

# 枳椇子에 탄올추출물이 B16F10흑색종세포의 멜라닌생성에 대한 효과

김준호 · 문대원 · 최미은 · 임규상<sup>1</sup> · 문연자<sup>1</sup> · 우원홍<sup>1\*</sup>

원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 1: 원광대학교 한국전통의학연구소

## Effect of *Hovenia dulcis* Thunb. Ethanol Extract on the Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cell

Jun Ho Kim, Dea Won Moon, Mi Eun Choi, Gyu Sang Lim<sup>1</sup>, Yeun Ja Mun<sup>1</sup>, Won Hong Woo<sup>1\*</sup>

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

1: Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

Acquired pigmentary skin diseases such as abnormal melanogenesis, vitiligo, chloasma and inflammatory pigmentation are related to regulate the melanin production. In this study, an ethanol extract of *Hovenia dulcis* Thunb.(EHD) makedly inhibited melanin biosynthesis and suppressed, the protein expression of tyrosinase, tyrosinase-related protein 1(TRP-1), and tyrosinase-related protein 2(TRP-2) in B16F10 cells. On the other hand, EHD did not inhibit mushroom tyrosinase activity. These results indicate that EHD may contribute to the inhibition of melanin biosynthesis through regulating tyrosinase activity and expression, and serve as a new candidate in the design of new skin-whitening or therapeutic agents.

Key words : *Hovenia dulcis* Thunb., melanin content, tyrosinase activity, TRP-1, TRP-2

### 서 론

色素沈着症을 韓醫學에서는 形態와 色調에 따라 黥點, 面黑, 雀卵, 斑點, 鰐子, 雀斑, 黑斑 등으로 多樣하게 表現하여 왔다. 皮膚는 表皮, 眞皮, 皮下脂肪層 으로 構成되어 있으며 顰 바깥층에 存在하는 表皮層은 각질세포, 멜라닌세포, 랑게한스세포, 메르켈세포들로 이루어져 있다. 그리고 皮膚色은 멜라닌, hemoglobin, carotene 등에 의해서 決定되는데, 이중에 가장 중요한 役割을 하는 것은 멜라닌이다<sup>1)</sup>. 멜라닌은 各질세포로 이동하여 紫外線이나 外部刺戟 物質 등으로부터 皮膚를 保護하는 肯定的인 機能을 가지고 있으나 過度한 色素沈着은 기미, 주근깨, 皮膚老化 促進 등 美容的인 側面에서 볼 때 否定的인 機能 또한, 가지고 있다<sup>2,3)</sup>.

멜라닌은 멜라닌소체(melanosome)에서 合成되며, 멜라닌소체는 正常的인 멜라닌을 合成하는데 必要的인 酵素인 tyrosinase, tyrosinase related protein 1(TRP-1)과 dopa chrome

tatutomerase(DCT, TRP-2)등이 있으며<sup>4,6)</sup> 이들 중 tyrosinase는 melanogenesis의 速度 決定段階인 初期反應에 作用하는 酵素이다. 따라서 tyrosinase의 活性 抑制는 皮膚 內에서의 멜라닌 合成을 效果의으로 阻害할 수 있기 때문에 皮膚美白劑의 開發에 있어서 유용한 評價方法으로 認定되고 있다<sup>7,8)</sup>.

最近 美에 대한 社會的인 觀心이 增加하면서 細胞에 毒性이 적으면서 멜라닌 合成을 減少시키고, 동시에 non-mutagenic한 美白劑에 대한 관심은 점차 增加되고 있는 실정이다.

