

## 해녀콩(*Canavalia lineata* THUNB. DC.) 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과

부희정·류기중\*·이선주†

제주대학교 자연과학대학 화학과, \*제주대학교 원예생명과학부

### Anti-melanogenesis Effect of *Canavalia lineata* Extract

Hee-Jung Bu, Key-Zung Riu\*, and Sunjoo Lee†

Department of Chemistry, Cheju National University, Ara-1, Jeju 690-756, Korea

\*Division of Horticultural Life Science

**요약** 피부에서 melanin은 자외선 차단에 주요한 역할을 한다. Tyrosinase는 멜라닌 생합성과정에서 초기 단계에 관여하는 중요한 효소로서 이것의 조절을 통한 피부 멜라닌화 억제에 관해 많은 연구가 되어져왔다. 본 연구에서는 해녀콩 추출물에서 mushroom tyrosinase 활성억제, B16F10 melanoma 세포를 이용한 dopa oxidase 활성억제 및 멜라닌 합성 억제 효과를 확인하였다. Tyrosinase mRNA 발현에서의 억제 효과를 확인하기 위하여 RT-PCR을 이용하였으며, CHCl<sub>3</sub> 층에서 분리해낸 A 분획에서 tyrosinase mRNA 발현을 억제시킴을 확인하였다.

**Abstract:** Melanin pigmentation in human skin is a major defensive mechanism against ultraviolet light of the sun. Tyrosinase plays a key role in the biosynthesis of melanin. This is why many researches have been focused on regulations in controlling the epidermal melanization. We found that extract of *Canavalia lineata* inhibits mushroom tyrosinase activity, dopa oxidase activity, and melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. To elucidate mRNA level reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique was used. It was revealed that A subfraction of CHCl<sub>3</sub> extract of *Canavalia lineata* reduced the tyrosinase mRNA expression of B16F10 melanoma cells by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique.

**Keywords:** *Canavalia lineata* THUNB. DC., tyrosinase, dopa oxidase, melanogenesis, melanin content

### 1. 서 론

인간의 피부 색깔은 환경, 인종, 성별 등의 요인과 멜라닌(melanin), 카로틴 및 헤모글로빈 양과 같은 여러 가지 요인에 의해 결정되지만 피부의 과색소 침착과 관련된 주요한 원인은 표피 내에서의 멜라닌 색소의 이상적 증가에 기인한다. 멜라닌은 동식물계에 널리 존재하는 생체 고분자물질로서 자외선을 흡수 또는 산란시켜 자외선으로부터 피부가 손상되는 것을 방지하는데 큰 역할을 한다[1,2]. 반면 과도한 자외선에의 노출은 색소 침착 뿐만 아니라 멜라닌 전구물질 등에 의한 독성으로 인한 세포 사멸 등 부정적인 기능도 가지고 있다[3]. 산업의 발달에 따른 환경오염의 영향으로 오존층 파괴가 일어나고 그로 인한 자외선 증가는 피부에 화상, 기미, 주근깨와 같은 색

소 침착, 피부 노화, 피부암까지도 유발할 수 있다[5,6]. 기미와 주근깨 같은 과색소 침착은 표피내의 멜라닌 생성 및 분포가 증가되면서 나타나는 질환이다. 멜라닌은 멜라닌생성세포(melanocyte) 내의 독특한 소기관인 멜라노좀(melanosome)에서 만들어지며, melanosome에는 멜라닌 생합성효소로 있는 타이로시네이즈(tyrosinase) 효소에 의해 도파와 도파퀴논으로 전환되고 이후 타이로시네이즈 관련 단백질인 TRP-1 (5,6-dihydroxy lindole-2-carboxylic acid oxidase)과 TRP-2 (dopachrome tautomerase)의 작용과 자동산화과정을 통해 멜라닌이 형성된다. 생성된 멜라닌은 표피를 구성하고 있는 각질세포로 전이되어 피부색이 표현되므로 melanocyte는 표피세포 kerationcyte와 밀접한 세포 간 정보망을 구성하고 있다.

