

교맥 에탄올 추출물의 피부 미백기전 연구

노성택 · 김대성 · 이성진¹ · 박대중² · 이장천² · 임규상 · 우원홍* · 문연자*

원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 1: 제3의학과, 2: 상지대학교 한의과대학 본초방제학교실

Study of Skin Depigmenting Mechanism of the Ethanol Extract of *Fagopyrum esculentum*

Seong Taek No, Dae Sung Kim, Seong Jin Lee¹, Dae Jung Park², Jang Cheon Lee², Kyu Sang Lim, Won Hong Woo*, Yeun Ja Mun*

Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University,

1: Department of the Third Medicine, 2: Department of Herhology & Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Sangji University

The aim of this study was to investigate the effect of ethanol extract of *Fagopyrum esculentum* on the melanogenesis. To determine whether ethanol extract of *Fagopyrum esculentum* suppress melanin synthesis in cellular level, B16F10 melanoma cells were cultured in the presence of different concentrations of *Fagopyrum esculentum* ethanol extract. In the present study, we examined the effects of *Fagopyrum esculentum* ethanol extract on cell proliferation, melanin contents, tyrosinase activity, expression of melanogenic enzyme proteins including tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) and tyrosinase-related protein 2 (TRP-2). Cell proliferation was slightly increased by treatment with ethanol extract of *Fagopyrum esculentum* (25-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The ethanol extract of *Fagopyrum esculentum* effectively suppressed melanin contents at a dose of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. It was observed that the color of cell pellets was totally whitened compared with the control. The ethanol extract of *Fagopyrum esculentum* inhibited tyrosinase activity, regulate melanin biosynthesis as the key enzyme in melanogenesis. Using western blot analysis, the ethanol extract of *Fagopyrum esculentum* dose-dependently decreased tyrosinase and TRP-1 protein levels, and tyrosinase and TRP-1 were detected in similar manner. α -MSH leads to a stimulation of melanin synthesis through increase of tyrosinase activity, melanin contents and cytoplasmic dendricity. In this study, ethanol extract of *Fagopyrum esculentum* down-regulated the α -MSH-induced tyrosinase activity, melanin contents and cytoplasmic dendricity. Regarding protein levels of the melanogenic enzymes, the amounts of tyrosinase and TRP-1 was increased after incubation with α -MSH. The treatment of ethanol extract of *Fagopyrum esculentum* decreased the α -MSH-induced expression levels of tyrosinase and TRP-1. These results suggest that the ethanol extract of *Fagopyrum esculentum* exerts its depigmenting effects through the suppression of tyrosinase, TRP-1 and cytoplasmic dendricity. And it may be a potent depigmetation agent in hyperpigmentation condition.

Key words : *Fagopyrum esculentum*, melanin, tyrosinase, TRP-1, depigmentation, α -MSH

서론

교맥(蕎麥, *Fagopyrum esculentum*)은 마디풀과의 한해살이

* 교신저자 : 문연자, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원
우원홍, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원

· E-mail : yjmun@wku.ac.kr, whwoo@wku.ac.kr

· Tel : 063-850-6942, 063-850-6845

· 접수 : 2007/09/20 · 채택 : 2007/10/02

쌍자엽 식물인 메밀(*Fagopyrum esculentum* moench)의 종자를 햇볕에 말린 것으로 혈압강화 효능을 지닌 rutin을 다량 함유하고 있으며, 동맥경화증, 폐출혈, 위양성 질환, 동상, 치질, 감기치료 등의 효과가 인정되어 임상적으로 이용되고 있다^{1,2}). 또한 교맥은 항고혈압기능, 혈당조절, 소화효소 저해활성, ACE 저해활성, 항산화, 알러지 유발 억제활성, 혈전증 예방효과 등이 보고되었다³⁻⁹).

멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 멜라닌세포(melanocyte)의 멜라노솜 내에서 생성되며, 이들은 수지상 돌기를 통하여 표

피의 각질형성세포(keratinocyte)로 이동되어 피부의 색을 나타낸다¹⁰⁻¹⁴. 이러한 멜라닌은 흑갈색의 eumelanin과 황적색의 pheomelanin으로 이루어져 있으며¹⁴, 멜라닌의 합성은 tyrosinase에 의해 tyrosine이 DOPA, DOPAquinone으로 전환되면서 시작된다^{10,11}. 또한 Tyrosinase-related protein 2(TRP-2)은 DOPACHrome을 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid, tyrosinase-related protein 1(TRP-1)은 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화반응을 촉매하며 eumelanin 합성에 tyrosinase, TRP-1과 2가 관여하고 있다¹⁰⁻¹⁴.

Melanin 생합성에 관여하는 인자로는 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), adrenocorticotrophic hormone, prostaglandin E₂ 등은 cAMP를 통한 melanin 합성을 조절하고^{15,16}, nitric oxide는 cGMP를 통해 melanin 합성을 조절 하는 것으로 보고되어 있다¹⁷.

