

양파(*Allium cepa* L.) 추출물이 Tyrosinase 유전자 발현에 미치는 효과

조남철 · 윤연희 · 이해진* · 손현정* · 김양경* · 최근희** · 나명석***
· 조영권**** · 이황희* · 진종언**†

동강대학 식품영양과, *전남대학교 자연과학대학 생명과학부, **동강대학 피부미용과,
광주여자대학교 생명과학부, *서남대학교 생활체육학부

Effect of Onion(*Allium cepa* L.) Extract on Tyrosinase Gene Expression

Namchul Cho, Yeon-Hee Yoon, Hyejin Lee*, Hyun-Jung Shon*,
Yangkyung Kim*, Keun-Hee Choi**, Myung-Suk Ra***, Young-Kwon Jo****,
Hwanghee Blaise Lee* and Jongeon Chin**†

Dept. of Food & Nutrition, Dongkang College, Gwangju 500-714, Korea.

*Dept. of Biological Sciences & Hormone Research Center, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea.

**Dept. of Cosmetology, Dongkang College, Gwangju 500-714, Korea.

***Dept. of Life Sciences, Kwangju Women's University, Gwangju 506-713, Korea.

****Dept. of Sports For All, Seonam University, Namwon 590-711, Korea.

Abstracts

Onion(*Allium cepa* L.) extract by methanol repressed the expression of tyrosinase gene of B16 mouse melanoma cell containing tyrosinase promoter. 10.0 $\mu\text{g/ml}$, 100.0 $\mu\text{g/ml}$, 1.0 mg/ml of the extract repressed expression of tyrosinase gene about 15%, 23%, and 57%, respectively, compared with control. In the MTT assay, the same extract exhibited low cytotoxicity at 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 10.0 $\mu\text{g/ml}$, 100.0 $\mu\text{g/ml}$, and 1.0 mg/ml , respectively. The fractions of ethyl acetate, butyl alcohol, and water did not showed the repressive effect on the expression of tyrosinase gene, but the fraction of methylene chloride repressed highly at 10.0 $\mu\text{g/ml}$ and 100.0 $\mu\text{g/ml}$.

Key words : Onion(*Allium cepa* L.), tyrosinase.

서 론

양파(*Allium cepa* L.)는 백합과(*Liliaceae*) 식물로서 독특한 향과 매운맛을 지녀 오래 전부터 향신료로 널리 사용되고 있으며 특히 다양한 생리활성물질들을 함유함으로써 건강식품으로도 주목받고 있다. 양파의 대표적인 생리활성물질로는 flavonoid계 화합물인 quercetin, quercitrin, rutin, 황화합물인 allyl propyl disulfide와 diallyl disulfide 등이며 이들은 항산화 효과, 항균효과, 중금속의 해독작용, 사염화 탄소에 대한

독성 완화작용, 그리고 지질과산화물의 생성 억제작용¹⁾ 뿐만 아니라 양파 추출물이 melanin 생합성에 관여하는 tyrosinase 효소의 활성을 저해하는 효과가 있는 것으로도 최근 보고된 바 있다^{2, 3)}.

자외선에 대한 피부 과다노출과 여러 가지 스트레스의 증가는 피부 손상과 함께 과다한 melanin 생성을 일으켜 색소침착(pigmentation)을 유발한다. 따라서 최근, 건강한 피부를 유지하기 위한 방법의 하나로서 melanin 색소침착 억제에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다⁴⁻¹³⁾.

