

도깨비부채 뿌리 추출물의 멜라닌 생성억제효과

최상윤* · 강난주** · 김호철***†

*한국식품연구원, **경희대학교 동서의학대학원, ***경희대학교 한의과대학

Inhibitory Effects of Root Extracts on Melanin Biosynthesis in *Rodgersia podophylla* A. Gray

Sang Yoon Choi*, Nan Ju Kang**, and Ho Cheol Kim***†

*Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea.

**Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea.

***Oriental Medical College, Kyunghee University, Seoul 130-701, Korea.

ABSTRACT : *Rodgersia podophylla* was a native medicinal plant cultivated in Korea. During the search for a new whitening natural herb, we found that underground part of *Rodgersia podophylla* showed inhibitory activity against melanin biosynthesis in melan-a cells by brocking tyrosinase activity. In addition, this plant exhibited protective effect on UV-B region. These results suggest that underground part of *Rodgersia podophylla* might be used as whitening agent for the skin.

Key words : *Rodgersia podophylla*, melanogenesis, tyrosinase

서 언

멜라닌은 동·식물계에 널리 존재하는 고분자의 천연색소로서 사람의 피부에서는 자외선 조사 등에 의한 피부손상에 대항하는 기작으로 생합성이 촉진된다 (Yoneta *et al.*, 2004; Paramonov *et al.*, 2002). 멜라닌 색소는 피부를 보호하는 긍정적인 면을 갖고 있으나 이의 과잉생성은 기미, 주근깨, 피부반점 등을 유발하며 멜라닌 전구물질의 독성으로 인한 세포의 사멸 및 피부암 생성이 촉진되기도 한다 (Chun *et al.*, 2001; Urabe *et al.*, 1994). 멜라닌 생합성에 관여하는 주요효소로는 tyrosinase가 대표적으로 알려져 있으며 이 효소는 tyrosin을 기질로 하여 L-dopaquinone으로 전이되는 초기 생합성 과정과 이후의 dihydroxyindole의 산화에 작용한다 (Iozumi *et al.*, 1993; Aroca *et al.*, 1993). 따라서 tyrosinase 활성억제제를 찾는 연구가 미백제의 개발에 있어서 중요한 부분을 차지하고 있고 현재까지 밝혀진 tyrosinase 활성억제제로는 kojic acid, arbutin, oxyresveratrol, catechin, hydroquinone 등이 있으며 (Cabanes *et al.*, 1994; Shin *et al.*, 1998) 천연자원으로는 느릅나무, 울피, 음양곽, 인진쑥 등이 보고 되었다 (Chun *et al.*, 2000; Chun *et al.*, 2001). 특히, 최근 동양권의 생활수준 향상과 더불어 천연물에 대한 인식이 새로워짐에 따라 천연물을

이용한 미백제의 개발과 관련된 연구가 활발히 진행 되어지고 있다.

도깨비 부채는 범의귀과에 속하는 여러해살이풀로써 경기도 이북지역에 자생한다. ‘담룡전’이라는 이름의 한약재로 쓰이는 이 식물은 발열증상에 해열의 목적으로 쓰여 왔다 (Ahn, 1998). 본 연구에서는 도깨비 부채 뿌리 추출물의 멜라닌 생성억제 효과를 발견하여 이를 보고하는 바이다. 미백효과의 검증에는 melan-a 세포주에서의 세포독성과 멜라닌 생성량에 미치는 영향, tyrosinase 활성에 미치는 영향, UV 흡수도 측정 등을 측정하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 조제

본 연구에서 사용된 식물시료는 2004년 경기도 포천에서 채취된 도깨비 부채의 뿌리로써 경희대학교 한의과대학 본초학 교실로부터 검정을 받아 사용하였다. 3일간 음건한 뿌리 94 g 을 분쇄하여 메탄올을 가한 후 1시간씩 3회 초음파를 이용하여 추출하였다. 얻어진 추출액을 여과한 후, 완전 감압 농축하여 3.77 g (수율: 4.0%)의 잔사를 얻고 -20°C에 보관하면서 시료로 사용하였다.