콩과 식물인 해녀콩은 제주도에서 자생하는 식물로 주로 가축사료로 사용되어왔다. 현재 해녀콩에 대한 활성 성분 검색은 연구되어 있지 않은 상태로 본 연구에서는

† 주 저자 (e-mail: sunjoo@cheju.ac.kr)

해녀콩의 미백효과에 대한 탐색을 위하여 타이로시네이즈 활성 저해 실험과 B16F10 melanoa cell line을 이용하여 최종 멜라닌 생성물 억제 효과 및 RT-PCR을 이용하여 tyrosinase gene에서의 억제 효과를 검증하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 시료추출

제주도에서 자생하고 있는 해녀콩을 2003년 10월 중순경 채집하여 마쇄기로 갈아 MeOH로 3회 교반 추출 후 감압 농축하였다. 농축한 MeOH 추출물을 물에 현탁시킨 후 비극성 용매부터 순차적으로 hexane, chloroform (CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (EtOAc), butanol (BuOH), H<sub>2</sub>O을 사용하여 용매 분획하였다. 여기서 얻은 각각의 분획물들은 일차적으로 타이로시네이즈 활성 억제 효과를 측정하였으며, 그 중 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc 분획층에서 우수한 효과를 보여 TLC와 column을 통해 CHCl<sub>3</sub> 용매 분획층에서 6개의 분획과 EtOAc 용매 분획층에서 5개의 분획을 얻어 실험에 사용하였다.

### 2.2. 세포 및 시약

B16F10 melanoma cell line은 KCLB (Korean Cell Line Bank)로부터 분양 받아 100 units/mL penicillin-streptomycin 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 5~7일에 한번씩 시행하였다. Tyrosinase와 tyrosinase 그리고 합성 멜라닌, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich사(USA)의 것을 구입하여 사용하였다. RT-PCR에 사용된 시약은 iNtRON (Korea)과 promega (USA) 제품을 이용하였다.

### 2.3. Tyrosinase 활성도 실험

Tyrosinase 저해활성은 dopachrome 방법을 이용하여 UV/Vis 분광광도계로 측정하였다[7]. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 450 µL, 시험시료 25 µL, mushroom tyrosinase (1500 U/mL~2000 U/mL)액 25 µL, 1 mM tyrosinase액 30 µL 섞어서 37°C에서 15 min 반응시켰다. 그리고 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.4. 세포의 Viability 측정(MTT assay)

MTT 정량은 Mosmann의 방법을 변형하여 실시하였다[8]. B16F10 cells (1.0 × 10<sup>5</sup> cells/mL)을 96 well plate에 200 µL 넣고 cell을 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에 전 배양(overnight)시키고, 부착된 cell에 시료를 처리한 후 4일간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다. 배양된 세포에 MTT (50 mg/mL) 시약을 처리(0.1 mg)하여 형성된 for-

mazan을 DMSO로 녹인 후 540 nm에서 ELISA로 측정하여 대조군과 비교하였다.

### 2.5. DOPA-oxidase 활성 측정

멜라닌 생성과정 중 도파에서 도파퀴논으로 전환될 때 참여하는 dopa oxidase 활성억제정도를 cell lysate를 이용해 측정하는 방법을 이용하였다. B16F10 cells (1.0 × 10<sup>5</sup> cells/mL)를 culture plate에 seeding (3 mL)하여 전 배양하고, 4일간 sample 처리한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다. Plate의 배지 제거 후 세포를 수확하여 세포 수를 2.0 × 10<sup>5</sup> cells/mL로 조정하고 1 mM L-Dopa가 든 cell lysis buffer 100 µL를 넣고 2 h 동안 37°C에서 반응시킨 후 450 nm에서 ELISA로 측정하여 대조군과 비교하였다[9].

