

사인의 열수 추출물이 B16F10 흑색종세포의 멜라닌형성에 미치는 영향

이수진 · 예정숙 · 최영현¹ · 이용태² · 정경태³ · 정성윤⁴ · 최병태*

동의대학교 한의과대학 해부학교실, 1: 생화학교실, 2: 생리학교실, 3: 자연과학대학 생명응용과학과, 4: 부산대학교 BIT융합기술산업화지원기반구축사업단

Inhibition of Aqueous Extract from *Amomum xanthioides* on α -melanocyte Stimulating Hormone Induced Melanogenesis in B16F10 Cell

Soo Jin Lee, Jeong Sook Ye, Yung Hyun Choi¹, Yong Tae Lee², Kyung Tae Chung³, Seong Yun Jeong⁴, Byung Tae Choi*

Departments of Anatomy, 1: Biochemistry 2: Physiology, College of Oriental Medicine, 3: Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University, 4: Korea BIO-IT Foundry center, Pusan Natinal University

To develop skin-whitening or therapeutic agents against hyperpigmentation, aqueous extract from *Amomum xanthioides* (AEAX) was evaluated for melanogenesis inhibitory activity in B16F10 melanoma cell. The treatment with AEAX at the 0.5 and 1.0 mg/ml level significantly inhibits the biosynthesis of melanin compared with untreated control. The AEAX-treated cells at the 1.0 mg/ml level were more efficient than commercial arbutin at 0.1 mg/ml. The tyrosinase activity also significantly decreased in AEAX-treated cells at the 0.5 and 1.0 mg/ml level. The Western analyses confirmed the significantly decreased expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 by AEAX treatment. These results indicate that AEAX may contribute to the inhibition of melanin biosynthesis through regulating tyrosinase activity and expression and serve as a new candidate in the design of new skin-whitening or therapeutic agents.

Key words : *Amomum xanthioides*, melanogenesis, tyrosinase, tyrosinase-related protein

서 론

멜라닌세포에 의해 방출되는 페놀류의 고분자 물질인 멜라닌은 피부와 머리카락 색을 결정하는 주요 인자일 뿐 아니라 자외선에 대해 세포 손상을 막아주며 독성물질의 흡수와 배출 등에 관여한다^{1,2}. 멜라닌은 L-tyrosine이 다양한 반응을 거쳐 만들어지는 최종산물이며 이의 형성은 tyrosinase라는 효소를 포함한 멜라닌세포내에서 일어나는 생리학적 반응과정을 말한다³. 포유동물의 tyrosinase는 L-tyrosine을 hydroxylation시켜 L-DOPA로 전환시키며, L-DOPA를 oxidation을 거쳐 L-dopaquinone으로 전환시키는 등 멜라닌형성을 조절한다⁴.

Tyrosinase와 tyrosinase-related protein (TRP)-1 및 TRP-2도 멜라닌형성에 관여한다. 그 기능은 아직 명확하지 않으나 dopachrome tautomerase로 알려진 TRP-2 존재하에 L-dopachrome은 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 전환되며 TRP-1는 DHICA를 산화시키며 tyrosinase를 안정화 시켜 멜라닌형성에 관여한다⁵. 최근 tyrosinase를 비롯한 멜라닌형성에 관여하는 효소의 발현과 활성을 조절함으로써 미백을 목적으로 한 다양한 소재개발이 이루어지고 있다.

특히 미백을 목적으로 한 tyrosinase저해제로 hydroquinone, ascorbic acid, kojic acid, azelaic acid, retinole, arbutin 등이 있다⁶. 최근 인공화합물의 다양한 부작용으로 천연물로부터 멜라닌형성관련 효소저해제에 대한 연구가 광범위하게 이루어지고 있다. 사인(砂仁, *Amomum xanthioides*)은 생강과의 다년생 초본으로 방향성이 높아 한방에서 소화기내의 습을 제거하고, 위장의 운동을 활성화하여 소화를 돕는 작용을 하는 것으로 알려져 있

* 교신저자 : 최병태, 부산 진구 양정 2동 산 45-1 동의대학교 한의과대학
· E-mail : choibt@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8653
· 접수 : 2006/11/23 · 수정 : 2007/01/22 · 채택 : 2007/02/09

으나 피부 관련 소재로도 사용되고 있다. 본 연구는 사인의 열수 추출물이 α -MSH에 의해 유도된 B16F10 세포내 멜라닌형성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

Arbutin, synthetic melanin, L-DOPA와 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)는 Sigma (St. Louis, MO)에서 구입하였으며, tyrosinase (H-109, sc-15341), TRP-1 (G-17, sc-10443) 및 TRP-2 (G-15, sc-10452)와 같은 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다.

