

비목나무 (*Lindera erythrocarpa* Makino) 껍질에서 분리한 신규화합물 (Jeju-Erythrane)의 멜라닌 생합성 억제 효과

강민철 · 고려경 · 김수경 · 최호민 · 진영준 · 한종헌 · 김봉석 · 이남호¹ · 김기옥*

(재)제주테크노파크 생물산업진흥센터, ¹제주대학교 자연과학대학 화학과

Melanin Biosynthesis Inhibitory Effect of New Compound (Jeju-Erythrane) Isolated from Bark of *Lindera erythrocarpa* Makino

Min-Chul Kang, Ryeo Kyeong Ko, Su-Gyeong Kim, Ho-Min Choi, Yeong-Jun Jin,
Jong-Heon Han, Bong-Seok Kim, Nam Ho Lee¹, and Gi-Ok Kim*

Jeju Bio-Industry Development Center, Jeju Technopark, Jeju 690-121, Korea

¹Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract In this study, a new compound, 1-(2-hydroxy-3,4,5,6-tetramethoxyphenyl)-1-methoxy-3-phenylpropane; (Jeju-Erythrane) was isolated and identified from the bark of *Lindera erythrocarpa* Makino. Also, we investigated the effects of Jeju-Erythrane on alpha melanocyte-stimulating hormone (MSH)-induced melanogenesis in mouse B16F10 melanoma cells. The new compound dose dependently inhibited the tyrosinase activity and melanin synthesis in B16F10 cells. The new compound showed inhibitory effect on the Tyrosinase and TRP-1 gene transcription but not on the TRP-2 gene. These results suggest that the new compound of *L. erythrocarpa* could be used as a functional biomaterial in developing skin whitening agent.

Keywords: *Lindera erythrocarpa* Makino, Jeju-Erythrane, tyrosinase activity, melanin content

서 론

인간의 피부색깔은 환경, 인종, 성별 등의 요인과 멜라닌, 카로틴 및 헤모글로빈 양과 같은 여러 가지 요인에 의해 결정되지만 피부의 과색소 침착과 관련된 주요한 원인은 표피 내 멜라닌색소의 이상적 증가에 기인한다. 과도한 melanin 합성은 인체에 기미, 주근깨, 피부반점을 형성하고 피부노화를 촉진하며 피부암 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다 [1-3]. 멜라닌 색소의 생합성은 tyrosinase 효소를 비롯하여 tyrosinase-related protein 1 (TRP1)과 dopachrome tautomerase (TRP2)에 의하여 조절되고 있으며, 그중 tyrosinase는 tyrosine을

기질로 하여 L-dopaquinone으로 전이되는 초기 생합성과정이후 dihydroxyindole의 산화에 작용한다 [4-6]. 따라서 tyrosinase 활성 억제제를 찾는 연구가 미백제의 개발에 있어서 중요한 부분을 차지하고 있으며, 현재 계속 알려지고 있는 tyrosinase 저해제로 hydroquinone, 4-hydroxyanisole, ascorbic acid 유도체, kojic acid, azelaic acid, corticosteroid, retinoids, arbutin, catechin, 3,4,5-trimethoxy cinnamate thymol ester 등이 있으나, 이들의 안전성과 경제성 등에 문제가 많아 사용에 있어서 어려움이 있다 [7-11]. 또한 현재 기능성 식품, 기능성 화장품 및 치료제 등 각 분야에서 인공물질이 아닌 천연 물질을 이용한 연구가 활발히 진행되어지고 있다 [12-14].

천연 항산화제로는 α -tocopherol, vitamin C, carotenoids, flavonoids 등이 알려져 있는데, 이러한 항산화 효과가 있는 물질들은 동식물에 널리 분포되어 있으며, 특히 많은 연구가 이루어진 분야는 식물성 물질이다. 식물 유래의 2차 대사산

*Corresponding author

Tel: +82-64-720-2333, Fax: +82-64-720-2331

e-mail: Kimgk350@jejuhidi.or.kr

물들은 자유유리기 (free radical)와 활성산소의 생성을 억제하거나 제거시켜서 산화에 의한 세포손상을 방지한다는 것이 생체 실험결과 밝혀졌다 [15-16]. 현재까지 보고 된 대부분의 천연 항산화제는 식물에서 유래된 것으로서 주로 폴리페놀 화합물인 것으로 알려져 있으며 [17], 특히 flavonoids는 지질의 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 함으로써 노화방지, 암 및 심장질환 등을 예방하거나 지연하는 효과가 있어서 오늘날 식품, 의약품, 화장품 등 많은 분야에서 활용되고 있다 [18]

비목나무 (*Lindera erythrocarpa*)는 녹나무과 (*Lauraceae*) 식물로 세계적으로 45속 1,500여종이 분포하고 우리나라에는 6속 12종이 자생하고 있는 것으로 알려져 있다. 비목나무는 자용이주로 4월에서 5월에 연한 황색의 꽃이 피고 9월에 8 mm 정도의 적색열매를 맺는다. 한국의 남부지방을 비롯하여 일본, 중국의 따뜻한 지역에 자생하는 높이 5 m의 낙엽수이다. 건조된 열매는 특이한 방향과 쓴맛을 가지고 있어 일본에서는 위장약과 신경통의 진통제로 사용되고 있다. 또한 비목나무 잎과 열매의 추출물이 항진균 활성을 나타내며 [19], 비목나무로부터 분리된 사이클펜타디온 화합물이 항암효과를 갖는다고 보고되었다 [20].