枳椇子(*Hovenia dulcis* Thunb.)는 갈매나무과(Rhamnaceae) 헛개나무의 肉質이 있는 果實 꼭지가 달린 열매의 種子이며<sup>9)</sup>, 異名은 나무에 나는 꿀이라는 뜻으로 木蜜, 神仙의 庭園에서 나는 배나무라는 뜻의 玄圃梨, 돌과같이 희고 단단하다하여 白石木 등으로 부르기도 한다<sup>10)</sup>. 枳椇子는 예로부터 酒醉, 煩熱, 口渴, 蟲毒, 大小便이 잘나오지 않는 症狀 등을 治療하는데 이용되어 왔으며<sup>11,12)</sup>, 主要成分으로는 多量의 glucose와 calcium malate가 포함되어 있다<sup>11,12)</sup>. 最近 研究에서는 抗酸化效果<sup>14)</sup>, 糖尿治療效果<sup>15-17)</sup>, 解毒 效能<sup>18)</sup>, 肝毒素을 除去하는 物質에 관한 研究<sup>19)</sup> 등이 보고된바 있으나 멜라닌 合成 抑制를 통한 皮膚美白에 대한 枳

\* 교신저자 : 우원홍, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대 한의학전문대학원

· E-mail : whwoo@wku.ac.kr, · Tel : 063-850-6845

· 접수 : 2009/01/06 · 수정 : 2009/02/19 · 채택 : 2009/03/02

槲櫟의 影響은 아직 보고되지 않았다.

이에 저자는 槲櫟子抽出物이 멜라닌 合成 調節 기전에 미치는 影響을 조사하고자, B16F10 細胞를 利用하여 tyrosinase 活性 및 멜라닌의 양을 관찰하였으며, 合成에 關여하는 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2 등의 蛋白質 發現變化를 測定하여 有意성 있는 結果를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 槲櫟子 추출물

실험에 사용된 槲櫟子(중국)는 (주)동경종합상사(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 槲櫟子 200 g에 100% 에탄올 2 l를 가하여 3일 동안 室溫에서 抽出한 것을 거즈로 濾過하고 減壓 농축 하여 4.2 g(수율 2.1%)의 시료를 얻었고, DMSO에 녹여 實驗에 사용하였다.

### 2. B16F10 세포주 배양

분양받은 B16F10 세포를 5% fetal bovine serum (FBS)가 添加된 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM, Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 培養하였다.

### 3. 세포생존율 측정

세포생존율 측정은 Mosmann의 方法<sup>17)</sup>에 의하여 실시하였다. 24-well 培養 용기에 B16F10 細胞를 2×10<sup>4</sup> 개씩 분주하고 24시간 培養 後 槲櫟子抽出物을 여러 濃度로 處理한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 에서 serum starvation으로 24시간 培養하였다. 培養 後 0.05%(W/V) MTT 溶液을 넣어 2시간 培養한 다음 상층액을 제거하고, 형성된 formazan을 DMSO(1 ml)로 녹여서 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 吸光度를 測定하였다.

### 4. 세포의 형태학적 관찰

B16F10 細胞를 6 cm 培養 容器에 1×10<sup>5</sup> 개씩 분주하여 細胞를 附着시키고 槲櫟子抽出物을 50 μg/ml, 100 μg/ml로 處理하여 1일간 培養한 後 B16F10 細胞의 樹枝狀突起의 變化를 위상차현미경(inverted phasecontrast microscope)를 利用하여 觀察하였다.

### 5. Tyrosinase 활성 측정

細胞內 tyrosinase 活性는 Martinez-Esparza 등의 方法<sup>20)</sup>으로 測定하였다. 6 cm dish 에 B16F10 細胞를 1×10<sup>5</sup> 개씩 분주하여 24시간 培養한 다음 槲櫟子抽出物을 50 μg/ml, 100 μg/ml로 處理하였다. 3일간 培養 後 PBS로 2회 세척하고, 5 mM EDTA가 包含된 0.1 M sodium phosphate buffer(SP, pH 6.8) 1 ml에 1%(V/V) Triton X-100과 0.1 M PMSF를 混合한 lysis buffer를 200 μl씩 분주하고 細胞를 收去하여 얼음에서 30분간 溶解시킨 다음 4°C, 15,000 rpm에서 30분간 遠心分離 하여 얻은 上層液을 tyrosinase 活性 測定에 使用하였다. 蛋白質 定量은 Bradford 試藥으로 595 nm에서 吸光度를 測定하여 同量의 蛋白質 量을 計

算하였으며, 計算된 蛋白質과 0.1 M SPB(pH 6.8)의 總量이 150 μl가 되도록 분주 하고 0.1%(W/V) L-DOPA를 50 μl씩 분주하여 37°C에서 405 nm의 파장으로 1시간동안 10분 간격으로 흡광도의 變化를 측정하였다. 효소 활성율은 대조군의 흡광도를 기준으로 한 백분율로 환산하여 結果로 나타내었다.

