간 동안 안정화시킨 후, 타우린을 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 2.5 mg/ml MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide]용액을 well당 50 µl씩 넣어 4시간 동안 배양기에 방치한다. 이후 상층액을 제거하고 DMSO를 well당 100 µl씩 가하여 1분간 shaking하여 formazan을 완전히 용해시킨 후 ELISA plate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>16)</sup>

#### Tyrosinase 효소의 활성 측정 및 Melanin 정량

**Tyrosinase activity 측정** -0.5×10<sup>6</sup> cells/ml의 B16F10 cell suspension을 60 π tissue culture dish에 가하여 배양기에서 24시간 동안 배양하여 안정화시켰다. 그 후 타우린을 농도별로 처리하여 48시간 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척하였다.

1% (w/v) Triton X-100을 10 mM sodium phosphate buffer pH 6.8로 만들어 150 µl로 cell을 모은 다음에 2000 rpm에서 5분간 centrifuge해서 각 각의 상층액 40 µl에 기질인 L-DOPA

200  $\mu$ l을 가해 37°C에서 1시간 배양하였다. 여기에서 생성된 dopa chrome의 양을 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>17)</sup>

**Melanin 정량** - 원심 분리한 pellet을 이용하여 농도별로 1N NaOH 100  $\mu$ l에 증류수 200  $\mu$ l를 가해서 60°C에서 1시간 배양한 다음 완전히 녹인 후 405 nm에서 멜라닌의 양을 측정하였다.<sup>18)</sup>

**Western blot으로 단백질 발현 측정** - B16F10 cell suspension을 60  $\pi$  tissue culture dish에 각 well당  $0.5 \times 10^6$  cells/ml cells로 가한 후 24시간 동안 배양하여 cell을 안정화시켰다. 배지를 제거 한 후 40 mM 타우린을 처리하여 18시간, 24시간, 48시간 별로 배양한 후 또 다시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척해주었다. lysis buffer(RIPA buffer 10 ml에 complete mini 1 tab를 가함) 100  $\mu$ l로 용해해서 4°C 14,000 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 Bradford assay로 정량하여 단백질(20  $\mu$ g)을 7.5~15%의 SDS-PAGE상에서 전기 영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 semi dry transfer cell 기기(Bio Rad)를 이용하여 nitrocellulose membrane에 옮겨, 실온에서 2시간 동안 blocking buffer(5% skim milk in TBST)에서 incubation 시켰다. 10분 간격으로 TBST로 3회 washing 하고 1차 항체를 1:500으로 희석하여 over night한 다음, 다시 10분 간격으로 TBST로 3회 washing 하고 2차 항체를 1:1000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 incubation 시켰다. 3회 washing 하고 vorsadoc으로 농도를 측정하였다.

#### 통계처리

본 연구의 그래프와 표의 모든 수치는 각 실험 횟수에 대한 평균과 표준편차로 표시하였으며, 모두 세 차례 이상 수행하였다. 각 sample의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student t-test를 시행하여 계산하였으며,  $p < 0.05$  인 값에 대해 유의적인 것으로 처리 하였다.