본 연구는 제주도의 비목나무 (*Lindera erythrocarpa*)껍질에서 분리한 신규화합물의 항산화 활성 및 B16F10 mouse melanoma 세포에 처리하여 멜라닌 생합성 억제활성을 통한 미백 및 기능성 화장품의 유용자원으로서 활용가능성이 있는지 알아보려고 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

추출물 분리 · 분석 및 정제

용매분획 및 분리

본 연구에 사용된 식물 시료인 비목나무 (*Lindera erythrocarpa*)껍질은 (재)제주테크노파크 생물산업진흥센터 추출물은행에서 분양 받아 사용하였다. 비목나무 (*Lindera erythrocarpa* Makino.) 껍질을 흐르는 물에 세척 후 3일 동안 40°C 열풍건조 하여 분쇄기로 분쇄하였다. 건조된 시료 200 g을 70% 에탄올에 침적시켜 3일 동안 실온에서 교반하여 침출하였다. 얻어진 추출물을 여과기로 여과하고, 침출·여과과정을 3회 더 반복한 후, 이 여과액을 감압농축 하였다. 얻어진 추출물 (70% ethanol extract) 60 g 중 42 g을 가지고, 증류수에 현탁시켜 분별 깔대기를 이용해 *n*-hexane (*n*-Hex), methylene chloride (CH₂Cl₂), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH)을 사용하여 분획한 뒤 여과, 감압 농축하여 각각의 용매별 분획물 얻었다. 또한 CH₂Cl₂ 분획층은 순상 silica gel (Hex/ EtOAc) (v/v), gradient 조건으로 신규화합물을 얻었다.

시약 및 기기

본 실험에서 시료의 추출에 사용된 용매들은 Merk Co.,

Junsei Co., Hyman Co.사의 제품을 사용하였다. 분리과정에서 사용된 충전제로는 normal-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel 60 (0.040-0.063 mm, Merck Co.)이 사용되었고, reverse-phase silica gel column chromatography에는 Silica gel 100 (RP-18, 230-400 mesh, Merck Co.)이 사용되었다. 분석과정에서는 Waters사의 HPLC (Alliance2695)를 이용하였고, Sunfire™ C18 5 μm 4.6 × 250 mm를 장착하여 사용되었고, 구조분석에 이용된 NMR (Nuclear Magnetic Resonance)은 ¹H (500 MHz)와 ¹³C (125 MHz) NMR (AvanceIII, 500MHz, Bruker Co., Germany) 사용하였고, 측정시 사용된 용매는 acetone-*d*₆ (Cambridge Inc., USA)을 사용하였다.

시료의 제조

비목나무 껍질에서 분리한 신규화합물은 DMSO 용매를 가하여 완전히 용해시킨 후 여과하여 사용하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 자유유리기 소거 활성 측정

전자공여능 (electron donating ability) 측정은 Blois 방법 에 의한 DPPH 자유유리기 소거법에 따라 측정하였다. 즉, 에탄올에 녹인 여러 농도의 시료를 96 well plate에 100 μL 씩 분주 하고 0.4 mM DPPH 용액을 동량 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 양성 대조군으로는 butylated hydroxy anisole (BHA)를 사용하였다. DPPH 자유유리기 소거활성은 아래의 식으로부터 산출하였고 DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도 (IC₅₀)로 표시하였다.

$$\text{DPPH 자유유리기 소거활성 (\%)} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A_{sample} = 시료를 첨가한 반응액의 흡광도.

A_{control} = 시료대신 에탄올을 첨가한 반응액의 흡광도.

Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성 측정

Xanthine oxidase에 의한 uric acid 생성은 290 nm에서 증가된 흡광도에 의해 측정하였고, 대조군으로 allopurinol (Sigma)을 사용하였다. superoxide의 양은 nitroblue tetrazolium (NBT) 환원방법으로 560 nm에서 측정하였다. 반응액은 각 시료의 여러 농도와 0.5 mM xanthine와 1 mM EDTA를 200 mM phosphate buffer (pH 7.5) 100 μL에서 준비하였고 50 mU/mL xanthine oxidase를 첨가하여 uric acid의 생성을 유도하였다. Superoxide 소거활성은 위 반응액에 0.5 mM NBT를 첨가하여 반응시켰다. Xanthine oxidase 억제 및 superoxide 소거 활성은 각각 생성된 uric acid와 superoxide의

흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도 (IC₅₀)로 표시하였으며, 각 시료는 3회 반복 실험 후 평균값을 구하였다.