### 6. 버섯 tyrosinase 활성 측정

버섯 tyrosinase는 2,500 units/ml가 되도록 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 녹여 冷藏庫에 -20°C에서 凍結 保管 後 酵素原으로 使用하였다. 試料과 酵素를 添加하여 25°C에서 5분간 先培養(pre-incubation) 시킨 後 基質로 L-DOPA를 添加하고 10분간 反應 시킨 後 475 nm에서 吸光度를 測定하였다. 각 實驗은 모두 3회 反復하였다.

### 7. 멜라닌 합성양의 측정

멜라닌 定量은 Hosei 등의 方法<sup>21)</sup>을 變形하여 使用하였다. 直徑 6 cm 培養容器에 1×10<sup>5</sup> 개씩 분주하여 24시간 培養한 後, 槲櫟子抽出物 50 μg/ml, 100 μg/ml씩 處理한 다음 3일간 培養하였으며, 각 군당 2×10<sup>6</sup> 개씩 收去하여 lysis buffer(5 mM EDTA, 0.1 M SPB(pH 6.8), 0.1% Triton X-100)로 細胞를 溶解하였다. 遠心分離 하여 얻은 細胞 沈澱物은 알코올로 洗滌한 後 10% DMSO가 添加된 1 N NaOH 溶液으로 90°C에서 1시간 溶解하여 405 nm로 吸光度를 測定하였다.

### 8. 멜라닌색소 침착의 육안적 관찰

멜라닌 定量은 Hosei 등의 方法<sup>21)</sup>을 變形하여 使用하였다. 直徑 6 cm 培養容器에 3×10<sup>5</sup> 개씩 분주하여 24시간 培養한 後, 槲櫟子抽出物 50, 100 μg/ml씩 處理한 다음 3일간 培養하였으며, 각 군당 2×10<sup>6</sup> 개씩 收去하여 肉眼的으로 멜라닌細胞의 색갈을 觀察하였다.

### 9. Western blot 분석

B16F10 細胞를 10 cm 培養容器에 3×10<sup>5</sup> 개씩 細胞를 附着시키고 50 μg/ml, 100 μg/ml씩 槲櫟子 抽出物을 處理하고 3일 동안 培養하였다. 培養된 細胞를 모두 收去하여 lysis buffer(1× RIPA buffer 1 ml, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin, 2 mM DTT)로 30분간 溶解시킨 後, 13,000 rpm에서 30분간 遠心分離 하여 上層液을 취하였다. 蛋白質은 Bradford 試藥을 利用하여 定量하였고, 50 μg 蛋白質과 2× sample buffer(1 ml glycerol, 0.5 ml β-mercaptoethanol, 3 ml 10% SDS, 1.25 ml 1 M Tris-HCl, 1~2 μg bromophenol blue)를 同量으로 混合한 다음 7.5% SDS polyacrylamide gel에서 電氣泳動 하였다. Nitrocellulose membrane로 轉移시키고 5% non-fat skim milk로 blocking 시킨 後, tyrosinase, actin, TRP-1, TRP-2의 antibody를 1:500으로 稀釋하여 室溫에서 1시간 30분 동안 反應시켰다. TBST로 3회 洗滌한 後, tyrosinase, actin, TRP-1 및 TRP-2 anti-Goat polyclonal IgG HRP conjugate 2차 antibody를 1:1000으로 稀釋하여 室溫에서 1시간 동안 反應시켰다. TBST로 洗滌한 後 ECL 溶液으로 發色 後

ChemiDoc을 이용하여 band의 寫眞을 撮影하였다.