2. 시료 추출

사인의 열수추출물은 사인 100 g을 증류수 2,000 ml에 넣어 90°C에서 3시간 동안 추출하였으며 3,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 침전물을 제거하고 pore size가 0.45 μ m인 filter로 여과한 다음 동결건조 하였다 (수득율 8.5 %). 이를 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 농도를 시료로 사용하였다.

3. B16F10 melanoma세포의 배양

B16F10세포의 배양을 위해 90%의 DMEM에 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin이 포함된 성장배지를 사용하였으며, 5%의 CO₂가 공급되는 37°C humidity incubator에서 배양하였다. 실험을 위하여 배양 플라스크에 부착되어 있는 B16F10 세포를 trypsin-EDTA (Gibco BRL)로 부유시켜 1×10⁵개로 100 mm 배양 용기에 나눈 다음, 24시간 동안 안정화시킨 후, 사인의 열수추출물과 α -MSH를 처리하여 2일 또는 5일 간 배양하였다.

4. 세포의 형태관찰과 세포주기 분석

B16F10세포의 형태학적 변화는 200배율로 위상차 현미경을 통해 관찰하였다. 세포 주기는 B16F10 세포를 trypsin-EDTA를 처리하여 배양 용기에서 떼어 낸 후, PBS로 세번 수세하여, 원심 분리시켜 cell pellet을 모았다. Cell pellet은 citrate buffer로 재부유시켜 RNase A를 처리한 후, 세포핵을 propidium iodide로 염색시켜 flow cytometry로 분석하였다.

5. 멜라닌농도 측정

B16F10 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)로 세 번 씻어내고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 10%의 DMSO를 함유한 1 N NaOH를 가하여 80 °C에서 1 시간 동안 반응시킨 후, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Synthetic melanin을 이용하여 농도별 표준곡선을 작성한 후 멜라닌의 농도를 측정하였다. 세포의 멜라닌은 B16F10 세포의 배양 상층액을 취하여 404 nm에서 흡광도를 측정하고, 세포의 수를 계수하여 한 개의 세포가 분비한 melanin의 양을 계산하여 대조군을 100%로 놓고 상대적인 값을 측정하였다.

6. Tyrosinase활성 측정

Tyrosinase활성은 Martinez-Esparza⁷⁾의 방법을 수정하여 사용하였다. B16F10 세포를 trypsin-EDTA로 부유시켜 1×10⁵개로 100 mm 배양 용기에 나눈 다음, 24시간 동안 안정화시킨 후, 사인의 열수추출물과 α -MSH를 처리하여 2일간 배양하고, phosphate-buffered saline을 세 번 씻어내고 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. Lysis buffer (1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM PMSF, 1 mM NaF)를 첨가하여 30 분간 얼음에서 반응시켜 세포를 녹인 후, 원심분리하여 상층액을 취하여 tyrosinase 활성 측정용액으로 사용하였다. 단백질 농도 50 μ g의 용액을 취하여 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)과 0.05% L-DOPA를 첨가하여 37°C에서 반응시키면서 10분 간격으로 405 nm에서 흡광도의 변화를 1시간 동안 관찰하였다.

7. Western blotting

B16F10 세포를 PBS로 세 번 수세하고, radioimmunoprecipitation buffer(50 mM Tris-HCl pH7.4, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 1 μ g/ml aprotinin, leupeptin, pepstatin)로 lysis를 실시하고, 14,000 rpm에서 25분간 원심분리하여 단백질을 포함하는 상층액을 얻어내어 Bradford's method에 따라 정량한 후 Laemli's sample buffer와 섞어 3분간 끓인 후 8%의 polyacrylamide gel상에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후, gel상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 옮겨 10% skim milk로 blocking을 한 후, 순차적으로 일차항체 및 이차항체를 처리한 후 enhanced chemiluminescence method로 발광시켜 X-ray 필름에 감광하였다.