세포배양

본 연구에 사용된 B16F10 mouse melanoma 세포는 미국 세포주 은행 (ATCC)으로부터 분양받았다. B16F10 세포를 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco), 1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco), L-glutamine와 sodium bicarbonate 가 함유된 DMEM 배지 (Gibco)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다.

형태학적 관찰

B16F10 세포를 24 well plate에 well당 2×10^4 개의 세포를 접종하고 24시간동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양한 후 신규화합물을 각각의 well에 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL 그리고 30 µg/mL의 농도로 처리하여 72시간 배양하였으며, 배양완료 후 Inverted Microscope (phasecontrast, Leica, Germany)를 이용하여 관찰 하였다.

MTT assay를 이용한 세포독성 측정

B16F10 세포를 24 well plate에 well당 2×10^4 개의 세포를 접종하고 24시간동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양한 후 시료를 각각의 well에 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL 그리고 30 µg/mL의 농도로 처리하여 72시간 배양하였다. 여기에 2 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 용액 200 µL를 첨가하고 동일한 배양 조건으로 4시간을 배양하여 배지를 제거하고 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 각 well당 DMSO 200 µL를 가하여 ELISA reader (µQuant, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

멜라닌 생성 저해 활성 측정

24 well plate에 well당 2×10^4 개의 B16F10 세포를 접종하고 24시간동안 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양한 후 시료를 각각의 well에 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL 그리고 30 µg/mL의 농도로 처리하여 3일간 시료 처리 후 배지를 제거하고 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 각 well당 500 µL의 1 N NaOH를 가하고 56°C에서 30분 용해한 후 ELISA reader (µQuant, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포내 Tyrosinase 저해 활성 측정

B16F01 세포를 24 well plate에 위의 기술한 방법과 동일하게 처리한 후, well의 세포를 원심분리하여 세포 침전물을 만들고, lysis buffer (0.1 M sodinm phosphate buffer, 0.2 mM PMSF, 1% Triton X-100)를 가하였다. 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고 원심분리한 후 상층액을 취하여 효소활성

측정에 사용하였다. 각 시료를 반응액에 (12.5 mM L-Dopa, 1.5 mM L-Tyrosine, 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8))넣고 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후 ELISA reader (µQuant, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR을 이용한 mRNA 발현 분석

배양이 끝난 세포를 2~3회 PBS로 세척 후 total RNA 추출은 TRIzol-reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 분리하였다. 세포에 TRIzol-reagent를 첨가하여 균질화한 후, 클로로포름을 첨가하여 원심분리 (12,000 rpm, 15 min)하였다. 상층액에 동량의 이소프로판올을 첨가하여 원심분리 (12,000 rpm, 10 min)하여 RNA를 침전시키고 75%의 diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리된 에탄올로 세척한 후, 건조시켜 DEPC 처리된 증류수에 녹였다. 260 nm의 흡광도를 측정하여 RNA를 정량하였고, A260/A280 nm의 비율이 1.6~1.9 범위 내의 값을 갖는 RNA를 실험에 사용하였다. cDNA 합성은 Improm-II™ cDNA kit (Promega, USA)를 이용하였고, 1 µg의 total RNA를 oligo (dT) primer, dNTP (0.5 µM), 1 unit RNase inhibitor 그리고 Improm-II™ reverse transcriptase (2 U)로 25°C 5분, 37°C 60분, 그리고 70°C에서 10분간 heating 시킴으로서 반응을 중지시켰다. Polymerase chain reaction (PCR)은 합성된 cDNA로부터 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, β-actin를 증폭시키기 위하여 1 µL cDNA, 4 µM의 5'과 3' primer, 10 × buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 µM dNTP, 25 mM MgCl₂, 1 unit Taq polymerase (Promega, USA)를 섞고 3차 증류수로 최종 25 µL로 맞추는 다음 Perkin-Elmer Thermal Cycler를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이때 PCR 조건은 94°C/30초, 50~55°C/45초, 72°C/45초 20~25회이며, PCR에 의하여 생성된 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하고 ethidium bromide로 염색하여 특정 band를 확인하였다. RT-PCR에서 사용된 primer는 Table 1과 같다.

Table 1. The primer sequences of the genes used in RT-PCR analysis and the expected size of their PCR products

Gene	Primer sequences	Fragment size(bp)
Tyrosinase	Forward 5'-GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT-3'	477
	Reverse 5'-TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC-3'	
TRP-1	Forward 5'-GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC-3'	268
	Reverse 5'-AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT-3'	
TRP-2	Forward 5'-GGA TGA CCG TGA GCA ATG GCC-3'	380
	Reverse 5'-CGG TTG TGA CCA ATG GGT GGC-3'	
β-actin	Forward 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'	349
	Reverse 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'	

