

산수유 메탄올 추출물이 B16/F10 Melanoma 세포주의 멜라닌 생성에 미치는 영향

최원형¹ · 천현자^{2*} · 이정호³ · 백승화¹

¹원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, ²원광대학교 자연과학기술학부, ³제3의학과

Effects of Methanol Extract from *Cornis fructus* on Melanogenesis

Won Young Choi¹, Hyun Ja Chun^{2*}, Jeong Ho Lee³, and Seung Hwa Baek¹

¹Department of Herbal Resources and ³Department of Third Medicine,
Professional Graduate School of Oriental Medicine, and

²Division of Natural Science, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract – *Cornis fructus* has been traditionally used for treating allergy, asthma, hepatitis, and chronic nephritis. Its major chemical constituents have been saponins, phenolic acids and loganin. The main aim of the present study was to examine the effect of methanol extract from *Cornis fructus* on melanogenesis. Cells were cultured in the presence of methanol extracts from *Cornis fructus* for 48 h, and there were estimated total melanin content as a final product and activity of tyrosinase, a key enzyme, in melanogenesis. Methanol extract from *Cornis fructus* increased the melanin content and tyrosinase activity in a dose-dependent manner. Particularly, it was observed that only methanol extract 200 µg/ml stimulated the melanin secretion in B16/F10 melanoma cells by 152% at 48 h treatment and the activity of tyrosinase was increased by 261% in the presence of same concentration.

Key words – *Cornis fructus*, melanogenesis, tyrosinase

서 론

우리 나라에 자생하고 있는 식물 중에는 약용이나 식용으로 이용할 수 있는 식물이 많으며 지금까지는 이들 식물에 대한 광범위한 연구가 미흡하였으나 과학의 발달과 천연물에 대한 인식이 새로워짐에 따라 천연물이 새로운 신약 및 신약 후보물질을 얻을 수 있는 좋은 재료로서 고려되어지고 있다. 한편 이러한 천연물 및 한약재의 효능과 작용기전이 밝혀진 약물을 대상으로 임상적으로 유용한 처방을 개발하기 위한 새로운 치료법의 연구를 통하여 한의학적 치료법의 새로운 연구분야의 개척을 선도하고자 한다.

산수유나무(*Cornus officinalis*)는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 낙엽활목으로서 중남부의 산야에 자생하고 생약 산수유는 가을에 익은 산수유의 열매(*Cornis Fructus*)를 따서 씨를 뽑아내고 햇볕에 말린 것을 말하며 한약 또는 민간에서 자양강장, 수렴약으로 사용하고 있으며 꽃은 관상자원으로 이용하기도 한다.¹⁻³⁾

산수유의 성분에 관하여는 triterpene계 saponin인 ursolic acid⁴⁾와 배당체인 morroniside, loganin, sweroside, 7-O-methylmorroniside,⁵⁾ 그 외 유기산 및 지방산이 함유되어 있고, 산수유에 대한 연구로는 주로 tannin화합물,⁶⁻⁷⁾ iridoid화합물⁵⁾ 및 정유성분⁸⁾ 등의 연구 보고가 있다. 산수유의 약리 작용에 관하여는 물 추출물이 항히스타민, 항아세틸콜린 및 항바륨작용이 있고,⁹⁾ 황색포도상구균¹⁰⁾을 억제하는 것으로 보고되었으며 메탄올추출물과 그의 에틸분획물이 소염작용에 효과가 있음이 보고되었다.¹¹⁾ 본 연구팀은 피부질환 치료제 및 미백제 개발을 목적으로 생약 및 한약재를 이용하여 멜라닌색소와 관련된 연구를 계속 진행해 오고 있다.¹²⁻¹⁶⁾ 이런 연구의 일환으로 소염효과를 보이는 산수유가 멜라닌 세포의 멜라닌화에 관여하는지를 알아보기 위하여 산수유 메탄올 추출물이 tyrosinase 효소활성 및 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

실험방법

검액조제 – 본 실험에서 사용한 산수유는 원광대학교 한

*교신저자(E-mail) : hjchun@wonkwang.ac.kr
(FAX) : 063-841-4893

의과대학 한방병원에서 구입한 시료를 *n*-hexane에 용해시켜 상온에서 24시간 3회 추출한 다음, 이 추출액을 여과하여 여과한 후, 감압농축하고 동결건조 시켜 시료를 얻었다. 계속하여 클로로포름, 에틸아세테이트, 메탄올, 물로 추출하고, 여액을 감압 농축하였다. 시료는 DMSO에 녹인 후 세포에 투여하기 전 0.22 μ m pore 여과지로 여과 멸균하여 농도를 조정하여 다음 사용하였다.