인체 내에서 합성된 멜라닌은 자외선 또는 외부 자극 물질 등으로부터 피부를 보호하는 긍정적인 기능이 있으나, 과도한 색소 침착은 기미, 주근깨 그리고 노인 반점 등을 일으키고 피부노화를 촉진하는 등의 부정적인 기능을 나타내기도 한다¹⁸.

본 연구는 피부의 과도한 색소 침착에 의한 기미, 주근깨, 노인 반점 등의 개선제를 개발하고자 B16F10 mouse melanoma 세포를 이용하여 교맥 에탄올 추출물이 멜라닌의 생성을 억제하는 지 조사하였다.

재료 및 방법

1. 약제

실험에 사용된 교맥은 신우약품사에서 구입한 국산 규격품을 정성하여 사용하였으며, 약제는 원광대학교 한의약전분대학원 약재보관 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

2. 추출

교맥 100 g에 에탄올 1000 ml를 가하여 48시간 실온에서 추출하고 1시간 동안 sonication 시킨 것을 여과지로 여과하여 감압 농축하여 1.65 g(수득률 1.65%)의 시료를 얻었으며 dimethylsulfoxide (DMSO)로 녹여서 사용하였다.

3. 세포주 및 세포배양

B16F10 mouse melanoma 세포를 10% fetal bovine serum(FBS, GIBCO) 와 1% Antibiotic-Antimycotic(GIBCO)를 첨가한 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, GIBCO)을 사용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

4. 세포 생존율 측정

MTT 정량은 Mosmann¹⁹의 방법을 변형하여 실시하였다. 교맥 추출물을 처리하고 3일 동안 배양한 후 상층액을 버리고 당일 제조한 0.05% MTT를 배양용기에 분주한 후 3시간 동안 배양하였다. 상층액을 제거하고 실온에서 25분간 DMSO에 formazan 침전물을 녹인 후 ELISA reader로 흡광도(540 nm)를 측정하여 대조군과 비교하였다.

5. B16F10 세포의 형태학적 관찰

B16/F10 세포를 6 cm 배양용기에 1×10⁵ 개씩 분주하여 세포를 부착시키고 교맥과 α -MSH (100 nM)을 각각 처리하여 배양한 후 B16/F10세포의 수지상 돌기의 변화를 위상차도립현미경(inverted phasecontrast microscope, Leica)를 이용하여 관찰하였다.

6. Tyrosinase 활성도 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Matinez-Esparza²⁰등의 방법으로 측정하였다. B16/F10세포를 6 well 배양용기에 8×10⁴개씩 분주하여 24시간 동안 배양하여 세포를 부착시킨 후, 교맥(50, 100 μ g/ml)과 α -MSH(100 nM)을 각각 처리하고 72시간 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 PBS로 세척하고 lysis buffer[5 mM EDTA, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8), 1% triton X-100, 0.1 mM PMSF]로 세포를 용해하였다. 4°C, 15,000 rpm에서 30분간 원심분리를 하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성측정 용액으로 사용하였고, protein assay 용액(Bio Rad, USA)으로 흡광도(595 nm)를 측정, 동량의 단백질 양을 계산하였다. 시료 50 μ l와 0.1 M sodium phosphate buffer 150 μ l, 0.1% L-3,4-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA) 50 μ l를 분주하여 혼합한 후 ELISA reader기로 37°C에서 405 nm의 파장으로 1시간동안 30분 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다. 활성율은 대조군의 흡광도를 기준으로 한 백분율로 환산하였다.

7. DOPA 염색

Chamber slide(Nunc)의 각 well에 1×10⁴개의 세포를 분주하여 24시간 배양 후 교맥 50 μ g/ml, 100 μ g/ml과 α -MSH(100 nM)을 각각 처리하였다. 72시간 배양한 후 5% formylsalin 용액으로 고정하고, 세척하고 0.1% L-dihydroxyphenylalanine(L-DOPA, Sigma)을 함유한 0.1 M PBS(pH 7.2) 용액으로 4시간 동안 실온에서 반응시켰다. 10% formylsaline으로 재고정하고 50%, 70%, 95%, 100% 알콜로 탈수시킨 다음 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

8. 멜라닌 측정 및 관찰

멜라닌 정량은 Hosi²¹등의 방법을 변형하여 사용하였다. B16/F10 세포를 직경 10 cm 배양용기에 3×10⁵개씩 분주하여 부착시킨 후, 시료를 처리하여 3일 동안 배양하고 각 군당 5×10⁶ 개의 세포를 수거하여 멜라닌을 측정하였다. Lysis buffer[5 mM EDTA, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8), 1% triton X-100]로 세포를 용해하고 원심 분리하여 얻은 세포침전물에 알코올을 가하여 세척한 후 건조시켰다. 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액으로 95°C에서 1시간 동안 멜라닌을 용해시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 멜라닌 색소는 각 군당 5×10⁶개의 세포를 수거하여 육안적으로 멜라닌세포의 색깔을 관찰하였다.