Immunoblotting을 이용한 단백질 분석

배양이 끝난 세포를 2~3회 PBS로 세척 후 100 µL의 lysis

buffer을 첨가하고, 30분 동안 lysis 시킨 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 단백질 농도는 BSA (Bovine serum albumin)을 표준화하여 Protein Assay Kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 정량하였다. 30~50 μg 의 단백질을 10% mini gel Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)로 변성 분리하고, 이를 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, USA)에 15 V로 1시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TTBS (TBS (Tris-buffered saline) + 0.1% Tween 20) 용액에서 상온에서 2시간동안 실시하였다. 반응이 끝난 뒤에 1차 항체 (1 : 500-1 : 2000)가 들어있는 5% skim milk에서 1시간 (25°C) 또는 24시간 (4°C)동안 반응시킨 후, TTBS로 3회 세척하고 2차 항체 (1 : 10000)와 상온에서 1시간 반응시킨 뒤에 TTBS로 5회 세척하여 enhanced chemiluminescence 방법으로 각 band의 영상을 얻었다.

결과 및 고찰

추출 및 분리정제

본 연구에서 사용한 식물인 비목나무껍질을 흐르는 물에 세척 후 3일 동안 40°C 열풍건조 하여 분쇄기로 분쇄하였다. 건조된 시료 200 g을 70% 에탄올에 침적시켜 3일 동안 실온에서 교반하여 침출하였고, 이 침출물을 여과기로 여과하고, 침출·여과과정을 3회 더 반복한 후, 이 여과액을 감압 농축 하였다. 얻어진 추출물 (70% ethanol extract) 60 g 중 42 g을 가지고, 증류수에 현탁시켜 분별 깔대기를 이용해 *n*-hexane (*n*-Hex), methylene chloride (CH_2Cl_2), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH)을 사용하여 분획한 뒤 여과, 감압 농축하여 각각의 용매별 분획물 *n*-hexane 8.56 g, CH_2Cl_2 1.47 g, EtOAc 4.14 g, *n*-BuOH 10.2 g, H_2O 14.58 g을 얻었다. 또한 CH_2Cl_2 분획층은 순상 silica gel (Hex/EtOAc) (v/v), gradient 조건으로 신규화합물 (59.6 mg)을 얻었다 (Fig. 1).

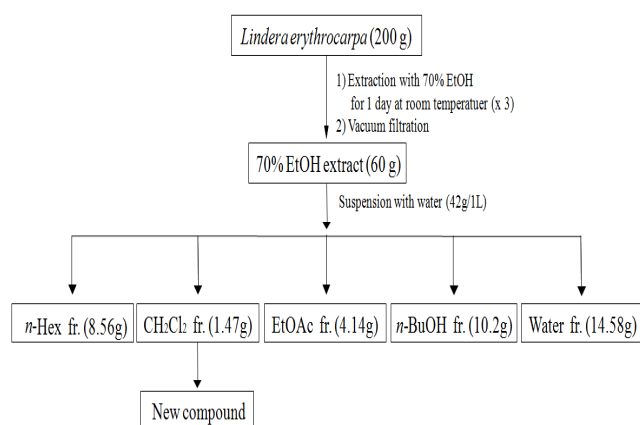


Fig. 1. The fractionation using solvent partition from the ethanol extract of *Lindera erythrocarpa* bark.

화합물 구조동정

비목나무 껍질을 이용해 얻은 에탄올 추출물에서 분리된 각각의 화합물은 NMR, (1 D, 2 D NMR), LR/HR FAB-MS를 이용하여 화합물 분석 및 구조 동정을 하였고 (Table 2), HPLC를 이용해 화합물의 순도 및 에탄올추출물 내 함량을 확인하였다. 그 결과 cyclopentadione계열에서 변형된 유도체 화합물로, 현재까지 보고된바 없는 신규 화합물로 동정하였다 (Fig. 2).

Table 2. 1 D and 2 D NMR data for Jeju-Erythrane in acetone- d_6

Position	New compound (Jeju-Erythrane)		
	δ_c (mult) ^a	δ_H (int, mult, J in Hz)	HMBC (H→C)
1	78.9 (d)	4.71 (1 H, dd, 8.5, 4.5)	C-2, C-3, C-1'
2	37.8 (t)	1.98 (1 H, m)	
		2.26 (1 H, m)	
3	32.8 (t)	2.65 (1 H, ddd, 15.0, 9.0, 7.5)	
		2.82 (1 H, ddd, 15.0, 9.5, 4.0)	
1-OCH ₃	57.5 (q)	3.34 (3 H, s)	C-1
1'	115.3 (s)	-	
2'	148.4 (s)	-	
3'	148.0 (s)	-	
4'	140.3 (s)	-	
5'	138.6 (s)	-	
6'	146.5 (s)	-	
2'-OCH ₃	61.1 (q)	3.72 (3 H, s)	C-2'
3'-OCH ₃	61.5 (q)	3.87 (3 H, s)	C-3'
4'-OCH ₃	61.4 (q)	3.76 (3 H, s)	C-4'
5'-OCH ₃	61.4 (q)	3.78 (3 H, s)	C-5'
6'-OH	-	8.8 (1 H, s)	C-1', C-5', C-6'
1"	142.8 (s)	-	
2" & 6"	129.4 (d)	7.22 (2 H, d, 7.5)	
3" & 5"	129.2 (d)	7.27 (2 H, t, 7.5)	C-3, C-1"
4"	126.6 (d)	7.16 (1 H, t, 7.5)	

¹H NMR (500 MHz), ¹³C NMR (125 MHz), acetone- d_6 ,

^aDetermined by DEPT experiments.