### 2.6. 멜라닌 양 측정

해녀콩 추출물의 멜라닌 생성 억제 정도를 melanoma cell을 이용하여 최종 생성되는 멜라닌 생성 억제 정도를 Gordon PR 방법을 수정하여 측정하였다[9]. B16F10 cells (1.0 × 10<sup>5</sup> cells/mL)에 시료를 dopa oxidase 활성 억제 실험 방법과 동일하게 처리한 후 세포수를 2.0 × 10<sup>5</sup> cells/mL로 조정하여 1 N NaOH 200 mL를 넣고 95°C에서 5 min간 멜라닌을 녹인 후에 450 nm에서 ELISA로 측정하여 대조군과 비교하였다. 합성 멜라닌을 이용하여 standard solution을 만들고 sample과 standard solution을 96 well plate에 넣고 흡광도를 측정한다. 멜라닌 농도는 합성 멜라닌으로 작성된 표준 농도 곡선으로부터 결정하였다.

### 2.7. RT-PCR

B16F10 melanoma cell (5 × 10<sup>5</sup> cells/dish)을 전 배양하고, 시험시료가 들어있는 새 배지로 교환하여 4일간 배양한 후, 세포로부터 easy-BLUE total RNA extraction kit (Korea)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 1 µL의 total RNA를 oligo (dT)<sub>18</sub> primer, dNTP (0.5 µM), 1 unit RNase inhibitor, M-MuLV reverse transcriptase (2U)로 70°C 5 min, 4°C 5 min, 25°C 5 min, 37°C 60 min, 그리고 70°C에서 10 min heating시켜 cDNA를 합성하였다. Polymerase chain reaction (PCR)은 합성된 cDNA로부터 β-actin과 tyrosinase 증폭시키기 위하여 2 µL cDNA, 10 × buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 250 µM dNTP, 1 unit Taq polymerase (Promega, USA)를 증류수로 전체를 25 µL로 맞춘 후 94°C에서 45 s간 denaturation, 60°C에서 45 s간 annealing, 72°C에서 90 s간 extension을 35 cycles 수행하여 amplification하였다. 반응에 사용된 primer는 Tyrosinase: upstream 5'-GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT-3'

**Table 1.** Inhibitory Effect of Several Fractions of *Canavalia lineata* Mushroom Tyrosinase (A) and Dopa Oxidase Activity (B) *in vitro*

Fractions	Inhibition effects (%) on tyrosinase activity	Inhibition effects (%) on dopa oxidase activity
Arbutin	49 ± 2	46 ± 1
MeOH	53 ± 1	23 ± 1
Hexane	-7 ± 0.2	14 ± 0.1
CHCl <sub>3</sub>	51 ± 0.1	22 ± 0.4
EtOAc	64 ± 0.1	38 ± 1
BuOH	66 ± 1	25 ± 1
Residue	10 ± 1	18 ± 1

A: Using mushroom tyrosinase assay were carried out with tyrosin as substrate dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8), and each extract was added 50 µg/mL.

B: 16F10 melanoma cells treated for 4 days with dose of several subfractions of *Canavalia lineata* as described materials and methods. Results are expressed as percentages of control and data reported are mean ± SD of at least three independent experiments done in duplicate. The tested concentration was 100 µg/mL.

downstream 5'-TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC-3', actin: upstream 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3' downstream 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'로 Bioneer (Korea)에서 합성한 것을 구입하여 사용하였다.

**3. 결과 및 고찰**

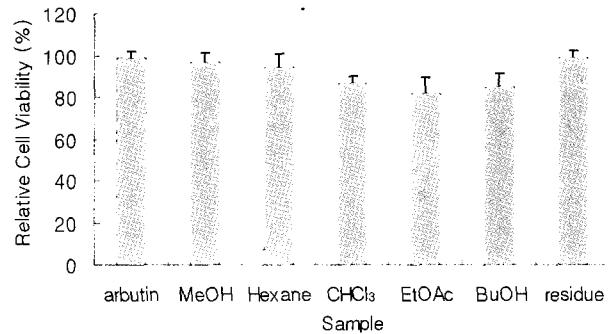
해너콩에서 추출한 성분들의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 mushroom tyrosinase 효소의 활성 억제 효과와 B16F10 melanoma cell에서의 dopa oxidase 억제 효과, 멜라닌 최종 산물의 억제 그리고 세포 생존률을 확인하였다.