결 과

1. 세포의 형태와 세포주기에 미치는 영향

MTT assay를 통해 결정된 0.5와 1.0 mg/ml의 사인 열수추출물과 200 nM 농도의 α -MSH를 함께 처리하여 5일간 B16F10 세포를 배양한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 세포의 형태적 변화는 보이지 않았다. 사인의 열수추출물이 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위해 flow cytometry 분석 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 사인의 열수추출물을 처리한 군은 각 대조군과 유사한 세포주기를 보여 주었다.

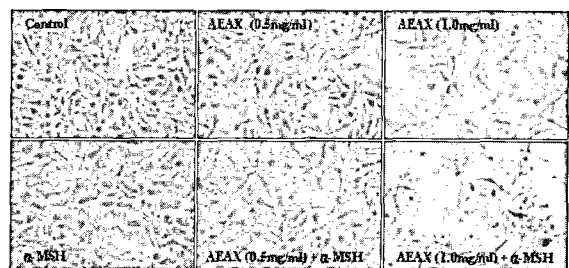


Fig. 1. Effects of AEAX on morphological changes in α -MSH-treated B16F10 cells. Cells were photographed by microscope (X200).

Table 1. Effects of aqueous extract from *Amomum xanthioides* (AEAX) on the cell cycle distribution of B16F10 melanoma cells

	% of cell		
	G1	S	G2/M
Control	70.72	6.85	7.53
α -MSH	58.01	2.74	6.46
AEAX (0.5 mg/ml)	64.85	7.45	8.54
AEAX (0.5 mg/ml) + α -MSH	67.83	7.48	8.50
AEAX (1.0 mg/ml)	51.21	10.56	10.53
AEAX (1.0 mg/ml) + α -MSH	55.24	10.18	12.51

The data are the mean of two different experiments and shows representative examples for duplicate tests.

2. 세포내 멜라닌생성에 미치는 영향

멜라닌생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 arbutin을 0.1 mg/ml의 농도로 처리하고 실험군과 같은 조건으로 배양하여 대조군으로 사용하였다. Fig. 2에 보는 바와 같이 0.5와 1.0 mg/ml 농도의 사인의 열수추출물을 처리한 경우 대조군에 비해 각각 81.7%, 25.2%로 감소하였으며 특히 1.0 mg/ml 농도는 58.1%를 나타내는 0.1 mg/ml 농도의 arbutin에 비해 높은 억제효과를 나타내었다.

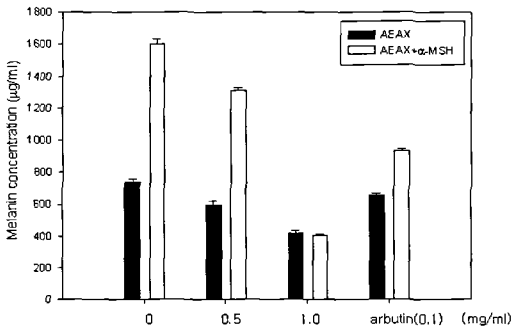


Fig. 2. Effects of AEAX on melanin contents in α -MSH-treated B16F10 cells. Data was means \pm S.E. of three experiments performed in duplicate.

3. 세포외 멜라닌분비에 미치는 영향

사인의 열수추출물과 α -MSH를 처리한 다음 5일간 배양 후 배양액을 취하여 B16F10세포가 세포외로 분비되는 멜라닌 양을 조사하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 0.5와 1.0 mg/ml 농도의 열수추출물에서 각각 62.0%, 97.3% 세포외 멜라닌분비에 억제효과를 보였으며 83.3%의 arbutin과는 차이를 보여 주지 않았다.