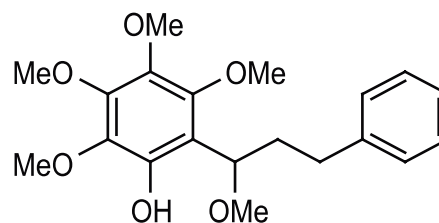


Fig. 2. New compound structure (Jeju-Erythrane).

신규화합물의 항산화 활성

비목나무 껍질에서 분리한 신규화합물의 항산화 활성에 대한 결과를 Table 2에 나타내었다. DPPH의 자유유리기 소거 활성은 대조군인 BHA IC₅₀ 값이 6.14인 반면 신규화합물의 활성은 없었다. 또한 신규화합물의 xanthine oxidase 억제활성 및 superoxide radical 소거활성에 대한 결과 또한 Table 3와같이 억제활성이 없었다.

Table 3. Antioxidant activities of new compound

Treatment	IC ₅₀ (μg/mL) ¹⁾		
	DPPH radical scavenging activity	Uric acid generation activity	Superoxide generation activity
New compound	> 500	> 500	> 500
BHA ²⁾	6.14 ± 0.07	N/A	N/A
Allopurinol	N/A	1.58 ± 0.03	1.81 ± 1.06

¹⁾ IC₅₀ values were calculated from regression lines using different concentration in triplicate experiments.

²⁾ Butylated hydroxyl anisole.

³⁾ N/A: Not assay.

형태학적 관찰

B16F10 세포에 신규화합물을 농도별로 처리하고 72시간이 지난 후에 형태학적 변화를 Inverted Microscope으로 control, 대조군 (arbutin)과 실험군을 비교 관찰하였다 (Fig. 3). 5 μg/mL 농도에서는 control과 비교하였을 때 큰 변화를 관찰 할 수 없었다. 그러나 처리농도가 10 μg/mL 이상 높아 질수록 control에 비하여 세포밀도는 점차 감소하였으며 세포의 크기가 약간 커졌고 수지상돌기의 형태가 나타나면서 길이가 약간 길어짐을 관찰할 수 있었다. 또한 대조군 arbutin 50 μg/mL 처리한 것보다 훨씬 멜라닌 생성을 억제함을 관찰할 수 있었다.

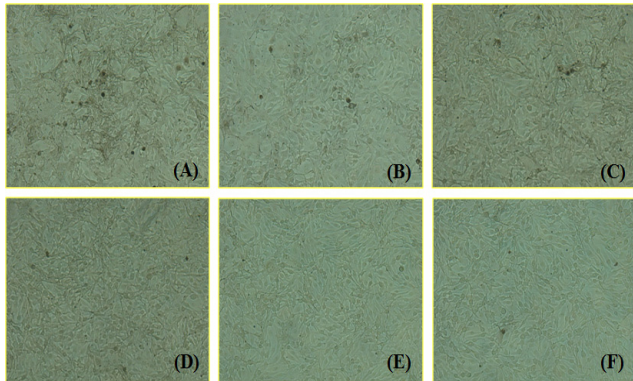


Fig. 3. Morphology of control and new compound-treated B16F10 cells. A: control, B: arbutin (50 μg/mL), C, D, E and F: cells treated with 5, 10, 20 and 30 μg/mL new compound, respectively.

세포 생존률에 미치는 영향

현재 알려지지 않은 신규화합물을 이용하여 B16F10 세포 주 세포 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다양한 농도로 3일 동안 처리하고 배양한 후에 MTT 방법으로 세포의 생존률을 관찰하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 대조군의 세포 생존률을 100%로 하였을 때, new compound의 5, 10, 20, 30 μg/mL 농도에서 거의 97~103%로 대조군에 약간 감소하거나 증가하였다. 이처럼 대조군에 비해 약간의 차이

가 있으나 유의할만한 변화를 나타내지 않았으므로 세포독성이 낮아야 하는 미백제로서의 기준에 신규화합물이 부합하는 것으로 사료되어진다.