**3.1 Tyrosinase 활성 억제 효과**

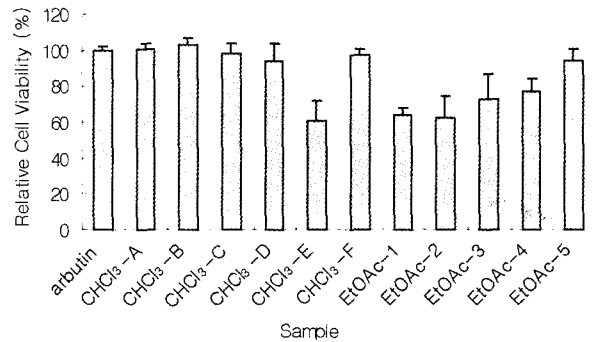
시료의 미백 효과에 대한 일차적 검색을 위하여 우선적으로 해너콩 메탄을 추출물로부터 hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, BuOH, H<sub>2</sub>O의 용매를 이용하여 순차적으로 분리한 용매 분획들의 효소 활성 억제를 조사하였다. 그 결과 대조군으로 사용된 arbutin (49.34%)에 비해 BuOH층(66.36%), EtOAc층(64.31%), CHCl<sub>3</sub>층(51.02%)이 좋은 효과를 보였고, 그 결과는 Table 1에 정리하였다.

**3.2. 멜라닌 세포내에서 Dopa-oxidase 활성 억제 효과**

Tyrosinase는 멜라닌 생성 초기에 작용하는 효소로서 melanosome 내에서 tyrosine을 산화시켜 dopa를 만드는



**Figure 1.** Effect of several fractions of *Canavalia lineata* on proliferation of B16F10 melanoma cells. The tested concentration was 100 µg/µL.

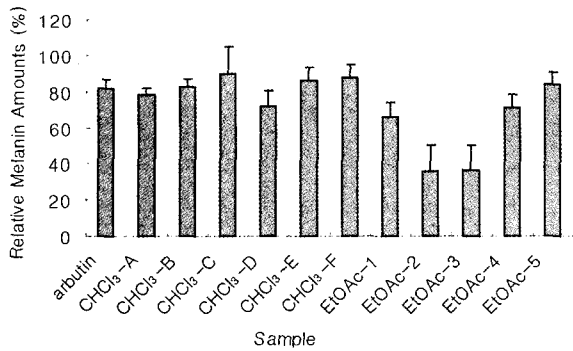


**Figure 2.** Effect of several subfractions of CHCl<sub>3</sub> fraction and EtOAc fraction of *Canavalia lineata* on proliferation of B16F10 melanoma cells. The tested concentration was 100 µg/µL.

tyrosinase hydroxylase로, dopa를 산화시켜 dopaquinone을 만드는 dopa oxidase로서 작용하여 melanin polymer를 합성하는데 key enzyme으로 작용한다[10]. 따라서 멜라닌 세포를 이용하여 dopa oxidase 활성 억제 효과를 각 분획물을 이용하여 측정함으로써 tyrosinase 효소의 활성 억제를 확인하였다. 실험결과는 Table 1에 정리하였으며, 각 분획물들의 dopa oxidase 억제 효과는 EtOAc층(38.06%)에서 가장 좋았으며, BuOH층(24.91%), CHCl<sub>3</sub>층(21.80%)이 억제 효과를 나타내었다.

**3.3. 세포의 증식에 미치는 효과**

B16F10 melanoma 세포에 해너콩 용매 분획물을 100 µg/mL로 처리하고 세포 증식에 미치는 효과를 측정하였다. 그 결과 mushroom tyrosinase 효소 활성과 dopa oxidase 활성 억제 효과가 제일 좋았던 EtOAc층(18.19%)이 가장 세포 증식 억제를 보였고, 그 다음으로 효과가 좋았던 BuOH층(14.84%)과 CHCl<sub>3</sub>층(13.3%)으로 효소 억제 효과가 좋았던 순서대로 세포 증식을 억제함을 확인할 수



**Figure 3.** Effect of several subfractions of CHCl<sub>3</sub> fraction and EtOAc fraction of *Canavalia lineata* on melanin contents of B16F10 melanoma cells. The tested concentration was 100 µg/µL.

