

은행 열매 추출물의 멜라닌 생성 저해효과

김윤석·이용화·이진영·이용섭[†]

호서대학교 한방화장품학과 기초과학연구소
(2015년 11월 19일 접수, 2015년 12월 13일 수정, 2015년 12월 15일 채택)

Inhibitory Effect of *Ginkgo biloba* Extracts on Melanin Biosynthesis

Yoon Suk Kim[†], Young Hwa Lee, Jin Young Lee, and Yong sub Yi

Department of Herbal Cosmetics Science, Reasearch institute for basic Sciences, Hoseo University, Sechul-ri,
Baebang-eup, Asan-si, Chungcheongnam-do 31499, Korea

(Received November 19, 2015; Revised December 13, 2015; Accepted December 15, 2015)

요약: 본 연구는 은행 열매 오일의 멜라닌 생성 억제 효과를 확인한 것이다. 은행나무 열매 오일은 DPPH assay와 FRAP assay를 사용하여 라디칼 소거능을 시험하였다. 결과적으로 은행나무 열매 오일은 DMSO를 용매로 0.06% 녹였을 때, DPPH assay에서 9.96% 소거활성을 나타내었고 FRAP는 1.33 mM의 ferric sulfate (FeSO₄)를 생성하였다. 은행 열매 오일은 tyrosinase inhibition assay에서 37.72%의 억제력을 가졌고 B16/F10 세포에 멜라닌 생합성 실험을 통해 확인하였다. 은행 오일 0.06%에서 α -MSH 처리 구에 비해 48.02%의 멜라닌 생성을 억제하였다. Tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2), microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 유전자 발현 수준은 control군에 비해 0.04%와 0.06% 농도 군이 크게 감소하였다. 결과적으로 은행 열매 오일 추출물이 멜라닌 생성을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인되었다.

Abstract: In this study, we investigated the inhibitory effect on melanin synthesis of *Ginkgo biloba* seed oil. The results showed 9.96% inhibitory effect scavenging activity on DPPH and showed a value of 1.33 mM of FeSO₄ at a concentration of 0.06% in DMSO by using FRAP assay. *G. biloba* seed oil inhibited tyrosinase activity up to 37.72% and suppressed the biosynthesis melanin up to 48.02% at 0.06% in B16/F10 mouse melanoma cell. In *G. biloba* seed oil treated group tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF gen expression levels significantly decreased compared to the control group at a concentration of 0.04% and 0.06%. In conclusion, these results indicated that *G. biloba* seed oil extract have a good antimelanogenetic effects.

Keywords: *Ginkgo biloba*, DPPH activity, melanin, oil, antimelanogenetic

1. 서 론

피부와 머리카락의 색을 결정짓는 중요한 요소인 멜라닌은 동물, 식물 및 미생물에 널리 존재하는 멜라노사이트에서 형성되는 페놀류의 고분자 물질로 UV광선에 의한 세포손상으로 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해서 매개되며, 독성 약물의 흡수 등

여러 중요한 작용을 수행한다[1,2]. 하지만 멜라닌은 과도하게 합성이 될 경우 피부에 색소가 침착되어 기미, 주근깨를 형성하며, 이와 같은 병변은 나아가 피부암의 원인이 되기도 한다[3-5]. Melanin은 몇 가지 세포내 신호를 통해 시작된다. 첫 번째 cyclicadenosine monophosphate (cAMP)/ PKA (protein kinase A)로 멜라닌 합성의 주요 경로이다. 둘째 nitric oxide에 의한 cyclic guanosine monophate (cGMP), 셋째 protein kinase C (PKC), 넷째 p28 MAP kinase가 알려져 있다. UV에 의