9. Western blot 분석

B16/F10세포를 10 cm 배양용기에 2×10⁸개의 세포를 부착시

키고 시료를 처리한 후 72시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 모두 수거하여 세포침전물을 세포용해액(Nonidet P-40, sodium dodecyl sulfate, 0.1 M Tris-HCl(pH 7.2), 100 mM/ℓ PMSF, 10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml leupeptin)에 용해시킨 후 15,000 rpm 에서 원심분리 하여 상층액을 취하였다. Protein은 bradford 시약(BIO-RAD)을 이용하여 정량하였고, 50 μg 단백질과 2× sample buffer(1 ml of glycerol, 0.5 ml of β-mercaptoethanol, 3 ml of 10% SDS, 1.25 ml of 1 M Tris-HCl, 1~2 μg of bromophenol blue)를 동량으로 혼합한 후 7.5% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. Nitrocellulose membrane에 전이시키고 5% non-fat skim milk로 1시간 동안 blocking 시킨 다음 tyrosinase, actin, TRP-1, TRP-2의 antibody를 1:1000으로 희석하여 각각 실온에서 4시간 동안 반응시켰다. TBST로 3회 세척한 후 tyrosinase는 anti-rabbit HRP로, actin, TRP-1 및 TRP-2는 anti-goat polyclonal IgG로 2차 antibody를 1:1000으로 희석하여 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBST로 세척한 후 western detection 용액으로 발색 후 image analysis 기기(ChemidocXRS)를 이용하여 band의 사진을 촬영하였다.

10. RT-PCR(역전사 중합효소 연쇄반응)

B16F10 세포를 1×10⁶ cells/dish 개씩 배양 용기에 부착 후 시료를 처리 하였다. 48시간 배양 후 total RNA는 total RNA extraction kit(iNtRON Biotechnology)를 사용하여 추출하였다. cDNA는 2 μg의 RNA와 Maxime RT PreMix Oligo dT primer(iNtRON Biotechnology)를 넣고 45℃에서 1시간, 95℃에서 5분간 반응시킨 후 급랭시켜 합성하였다. i-Master mix PCR kit(iNtRON)에 합성된 cDNA 2 μl와 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 primer를 넣은 후 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 94℃에서 5분간 1회 반응시킨 후 94℃에서 20초, 55℃에서 10초, 72℃에서 50초로 총 35회 반복하였으며 최종적으로 72℃에서 5분간 1회 반응시켰다. 이를 2% agarose gel에 전기 영동하여 정량하였다. Tyrosinase primer의 염기서열은 forward ; 5'-CATTTTIGATTGAGIGTCT-3' 이고 reverse ; 5'-TGIGGTAGTCGT CTTGTCCT-3' 이다. TRP-1 primer의 염기서열은 forward ; 5'-CTTCTCCCTTCCTT ACTGG-3' 이고 reverse ; 5'-TGGCTTCATCTTGGIGCTT-3' 이다. TRP-2 primer의 염기서열은 forward ; 5'-TGAGAAGAAACAAAGTAGGCAGAA-3' 이고 reverse ; 5'-CAACCCCAAGAGCAAG ACGAAAGC-3' 이다. 그리고 actin primer의 염기서열은 forward ; 5'-TCAGAAGGACT CCTATGTGG-3' 이고 reverse ; 5'-TCTCTTTGATGTC AGCACG-3' 이다.

결 과

1. 세포 생존율

교맥 에탄올 추출물이 B16F10 세포에 미치는 생존율을 조사 하기 위하여 25~200 μg/ml의 농도로 처리하고 3일간 배양한 후 MTT assay로 생존율을 측정 하였다(Fig. 1). 그 결과 세포 독성은 없었으며, 교맥 추출물의 농도가 증가함에 따라 세포 생존율 또한 증가함을 보였다(Fig. 1). 또한 α-MSH와 교맥을 함께 처리

한 결과에서 역시 생존율이 증가하였다(Fig. 2).

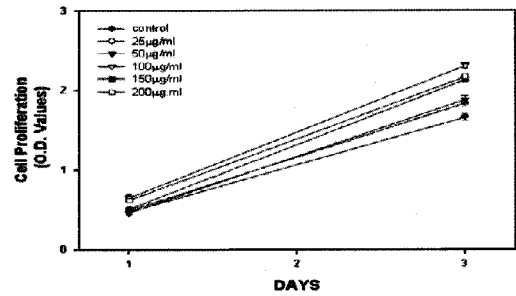


Fig. 1. Effect of FE on cell proliferation. Cells were plated at 1×10⁴ cells/dish and incubated in media containing from 25 to 200 μg/ml of FE for 72 hours. Cell proliferation was determined by MTT assay as described in Materials and Method. Data are means ± S.D. of three experiments performed in triplicate.