† Corresponding author : Jongeon Chin

Melanin의 생합성은 tyrosinase, DHICA oxidase, DOPA chrome tautomerase, 그리고 catechol-O-methyltransferase와 같은 여러 효소들에 의해 조절되며 그 중 tyrosinase가 melanin 생합성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 바 tyrosinase 효소 저해물질을 이용한 melanin 생성 억제 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재까지 몇몇 식물들과 해조류들이 tyrosinase 저해효과가 있는 것으로 보고되었으며⁴⁻⁷⁾, 그 중 녹차⁸⁾, 목단피⁹⁾, 상백피¹⁰⁾, 감초¹¹⁾, 다나무¹²⁾, 약대황¹³⁾, 아프리카 약용식물¹⁴⁾, 볼리비아 약용식물¹⁵⁾ 등의 식물로부터는 저해효과가 있는 단일성분들이 분리되었다. 그러나 이러한 연구들의 대부분은 효소의 활성 저해 수준에서 이루어져 melanin 생성 억제효과가 낮고 지속성이 짧다는 단점이 있다. 따라서 효과적으로 melanin 생합성을 조절하기 위해서는 유전자 발현 수준에서의 연구가 필요하나 Chin 등¹⁶⁾의 연구를 제외하고는 매우 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 이러한 연구노력의 일환으로 양파 추출액을 형질전환 된 B16 mouse melanoma cell에 처리함으로써 tyrosinase 유전자의 발현에 대한 양파추출물의 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 양파는 전라남도 무안군 현경면에서 직접 채취하여 감정한 후 사용하였으며, 표본은 동강대학 식품영양과 식품분석실에 보관하였다.

2. 추출 및 분획

시료의 추출은 생약을 세절하여 0.1 kg씩을 취한 다음 methanol을 가하여 실온에서 1 주일 동안 정치시킨 후 3 회 추출·여과하였다. 여과액은 감압·농축하여 동결건조시킨 후 분말 형태로 제조하였다. 용매분획은 농축된 methanol 추출물을 증류수로 현탁한 다음, 극성도가 다른 methylene chloride, ethyl acetate, butyl alcohol, 물 등의 용매를 이용 4개의 층으로 분획하여 methanol 추출물과 같은 방법으로 농축하였다. 그리고, 이 농축물은 동결건조하여 분말 형태로 제조하였다.

3. 시료 제조

분말로 된 추출물 및 분획물 100.0 mg에 ethanol과 dimethyl sulfuroxide가 1:1로 혼합된 용매 1.0 ml씩을 가하여 완전히 용해시킨 후 여과하여 tyrosinase 유전

자 발현율과 세포독성 측정에 이용하였다.

4. 세포배양

B16 mouse melanoma cell은 10%(v/v)의 fetal bovine serum(FBS, GibcoBRL), 1%(v/v) antibiotic(Gibco BRL), 그리고 2mM의 L-glutamine이 포함된 RPMI Medium 1640(GibcoBRL, RPMI Medium 1640 완전배지)에서 CO₂ 분압을 5.0%로 조절하여 37 °C에서 배양하였으며, 세포는 36~48 시간 주기로 계대배양하여 유지하였다.

Tyrosinase promoter를 도입하여 형질전환시킨 B16 mouse melanoma cell은 위의 RPMI Medium 1640 완전배지에 Geneticin(200 µg/ml)을 가한 선택배지를 이용하여 배양하였다.

5. 세포내 유전자 도입(Stable Transfection)

B16 mouse melanoma cell내에 tyrosinase promoter가 삽입된 유전자를 도입하기 위해 LipofectAMINE(Life Technologies Inc.)을 이용한 다음과 같은 방법으로 stable transfection을 실시하였다.

1) 세포내 유전자 도입

B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 완전배를 함유한 배양접시에 세포수가 3~4×10⁵이 되도록 접종한 후 24 시간 배양한 다음, 배양액 1.0 ml에 6.0 µl LipofectAMINE과 2.0 µg의 total plasmid DNA를 5 시간 처리함으로써 transfection을 실시하였다.

Plasmid DNA는 luciferase gene을 지닌 pGL2-basic vector(Promega)의 *Sma*I site에 1.5Kb의 neomycin 저항성 유전자를 삽입한 다음 1.0 Kb의 human tyrosinase promoter를 *Eco*RI/*Kpn*I site에 클로닝을 하였다.