[†] 주 저자(e-mail: yongsub@hoseo.edu)
call: 041)540-5979

해 피부 내 melanin 세포의 cAMP가 증가되고 PKA를 활성화 시키면서 cAMP response element binding protein (CREB)을 거쳐 MITF의 발현을 증가시킨다. MITF는 합성과정에서 중요한 전사조절 인자로 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진한다[6-8]. Tyrosinase는 melanocyte 내에서 tyrosine을 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)으로, L-DOPA를 L-DOPA quinone으로 전환하여 melanin이 합성된다. Tyrosinase와 TRP-1, TRP-2와 같은 단백질이 멜라닌 생성에 관여하지만 그 기능은 아직 정확하게 밝혀지지 않고 있고, 최근에는 멜라닌 합성 억제에 관한 연구로 tyrosinase를 비롯해 TRP-1, TRP-2 등과 같은 단백질에 관한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 이뿐만 아니라 melanin 과잉 생성을 억제하는 연구가 이루어지고 있으며 tyrosinase를 비롯한 멜라닌 형성에 관여하는 효소의 발현과 활성을 조절함으로써 미백을 목적으로 한 다양한 소재개발이 이루어지고 있다[9-12]. 화장품 분야에서는 미백물질로 kojic acid, arbutin 등 tyrosinase 효소활성을 억제하는 물질과 hydroquinone, vitamin C 및 이들의 유도체와 각종 식물 추출물이 사용되어 왔다[13]. 이러한 물질들은 각종 문제로 인해 사용이 제한되고 있는 상황으로 기존의 미백제의 문제를 극복하기 위해 천연물에서 새로운 미백제 개발에 많은 연구가 진행되고 있다. 은행나무(*Ginkgo biloba*, *G. biloba*)는 은행나무과에 속하는 수목류로 생존하는 수목류 중 가장 오래된 살아있는 화석실물로서 병, 해충, 오염물질에 고도의 저항성을 가지고 있다. 북중국이 원산이며 낙엽교목으로 단 1과 1속 1종뿐이며, 한때 전 세계에 분포되어 있었으나 지금은 동남아시아 지역에서 주로 자생되고 있다. 은행 종실은 주로 동양에서 예로부터 약용 또는 식용으로 많이 연구되어오고 있다[14]. 본 연구는 은행 종실의 hexane으로 추출하여 오일 추출물의 항산화효과 및 미백효과에 관한 것이다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료의 제조

본 실험에 사용된 은행나무 열매는 중국에서 자생한 것을 구입하여 사용하였으며, 실험재료는 60 °C에서 3일간 건조한 뒤 건조된 열매를 분쇄하여 분말로 만든 다음 추출시료로 사용하였다. 열매 분말 450 g에 hex-

ane 900 mL 첨가하여 상온에서 24 h 교반추출 하였고, 이 과정을 2회 반복하였다. 감압농축기를 사용하여 농축하였고 농도에 맞게 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 녹여 사용하였다.

2.2. 시약 및 기기

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, USA), ascorbic acid, mushroom tyrosinase, 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (Sigma, USA), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) (Sigma, USA), tyrosinase mushroom, dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA), α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) (Sigma, USA), L-3,4-dihydroxy-phenyl-alanine (L-DOPA) (Sigma, USA) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Thermo, USA), fetal bovine serum (FBS) (Thermo, USA), trypsin (Thermo, USA), FBS (Thermo, USA), 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin (Thermo, USA), TRIzol (Invitrogen, USA). 실험에 사용된 기기는 UV/Vis-spectrophotometer (BIO-RAD, USA), PCR (T1 Thermocycler, Biometra, Germany), real-time PCR (CFX connect, Bio-Rad, USA)을 사용하였다.

2.3. 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH Assay

Tyrosinase의 초기 반응속에서 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)의 산화가 관여되므로 전자공여능(electron donating ability, EDA)이 있을 경우 melanin의 생성 억제에 효과가 있을 것으로 예상하여 DPPH의 환원력을 이용하여 측정하였다[6]. 시료 10 μ L에 메탄올 100 μ L와 0.25 mM DPPH 90 μ L을 혼합하여 암실에서 30 min 동안 반응하였다. 분광광도계를 사용하여 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 ascorbic acid를 사용하였으며 전자공여효과는 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 백분율로 나타내었다.

2.3.2. FRAP Assay

FRAP assay는 Benzie와 Strain의 방법을 변형하여 측정하였다. FRAP reagent는 25 mL acetate buffer (300 mM, pH 3.6)를 37 °C에서 가온한 후, 40 mM HCl에 용해한 10 mM TPTZ 5 mL와 20 mM FeSO₄ 2.5 mL를 가

하여 제조하였다. 제조된 0.9 mL FRAP reagent에 각 조건의 샘플을 0.03 mL와 증류수 0.09 mL를 넣은 다음 37 °C에서 10 min 동안 반응시킨 후 593 nm에서 분광광도계(Benchmark PLUS Bio-Rad)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