†Corresponding author: (Phone) +82-02-961-0419 (E-mail) hckim@khu.ac.kr

Received October 10, 2005 / Accepted January 20, 2006

Table 1. Effects of *Rodgersia podophylla* root extract on cell viability and melanin production in melan-a cells.

Samples	Concentrations (ppm)	Melanin production (%)	Cell viability (%)
<i>Rodgersia podophylla</i> Root Extract	1	100.4 ± 0.7	99.2 ± 4.7
	10	95.8 ± 1.1	95.2 ± 2.2
	100	75.4 ± 3.5	99.1 ± 0.6
Kojic acid	1	98.8 ± 0.9	97.2 ± 2.5
	10	93.2 ± 2.0	96.4 ± 3.7
	100	83.3 ± 4.0	86.9 ± 1.8

Viability and melanin content of vehicle was set to 100%. Each value represents the mean ± S.E. of three experiments.

2. 세포배양

마우스 유래의 melan-a 세포는 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin, 200 nM의 phorbol-12 myristate 13-acetate가 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

3. 세포생존율 측정

24 well plate에 1×10⁵개의 세포를 접종하고 24시간동안 배양한 후 용매 (propylene glycol/EtOH/H₂O = 5/3/2)에 녹인 10 μl의 검색시료를 3일간 처리하였다. 마지막 처리 후 24시간 동안 배양하고 배지를 제거 한 후 세포를 PBS로 세척하였다. Well 당 crystal violet (0.1%, 10% 에탄올에 녹임) 200 μl 를 첨가하고 5분간 상온에서 배양하여 살아있는 세포를 염색하였다. 염색된 세포를 증류수로 2번 세척한 후 1 ml의 에탄올을 첨가하고 10분간 교반하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 멜라닌 생성량의 측정

위에서 기술한 방법과 같이 세포에 3일간 시료 처리 후 배지를 제거하고 세포를 PBS로 세척하였다. 각 well 당 1 ml의 1 N NaOH를 가하고 교반한 후 400 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Melan-a 세포로부터 tyrosinase의 추출

Melan-a 세포를 각 culture dish에 가득 키운 후, 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. 각 dish에 lysis buffer (67 mM sodium phosphate buffer, 1% Triton X-100, 0.1 mM phenyl-methyl sulfonyl fluoride)를 100 μl 첨가한 후 세포를 수집하여 ultra sonication하였다. 이를 1시간 동안 방치한 후 12,500 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻어진 상층액을 단백질 정량하여 효소용액으로 사용하였다.

6. Tyrosinase 활성억제도 측정

Tyrosinase 활성억제도는 67 mM phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 8.0 mM의 L-Dopa 120 μl와 여러 농도로 메탄올에

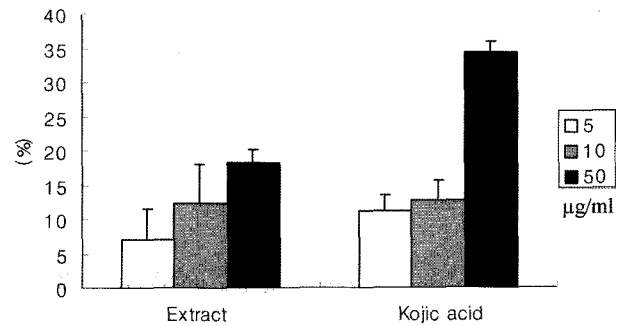


Fig. 1. Inhibitory effects of *Rodgersia podophylla* root extract on melan-a cell originated tyrosinase.