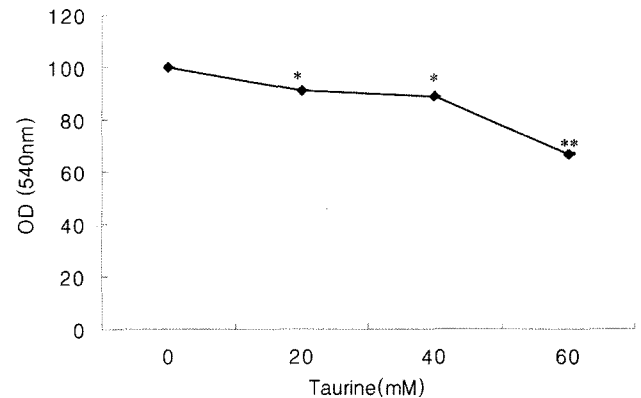
### 실험 결과

#### 세포 생존율

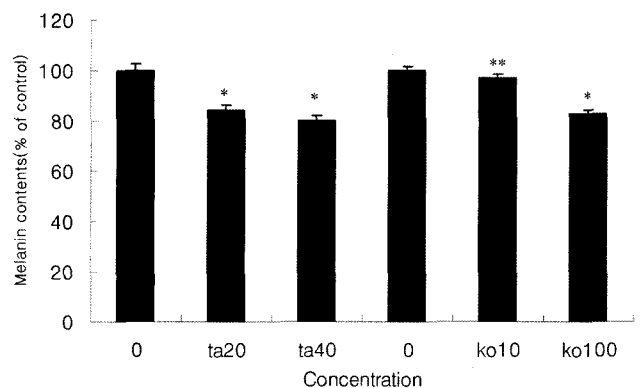
B16F10 cell에서 타우린의 농도별 세포 생존율을 알아보기 위해 MTT assay를 실행하였다. 배양 기간은 2일로 고정하였으며, 타우린의 농도는 20~60 mM 범위에서 실험을 시행하였다. 40 mM 농도까지는 세포 생존율에 크게 영향을 미치지 못하였으나 타우린의 농도가 증가함에 따라 세포 생존율이 농도 의존적으로 감소하여 taurine의 농도가 60(mM)에서는 세포 생존율이 66.3%로 나타났다. 이에 타우린의 농도가 40 mM일 때 최고 농도로 하여 실험을 시행하였다(Fig. 2).

#### Melanin 정량

B16F10에서 타우린과 kojic acid를 농도별로 처리하여 48시간



**Fig. 2** - Cell viability of B16F10 cells after treatment with taurine. The cells were exposed to various concentration of taurine for 48 hr. O. D of cell viability was determined by using MTT assay. Values are means  $\pm$  SD and were obtained from three different experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ : Significantly different from untreated control cells.



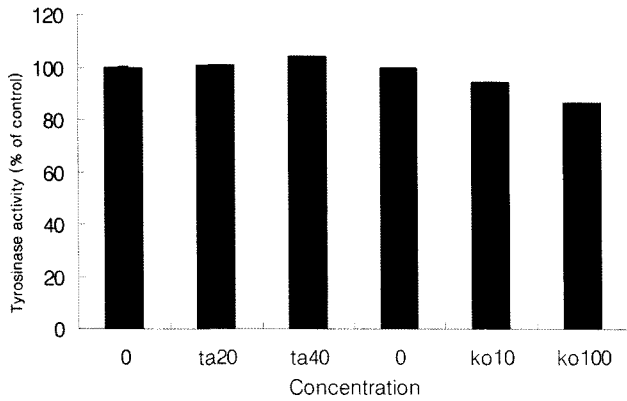
**Fig. 3** - Melanin contents of B16F10 cells after treatment with taurine (tau, mM) and kojic acid (ko,  $\mu$ M). Results are expressed as percentage of control. Values are means  $\pm$  SD and were obtained from three different experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ : Significantly different from untreated control cells.

후 멜라닌의 양을 측정하였다. 멜라닌의 양은 control 대비 타우린 20 mM에서는 85%, 40 mM에서는 79%로 측정되어 각각 15%, 21%의 멜라닌의 억제 효과를 나타내었다.

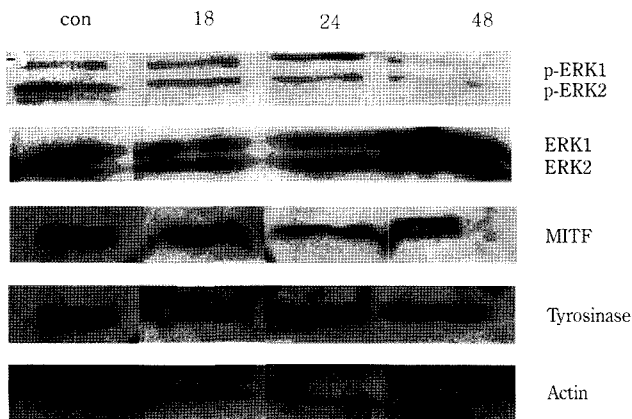
대조군인 kojic acid의 결과는 10  $\mu$ M에서는 영향이 없었고, 100  $\mu$ M은 91.8%의 멜라닌이 측정되어 약 10%의 억제율을 나타내었다(Fig. 3).

#### Tyrosinase activity 측정

Tyrosinase는 멜라닌 형성의 cascade 반응에 관여하는 효소로서 전사 인자인 MITF 와도 밀접한 관계가 있다. 따라서 타우린이 멜라닌 형성의 과정 중 어느 단계에서 작용하여 억제 효과를 나타내는지 규명하기 위해서 tyrosinase 의 활성을 확인하여 보



**Fig. 4** - Effect of taurine (tau, mM) and kojic acid (ko,  $\mu$ M) on melanogenesis in B16F10 cells. Tyrosinase activity was measured after the cells were exposed to various concentration of taurine for 48 hr. Results are expressed as percentage of control. Values are means $\pm$ SD and were obtained from three different experiments.