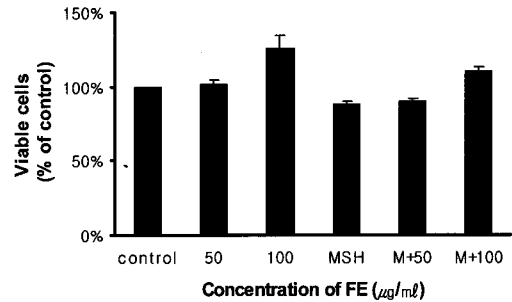


Fig. 2. Cytotoxic effect of FE. Cells were seeded at 1×10⁴ cells/dish. After 24 hours, cells were treated with FE and α-MSH for 72 hours. Cell proliferation was determined by MTT assay as described in Materials and Method. Data are means ± S.D. of three experiments performed in triplicate.

2. 수치상 돌기의 변화

교맥 에탄올 추출물을 100 μg/ml과 α-MSH를 각각 처리하여 72시간 배양 후 광학현미경으로 관찰한 결과 100 μg/ml은 대조군과 비교하여 세포수와 수치상 돌기의 변화가 없었다(Fig. 3). 그러나 α-MSH 처리군은 대조군과 비교하여 수치상 돌기가 현저히 증가하였고, 교맥 에탄올 추출물 100 μg/ml과 α-MSH 병용 처리 구간의 경우 α-MSH 처리군에 비해 수치상 돌기가 감소하였다.

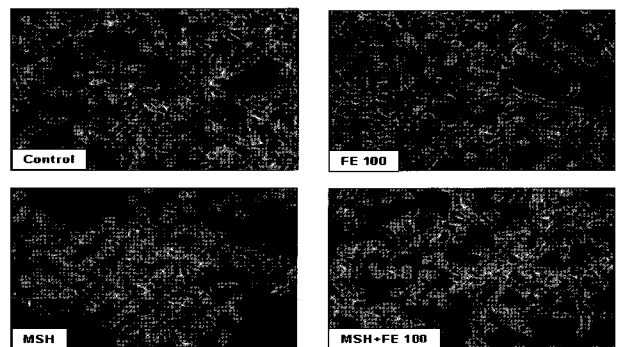


Fig. 3. Light micrographical observation of B16/F10 cells after treatment with FE and α-MSH. Cells were incubated with FE and α-MSH. After 72 hours, cell were photographed with phase contrast inverted microscope. Control, FE 100: FE 100 μg/ml, MSH: α-MSH 100nM, MSH+FE 100: α-MSH+FE 100 μg/ml (200×).

3. Tyrosinase 활성도 측정

교맥 에탄올 추출물 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 대조군에 비해 81%, 50%로 tyrosinase의 활성이 감소하였다. 그러나 α -MSH 처리시 252%로 대조군의 약 2.5배 정도 tyrosinase의 활성이 증가하였으며, 교맥 에탄올 추출물 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 α -MSH(100 nM)을 병용 처리했을 때 각각 213%, 125%로 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

또한 DOPA 염색을 이용하여 tyrosinase의 DOPA oxidase 활성을 관찰한 결과, 대조군에 비하여 교맥 에탄올 추출물 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리 군에서 tyrosinase의 활성이 감소하였다. 그리고 α -MSH 단일 처리군은 대조군에 비하여 활성이 현저히 증가하였으나, α -MSH와 교맥 에탄올 추출물을 병용 처리할 경우 tyrosinase의 활성이 크게 감소함을 보였다(Fig. 5). 이와더불어 수치상 돌기 역시 α -MSH 처리군에 비해 많이 감소하였음을 볼 수 있었다.

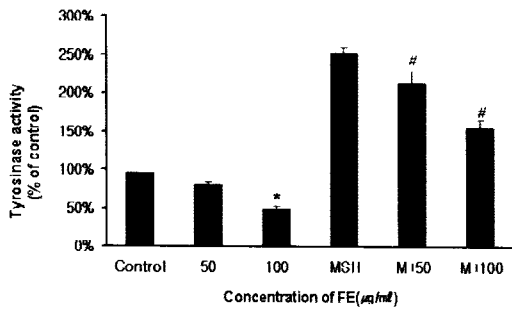


Fig. 4. Effect of FE and α -MSH on the tyrosinase activity. The effect on tyrosinase activity was tested with various doses of FE and α -MSH in B16/F10 cells for 72 hours. Data are expressed as percent(%) of control and each column represents the mean \pm S.D. of at least three experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$: compared with control, # $p < 0.05$: compared with α -MSH.