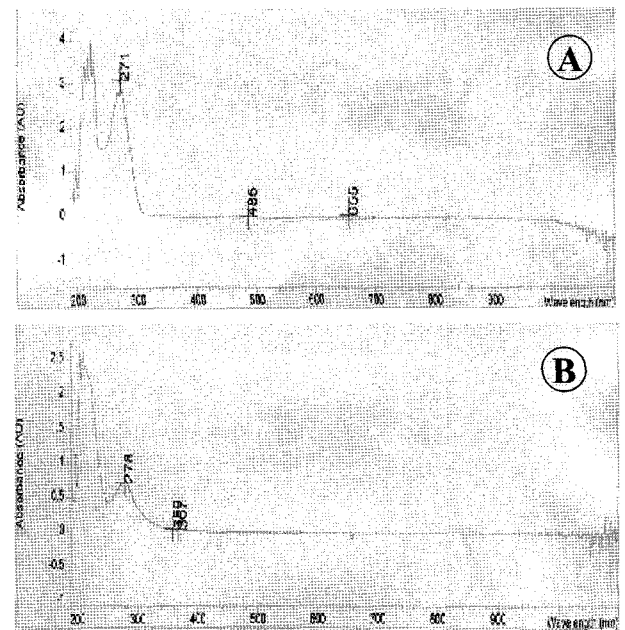


Fig. 2. Absorption abilities at UV-A (350-370 nm) and UV-B (270-290 nm) region A: Kojic acid 100 μg/ml, B: *Rodgersia podophylla* root extract 100 μg/ml.

녹인 검색시료 40 μl를 96-well microplate에 넣은 후 67 mM phosphate buffer (pH 6.8)에 녹인 효소용액 (단백질 함량이 50 μg/ml로 희석된 melan-a 추출용액) 40 μl를 첨가하여 37°C에서 30분간 배양한 후 생성된 dopachrome의 양을 490 nm에서 측정하였다.

7. UV 흡수도 측정

시료를 100 μg/ml 농도로 메탄올에 녹여 200 nm ~ 600 nm에서의 UV 흡수도 분포를 측정하였다.

8. 통계방법

각 실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며 Student's t-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 세포생존률 및 멜라닌 생성량에 미치는 영향

Melan-a 세포주는 마우스 유래의 멜라닌 생성세포로서 멜라닌을 생합성 한다 (Bennett *et al.*, 1987). 도깨비 부채 뿌리 추출물이 melan-a 세포주의 세포 생존율과 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 3일간 처리한 결과 세포생존률의 큰 변화 없이 멜라닌 생성량을 각각 99.2%, 95.2%, 75.4%으로 농도 의존적으로 감소시켰다. 이 결과는 멜라닌 생성은 줄이면서 세포독성은 낮아야 하는 미백제로써의 기준에 도깨비 부채 뿌리 추출물이 부합하는 것으로 판단되어진다. 한편 대조물질로써 사용된 kojic acid는 농도에서 약간의 세포독성을 나타냈다.

2. Tyrosinase 활성에 미치는 영향

도깨비 부채 뿌리 추출물이 melan-a 세포에서 멜라닌 생성량 감소효과를 보인 원인을 알아보기 위하여 멜라닌 생합성에 관여하는 주요효소인 tyrosinase에 대한 영향을 측정하였다. 도깨비 부채 뿌리 추출물을 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가하여 tyrosinase 활성억제도를 측정한 결과 각각 7.1%, 12.3%, 18.2%를 나타내어 대조물질인 kojic acid 보다는 저해도가 낮으나 농도 의존적으로 저해도가 높아지는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과로 볼 때 melan-a 세포주에서의 도깨비 부채 뿌리 추출물에 의한 멜라닌 생성 감소효과는 tyrosinase 활성 억제에 의한 것이 주요한 원인중의 하나로 판단된다.

3. UV 영역에서의 흡수도

도깨비 부채 뿌리 추출물의 UV-B 영역 (270 nm~290 nm)과 UV-A 영역 (350 nm~370 nm)에서의 흡수도 (Matsuda *et al.*, 1996)를 측정한 결과 UV-B 영역인 278 nm에서 특징적인 흡수 피크를 나타내었다. 자외선 영역 중 UV-A는 파장이 길어 피부 진피층 까지 침투되어 즉시형 색소침착을 일으키며 UV-B는 파장이 짧고 에너지가 높아 일광화상을 일으키며 자외선 노출 후 72시간 후에 색소침착이 일어나는 지연성 색소침착을 일으킨다. 따라서 도깨비 부채 뿌리 추출물을 피부에 도포시 피부로 투과되는 UV-B 영역의 자외선을 흡수하여 일광화상 및 지연성 색소침착을 감소시키는 효과를 기대할 수 있다.