세포배양 - B16/F10 melanoma 세포는 CO₂ 세포배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 10% fetal bovine serum (Gibco. Co.) 이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 여기에 penicillin-streptomycin (Sigma Chemical Co., USA) 100 I.U. - 100 μ g/ml를 첨가하였으며, 약 24 시간 주기로 DMEM 배양액을 교체하였다.

MTT Assay - 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 정량은 Mosmann의 방법¹⁷⁾을 변형하여 실시하였다. 세포를 48 시간 배양한 후 상층액을 버리고, 당일 제조한 500 μ g/ml MTT를 배양 용기당 1 ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3 시간 동안 배양하였다. 살아 있는 세포는 MTT와 반응하여 보라색 불용성 formazan 침전물이 형성되며 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 10% DMSO를 200 μ l씩 넣고 15 분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

Trypan blue 검사 - 대조군과 실험군의 각 well에 0.05% tyrosine - 0.02% EDTA 용액을 가하여, 각 well에서 세포를 분리 수거하였다. 이 분리 수거한 세포를 PBS로 2회 세척한 후 0.02 ml와 동량의 0.4% (w/v) trypan blue를 잘 섞은 다음 hemocytometer에 넣고 광학현미경을 이용하여 trypan blue에 염색되지 않은 살아 있는 세포수를 측정하였다.

멜라닌 양 측정 - 멜라닌 양은 Hosoi¹⁸⁾ 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 2 회 세척한 후 원심분리하여 세포 침전물을 만들었다. 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액을 200 μ l 첨가하고 80°C에서 1 시간 동안 용해하였으며, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 합성 멜라닌(Sigma Co.)을 사용하여 작성된 표준 직선에서 구하고, 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하였다.

Tyrosinase 활성도 측정 - Tyrosinase 활성도는 Matinez-Esparza¹⁹⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 각 well의 세포를 원심분리하여 세포 침전물을 만들고, 100 μ l의 lysis buffer (1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate, 0.1 mM PMSF)를 가하였다. 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고 원심분리한 후 상층액을 취하여 효소용액으로 사용하였다. 100 mM sodium phosphate (pH 7.0) 용액 100 μ l에 시료인 효소

Table I. Extraction yield of *Cornis fructus* extracted with different solvents

Solvent	Extraction Yield g (w/w, %)
<i>n</i> -Hexane	4.8 (0.3)
Chloroform	9.9 (0.7)
Ethyl acetate	73.2 (4.9)
Methyl alcohol	663.1 (44.2)
Water	497.4 (33.2)

용액 50 μ l를 가하고 37°C에서 5 분간 보온하였다. 100 mM catechol 50 μ l를 넣은 후 ELISA reader로 37°C, 405 nm의 조건에서 흡광도의 변화를 1시간 동안 관찰하였다.

통계방법 - 실험결과는 평균 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's *t*-test를 이용하였다.

실험결과

산수유의 용매별 추출물의 수득율 - 산수유 1.5 kg에 용매를 넣고 상온에서 교반하며 연속추출법을 이용하여 각 추출물을 얻었다. 각 추출물을 0.4 m 필터로 여과한 후, 여과액을 증류기로 35°C에서 감압농축시킨 후 냉동 건조하여 건조중량을 얻었으며 각 용매별 수득율을 Table I에 나타내었다. 추출물의 수득율은 용매의 극성정도에 따라 수득율이 증가하였으며 수득율은 시료의 건조중량에 대한 추출물 함량의 백분비로 하였다.

산수유 메탄올 추출물이 세포생존율에 미치는 영향 - 산수유 메탄올 추출물이 B16/F10 melanoma 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 메탄올 추출물을 1 μ g/ml에서 300 μ g/ml까지 다양한 농도로 처리하고, 48 시간 배양한 후에 MTT 방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 메탄올 추출물에 의한 세포 생존율은 최고 300 μ g/ml 처리시에도 유의할만한 변화를 나타내지 않았다. 이 결과를 다시 확인하기 위하여 trypan blue 방법으로 메탄올추출물을 처리하고 세포수를 조사해본 결과도 MTT 방법의 결과와 마찬가지로 농도가 증가해도 유의할만한 변화를 나타내지 않았으며 또한 세포의 형태학적 변화를 관찰해 본 결과 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 2). 이상의 결과를 종합해 볼때 사용한 메탄올 추출물의 농도 범위는 세포증식이나 독성이 없는 것으로 사료된다.