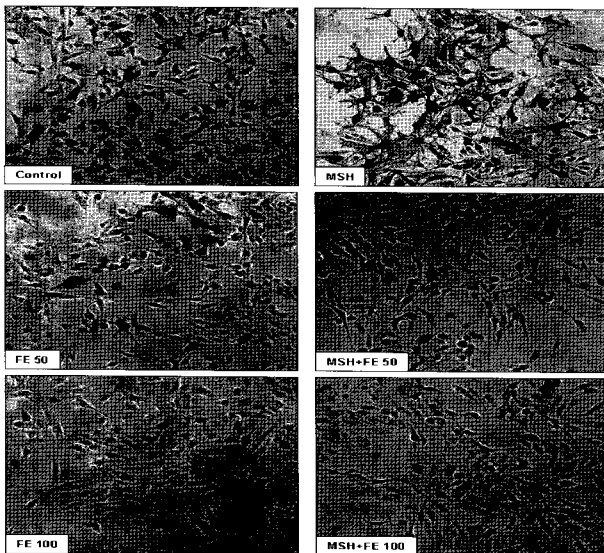


Fig. 5. Observation of tyrosinase activity by DOPA stain after treatment with FE and α -MSH. Cells were incubated with FE and α -MSH. After 3 days, cells were stained with DOPA as described in materials & methods. Control, FE 50: FE 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, FE 100: FE 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, MSH: α -MSH(100 nM), MSH + FE 50: α -MSH + FE 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, MSH + FE 100: α -MSH + FE 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\times 200$).

4. Melanin 합성 억제 효과

교맥 에탄올 추출물 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 α -MSH를 각각 72시간 처리하고 각 군당 5×10^6 개의 세포를 수집한 다음 세포를 용해시켜 세포 내에서 합성된 멜라닌 양을 측정하였다. 그 결과 교맥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서 대조군의 57%로 멜라닌이 감소하였다. 그러나 α -MSH 처리군은 360%로 멜라닌이 대조군의 3.6배 증가 하였다. 반면 교맥 에탄올 추출물 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 α -MSH를 함께 처리했을 때 180%, 교맥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 α -MSH를 함께 처리했을 때는 95%로 유의하게 감소하였다(Fig. 6). 또한 멜라닌 색소 침착을 관찰한 결과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서 현저한 색의 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

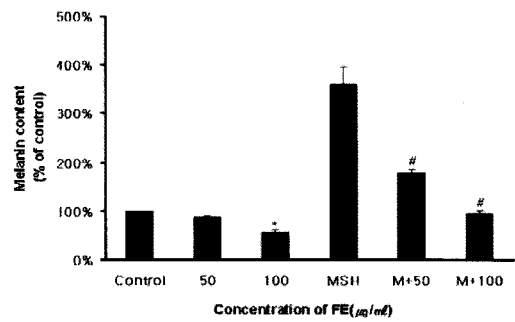


Fig. 6. Effect of FE and α -MSH on melanin contents of B16/F10 cell. The cells were seeded at 3×10^5 cells/dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of FE and α -MSH for 72 hours. Then, melanin contents were measured as described in materials and methods. Data are mean \pm S.D. of three experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$: compared with control, # $p < 0.05$: compared with α -MSH.

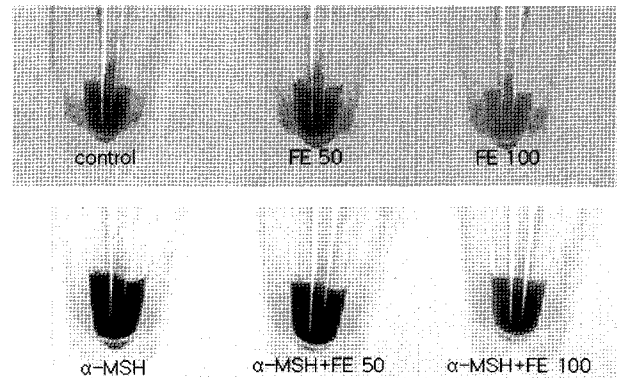


Fig. 7. Formation of melanin on the B16/F10 cells after treatment with FE and α -MSH. B16/F10 cells seeded at 3×10^5 cells/dish. The cells were treated with FE and α -MSH for 3 days. Cells pellets containing 5×10^6 cells were photographed. 1: control, 2: FE 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3: FE 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 4: α -MSH(100 nM), 5: α -MSH + FE 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 6: α -MSH + FE 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

5. 멜라닌-관련 효소의 단백질 발현

멜라닌 합성은 tyrosinase 뿐만 아니라 DOPA quinone을 DHICA로 전환시키는 TRP-2와 DHICA를 indol-5,6-carboxylic acid로 전환시키는 TRP-1의 반응에 의하여 일어난다. 본 연구에서 western blot을 이용하여 tyrosinase, TRP-1과 TRP-2의 단백질 발현을 조사한 결과 tyrosinase는 교맥 에탄올 추출물 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 현저한 감소를 보였으며, TRP-1 및 TRP-2는

교맥 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 감소를 보였다. α -MSH 처리군은 대조군에 비해 tyrosinase와 TRP-1의 발현이 현저히 증가하였다. 그러나 α -MSH와 교맥 에탄올 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 병용 처리했을 때는 tyrosinase와 TRP-1의 발현이 유의하게 감소하였다(Fig. 8).