**Fig. 5** - Effects of taurine on the ERK pathway and melanogenic protein expression. Taurine affects the ERK signaling pathway with MITF degradation. After 24 hr of serum starvation, B16F10 cells were treated with taurine (40 mM) for the time (hr) indicated. Whole cell lysates were subjected to western blot analysis using antibodies against phospho-specific ERK, MITF and tyrosinase. Equal protein loadings were confirmed by reaction using phosphorylation-independent ERK antibodies and beta-actin antibody.

았다. B16F10 cell에서 타우린을 농도별로 처리하여 48시간 후 측정 하였으며, 대조군으로는 kojic acid를 사용하였고, 그 결과는 control 대비 백분율로 나타내었다. 타우린은 tyrosinase에 오히려 약간의 활성이 있는 것으로 나타났으나 타우린의 멜라닌 생성 억제에는 크게 영향을 미치지 못하는 것으로 사려 된다.

#### 단백질 발현에 미치는 영향

Taurine이 멜라닌 형성과정의 signal 인 ERK-P, ERK, MITF, tyrosinase 에 어떠한 영향을 나타내는지 알아보기 위하여 타우

린(40 mM)을 시간별로 처리한 후 Western blot으로 단백질의 발현 양상을 측정하였다.

그 결과, 18시간과 24시간에 ERK가 activation 되어 ERK-P가 증가 되었으며, 이에 따른 MITF의 발현은 감소 하였다. 48시간에는 MITF 발현이 증가하는 경향을 보였고, tyrosinase는 시간에 따라 별다른 영향이 없었다(Fig. 5).

#### 고 찰

이상의 실험 결과, 타우린은 kojic acid 보다 멜라닌 억제 효과가 좋은 것으로 나타났고 이러한 현상은 MITF의 발현이 ERK-P와 관련하여 변화되는 것으로 보아 타우린의 멜라닌 억제 기전은 MITF의 degradation이나 gene 발현 억제에 관련이 있으며<sup>19,20</sup> 48시간에서 타우린에 의한 멜라닌양의 감소는 18, 24시간에 ERK의 activation로 MITF의 감소에 의한 영향으로 추정 된다.

포유동물조직에서 심장, 망막, 근육결, 백혈구에 많이 존재하면서 인체에 아주 중요한 작용을 하는 타우린에 대한 연구결과는 지금까지 산화를 일으키는 손상에 조직방어기능, 산화억제작용, 항염작용, 보습효과가 있는 것으로 밝혀졌으나, 미백이나 노화방지에 초점을 둔 타우린에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다. 지구온난화 등 환경변화에 따른 자외선의 잦은 노출이나 급속한 산업화로 인한 환경오염 그 밖의 외부 요인의 자극으로 멜라닌 형성이 증가되고 그 결과 피부노화나 피부암의 발생이 증가하고 있다. 이런 점에서 타우린이 kojic acid보다 멜라닌 억제 효과가 크게 나타난 본 연구 결과가 멜라닌의 억제를 통한 미백과 노화 방지를 위한 기능성화장품 개발에 도움이 될 것으로 기대된다. 그러나 향후 타우린의 인체 적용을 위해서는 *in vivo* 연구가 선행되어야 하며, 멜라닌 억제 기전에 대해서도 추가로 깊이 있는 실험이 요구된다.

#### 결 론

본 연구에서는 미백 효과를 알아보기 위한 일환으로 침습성이 강하고 전이가 빠른 악성 흑색종 세포에서 타우린의 멜라닌 생성 억제 효과와 그 분자적 기전을 알아보려고 하였다. B16F10 murine melanoma cell에서 농도와 시간에 따라 멜라닌의 양을 측정하고, tyrosinase 활성을 확인하였으며, ERK-P, MITF, tyrosinase의 gene 발현을 관찰하여 비교하였다. 그 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

타우린 40 mM 농도로 처리한 세포에서 멜라닌 억제 효과가 있었고, 멜라닌 형성 과정 중 ERK pathway와 관련이 있으며, tyrosinase 활성을 약간 상승 시키는 것으로 보아 타우린의 효과는 MITF degradation 이나 MITF gene 발현 억제에 의한 것으로 추정된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 약학연구소 2005년도 연구지원 및 과학기술부/한국과학재단 우수연구센터육성사업(R11-2005-017) 지원으로 수행되었음.