메탄올 추출물이 tyrosinase활성에 미치는 영향 - Tyrosinase는 Cu와 결합한 효소로 동·식물, 미생물 및 사람 등에 널리 분포되어 있는 polyphenol oxidase로 멜라닌 합성 과정에서 속도를 제한하는 등 멜라닌합성의 주요한 조절적

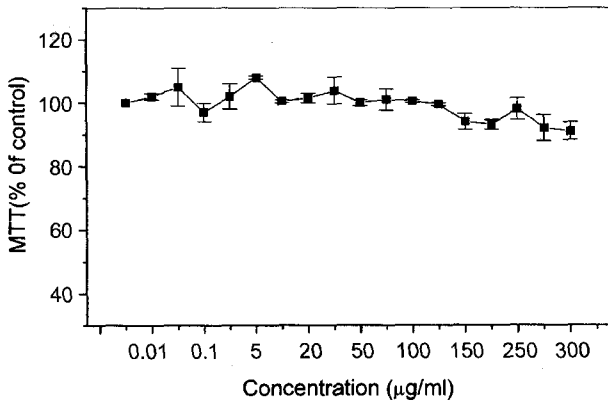


Fig. 1. Effect of methanol extract from *Cornis fructus* on the viability of B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Cornis fructus* for 48 h. The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % control and data were mean±S.E. of at least five determinations.

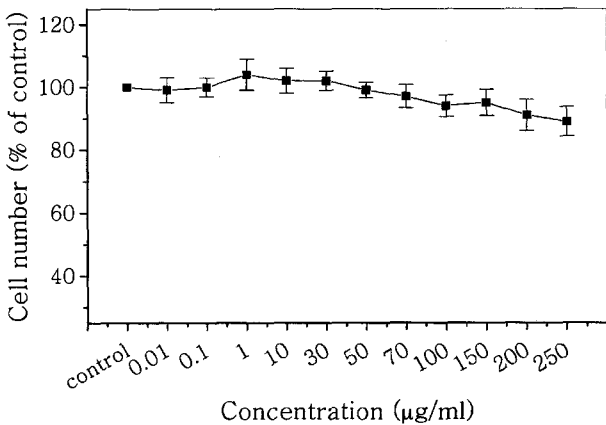


Fig. 2. Effect of methanol extract from *Cornis fructus* on the viability of B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Cornis fructus* for 48 h. The viability of the cells was measured by trypan blue test. Results were expressed as % control and data were mean±S.E. of at least five determinations.

단계를 나타내는 효소이다.²⁰⁾

산수유 메탄올 추출물이 tyrosinase활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 B16/F10 melanoma 세포에 메탄올 추출물을 농도별로 처리하고, 48 시간 배양한 후 tyrosinase 활성도를 측정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 메탄올 추출물들의 처리 양이 증가함에 따라 tyrosinase 측정값은 대조군에 비하여 모두 유의성 있는 증가를 보였다. 특히, 200 µg/ml 농도에서 메탄올 추출물 처리군이 대조군에 비하여 2.6 배의 증가를 보였으며, 전체적으로 첨가량이 증가함에 따라 대조군에 비하여 실험군에서 모두 통계적으로 유의성 있게

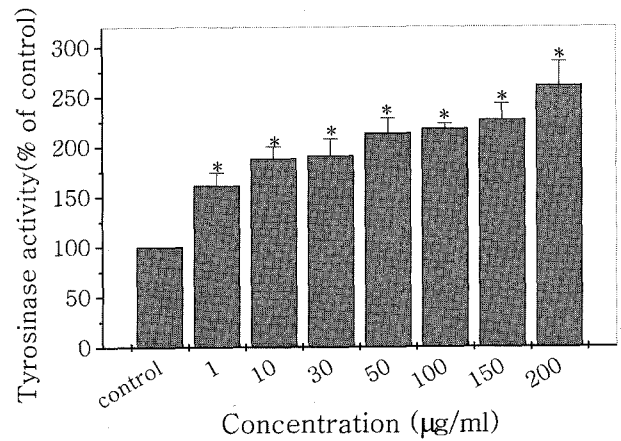


Fig. 3. Effect of methanol extract from *Cornis fructus* on tyrosinase activity and melanin contents in B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Cornis fructus* for 48 h. Results were expressed as % control and data were mean±S. E. of at least five determinations. Significantly different from control group (* $p < 0.01$).