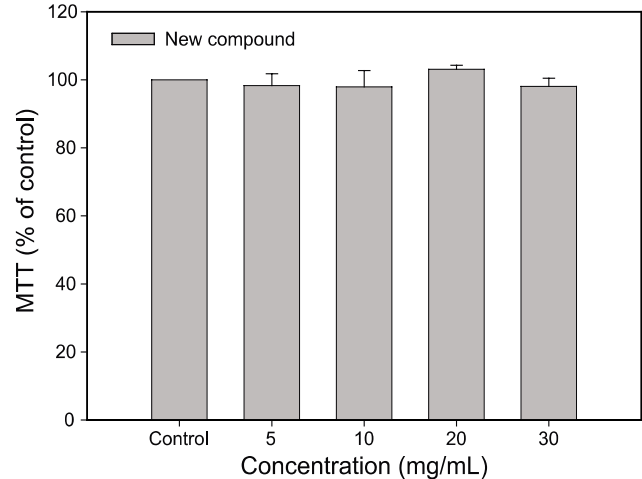


Fig. 4. Cell viability rates of new compound in B16F10 cells. The data represent the mean ± SD of three determinations.

멜라닌 생성 저해 활성에 미치는 영향

위의 실험결과 세포독성이 없는 것으로 관찰된 신규화합물을 다양한 농도로 3일 동안 처리한 후, 멜라닌생성 저해 활성을 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 대조군으로서 미백제로 알려진 arbutin 50 μg/mL 처리시 33.6%의 멜라닌 생성 억제활성을 보였으며, 각각 5 μg/mL, 10 μg/mL, 20 μg/mL, 30 μg/mL 농도까지 처리시 new compound는 19%, 32%, 51%, 59%의 높은 저해 활성을 보였다. 따라서 대조군인 arbutin보다 약 2배 더 높은 멜라닌 저해 활성을 보였으며, 천연식물에서의 미백제로서 좋은 결과를 보여주었다.

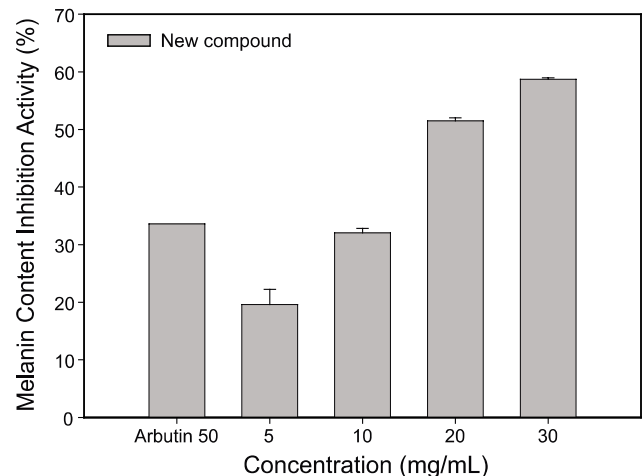


Fig. 5. Melanin contents inhibitory activity of new compound in B16F10 cells. The data represent the mean ± SD of three determinations.

세포내 tyrosinase 저해 활성에 미치는 영향

비목나무 껍질에서 분리한 신규화합물을 처리 후 최종 멜라닌양이 억제된 것은 멜라닌 합성에 관여하는 효소들의 활성과 관련이 있음을 나타내므로 B16F10 세포에서 tyrosinase 활성을 보기위해 다양한 농도로 처리하여 3일 배양 한 결과, Fig. 6과 같이 대조군인 arbutin 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리시 14%의 tyrosinase 저해 활성을 보였으며, 비목나무 껍질에서 분리한 신규화합물을 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 그리고 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 처리시 각각 2%, 15%, 20%, 32%의 억제활성을 보였다. 따라서 비목나무 껍질에서 분리한 신규화합물은 B16F10 세포에서 처리농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성도가 탁월하게 억제되는 경향을 보였으며, 통계학적으로 유의성이 있음을 보여 주었다. 이러한 결과로 볼 때 B16F10 세포주에서의 비목나무 껍질에서 분리한 신규화합물에 의한 멜라닌 생성 감소는 tyrosinase 저해 활성에 의한 것이 주요한 원인 중의 하나로 판단된다.

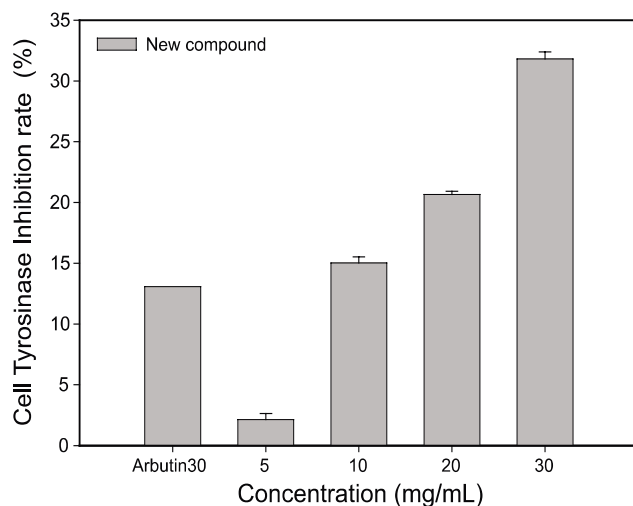


Fig. 6. Cell tyrosinase inhibitory activity of new compound in B16F10 cells. The data represent the mean \pm SD of three determinations.