적 요

도깨비 뿌리 추출물의 멜라닌 생성 억제효과를 검증하기 위하여 melan-a 세포주에서의 세포독성 및 멜라닌 생성량을 측정하고 멜라닌 생합성에 관여하는 주된 효소인 tyrosinase의 활성에 미치는 영향과 자외선에 대한 흡수도를 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 도깨비 뿌리 추출물을 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 melan-a 세포에 처리시 뚜렷한 독성 없이 멜라닌 생성을

24.6% 감소시켰으며 melan-a 세포로부터 추출된 tyrosinase 활성억제 효과실험에서 농도 의존적인 활성억제 효과를 보였다. 또한 도깨비 뿌리추출물은 일광화상의 원인인 UV-B 영역의 자외선을 흡수하였다. 이상의 결과를 바탕으로 볼 때 도깨비 부채 뿌리 추출물은 피부 미백 및 자외선 차단을 목적으로 하는 기능성 원료로써의 높은 활용 가능성을 가지는 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 농림부 농림기술개발연구사업의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Ahn DK (1998) Illustrated book of Korean medicinal herbs. Kyo-Hak Press. Seoul. p. 773.
- Aroca P, Urabe K, Kobayashi T, Tsukamoto K, Hearing VJ (1993) Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem.* 268:25650-25655.
- Bennett D, Cooper P, Hart I (1987) A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumor promoter for growth. *Int. J. Cancer* 39:414-418.
- Cabanes J, Chazara S, Garcia CF (1994) Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* 46:982-985.
- Chun HJ, Mun YJ, Kim JH, Kim KI, Jeon BH, Woo WH (2000) Effect of the aqueous extract of epimedium koreanum nakai on melanin formation in B16 mouse melanoma cell line. *Yakhak Hoeji.* 44:455-462.
- Chun HJ, Ahn BY, Han JH, Woo WH (2001) Inhibitory effects of crude poly-saccharide of water extract of artemisia iwayomogi kitamura on melanin biosynthesis. *Yakhak Hoeji.* 45:701-707.
- Chun HJ, Jeong SI, Kim IK (2001) Effects of ethylacetate extract from ulmus davidiana var. japonica on melanogenesis. *Yakhak Hoeji.* 45:724-729.
- Chun HJ, Choi EY, Yoon SC, Nam HW, Back SH, Woo WH (2001) Inhibitory effects of ethanol extract of atractylodis rhizoma alba on melanin biosynthesis. *Yakhak Hoeji.* 45:269-275.
- Iozumi K, Hoganson GE, Pemella R, Everett MA, Fuller BB (1993) Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 100:806-811.
- Matsuda H, Higashino M, Nakai Y, Munekazu I, Kubo M, Lang F (1996) Inhibitory effects of some arctostaphylos plants on melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 19:153-156.
- Paramonov BA, Turkovskii II, Potokin IL, Yuriyova NA, Chebotarev VY (2002) Photoprotective activity of melanin preparations in human skin exposed to UV irradiation: dependence on previous photoexposure. *Bull. Exp. Biol. Med.* 134:366-369.
- Shin NH, Ryu SY, Choi EJ, Kang SH, Chang IM, Min KR,

- Kim Y** (1998) Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243:801-803.
- Urabe K, Aroca P, Tsukamoto K, Mascagna D, Paulumbo A, Prota G, Hearing VJ** (1994) The inherent cytotoxicity of melanin precursors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1221:272-278.
- Yoneta A, Yamashita T, Jin HY, Kondo S, Jimbow K** (2004) Ectopic expression of tyrosinase increases melanin synthesis and cell death following UVB irradiation in fibroblasts from familial atypical multiple mole and melanoma (FAMMM) patients. *Melanoma Res.* 14:387-394.