2) 형질전환된 세포의 선별

Stable transfection 처리 5 시간 후 B16 mouse melanoma cell로부터 LipofectAMINE 시약과 재조합된 DNA가 함유된 배지를 제거한 후 클로니가 형성될 때까지 Geneticin(600 µg/ml)이 들어있는 선택배지에서 배양한 후 형질전환 된 B16 mouse melanoma cell을 선별하였다.

6. Luciferase 활성도 측정

세포내 유전자 도입을 통해 얻은 B16 mouse melanoma cell의 형질전환 유무를 확인하기 위하여 luciferase 활성도를 측정하였다. Transfection을 통하여

얼은 콜로니들을 Trypsin-EDTA를 처리하여 떼어낸 후 24 well plate에 세포수가 well당 6×10^4 되게 분주하여 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 세포들은 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4))으로 세척한 다음 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 그리고 2mM Dithiothreitol이 함유되어 있는 pH 7.8의 25 mM Tris-Phosphate 완충용액으로 용해하였다. 용해된 세포들을 취하여 원심분리한 다음 얻어진 상등액에 대해 Luminometer(Lumat LB 9507, Berthold)를 이용하여 luciferase 활성도를 측정하였으며 luciferase 활성도가 가장 높게 나타난 B16 mouse melanoma cell을 선별하여 본 실험에 이용하였다.

7. Tyrosinase 유전자 발현을 측정

형질전환 된 B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 완전배지가 들어 있는 24 well plate에 세포수가 well당 6×10^4 되게 접종한 다음 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 각각의 well에 양파 methanol 추출물은 10.0 $\mu\text{g/ml}$, 100.0 $\mu\text{g/ml}$, 1.0 mg/ml의 농도로, 그리고 용매 분획물은 각각 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 10.0 $\mu\text{g/ml}$, 100.0 $\mu\text{g/ml}$, 500.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 6 시간 동안 처리한 다음 luciferase 활성도를 측정하여 tyrosinase 유전자 발현에 미치는 효과를 조사하였다.

8. 세포독성 측정

B16 mouse melanoma cell을 RPMI Medium 1640 완전배지가 들어 있는 96 well plate에 세포수가 well당 $1.0 \sim 1.2 \times 10^4$ 되게 접종한 다음 24시간 동안 배양하였다. 그 후 양파 methanol 추출물을 각각의 well에 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 10.0 $\mu\text{g/ml}$, 50.0 $\mu\text{g/ml}$, 그리고 100.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 6 시간 동안 처리한 다음 Mosmann¹⁷⁾의 방법에 따라 MTT assay를 실시하여 세포독성을 평가하였다.

결과 및 고찰

1. Tyrosinase 유전자 발현에 대한 양파 Methanol 추출물의 효과

세포내 유전자 도입을 통하여 제조된 B16 mouse melanoma cell에 양파 methanol 추출물을 처리하여 tyrosinase 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과, 양파 methanol 추출물은 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하였다(Fig. 1). 양파 methanol 추출물의 농도를 각각 10.0 $\mu\text{g/ml}$, 100.0 $\mu\text{g/ml}$, 1.0 mg/ml로 달리 하여 세포에 처리하였을 때 억제 효과는 대조군에

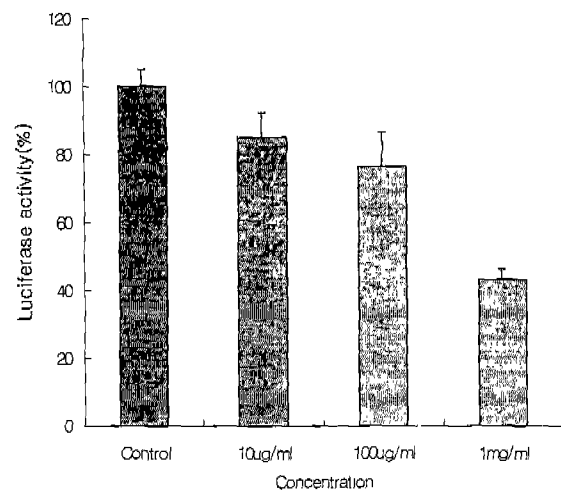


Fig. 1. Effects of onion(*Allium cepa* L.) extract by methanol on the tyrosinase gene in B16 mouse melanoma cells.