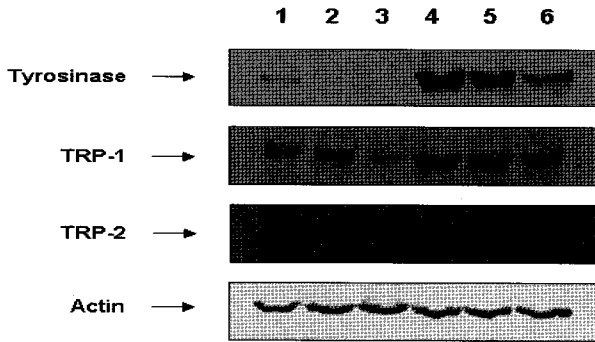


Fig. 8. Effect of FE and α -MSH on melanogenic enzyme expression. Cells were incubated with FE and α -MSH. After 3 days, whole cell lysates were then subjected to western blot analysis using antibodies against tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 as described in materials & methods. Lane 1: control, Lane 2: FE 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Lane 3: FE 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Lane 4: α -MSH(100 nM), Lane 5: α -MSH+FE 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Lane 6: α -MSH+FE 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

6. 멜라닌-관련 효소의 mRNA 발현

교맥 에탄올 추출물이 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 mRNA 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 실험 결과 교맥 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서 대조군에 비해 tyrosinase mRNA의 발현이 현저하게 감소하였으며, α -MSH와 교맥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군 또한 현저하게 감소하였다(Fig. 9). TRP-1의 경우 α -MSH와 교맥을 병용 처리한 구간에서 약간 감소하였으며, TRP-2는 큰 변화가 없었다(Fig. 9).

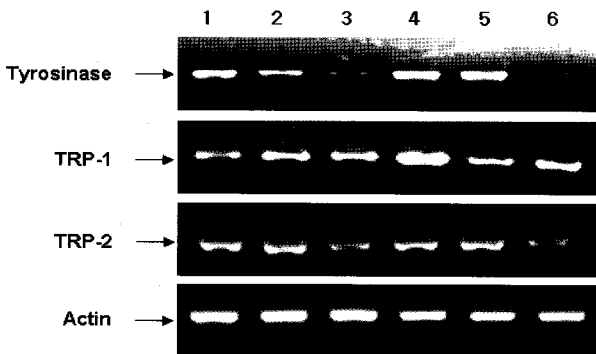


Fig. 9. Effect of FE on mRNA of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2. B16F10 mouse melanoma cells were cultured with FE 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 100 nM α -MSH for 2 days. mRNA was isolated and amplified using RT-PCR as described in Materials and Methods. Lane 1: control, Lane 2: FE 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Lane 3: FE 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Lane 4: α -MSH(100 nM), Lane 5: α -MSH+FE 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Lane 6: α -MSH+FE 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

고찰

자외선(UV)은 인체에서 과도한 피부색소 침착을 일으키는 주요 원인으로 각질형성세포와 멜라닌세포는 자외선에 대하여 α -MSH(melanocyte stimulating hormone)와 부신피질자극호르몬

(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)과 같은 melanocortin peptide를 분비하는데, 이때 α -MSH는 멜라닌 세포의 주변분비(paracrine)와 자가분비(autocrine) 인자로서 피부의 색소 침착에 관여하고 있다²². 또한 melanocortin peptide는 melanocortin receptors(MS-Rs)와 결합하는데 이는 G-protein-coupled receptor로서 5개의 subtype이 있으며, 이들 중 α -MSH는 melanocortin 1 receptor에 결합한 후 adenylate cyclase를 활성화시킴으로서 세포내 cAMP 함량을 증가시킨다²³⁻²⁵. cAMP는 피부 색소침착을 조절하는 key messenger로서 tyrosinase 활성 등의 일련의 반응을 거쳐 멜라닌 합성을 촉진하는 것으로 생각된다²⁶.

최근 연구에 따르면 cAMP 유도물질인 cholera toxin, forskolin 등과 melanogenic enzyme인 TRP-1, TRP-2, pMel 17과 염증반응에 관여하는 각종 cytokine류, melanocyte gene expression factor 인 MITF, Pax-3 등에 의해서도 멜라닌 합성이 영향을 받는다고 알려져 있다^{27,28}.

본 연구에서 교맥(蕎麥, *Fagopyrum esculentum*) 에탄올 추출물이 B16F10 세포에서 tyrosinase의 활성을 감소시켰으며, α -MSH 자극에 의해 증가된 tyrosinase 활성 또한 효과적으로 억제하였다(Fig. 4). 따라서 세포 내에 합성된 melanin의 양을 측정 한 결과 교맥 추출물은 melanin 합성을 억제했으며, α -MSH로 자극된 melanin 합성 또한 억제함을 보였다(Fig. 6 & 7). 멜라닌-관련 효소인 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 단백질 발현 정도를 조사한 결과 tyrosinase와 TRP-1은 교맥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대조군에 비해 현저하게 감소하였으며, α -MSH로 인해 증가된 tyrosinase와 TRP-1 발현 역시 현저히 감소시켰다(Fig. 8). 그러나 TRP-2는 변화가 조금 있거나 거의 없었다(Fig. 8).