있었다(Figure 1). CHCl<sub>3</sub>층에서 얻은 6개의 분획들 중에서는 100 µg/mL의 농도로 시료를 처리한 결과, E (38.84%)를 제외하고는 비교적 독성이 낮거나 오히려 세포 증식을 시키고 있음을 확인할 수 있었다. EtOAc층에서 분리한 분획에서는 5번(6.24%)을 제외하고 모든 분획에서 비교적 높게 세포증식을 억제하고 있음을 확인할 수 있었다(Figure 2).

### 3.4. 멜라닌 생성에 미치는 영향

생체에서의 멜라닌 합성과정은 tyrosinase 효소 활성 작용을 시작으로 연속적인 산화가 진행된 후 각 생성물의 중합반응에 의해 이루어진다[11]. CHCl<sub>3</sub>층과 EtOAc층에서 분리한 분획의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였다. B16F10 melanoma 세포에 각 분획물들을 100 µg/mL로 처리하여 4일 배양한 후 멜라닌 생성을 측정하였다. Figure 3에서 보는 바와 같이 대조군인 arbutin (21.75%)에 비하여 CHCl<sub>3</sub>층의 A와 D에서 좋은 효과를 보였고, EtOAc층에서 분리한 2(64.38%), 3(63%), 1(34.25%), 4(28.88%) 분획에서 좋은 효과를 나타내었다.

### 3.5. Tyrosinase Gene Transcription 억제 효과

RT-PCR 분석에 따른 해너콩 추출물의 tyrosinase mRNA expression 억제 효과를 확인하였다. 세포증식을 억제하지 않으면서도 효소 활성 억제와 melanin 생성이 억제되었던 CHCl<sub>3</sub>층에서 분리한 A와 D 분획물을 100 µg/mL의 농도로 처리하여 tyrosinase gene 억제 효과를 확인하였다(Figure 4). 그 결과 A 분획층에서 대조군으로 사용된 kojic acid나 arbutin보다 우수한 저해 효과를 보였고, D 분획인 경우도 대조군들과 비슷한 수준으로 tyrosinase gene을 억제하고 있음을 확인할 수 있었다. 멜



**Figure 4.** Result of RT-PCR for tyrosinase gene expression. B16F10 murine melanoma cells were incubated with kojic acid (lane 1), arbutin (lane 2), none (lane 3), subfraction A of CHCl<sub>3</sub> extract (lane 4) and sunfraction D of CHCl<sub>3</sub> extract (lane 5) for 4 days. RT-PCR for tyrosinase gene was performed on RNA extracts. The tested concentration was 100 µg/mL.

라닌 양 측정에서 D 분획층이 A보다 생성억제를 더 함에도 불구하고 tyrosinase mRNA expression 수준에서는 A 분획보다 효과가 낮게 나타남을 확인할 수 있었다. 이것은 멜라닌 생성에 관여하는 다른 D 분획물이 tyrosinase가 아닌 TRP-1이나 TRP-2 등의 다른 유전자에 작용하여 최종 멜라닌 생성에 관여하기 때문으로 판단된다.

## 4. 결 론

기능성 미백 화장품에 대한 연구는 동양인들에게는 예로부터 고운 피부에 대한 선망도와 관련하여 중심적으로 연구 개발되는 분야이다. 현재 웰빙의 붐과 함께 자연적인 소재의 활용과 수요는 여러 분야에서 더욱 늘어가고 있고, 화장품에서도 천연물 유래의 소재를 이용하려는 소비자의 욕구가 늘어가고 있다.