비해 각각 약 15%, 23%, 57%로서 추출액 농도에 비례하였다. 한편 tyrosinase 효소 활성 저해물질로 알려진 목단과⁹⁾, 감초¹¹⁾, 약대황¹³⁾ 추출물들은 tyrosinase 유전자의 발현을 오히려 증진시킨다는 Chin 등¹⁶⁾의 보고가 있었으나 본 연구 결과에 의하면 양파 methanol 추출물은 tyrosinase 효소의 활성을 저해할 뿐만 아니라 tyrosinase 유전자의 발현을 억제함으로써 melanin 생성을 효과적으로 감소시킬 수 있다는 가능성을 나타냈다. 그러나 양파 추출물은 growth hormone promoter가 도입된 rat pituitary cell에 처리하였을 때 유전자의 발현에는 영향을 주지 못하였다. 따라서 양파 추출물은 일반적인 모든 promoter의 발현에 영향을 주는 것이 아니라 tyrosinase promoter와 같은 특정한 유전자의 발현에만 관여하는 것으로 사료된다.

2. 양파 Methanol 추출물이 세포독성에 미치는 효과

B16 mouse melanoma cell에 양파 methanol 추출물을 처리한 결과 세포독성은 매우 낮게 나타났다(Fig. 2). 양파 methanol 추출물을 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 저농도로 세포에 처리하였을 때에는 세포의 생존율이 약 126%로 세포독성보다는 오히려 세포를 증식하였으며, 그리고 10.0 $\mu\text{g/ml}$, 100.0 $\mu\text{g/ml}$, 1.0 mg/ml의 농도로 처리하였을 때에도 세포의 생존율이 대조군에 비해 감소하였지만 약 90%, 85%, 64%로 세포독성이 매우 낮게 나타났다. 이와 같이 양파 methanol 추출물은 세포독성이 낮으면서도 tyrosinase 효소의 유전자 발현을 억

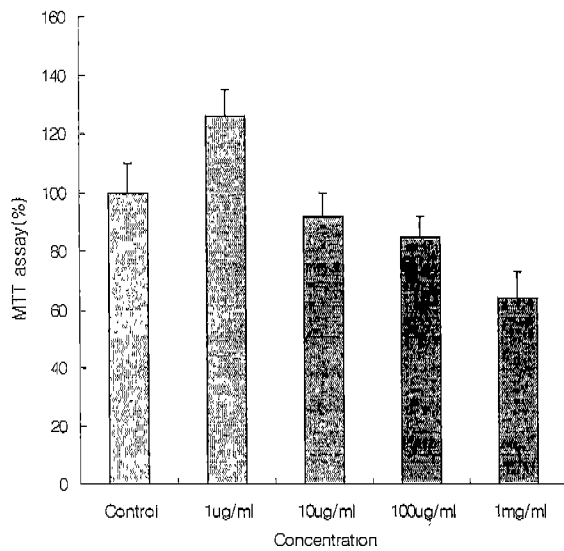


Fig. 2. Cytotoxicity of onion (*Allium cepa* L.) extracts by methanol on B16 mouse melanoma cells.

제하는 것으로 보아 효과적인 melanin 생성 억제제로서의 응용이 기대된다.