멜라닌 생성에 관여하는 단백질 및 mRNA 발현 저해 활성

멜라닌 세포는 자외선에 의해 각질형성세포 등에서 생성된 NO가 cGMP 경로를 통하여 멜라닌 생성을 증가시키고, Tyrosinase와 TRP-1을 증가시키고 Tyrosinase 활성의 mRNA 발현을 유도하는 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다 [21-23]. B16F10 mouse melanoma 세포에서 독성을 보이지 않는 농도에서 비목나무 껍질에서 분리된 신규화합물의 멜라닌 억제 효과가 단백질 발현 억제에 의한 것인지 확인하기 위하여 Immunoblotting을 실시하였다. 멜라닌 생성에 주요한 효소로 알려진 Tyrosinase 외의 TRP-1, TRP-2 단백질의 발현 억제양상을 확인하였다. 그 결과 Fig. 7(a)에서 보는 바와 같이 신규화합물이 Tyrosinase, TRP-1 단백질을

의 발현양이 농도 의존적인 감소를 보였다. 또한 위의 단백질 발현 억제가 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 유전자 mRNA의 감소에 의한 것임을 확인하기 위해 RT-PCR을 실시한 결과 Fig. 7(b)에서 보는 바와 같이 tyrosinase, TRP-1 mRNA의 발현양이 농도 의존적으로 감소함을 보였다. 보통 멜라닌 합성 과정에서 TRP-2는 dopachrome을 carboxylated derivative인 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 전환시키는 기능을 한다고 보고되어 있지만 [24], TRP-2 단백질과 mRNA 유전자의 발현을 확인한 결과, TRP-2 단백질과 mRNA 발현이 농도에 관계없이 일정하였다. 따라서 비목나무 껍질에서 분리한 신규화합물은 TRP-2와 상관없이 tyrosinase와 TRP-1의 mRNA 발현을 감소시킴으로서 멜라닌 합성을 저해하는 것으로 사료되어 진다. 이상의 결과로 신규화합물이 B16F10 흑종세포에 대하여 뛰어난 멜라닌 색소 생성 억제 및 tyrosinase 억제 효과를 가지고 있는 것으로 사료되어지며 미백 관련 기능성 소재로서의 활용가치가 있음을 보여준다.

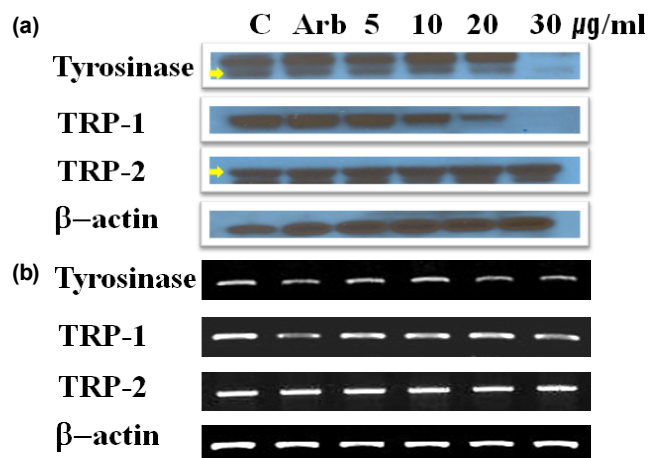


Fig. 7. Effects of new compound on the Tyrosinase, TRP-1, TRP-2 protein and mRNA expression in B16F10 cells. (a) protein expression (b) mRNA expression B16F10 cells were cultured for 72 h inducing melanogenesis with α -MSH. When it passed for 24 h, media were exchanged and new compound were retreated.

요약

본 연구는 제주도에서 자생하는 비목나무 (*Lindera erythrocarpa*) 껍질에서 분리·동정한 신규화합물 (Jeju-Erythrane)의 항산화 활성 및 B16F10 mouse melanoma 세포에서의 tyrosinase와 멜라닌 생성의 억제효과를 확인하여, 유용자원으로서 미백 및 기능성 화장품료의 산업적 활용 가능성이 있는지 알아보려고 시행하였다. 실험 결과, 신규화합물인 Jeju-Erythrane의 항산화 활성은 확인되지 않았고, B16F10 세포에서 tyrosinase와 멜라닌 합성을 농도 의존적으로 억제하는 것으로 밝혀졌으며, tyrosinase와 TRP-1

유전자의 단백질 및 mRNA 발현양도 농도 의존적으로 감소함을 보였다. 하지만, TRP-2 단백질과 mRNA는 농도에 관계없이 일정하게 발현하는 것을 알 수 있었다. 따라서, 본 연구 결과는 비목나무 (*Lindera erythrocarpa*) 껍질에서 분리·동정한 신규화합물 (Jeju-Erythrane)이 미백 관련 기능성 소재로서의 활용가치가 있음을 보여준다.