2.4. Tyrosinase Inhibition Assay

0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) 0.5 mL에 10 mM L-DOPA를 녹인 기질액 0.5 mL 및 은행 추출물을 농도 별(4%, 6%)로 0.5 mL를 첨가하였다. 여기에 mushroom tyrosinase (110 U/mL) 0.2 mL를 첨가하여 37 °C incubator에서 5 min 동안 반응시킨 후 475 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 은행 추출물을 첨가하지 않은 동일한 혼합물을 대조군으로 사용하였다. Tyrosinase 효소 활성 저해율은 다음 계산식에 의하여 산출하였으며 양성대조군으로 arbutin을 사용하였다.

$$\text{저해율(\%)} = (A-B)/A \times 100$$

A : 시료를 첨가하지 않았을 때의 흡광도

B : 시료를 첨가하였을 때의 흡광도

2.5. 세포배양

B16/F10 melanoma cell에 배양에 사용된 배지는 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin, streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)를 사용하였다. 세포는 37 °C와 5% CO₂ 상태에서 배양하였다. B16/F10 melanoma cell에 각 조건 별로 96 well plate에는 5 × 10⁴ cells/well, 100 mm cell culture dish는 1 × 10⁵ cells/mL, 60 mm cell culture dish는 1 × 10⁵ cells/mL로 분주하였다.

2.6. 세포독성 측정

세포 독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 먼저 96 well plate에는 5 × 10⁴ cells/well 되도록 분주 후 24 h 뒤에 각 농도에 맞도록 DMSO에 녹인 sample을 첨가하였다. 24 h 뒤에 배지를 제거한 후 media와 MTT (in PBS 5 mg/mL) 9:1로 섞은 다음 well에 200 μL씩 가하고 incubator에 4 h 반응 후 다시 상층액을 제거한다. DMSO와 에탄올을 1:1 비율로 섞어 150 μL씩 분주하여 완전히 녹인다. 분광광도계(Benchmark

PLUS Bio-Rad)를 이용하여 550 nm에서 측정하였다.

2.7. Melanin Contents Assay

세포 내의 melanin 생성량을 측정하기 위하여 B16/F10 melanoma cell을 100 mm cell culture dish에 1 × 10⁵ cells/mL 농도로 분주하였다. 24 h 동안 배양한 후 α-MSH을 10 nM 되도록 처리하였고, 4 h 뒤에 은행나무 오일을 처리하였다. 24 h 뒤에 세포 내 melanin 생성에 미치는 영향을 측정하기 위해 DPBS로 2회 세척하고 cell scraper로 cell을 모았다. Lysis buffer (0.1 M sodium phosphate buffer pH 6.8, 1% (v/v) triton X-100)를 1 mL 첨가한 다음 4 °C 30 min 간 반응하였다. 반응한 용액을 13,000 rpm 10 min 간 원심분리 하였다. 상등액은 BCA단백질 정량법으로 정량을 하였다. 침전물은 1 N NaOH용액 1 mL 첨가한 다음, 90 °C에서 1 h 반응한 뒤 단백질 양에 맞춰 희석하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.8. 유전자 발현 분석

2.8.1. 총 RNA 분리

배양한 B16/F10 melanoma cell을 100 mm cell culture dish에 1 × 10⁵ cells/mL 농도로 분주하여 24 h 동안 배양한 후 α-MSH을 10 nM 되도록 처리하였고, 4 h 뒤에 은행나무 오일을 처리하였다. 24 h 뒤에 1 mL TRIzol reagent를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 총 RNA에 200 μL chloroform : isoamylalcohol (24:1)을 넣고 잘 섞은 후 14,000 rpm으로 20 min 간 원심분리하여 상층액 500 μL을 새로운 tube에 담는다. 500 μL Isopropyl alcohol을 이용하여 RNA를 침전시킨 후 70% 에탄올로 세척하고 자연 건조시킨다. RNAase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase-free DNase를 첨가하고 -70 °C에 보관하였다.