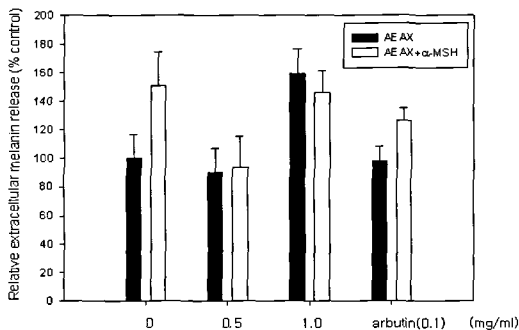


Fig. 3. Effects of AEAX on extracellular melanin accumulation in α -MSH-treated B16F10 cells. Data was means \pm S.E. of three experiments performed in duplicate.

4. Tyrosinase활성에 미치는 영향

멜라닌생성에 대해 조사한 동일한 농도의 사인 열수추출물과 α -MSH를 함께 처리한 후 2일간 배양하여 tyrosinase활성도를 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. α -MSH에 의해 유도된 tyrosinase활성은 약 663% 증가하였다. 0.5와 1.0 mg/ml 농도의 사인 열수추출물처리를 처리했을 때 대조군에 비해 각각 87.9%, 68.9% 감소하였으며 arbutin은 50.3%가 감소하였다.

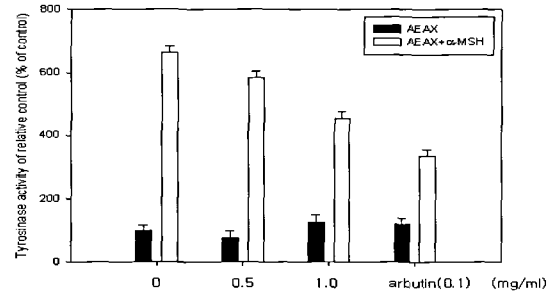


Fig. 4. Effects of AEAX on tyrosinase activity in α -MSH-treated B16F10 cells. Data are means \pm S.E. of three experiments performed in duplicate.

5. Tyrosinase, TRP-1과 TRP-2 발현에 미치는 영향

사인의 열수추출물이 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2와 같은 멜라닌형성에 관여하는 효소발현을 Western blot으로 살펴보았다. Fig. 5와 같이 α -MSH에 의해 현저히 증가한 tyrosinase와 TRP-1의 발현이 1.0 mg/ml 농도의 사인의 열수추출물을 처리하였을 때 감소하는 것을 볼 수 있다. 이에 비해 TRP-2의 발현은 α -MSH를 단독으로 처리한 경우와 유사한 발현을 보였다.

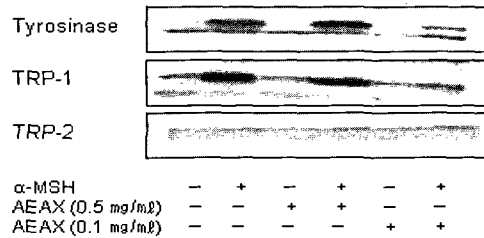


Fig. 5. Effects of AEAX on the protein levels of tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 in α -MSH-treated B16F10 cells.

고 찰

멜라닌형성은 멜라닌세포의 melanosome내에서 이루어지며, tyrosinase라는 효소에 의해 시작되어지는 연쇄적이며 특이적인 효소반응이다⁸⁾. 최근 천연물에서 tyrosinase활성 억제관련 소재의 스크린을 통한 미백관련 화장품 및 의약품 소재에 대한 연구가 널리 이루어지고 있어 한방에서 사용되고 있는 피부관련 한약재 중 멜라닌형성에 억제 기능을 가지는 한약재를 탐색하였다. α -MSH에 의해 유도된 B16F10세포계를 사용한 결과 사인의 열수추출물이 α -MSH에 의해 유도된 멜라닌형성에 억제 기능 가지며 있어 보고하는 바이다.