10. 통계처리

實驗 結果는 student's t-test를 利用하여 p-value를 구하여 有意性を 檢證하였다.

결 과

1. 細胞生存率에 미치는 影響

B16F10 細胞生存率에 미치는 影響을 알아보기 위하여 枳椇子抽出物을 12.5~200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 濃度로 各各 處理하고, serum free-media로 24시간 培養하여 MTT assay를 實施하였다. 實驗 結果 枳椇子抽出物 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  處理군에서 細胞生存率은 對照群(100 $\pm$ 1.8%)과 比較하여 各各 91 $\pm$ 1.5%, 90 $\pm$ 1.5%로 거의 變化가 없었고, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度 處理群에서는 82 $\pm$ 0.5%로 약간 減少하였으나, 有意性은 없었다(Fig. 1).

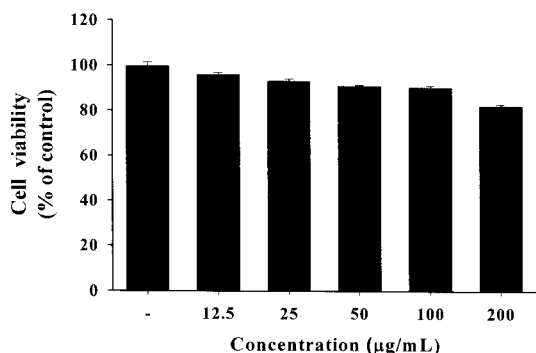


Fig. 1. Effect of ethanol extract of *Hovenia dulcis* Thunb. (EHD) on cell viability. Cells were serum-starved for 24 hours and EHD was treated in serum free-media at 12.5-200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 24 hours. Cell viability was determined by MTT assay as described in materials and methods. Data are means  $\pm$  S.D. of three experiments performed in triplicate.

2. 멜라닌세포의 형태학적 관찰

멜라닌세포는 actin filament의 再構成을 통해 많은 樹枝狀突起를 形成한다. 이 樹枝狀突起를 통해 生成된 멜라닌을 周邊의 각질세포(keratinocyte)로 보내게 된다. 따라서 본 研究에서 枳椇子抽出物이 B16F10 細胞의 樹枝狀突起 形成에 影響을 미치는지 調查하기 위하여 枳椇子抽出物을 各各 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 處理하여 3일 동안 培養한 다음 細胞의 形態的 變化를 對照群과 比較 觀察하였다. 현미경 觀察 結果 枳椇子抽出物 處理群에서의 멜라닌세포는 對照群에 비해 樹枝狀突起가 減少하였음을 觀察할 수 있었다(Fig. 2).

3. Tyrosinase 활성 억제 효과

1) Tyrosinase 활성도

멜라닌세포에서 멜라닌을 合成하는 重要기전은 tyrosine을 DOPA로 轉換 시키는 tyrosine hydroxylase와 DOPA를 DOPAquinone으로 轉換시키는 DOPA oxidase로서 처음 두 段階의 反應을 觸媒 하는 tyrosinase의 作用에 의해 시작된다. 본 研究에서 枳椇子抽出物이 tyrosinase 活性에 미치는 影響을 調查

하기 위하여, 시료를 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度로 處理하고 3일 後 tyrosinase 活性을 測定하였다. 對照群(100 $\pm$ 5.8%)을 基準으로 比較한 結果 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 63 $\pm$ 1.1%, 그리고 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 56 $\pm$ 5.6%로 tyrosinase 活性이 현저히 減少하였다(Fig. 3).

2) 버섯 효소 활성도

버섯 tyrosinase를 利用하여 枳椇子抽出物이 直接的으로 tyrosinase 酵素의 活性을 抑制하는지 調查해 본 結果, 枳椇子抽出物은 버섯 tyrosinase 酵素의 活性度를 抑制하지 않았다(Fig. 4). 이는 tyrosinase 酵素의 活性을 枳椇子抽出物이 直接的으로 抑制하지않는 것을 意味한다.