2.8.2. cDNA 합성

시약은 Fermentas에서 제조한 RevertAid™ first stand cDNA synthesis kit를 사용하였다. 대조군 및 시험군에서 각각 분리한 총 RNA 1 μg에 oligo dT 2 μL를 넣은 후 DEPC water 8 μL 넣고 조심스럽게 혼합한 다음, 65 °C에서 5 min 간 반응 후 다시 얼음에 넣어 4 °C를 유지한 후 5 X reaction buffer 4 μL, RiboLock™ RNase in-

Table 1. Probe Used for PCR

Gene	Applied Biosystems reference
Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Mm99999915-g1
Tyrosinase	Mm00495817-m1
Tyrosinase-related protein-1 (TRP-1)	Mm00453201-m1
DOPachrome tautomerase (DCT, TRP-2)	Mm01225584-m1
Microphthalmia-associated transcription factor (MITF)	Mm00434954-m1

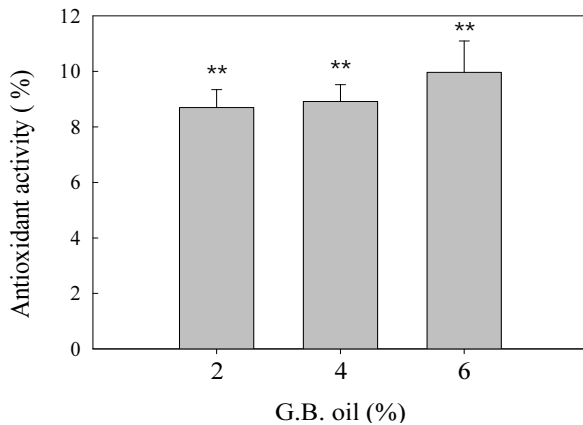


Figure 1. Scavenging effect of *G. biloba* oil on DPPH Radical. Results are expressed as mean \pm S. D. (N = 3). ** $p < 0.05$, * $p < 0.5$ as compared to the untreated group (control).

hibition (20 U/ μ L) 1 μ L, 10 mM dNTP mix 2 μ L 그리고 RevertAid™ M-MuLV reverse transcriptase (200 u/ μ L) 1 μ L를 가하여 총 양을 20 μ L로 만들었다. 이 후, 42 $^{\circ}$ C에서 60 min 간 반응한 다음 4 $^{\circ}$ C에서 final extension 하였다. 반응이 종료된 다음 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

2.8.2. Real-Time RT-PCR

cDNA 증폭을 위해 reaction mixture를 포함한 Taqman universal master mix II (Life technologies)를 사용하였고, Taqman gene expression assay를 사용하여 진행하였다. Quantitative real time PCR 조건은 denaturation은 95 $^{\circ}$ C에서 15 s, annealing은 68 $^{\circ}$ C에서 60 s를 40 cycle 진행하고 final extension은 72 $^{\circ}$ C에서 30 s 반응하였다. 상대적인 melanogenic protein mRNA 발현 비교는 GAPDH mRNA와 비교하였다.

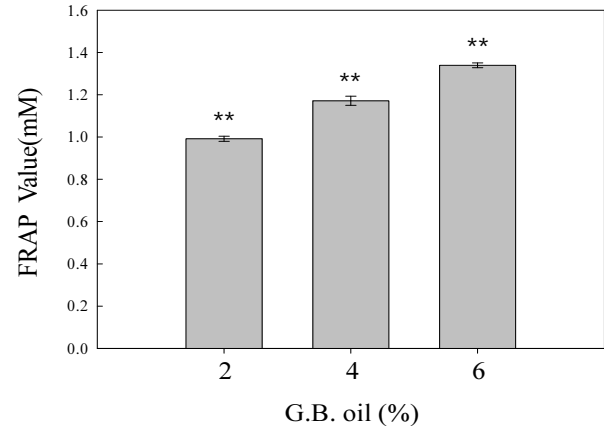


Figure 2. Ferric-reducing antioxidant potential value of *G. biloba* oil. Data were expressed in mean \pm S. D. (N = 3). ** $p < 0.05$, * $p < 0.5$ as compared to the untreated group (control).

3. 결과 및 고찰

3.1. 항산화 효과 측정 결과

3.1.1. DPPH Assay

추출물의 미백 효능 검증하기 위해 가장 먼저 항산화 효과를 측정하였다. 그 결과 농도 의존적으로 DPPH 라디칼 소거능이 증가하였으며, 추출물 6%일 때 9.95%의 소거활성을 보였다(Figure 1).

3.1.2. FRAP Assay

FRAP 방법은 총항산화능을 측정하는 방법으로 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ)복합체가 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ)으로 환원되는 원리로 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에 개발된 방법이다. FRAP법을 이용하여 항산화성을 측정한 결과 농도 의존적으로 효과가 증가하였으며, 6%에서 1.33 mM의 소거량을 나타냈다(Figure 2).