α -MSH에 의한 B16F10세포의 멜라닌형성은 in vivo와 유사한 양상을 나타내는데, 특히 형태적인 관찰에서 볼 수 있는 수지

상 돌기의 형성과 melanosome내 색소침적이 바로 그것이다^{9,10}. 수지상의 돌기는 epidermal melanin unit을 이루는 각질세포와의 연접을 위하여 멜라닌세포의 세포막이 확장되는 형태이다. α -MSH의 처리는 B16F10 세포를 크게 확장시키며, 수지상의 돌기를 형성하게 하며 세포내 색소침적을 형성한다. MTT assay를 통해 정해진 농도의 사인 열수 추출물이 B16F10세포의 형태와 세포 주기에 미치는 영향을 볼 때 세포성장시기에 해당하는 G1기의 비율이 열수추출물처리와 관계없이 유사하게 나타나 세포의 성장에 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

Mouse melanoma인 B16F10세포는 세포막에 존재하는 melanocortin 1 receptor에 α -MSH가 결합함으로써 adenylate cyclase를 활성화시켜 세포내 cyclic adenosine monophosphate의 양을 증가시키고, 순차적으로 protein kinase A를 활성화시켜 tyrosinase의 활성을 유도하거나 tyrosinase의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다^{11,12}. 나아가 멜라닌형성관련 효소인 TRP-1과 TRP-2의 전사에 관여하는 microphthalmia-associated transcription factor를 활성화 시킨다¹³.

본 실험의 사인 열수추출물은 세포 성장에 영향을 미치지 않은 농도에서 멜라닌생성을 억제하며 세포 수준의 tyrosinase활성을 억제하며 나아가 멜라닌형성관련 효소인 tyrosinase, TRP-1 단백질의 발현을 Western blot으로 재검정 하였다. 이상의 결과는 사인의 열수추출물이 세포 수준에서 tyrosinase활성 뿐 아니라 그 발현을 억제함으로써 궁극적으로 멜라닌생성을 저해하는 것을 볼 수 있다. 따라서 사인의 열수 추출물을 더 진행된 분획과정을 통해 보다 효능이 높은 물질로 순수 분리를 통한다면 미백관련 화장품이나 약제 개발에 대한 기초 자료로 유용할 것이다.

결 론

사인의 열수추출물이 α -MSH에 의해 유도된 B16F10 흑색종 세포의 멜라닌형성에 대한 영향을 조사하였다. 세포의 성장 및 형태에 있어서는 영향을 미치지 않는 0.5 및 1.0 mg/ml 농도의 열수추출물에 의해 멜라닌 생성이 억제되었다. 동일 농도에서 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase활성이 억제되며 멜라닌형성관련 효소인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 발현을 살펴 본 결과 tyrosinase와 TRP-1의 발현이 열수추출물에 의해 저해되었다. 이상의 결과로 보아 사인의 열수추출물은 tyrosinase활성과 발현을 함께 억제함으로써 멜라닌생성을 저해함을 알 수 있으며 이는 미백관련 화장품 또는 의약품 개발에 대한 기초 자료로 유용할 것이다.

감사의 글

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

참고문헌

1. Ito, S. The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Res*, 16: 230-236, 2003.
2. Kim, D.S., Park, S.H., Kwon, S.B., Youn, S.W., Park, K.C. Effects of lysophosphatidic acid on melanogenesis. *Chem Phy Lipid*, 127: 199-206, 2004.
3. Prota, G. The chemistry of melanins and melanogenesis. *Fortschr Chem Org Naturst*, 64: 93-148, 1995.
4. Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, Q.T., Bernard, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J Ethnopham*, 82: 155-158, 2002.
5. Kobayashi, T., Imokawa, G., Bennett, D.C., Hearing, V.J. Tyrosinase stabilaton by Tyrp1 (the brown locus protein). *J Biol Chem*, 273: 31801-31805, 1998.
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. Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J.A., Garcia-Borron, J.C. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem*, 255: 139-146, 1998.
8. 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.
9. Seiberg, M., Paine, C., Sharlow, E., Andrade-Gordon, P., Costanzo, M., Eisinger, M., Shapiro, S.S. The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. *Exp Cell Res*, 254: 25-32, 2000.
10. Sharlow, E.R., Paine, C.S., Babiarz, L., Eisinger, M., Shapiro, S., Seiberg, M. The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *J Cell Sci*, 113: 3093-3101, 2000.
11. 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.
12. 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.
13. Widlund, H.R., Fisher, D.E. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene*, 22: 3035-3041, 2003.