연구에 사용된 해너콩은 제주도에서 자생하고 있는 식물로서 현재까지 그 활성성분에 대한 연구는 거의 연구되지 않았다. 따라서 본 연구자는 그동안 콩과 식물에서 여러 유효한 활성 성분에 대한 연구가 되어진 것에 기인하여 제주에서 자생하고 있는 해너콩의 추출물을 이용하여 미백 효과 검색에 따르는 실험 방법으로 효능을 검증하였다.

Mushroom tyrosinase 활성 억제 효과를 보이면서 세포내에서 독성이 없고 멜라닌 최종 생성 양이 감소하는 것을 확인함으로써 미백 효능을 갖는 물질이 CHCl<sub>3</sub>층에서 분리한 A 분획에 속해 있음을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 미백효과는 RT-PCR을 통해 tyrosinase mRNA 발현을 억제함으로써 나타나고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 CHCl<sub>3</sub>층에서 분리한 분획 A의 멜라닌 생성 억제 효과는 멜라닌 생성 과정에서 초기 단계에 관여하는 tyrosinase 효소 활성을 감소시킴으로써 나타남을 알 수 있었다.

현재 환경오염에 따른 피부질환의 문제가 많이 대두되면서 미백제에 대한 관심이 날로 증가하고 있다. 특히 천연물 유래의 친피부적 성분에 대한 연구가 많이 진행되고 있는 상황에서 해너콩에서 추출한 성분들은 좋은 미

백 원료로서 사용할 수 있는 가능성을 예측할 수 있었다. 본 연구에서는 아직 활성 성분의 *in vivo* 실험을 거치지 않은 상태로 임상적인 연구가 뒷받침된다면 피부 미백제 연구에 있어 훌륭한 소재의 개발이 이루어지리라 여겨진다.

### 감사의 말씀

본 연구는 2003년 산업자원부 지역산업기술개발사업의 연구비 일부와 제주대학교 아열대원예산업연구센터(RRC)의 2004년 아열대 식물 유전자 연구의 학술연구비, 2004년 과기부 과학재단지정 특수연구소재은행 아열대/열대 생물유전자은행의 연구비 일부지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고 문헌

1. Y. Mishima, S. Hatta, and Y. Ohyama, Induction of melanogenesis suppression: cellular pharmacology and mode of differential action, *Pigment Cell Res.*, **1**, 367 (1988).
2. H. Matubara, Inhibitory effect of lichen metabolites and their synthetic analogues on melanin biosynthesis in cultured B-16 mouse melanoma cells, *Natural Product Sciences*, **4**, 3 (1998).
3. B. W. Choi, B. H. Lee, K. J. Kang, E. S. Lee, and N. H. Lee, Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants, *Kor. J. Pharmacogn.*, **29**, 3 (1998).
4. S. Pavel, Dynamics of melanogenesis intermediate, *J. Invest. Dermatol.*, **162** (1993).
5. B. A. Gilcherst, S. Zhai, M. S. Eller, D. B. Yarosh, and R. M. Yaa, Treatment of human melanocytes and S91 melanoma cells with the DNA repair enzyme T4 endonuclease V enhances melanogenesis after ultraviolet irradiation, *J. Invest. Dermatol.*, **101**, 666 (1993).
6. V. J. Hearing, Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): Purification, properties, and reaction catalyzed, *Methods in Enzymology*, **142**, 154 (1987).
7. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods*, **65**, 55 (1983).
8. K. Meada and M. Fukuda, *In vitro* effectiveness of whitening cosmetic components in human melanocyte, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**, 361 (1991).
9. P. R. Gordon, C. P. Mansur, and B. A. Gilchrest, Regulation of human melanocyte growth, dendricity and melanization by keratinocyte derived factors, *J. Invest. Dermatol.*, **2**, 566 (1989).
10. V. J. Hearing, Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization, *Soc. Invest. Dermatol.*, **4(1)**, 24 (1999).
11. M. Eisinger and O. Marko, Selective proliferation of normal human melanocytes *in vitro* in the presence of phorbol ester and cholera toxin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 2018 (1982).