## 참고문헌

- 1) Park, E. K. and Schuller-Levis, G. B : Taurine : new implication for an old amino acid. *FEMS Microbiol. Lett.* **226**, 195 (2003).
- 2) Choray, M., Kontny, E., Marcinkiewicz, J. and Maslinski, W. : Taurine chloramine modulates cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Amino Acids* **23**, 407 (2002).
- 3) Georgia, B., Schuller-Levis, and Eunhye Park, E. K. : Taurine and Its Chloramine: Modulators of Immunity. *Neurochem Res.* **29**(1), 117 (2004).
- 4) Ibrahim, S. M., Koczan, D. and Thiesen, H. J. : Gene-expression profile of collagen-induced arthritis. *J. Autoimmun.* **18**, 159 (2002).
- 5) Baura, M., Liu, Y. and Quinn, M. R. : Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF- $\alpha$  gene expression in activated alveolar macrophages : Decreased NF- $\kappa$ B activation and I $\kappa$ B kinase activity. *J. Immunol.* **167**, 2275 (2002).
- 6) Parcell, S. : Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern. Med. Rev.* **7**, 22 (2002).
- 7) Sturman, J. A. : Taurine in development. *Physical Rev.* **73**, 119 (1993).
- 8) Englaro, W., Bertolotto, C., Busca, R., Brunet, A., Pages, G., Ortonne, J. P. and Ballotti, R. : Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway triggers B16 melanoma cell differentiation. *J Biol Chem.* **273**, 9966 (1998).
- 9) Kim, D. S., Hwang, E. S., Lee, J. E., Kim, S. Y., Kwon, S. B. and Park, K. C. : Sphingosin-1-phosphate decrease melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *J Cell Sci.* **116**, 1699 (2003).
- 10) Kim, D. S., Kim, S. Y., Chung, J. H., Kim, K. H., Eun, H. C. and Park, K. C. : Delayed ERK activation by ceramide reduces melanin synthesis in human melanocytes. *Cell Signal.* **14**, 779 (2002).
- 11) Englaro, W., Rezzonico, R., Durand-Clement, M., Lallemand, D., Ortonne, J. P. and Ballotti, R. : Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 24315 (1995).
- 12) Kim, D. S., Park, S. H. and Park, K. C. : Transforming growth factor- $\beta$ 1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1482 (2004).
- 13) Kim, D. S., Park, S. H., Kwon, S. B., Na, J. I., Huh, C. H. and Park, K. C. : Additive effects of heat and p38 MAPK inhibitor treatment on melanin synthesis. *Arch. Pharm. Res.* **30**(3), 581 (2007).
- 14) Roser, B. and Robert, B. : Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment. Cell Res.* **13**, 60 (2000).
- 15) Bertolotto, C., Busca, R., Abbe, P., Bille, K., Aberdam, E. and Ortonne, J. P. *et al.* : Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and promoter activities by cyclic AMP: Pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol Cell Biol.* **18**, 694 (1998).
- 16) Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A. and Boyd, M. R. : Tetrasodium-based assays for cellular viability a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* **51**, 2515 (1991)
- 17) Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Beermann, F., Aparicio, P., Lozano, J. A. and Garcia-Borrón, J. C. : Transforming growth factor-beta1 inhibits basal melanogenesis in B16/F10 mouse melanoma cells by increasing the rate of degradation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1. *J. Biol. Chem.* **272**, 3967 (1997).
- 18) Martinez-Esparza, M., Ferrer, C., Castells, M. T., Garcia-Borrón, J. C. and Zuasti, A. : Transforming growth factor beta 1 mediates hypopigmentation of B16 mouse melanoma cells by inhibition of melanin formation and melanosome maturation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**, 971 (2001).
- 19) Busca, R., Abbe, P., Mantoux, F., Aberdam, E., Eychene, A., Ortonne, J. P. and Ballotti, R. : B-Raf mediates the cAMP activation of MAPK in B16 melanoma cells. *Pigment Cell Res. Suppl* **7**, 106 (1999).
- 20) Yavuzer, U., Keenan, E., Lowings, P., Vachtenheim, J., Currie, G. and Goding, C. R. : The microphthalmia gene product interacts with the retinoblastoma protein *in vitro* and is a target for deregulation of melanocyte-specific transcription. *Oncogene* **10**, 123 (1995).