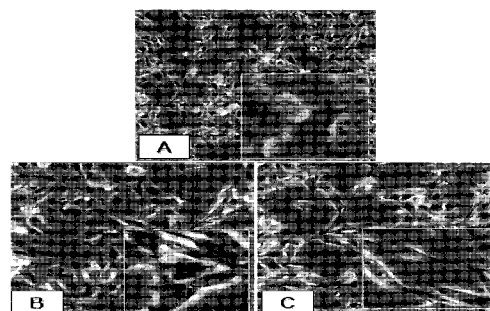


Fig. 2. Light micrographical observation of B16F10 cells after treated with EHD. Cells were cultured with vehicle, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of EHD. After 3 days, cells were photographed with inverted phase-contrast microscope. A: vehicle, B: EHD (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), C: EHD (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ( $\times$ 100).

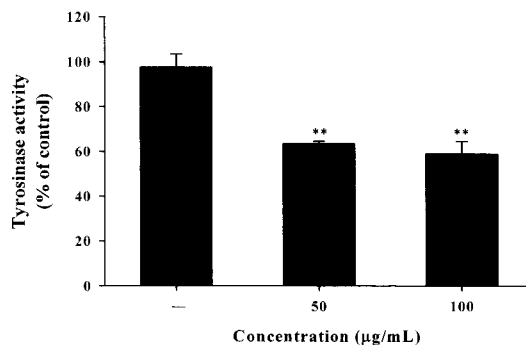


Fig. 3. Effect of EHD on tyrosinase activity in B16F10 cells. The effect on tyrosinase activity was tested with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of EHD for 3 days. Results are expressed as percent of control. Each column represents the means  $\pm$  S.D. of triplicate determinations. \*\*P<0.01 compared with the vehicle.

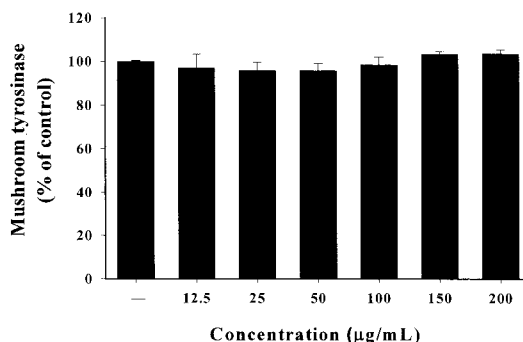


Fig. 4. Effect of EHD on tyrosinase activity in a cell free system. To test direct effect on tyrosinase, the tyrosinase activity was measured in a cell free system, as described in materials and methods. Data are expressed as percent (%) of control and each column represent the means  $\pm$  S.D. of least three experiments performed in triplicate.

4. 멜라닌 합성양에 미치는 영향

枳椇子抽出물이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 B16F10 세포에 50 µg/ml, 100 µg/ml 농도로 처리하여 3일 동안 배양하고, 각 집단 2×10<sup>6</sup> 개의 세포를 수거한 다음 멜라닌량을 측정하였다. 실험 결과 대조군(100±4.2%)과 비교하여枳椇子抽出물을 처리한 경우 50 µg/ml에서 73.3±3.5%, 그리고 100 µg/ml에서는 47.6±2.7%로 멜라닌량이 감소하였다(Fig. 5).

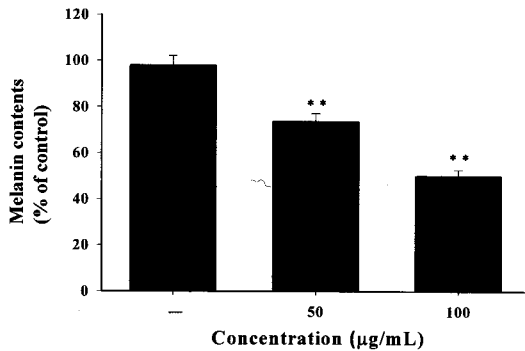


Fig. 5. Effect of EHD on melanin synthesis in B16F10 cells. Cells were treated with 50 µg/ml, 100 µg/ml of EHD for 3 days. Melanin contents were measured as described in materials and methods. Results are expressed as percent of control. Each determination was made in triplicate; the data shown represent means ± S.D. \*\*P<0.01 compared with the vehicle.