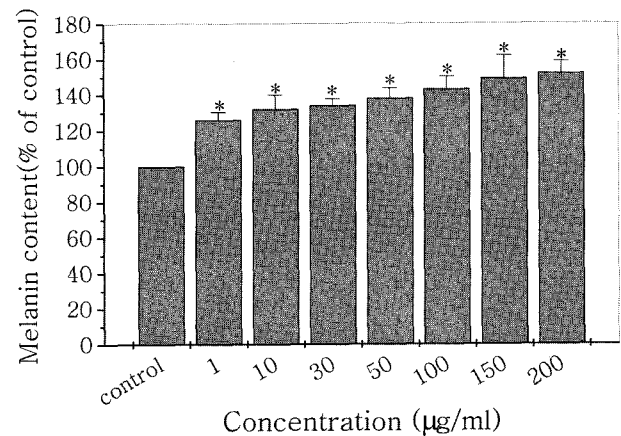


Fig. 4. Effect of methanol extract from *Cornis fructus* on melanin contents in B16/F10 melanoma cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of *Cornis fructus* for 48 h. Results were expressed as % control and data were mean±S.E. of at least five determinations. Significantly different from control group (* $p < 0.05$).

증가되는 경향을 보였다.

메탄올 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향 - 생체에서의 멜라닌 합성은 기질인 tyrosine이 tyrosinase에 의해 quinone과 indolquinone화합물들의 여러 중간체를 거쳐 멜라닌이 생성된다.²¹⁻²²⁾ 메탄올 추출물이 *in vivo*에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였다. B16/F10 melanoma 세포에 메탄올 추출물을 각각 1 µg/ml에서 200 µg/ml의 다양한 농

도로 처리하고 48 시간 배양한 다음 멜라닌 생성을 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 메탄올 추출물의 첨가량이 증가함에 따라 대조군에 비하여 실험군에서 모두 통계적으로 유의성 있게 증가하였다($p < 0.05$). 한편, 메탄올 추출물을 처리한 군들의 tyrosinase 활성과 멜라닌 양을 비교해 볼 때, 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 tyrosinase 활성은 메탄올 추출물 처리군이 대조군에 비하여 2.6배 증가하였으나 멜라닌 생성은 약 1.5배 증가하여, tyrosinase 활성이 멜라닌 양에 비하여 더 많이 증가하는 경향을 보였다. 이는 tyrosinase 활성이 멜라닌 생성되는 초기단계에서 크게 증가되는 반면에, 멜라닌은 다른 경로들도 많고 최종산물이므로 여러 단계를 거치므로 적게 만들어질 수 있으리라 사료된다.

이상의 결과를 종합해보면 산수유의 메탄올 추출물은 B16/F10 melanoma 세포에서 tyrosinase 활성을 증가시키고 멜라닌 합성을 증가시키므로써 멜라닌화를 촉진하는 작용이 있음이 확인되었으며, 앞으로 산수유의 메탄올 추출물에 의한 멜라닌 생성의 반응경로를 규명하고 그 주성분을 밝히는 연구가 진행됨으로써 산수유가 멜라닌 색소의 감소나 소실에 의해 유발되는 색소성 질병인 백반증 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

산수유 추출물이 피부의 멜라닌 색소 형성에 어떠한 영향을 나타내는지를 규명하기 위하여, B16/F10 melanoma 세포에 산수유의 메탄올 추출물을 처리한 후 세포의 생존율, 멜라닌 양의 변화 및 tyrosinase 활성도를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 메탄올 추출물은 B16/F10 melanoma 세포의 생존율에 영향을 거의 주지 않았다.
2. Tyrosinase 활성도는 메탄올 추출물 처리군 모두에서 통계적으로 유의한 증가를 보였다.
3. 멜라닌 생성은 tyrosinase 활성도와 마찬가지로 메탄올 추출물 처리군의 처리농도에 비례하여 증가하였으며, 모두 통계적으로 유의한 증가를 보였다.