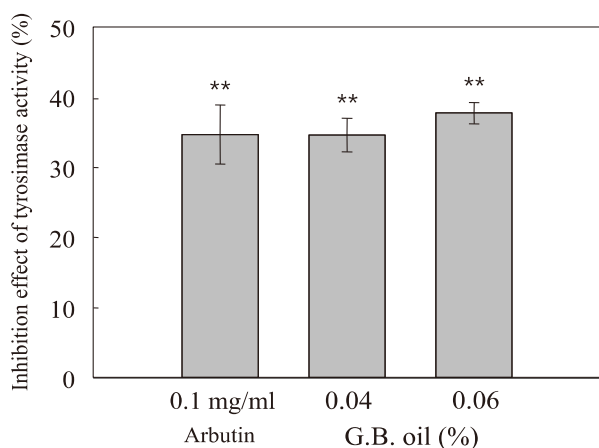


Figure 3. Inhibitory effect of *G. biloba* oil against tyrosinase. Data were expressed in mean \pm S. D. (N = 3). ** p < 0.05, * p < 0.5 as compared to the untreated group (control).

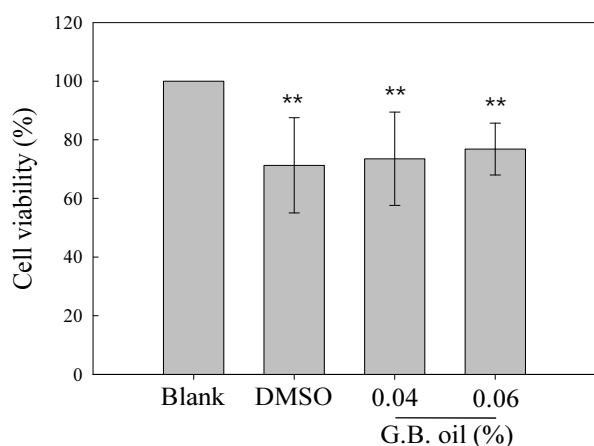


Figure 4. Effects of *G. biloba* oil on the toxicity of B16/F10 melanoma cell. The cells were incubated with *G. biloba* oil extracts for 24 h in 5% CO₂ incubator at 37 °C. The amount of living cells was measured using MTT. Data were expressed in mean \pm S. D. (N = 3). ** p < 0.05, * p < 0.5 as compared to the untreated group (control).

3.2. Tyrosinase Inhibition Assay

멜라닌 생성은 tyrosinase가 tyrosine을 산화하여 생성되는 멜라닌을 측정하여 추출물의 tyrosinase 억제하여 미백효능 검증하는 방법이다. 측정결과 은행 추출물이 농도 의존적으로 tyrosinase 억제 효과가 있었으며 0.04% 저해율은 양성대조군인 arbutin과 유사한 효과가 나타났다(Figure 3).

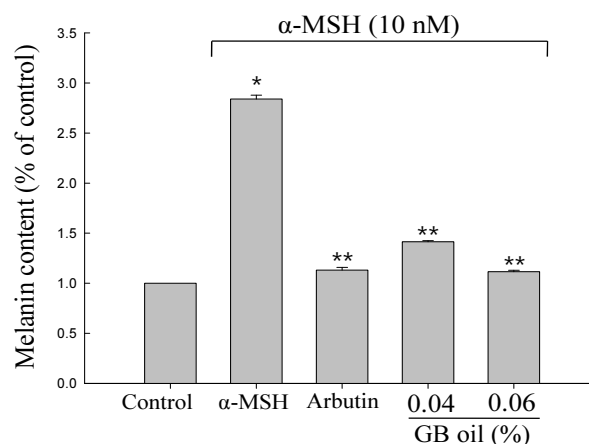


Figure 5. Effect of *G. biloba* oil concentration on the melanin contents of B16/F10 murine melanoma cell. Data were expressed in mean \pm S. D. (N = 3). ** p < 0.05, * p < 0.5 as compared to the untreated group (control).

3.3. 세포독성 측정

은행 추출물을 세포에 노출하는 실험에서 추출물이 세포에 미치는 독성을 확인하기 위해 MTT를 이용하였다. 농도별 처리구와 DMSO로 인한 독성을 확인하기 위하여 DMSO를 처리하였고 추출물이 증가함에도 세포의 생존율이 줄지 않음을 확인하였다(Figure 4).