3. Tyrosinase 유전자 발현에 대한 양파 용매 분획물의 효과

형질전환 된 B16 mouse melanoma cell에 각각의 양파 용매 분획물을 처리한 바 tyrosinase 유전자의 발현은 용매 분획물에 따라 다양한 결과를 나타냈다 (Table 1). 극성도가 높은 butyl alcohol과 물 용매 분획물은 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 10.0 $\mu\text{g/ml}$, 100.0 $\mu\text{g/ml}$, 500.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 모든 농도에서 대조군에 비해 tyrosinase 유전자의 발현을 약 10~40% 정도 증진시키는 결과를 보여주었다. 그러나 극성도가 낮은 methylene chloride 용매 분획물은 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 저농도에서 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 효과가 나타나지 않았으나 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 와 100.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 억제 효과가

각각 13%와 65%로 높게 나타났다. 그러나 500.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 세포가 분해될 정도로 심한 독성 효과를 나타내 억제효과의 측정이 불가능하였다. 또한 ethyl acetate 용매 분획물은 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 10.0 $\mu\text{g/ml}$, 100.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 tyrosinase 유전자의 발현을 각각 119%, 140%, 177%로 크게 증진시키는 결과를 보여 주었지만 500.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서는 약 39%의 억제효과를 보여 주었다. 따라서 유전자 발현 수준에서 이루어지는 양파 용매 분획물의 tyrosinase 유전자의 발현효과가 항산화 효과와는 다른 차이를 보이는 것은 화학적인 수준에서 입증되는 tyrosinase 활성 저해 또는 항산화 효과와는 서로 다른 기작에 의해서 이루어지는 것으로 판단된다.

이와 같은 결과들을 통해서 양파 methanol 추출물은 세포독성이 낮으면서도 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인되었다. 그리고 양파 용매 분획물의 tyrosinase 유전자 발현율도 용매에 따라 서로 다른 경향을 보여 주었다. 즉, 극성도가 큰 물, butyl alcohol, ethyl acetate의 용매 분획물은 tyrosinase 유전자의 발현을 증진시켰으나 극성도가 낮은 methylene chloride 용매 분획물은 발현을 억제하는 효과를 보여주었으며, 그의 억제효과는 100.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 65%로 methanol 추출물보다 2배 이상 향상되었다. 따라서 양파 추출물 내에는 tyrosinase의 활성을 저해할 뿐만 아니라 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 성분도 지니고 있는 것으로 생각되며, 이러한 결과는 피부의 미백효과를 기대하는 화장품 및 의약품에 많이 응용될 것으로 생각된다.

요 약

Melanin 생성에 관여하는 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 물질을 탐색하고자 tyrosinase promoter를 지닌 B16 mouse melanoma cell에 양파 methanol 추출물을 처리한 바 양파 methanol 추출물은 10.0 μg

Table 1. Effects of solvent fractions of onion (*Allium cepa* L.) on the tyrosinase gene in B16 mouse melanoma cells

Solvent fractions	Luciferase assay(%)			
	1.0 $\mu\text{g/ml}$	10.0 $\mu\text{g/ml}$	100.0 $\mu\text{g/ml}$	500.0 $\mu\text{g/ml}$
Methylene chloride	106 \pm 8.4	87 \pm 5.4	35 \pm 3.7	ND*
Ethyl acetate	115 \pm 3.1	140 \pm 11.6	177 \pm 5.9	61 \pm 7.6
Butanol	119 \pm 11.4	132 \pm 5.5	122 \pm 4.0	129 \pm 0.6
Water	110 \pm 2.0	148 \pm 7.5	136 \pm 5.9	122 \pm 3.9

* ND : Not detected by cell lysis.

/ml, 100.0 $\mu\text{g/ml}$, 1.0 mg/ml의 농도에서 대조군에 비해서 약 15%, 23% 57%의 억제효과를 나타냈으며, 세포생존율은 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 10.0 $\mu\text{g/ml}$, 100.0 $\mu\text{g/ml}$, 1.0 mg/ml의 농도에서 약 126 %, 92%, 85%, 64%로서 세포독성이 낮게 나타났다. Ethyl acetate, butyl alcohol, 그리고 물 용매 분획물은 tyrosinase 유전자의 발현을 억제하는 효과가 없었지만 methylene chloride 용해 분획물은 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 과 100.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 87%와 35%의 발현율을 나타냄으로서 대조군에 비해 크게 억제하였다.