접수 : 2010년 6월 30일, 게재승인 : 2010년 8월 14일

REFERENCES

- Kubo, M. and H. Matsuda (1995) Development studies of cuticle and medicinal drugs from natural sources on melanin biosynthesis. *J. Fragrance* 8: 48-55.
- Chen, J. S., C. Wei, and M. R. Marshall (1991) Inhibition mechanism of koji acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 39: 1897-1901.
- Urabe, K., P. Aroca, K. Tsukamoto, D. Mascagna, A. Paulumbo, G. Prota, and V. J. Hearing (1994) The inherent cytotoxicity of melanin precursors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1221: 272-278.
- Aroca, P., K. Urabe, K. Kobayashi, K. Taskamoto, and V. J. Hearing (1993) Melanin biosynthesis patterns of following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem.* 268: 25650-25655.
- Iozumi, K., G. E. Hoganson, R. Pemella, M. A. Everett, and B. B. Fuller (1993) Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 100: 806-811.
- Jimenez-Cervantes, C., F. Solano, T. Kobayashi, K. Urabe, V. J. Hearing, J. Lozano, and C. Garcia-Borron (1994) A new enzymatic function in the melanogenic pathway. *J. Biol. Chem.* 269: 17993-18001.
- Tomita, K., N. Oda, M. Kamel, T. MiyaKi, and T. Oki (1990) A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiotics* 12: 1601-1605.
- Cabanes, J., S. Chazara, and C. F. Garcia (1994) Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 982-985.
- Jung, S. W., N. K. Lee, S. J. Kim, and D. Han (1995) Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 27: 891-896.
- Elsner, P. and H. I. Maibach (2000) *Cosmeceuticals: drugs vs. cosmetics.* pp. 123-145, Marcel Dekker, Inc., NY, USA.
- Hwang, J. S., H. J. Shin, H. S. Noh, H. J. Choi, S. M. Ahn, D. S. Park, D. H. Kim, B. G. Lee, I. S. Chang, and H. H. Kang (2002) The inhibitory effects of 3,4,5-trimethoxy cinnamate thymol ester (TCTE, Melasolv[®]) on melanogenesis. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.* 28: 135-149.
- Kim, S. J., M. Y. Heo, K. H. Son, and H. P. Kim (2003) Tyrosinase inhibitory activity of 80 plant extracts (II). *J. Appl. Pharmacol.* 11: 5-7.
- Suk, K. D., S. J. Lee, and J. M. Bae (2004) Inhibitory effects of *cuscuta japonica* extract and *c. australis* extract on mushroom tyrosinase activity. *Kor. J. Pharmacogn.* 35: 380-383.
- Lee, H. B., S. Bai, and J. E. Chin (2005) Inhibitory effect of *lithospermum erythrorhizon* extracts on melanin biosynthesis. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* 34: 1325-1329.
- Jeong, S. J., J. H. Lee, H. N. Song, N. S. Seong, S. E. Lee, and N. I. Baeg (2004) Screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts, *J. Korea. Soc. Appl. Biol. Chem.* 47: 135-140.
- Kang, I. H., J. H. Cha, J. H. Han, S. W. Lee, H. J. Kim, S. H. Kwon, I. H. Han, B. S. Hwang, and W. K. Whang, (2005) Isolation of anti-oxidant from domestic *Crataegus pinnatifida* Bunge leaves, *Kor. J. Pharmacogn.* 36: 121-128.
- Pratt, D. E., M. T. Huang, S. T. Ho, and C. Y. Lee (1992) Phenolic compounds in food and their effects on health (II), antioxidants and cancer prevention. *Am. Chem. Soc.* 265-268.
- Kim, E. C., S. Y. Ahn, E. S. Hong, G. H. Li, E. K. Kim, and K. H. Row (2005) Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect, *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* 16: 348-353.
- Cho, Y. H., S. Y. Kwon, J. H. Kim, N. I. Baek, G. J. Choi, K. Y. Cho, and B. M. Lee (2003) Isolation of antifungal active compounds from the leaves of *lindera erythrocarpa*. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 46: 150-153.
- Kwon, B. M., K. H. Son, D. C. Han, S. K. Choi, and H. M. Oh (2006) Anti-cancer composition comprising cyclopentadionederivatives. *Kor. Patent* 100658519.
- Romero-Graillet, C., E. Aberdam, N. Biagoli, W. Massabni, J. P. Ortonne, and R. Ballotti (1996) Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J. Biol. Chem.* 271: 28052-28056.
- Romero-Graillet, C., E. Aberdam, M. Clement, J. P. Ortonne, and R. Ballotti (1997) Nitric oxide producee by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J. Clin. Invest.* 99: 635-642.
- Sasaki, M., T. Horikoshi, H. Uchiwa, and Y. Miyachi (2000) Up-regulation of tyrosinase gene by nitric oxide in human melanocytes. *Pigment. Cell. Res.* 13: 248-252.
- Solano, F., P. Aroca, C. Salinas, J. C. Gracia-Borron, and J. A. Lozano (1992) Regulation of final phase of melanogenesis. *Eur. J. Biochem.* 208: 155-163.