3.4. Melanin Contents Assay

은행 추출물이 미백에 효과가 있는지 검증하기 위해 mouse melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 합성 억제효과를 측정하였다. 추출물을 처리하고 멜라닌 양을 측정된 결과 추출물의 농도 의존적으로 감소하였으며, 대조군으로 arbutin 500 μ M 처리한 세포 보다 더 melanin 합성 억제효과가 높게 측정되었다(Figure 5).

3.5. 유전자 발현 분석

세포 내 유전자 발현과 관련하여 은행 추출물의 미백효능을 확인하기 위하여 Qpcr을 진행하였다. Qpcr은 증폭산물의 생성량을 모니터링 하여 target DNA의 양을 분석하는 실험이다. Qpcr data는 housekeeping gene인 GAPDH와 비교한 상대적인 수치($dCt = gene - GAPDH$)를 이용하여 normalization한 GAPDH 대비 상대적인 유전자 발현의 비율(2^{-n-dCt})을 의미한다. Melanoma을 유도한 곳보다 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2의 mRNA양이 발현 억제가 일어남을 확인할 수

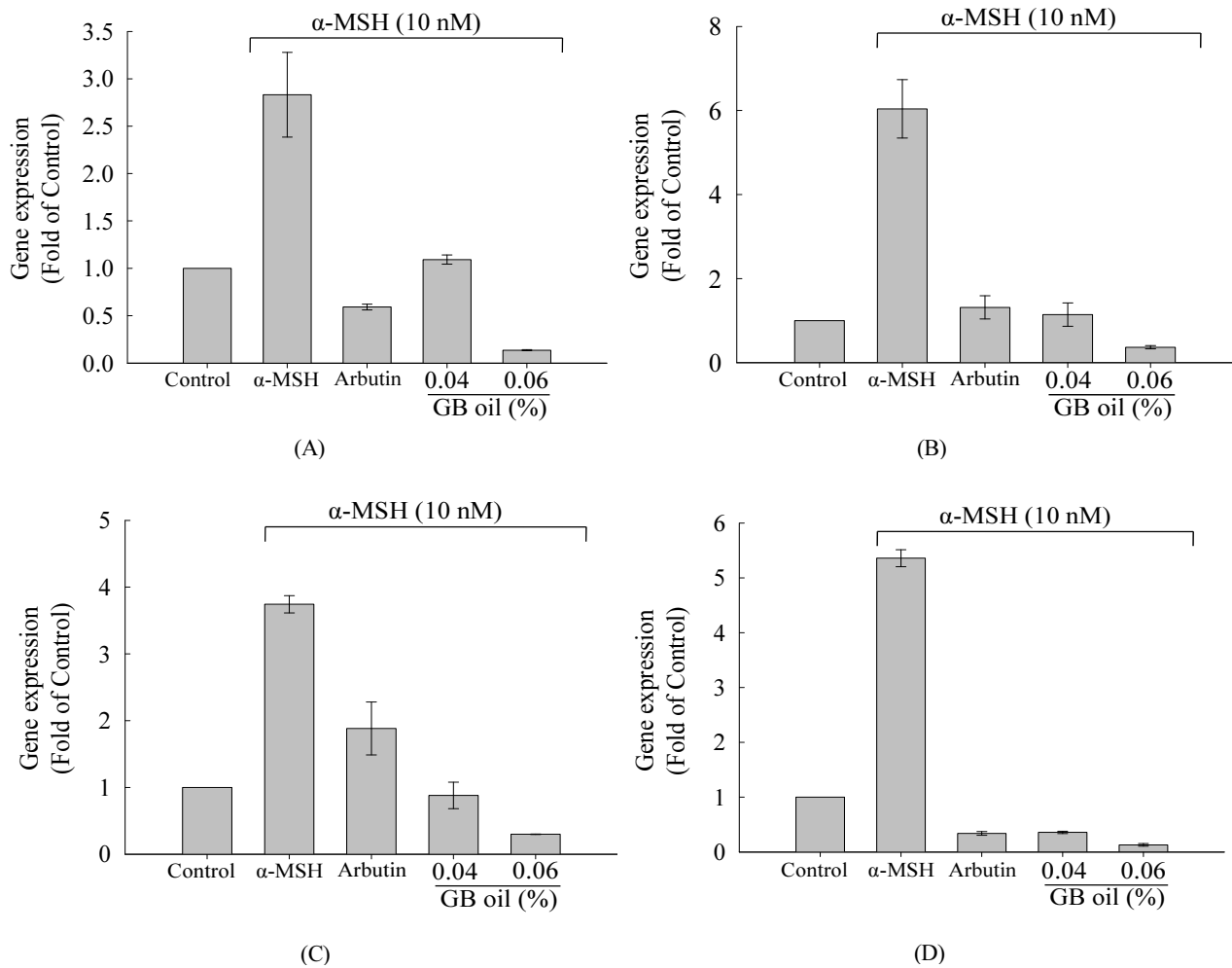


Figure 6. Quantitative mRNA expression rate of *G. biloba* oil. B16/F10 cells (1×10^5 cells) treated α -MSH medium for 4 h and the cells were treated with 0.04% and 0.05% of ethanol extracted of *G. biloba* oil for 24 h. Melanin related mRNA was detected by real-time PCR. It show the densitometric of tyrosinase protein normalized to GAPDH. Each values represents mean \pm S. D. of three individual experiments (A : tyrosinase, B : TRP-1, C : TRP-2, D : MITF).

있었다(Figure 6).

4. 결 론

본 연구에서 은행 열매의 오일을 추출하여 화장품의 기능성 소재로 사용하고 그 효능 및 효과를 조사하였다. 멜라닌 생성 첫 단계인 tyrosinase 억제 활성화와 멜라닌 생성 억제 효과를 측정된 결과, tyrosinase의 활성을 억제하였고, melanin을 형성하는 B16/F10 melanoma 세포의 멜라닌 생성 억제하였다. Melanogenesis에 관여하는 MITF, TRP-1, TRP-2, tyrosinase의 유전자 발현을

억제하는 것으로 은행 열매의 오일이 천연 기능성 재료로서 가능성이 매우 높은 것으로 판단된다.

Reference

1. D. S. Kim, S. H. Park, S. B. Kwon, S. W. Youn, and K. C. Park, Effects of lysophosphatidic acid on melanogenesis, *Chem. Phys. Lipids.*, **127**(2), 199. (2004).
2. S. Ito, The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis, *Pigment Cell Res.*, **16**, 230 (2003).

3. J. Cabanes, S. Chazarra, and F. Garcia-Carmona, Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**(12), 982 (1994).