한편 본 연구결과 교맥 추출물은 세포독성이 없으며 오히려 세포의 증식을 촉진하였다(Fig. 1). α -MSH와 세포증식과의 관계를 살펴보면, α -MSH는 배양 인체 멜라닌 세포의 증식에는 영향을 주지 않는다고 보고된 반면^{29,30}, 멜라닌 세포의 증식 효과가 있다는 보고도 있다^{31,32}. 본 실험에서 α -MSH를 처리한 후 세포 증식을 조사한 결과 대조군에 비해 세포수가 감소하였으며, 교맥 추출물 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 함께 처리 하였을 때는 세포수가 증가됨을 보였다(Fig. 1 & 2).

본 연구결과와 멜라닌-관련 효소 mRNA에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 실험 결과 tyrosinase는 교맥 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 단독 처리군에서 대조군에 비해 mRNA의 발현이 현저하게 감소하였으며, α -MSH와 교맥 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군 또한 현저하게 감소하였다(Fig. 9). TRP-1의 경우 α -MSH와 교맥을 병용 처리한 구간에서 조금 감소하였으며, TRP-2는 큰 변화가 없었다(Fig. 9).

멜라닌세포는 신경능선(neural crest)에서 유래한 세포로서 수지상 가지돌기(dendritic process)를 갖고 있으며 약 30-40개의 각질형성세포와 연결되어 표피-멜라닌 단위(epidermal-melanin unit)를 형성하는데, 이 돌기를 통하여 멜라노솜이 각질형성세포로 이동 된다³³. 따라서 멜라닌세포의 돌기형성(dendricity)과 인접한 각질형성세포 사이의 연결은 멜라노솜의 수송에 중요한 역할을 하고 있으며, 자외선과 α

-MSH에 의해 이러한 epidermal-melanin network이 확장된다. 그러나 현재까지 멜라노솜의 수송기전과 조절에 대하여 거의 알려지지 않았으나, melanosome은 kinesin, dynein, myosin V와 같은 운동단백질(motor protein)과 microtubule, actin filament에 의하여 가지돌기를 따라 각질형성세포로 이동되는 것으로 생각된다^{34,35)}. 본 실험에서 α -MSH는 수지상 가지돌기를 증가시켰으며, 교맥 추출물은 가지돌기 형성을 효과적으로 억제하였다(Fig. 5). 따라서 본 실험에서 Rac과 Rho에 미치는 영향은 조사하지 않았으나 교맥 추출물은 가지돌기의 형성을 효과적으로 억제하였으며, 이는 교맥 추출물의 수지상 가지돌기의 형성 억제작용이 kinesin, dynein, myosin V와 같은 운동단백질(motor protein)과 microtubule, actin filament에 영향을 미쳤을 가능성이 있다.

이상의 연구 결과, 교맥 에탄올 추출물은 tyrosinase 활성을 효과적으로 억제하여 결국 melanin 생성을 저해하였다. 이는 전사 이전 단계에서 교맥 추출물이 작용함으로서 tyrosinase 관련 mRNA를 감소시켰기 때문인 것으로 보인다. 게다가 세포독성이 없는 것으로 실험 결과 증명이 되었기 때문에 과색소침착증에 좋은 약재로서의 가능성이 있을 것이라 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