감사의 말씀

본 연구는 BK 21 사업의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 김창민(1997) 중약대사전. 정담출판사 pp. 2667-2672.

2. 김재길(1995) 동양전통약물 원색도감, 도서출판 영림사, pp. 230.
3. 정진섭, 신민교(1998) 도해 생약대사전, 도서출판 영림사, pp. 448-449.
4. Yang, T. H., Liu, S. H. and Sun, M. H. (1971) Constituents of the fruits of *Cornus officinalis*. *Taiwan Yao Hsueh Tsa Chih*, 22-26.
5. Endo, T. and Taguchi, H. (1973) Study on the constituents of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc., *Yakugaku Zasshi*, **93**: 30-32.
6. Hatano, T., Ogawa, N., Kira, R., Yasuhara, T. and Okuda, T. (1989) Tannins of cornaceous plants. I. cornusins A, B and C. dimeric, monomeric and trimerichydrolyzable tannins from *Cornus officinalis* and orientation of valoneoyl group in related tannins. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 2083-2090.
7. Lee, S. H., Tanaka, T., Nonaka, G. I. and Nishioka, I. (1989) Sedoheptulose digallate from *Cornus officinalis*. *Phytochem.* **28**: 3469-3472.
8. Miyazawa, M. and Kameoka, H. (1989) Volatile flavor components of corni fructus. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 3337-3340.
9. Seo, K. I., Lee, S. W. and Yang, K. H. (1999) Antimicrobial and antioxidative activities of fructus extracts. *Kor. J. Postharvest Sci. Tec.* **6**: 99-103.
10. Gaw, H. Z. and Wang, H. P. (1949) Survey of Chinese drugs for presence of antibacterial substances, *Science*, **110**: 11-15.
11. Lee, E. B., Choi, B. C. and Cho, T. S. (1985) Pharmacological studies on ether fraction of *Corni fructus*. *J. Pharm. Soc. Kor.* **29**: 1-10.
12. Chun, H. J., Mun, Y. J., Kim, J. H., Kim, I. K., Jeon, B. H. and Woo, W. H. (2000) Effect of the aqueous extract of *Epimedium koreanum* Nakai on melanin formation in B16 mouse melanoma cell line. *J. Pharm. Soc. Kor.* **44**: 455-462.
13. Chun, H. J., Kim, I. K. and Woo, W. H. (2000) Inhibitory effects on retinoic acid and melanization of B16 melanoma cell by *Epimedium koreanum* Nakai and α -MSH. *J. Kor. Chem. Soc.* **44**: 533-537.
14. Chun, H. J., Choi, E. Y., Yoon, S. C., Nam, H. W. and Woo, W. H. (2001) Inhibitory effects of *Atractylodes Rhizoma alba* on melanin biosynthesis *J. Pharm. Soc. Kor.* **45**: 269-275.
15. Chun, H. J., Hwang, S. G., Lee, J. S., Baek, S. H., Jeon, B. H. and Woo, W. H. (2002) Inhibitory effect of butyl alcohol extract from *Caesalpinia sappan* L. on melanogenesis in melan-a cells *Kor. J. Pharmacogn.* **33**: 130-136.
16. Chun, H. J., Choi, W. H., Baek, S. H. and Woo, W. H. (2002) Effect of quercetin on melanogenesis in melan-a melanocyte cells *Kor. J. Pharmacogn.* **33**: 245-251.
17. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods* **65**: 55-63.
18. Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. (1985) Regulation

- of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α -25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**: 1474-1478.
19. Matinez-Esparza, M. (1998) Mechanisms and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **225**: 139-146.
20. Hearing, V. J. (1987) Mammalian monophenol monooxygenase, *Methods in Enzymol.* **142**: 152-165.
21. Hearing, V. J. (1999) Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *Soc. Invest. Dermatol.* **4**: 24-28.
22. Jimbow, K, Queredo, Jr. W. C, Prota, G, Fitzpatrick, T. B. (1999) Biology of melanocytes. In: Freedberg, I. M., Eisen, A. Z., Wolff, K. W. *et al.*, eds. *Dermatology in general medicine*, 5th ed. New York: McGraw-Hill Book, pp. 192-220.

(2003년 1월 18일 접수)