4. J. S. Chen, C. Wei, and M. R. Marxhall, Inhibition mechanism of koji acid on polyphenol oxidase, *J. Agr. Food Chem.*, **39**(11), 1897 (1991).
5. K. Urabe, P. Aroca, K. Tsukamoto, D. Mascagna, A. Paulumbo, G. Prota, and V. J. Hering, The inherent cytotoxicity of melanin precursors, *BBA-Mol. Cell. Res.*, **1221**(3), 272 (1994).
6. R. Busca and R. Ballotti, Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation, *Pigment Cell Res.*, **13**(2), 60 (2000).
7. C. P. Sassone, Coupling gene expression to cAMP signalling: Role of CREB and CREM, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **30**(1), 27 (1998).
8. B. Saha, S. K. Singh, C. Sarkar, R. Bera, J. Ratha, D. J. Tobin, and R. Bhadra, Activation of the MITF promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB, *Pigment Cell Res.*, **19**(6), 595 (2006).
9. S. Parvez, M. Kang, H.-S. Chung, C. Cho, M.-C. Hong, M.-K. Shin, and H. Bae, Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents, *Phytother. Res.*, **20**(11), 921 (2006).
10. N. Baurin, E. Arnoult, T. Scior, Q. T. Do, and P. Bernard, Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity, *J. Ethnopham.*, **82**(2-3), 155 (2002).
11. V. J. Hearing and K. Tsukamoto, Enzymatic control of pigmentation in mammals, *FASEB J.*, **5**(14), 2902 (1991).
12. G. Prota, The chemistry of melanins and melanogenesis, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **64**, 93 (1995).
13. J. Yamakoshi, F. Otsuka, A. Sano, S. Tokutake, M. Saito, M. Kikuchi, and Y. Kubota, Lightening effect on ultraviolet induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin rich extract from grape seeds, *Pigment Cell Res.*, **16**(6), 629 (2003).
14. B. P. Jacobs and W. S. Browner, Ginkgo biloba: a living fossil, *Am. J. Med.*, **108**(4), 341 (2000).