- Lee, J.S., Ra, K.S., Son, H. Extraction and component sugar analysis of polysaccharides from buckwheat. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 860-865, 1995.
- Lee, G.D., Yun, S.L., Kim, J.O., Heo, S.S., Seo, G.I. Monitoring on the tea with steaming and drying process of germinated byck wheat. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 212-217, 2004.
- Jung, S.L., Heung, S.S., Young, S.M., Yu, K.C., Jin, S.J. Effects of buckwheat on organ weight, glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 25: 831-838, 1994.
- Choi, Y.S., Kim, B.R., Jin, L.H., Lee, B.H., Shim, T.H., Lee, S.Y. In vitro screening of dietary factors on buckwheat(Fagopyrum esculentum Moench) influencing the regulation of blood pressure, glucose and cholesterol level. J Korean Soc Food Sci Nutr 29: 280-287, 2000.
- Ham, S.S., Choi, K.P., Choi, Y.S., Lee, S.Y. Studies on antimutagenic and lipotropic action of flavonoids of buckwheat leaf extract. J Korean Soc Food Nutr 23: 698-703, 1994.
- Kim, Y.E., Oh, S.W., Kwon, E.K., Han, D.S., Kim, I.H., Lee, C.H. Effects of green tea, buckwheat and grape leaves extracts on lipid metabolism, antioxidative capacity, and antithrombotic activity in rats fed high cholesterol diets. Korean J Food Sci Technol 36: 979-985, 2004.
- Tomomi, M., Buxiang, S., Aya, I. Antioxidant activities of buckwheat hull extract toward various oxidative stress in vitro and in vivo. Bio pharm Bull 24: 209-213, 2001.
- Kim, C.D., Lee, W.K., No, K.O., Park, S.K., Lee, M.H., Lim, S.R., Roh, S.S. Anti-allergic action of buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) grain extract. Int Immunopharmacol 3: 129-136, 2003.
- 손호용, 권정숙, 손건호, 권기석, 류희영, 금은주. 메밀 종자의 항트롬빈 활성과 혈전증 예방효과, 한국식품영양과학회지 35(2):132-138, 2006.
- Ferguson, C.A. and Kidson, S.H. The regulation of tyrosinase gene transcription. Pigment Cell Res. 10: 127-138, 1997.
- Hearing, V.J. and Tsukamoto, K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. FASEB J. 5: 2902-2909, 1991.
- Tsukamoto, K., Jackson, I.J., Urabe, K., Montague, P.M. and Hearing, V.J. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPochrome tautomerase. EMBO J. 11: 519-526, 1992.
- Boissy, R.E., Sakai, C., Zhao, H., Kobayashi, T. and Hearing, V.J. Human tyrosinase related protein-1 (TRP-1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1. Exp. Dermatol. 7: 198-204, 1998.
- Jimbow, K., Alena, F., Dixon, W. and Hara, H. Regulatory factors of pheo- and eumelanogenesis in melanogenic compartments, pigment Cell Res. 2: 36-42, 1992.
- Im, S., Moro, O., Peng, F., Medrano, E.E., Cornelius, J., Babcock, G., Nordlund, J.J. and Abdel-Malek, Z.A. Activation of the cAMP pathway by α -melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation. Cancer Res. 58: 47-54, 1998.
- Kadekaro, A.L., Kanto, H., Kavanagh, R. and Abdel-Malek, Z.A. Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. Ann. N. Y. Acad. Sci. 994: 359-365, 2003.
- Romero-Graillet, C., Aberdam, E., Biagoli, N., Massabni, W., Ortonne, J.P. and Ballotti, R. Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. J. Biol. Chem. 271: 28052-28056, 1996.
- Maeda, K., Fukuda, M. In vivo effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. J. Soc. Cosmet. Chem. 42: 361-368, 1991.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth

- and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Methods* 65: 55-63, 1983.
20. Matinez-Esparza, M. Mechanisms and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* 225: 139-146, 1998.
 21. Hosoi, J., Abe, E., Suda, T., Kuroki, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Research* 45: 1474-1478, 1985.
 22. Chakraborty, A.K., Funasaka, Y., Slominski, A., Ermak, G., Hwang, J., Pawelek, J.M., Ichihashi, M. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim Biophys. Acta* 1313: 130-138, 1996.
 23. Walter, E., Roger, R., Monique, D.C., Dominique, L., Jean-paul, O., Robert, B. Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B16 melanoma cells. *J. Bio. Chem.* 270: 24315-24320, 1995.
 24. Hearing, V.J., Tsukamoto, K., Urabe, K. et al. Functional properties of cloned melanogenic proteins. *Pigment Cell Res.* 5: 264-270, 1992.
 25. Mas, J.S., Gerritsen, I., Hahmann, C., Jimenez-Cervantes, C. and Garcia-Borrón, J.C. Rate-limiting factors in melanocortin 1 receptor signalling through the cAMP pathway. *Pigment Cell Res.* 16: 540-547, 2003.
 26. Busca, R. and Ballotti, R. Cyclic AMP: a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* 13: 60-69, 2000.
 27. Ortonne, J.P. Photoprotective properties of skin melanin. *British J. Derma.* 146(61):7-10, 2002.
 28. Prota, G. Recent advance in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.* 75: 122-129, 1980.
 29. Hunt, G., Donatien, P.D., Lunec, J. Cultured human melanocytes respond to MSH peptides and ACTH. *Pigment Cell Res.* 7: 217-221, 1994.
 30. Im, S., Kim, J., On, W.Y., Kang, W.H. Increased expression of α -Melanocyte-stimulating hormone in the lesion skin of melasma. *Br. J. Dermatol* 146: 165-167, 2000.
 31. Friedman, P.S., Wren, F., Buffey, J. α -MSH causes a small rise in cAMP but has no effect on basal or ultraviolet-stimulated melanogenesis in human melanocytes. *Br J Dermatol.* 123: 145-151, 1990.
 32. Hun, G., Todd, C., Cresswell, J.E. α -melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7 α -MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J Cell Sci.* 107: 205-211, 1994.
 33. Provance, D.W., Jr, Wei, M., Ipe, V., Mercer, J.A. cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14554-14558, 1996.
 34. Hara, M., Yaar, M., Byers, H.R., Goukassian, D., Fine, R.E., Gonsalves, J., Gilchrist, B.A. Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. *J Invest Dermatol.* 114: 438-443, 2000.
 35. Wu, X., Bowers, B., Rao, K., Wei, Q., Hammer, J.A. Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo. *J Cell Biol.* 143: 1899-1918, 1998.