참고문헌

- 鄭普燮, 辛民教 圖解藥(生藥) 大事典, 圖書出版 永林社, 서울, p. 155~156 (1998).
- Jung, S. W., Lee, N. K., Kim, S. J., and Han, D. S. : Screening of tyrosinase inhibitor from plants, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27, 891~896 (1995).
- Shin, Y. J., Han, D. S., Kim, S. J., and Kim, I. H. : Ability of lipophilic extract obtained from plants to inhibit tyrosinase activity in reverse micelles, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 32, 736~741 (2000).
- Jung, S. W., Lee, N. K., Kim, S. J. and Han, D. S. : Screening of tyrosinase inhibitor from plants, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27, 891~896 (1995).
- Lee, S. H., Park, J. S., Kim, S. Y., Kim, J. J. and Chung, S. R. : The screening of the inhibitory compounds on tyrosinase activity from the natural product, *Yakhak Hoeji*, 41, 456~461 (1997).
- Park, Jeong, H., Shin, Y. G., Shin, U. K., Baek, S. K., Lee, S. K., Chung, M. H. and Y. I. Park, : Tyrosinase Inhibition Activity of some herbal drugs, *Yakhak Hoeji*, 41, 518~523 (1997).
- Choi, B. W., Lee, B. H., Kang, K. J., Lee, E. S. and Lee, N. H. : Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants, *Korean J. Pharm.*, 29, 237~242 (1998).
- No, J. K., Soung, D. Y., Kim, Y. J., Shim, K. H., Jun, Y. S., Rhee, S. H., Takako Yokozawa and Chung, H. Y. : Inhibitory of tyrosinase by green tea components, *Life Science*, 65, PL241~246 (1999).
- Lee, S. H., Park, J. S., Kim, S. Y., Kim, J. J. and Kim, S. R. : Isolation of inhibitory components on tyrosinase activity from the bark of *Paeonia moutan*, *Yakhak Hoeji*, 42, 353~358 (1998).
- Shin, N. H., Ryu, S. Y., Choi, E. J., Kang, S. H., Chang, I. M., Min, K. R. and Kim, Y. S. : Oxyresveratrol as the potent inhibitor on the dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243, 801~803 (1998).
- Tomohiro Yokota, Hiroyuki Nishino, Yasuo Kubota, and Masako Mizoguchi : The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation, *Pigment Cell Research*, 11, 355~361 (1998).
- Jang, D. I., Lee, B. G., Jeon, C. O., Jo, N. S., Park, J. H., Cho, S. Y., Lee, H. and Koh, J. S. : Melanogenesis inhibitor from paper mulberry, *Cosmetics & Toiletries Magazine*, 112(3) 59~62 (1997).
- Koichi Iida, Koji Hase, Kenji Shimomura, Syu Sudo, Shigetoshi Kadota, and Tsuneo Namba : Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from *Rheum officinale*, *Planta Medica*, 61, 425~428 (1995).
- Isao Kubo and Ikuyo Kinoshita-Hori : 2-Hydroxy-4-methoxy-benzaldehyde A potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants, *Planta Medica*, 65, 19~22 (1999).
- Isao Kubo, Yoshihiro Yokokawa, and Ikuyo Kinoshita-Hori : Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants, *Journal of Natural Products*, 58, 739~743 (1995).
- Chin, J. E., Sun, H. S., Lee, K. J., Choi, T. J., Ko, Y. S., Sohn, H. J., Kim, J. J., Jeon, B. H. and Blaise Lee, H. H. : Inhibitory effects of some medicinal plant extracts on the tyrosinase promoter activity on B16 mouse melanoma cells, *International Journal of Oriental Medicine*, 1, 6~13 (2000).
- Mossman T. J. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival Application to proliferation and cytotoxicity assay, *Immunol. Methods*, 63, 55~63 (1983).

(2001년 5월 14일 접수)