5. 멜라닌 색소 침착의 육안적 관찰

위의 연구 결과枳椇子抽出물이 tyrosinase 활성과 멜라닌량을 감소시켰으므로 세포를 수거하여 멜라닌 생성 억제 효과를 육안으로 관찰하였다. B16F10 세포에枳椇子抽出물을 50 µg/ml, 100 µg/ml 농도로 처리하여 3일 동안 배양하고, 각 집단 2×10<sup>6</sup> 개의 세포를 수거한 다음 세포 pellet의 멜라닌 색소를 대조군과 비교하였다. 실험 결과 멜라닌 색소는 실험군에서 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

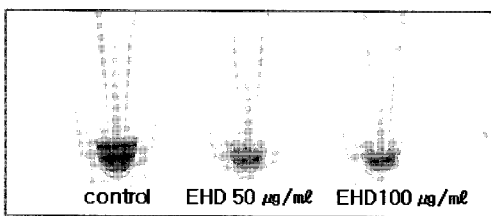


Fig. 6. The formation of melanin on the B16F10 cells after treated with EHD. Cells were treated with 50, 100 µg/ml of EHD for 3 days.

6. 멜라닌 합성 관련 단백질 발현에 미치는 영향

枳椇子抽出물이 B16F10 세포의 tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2 단백질 발현을 조절하는지 알아보기 위해 Western blot을 시행했다. 실험 결과枳椇子抽出물을 50 µg/ml, 100 µg/ml의 농도로 처리하였을 때 tyrosinase 단백질 발현은 각각 0.38, 0.18배로, TRP-1은 0.8, 0.68배로 감소하였으며 TRP-2는 0.79, 0.86배로 감소하였다. 따라서枳椇子抽出물은 멜라닌 합성 관련 효소 중 TRP-1과 TRP-2에 비하여 tyrosinase의 발현을 현저히 억제하였음을 알 수 있었다(Fig. 7).

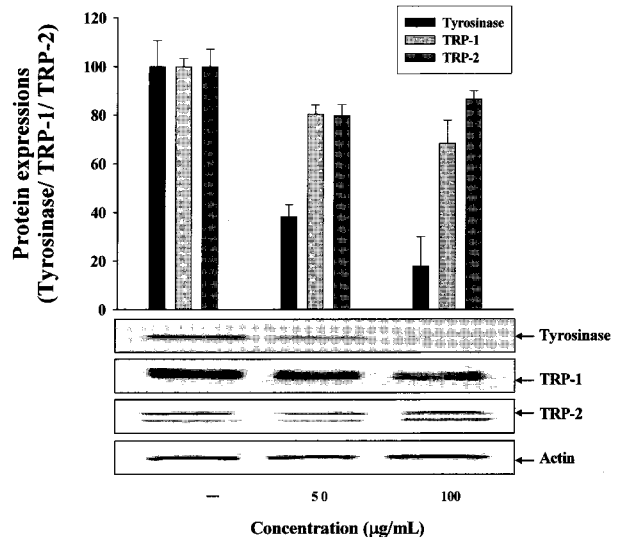


Fig. 7. Effect of EHD on the tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 protein expressions in B16F10 cells. B16F10 cells were incubated with EHD. After 3 days, cells were analysed using Western blotting as described in materials & methods. Each determination was made in quintuplicate; the data shown represent means ± S.D.

고찰

피부의 주요 기능 중 하나는 외부로부터人體를保護하는 기능인데, 특히 紫外線 露出 시에 멜라닌세포는 멜라닌을 합성하여 피부의 색소沈着에 중요한 역할을 할 뿐 아니라 過度한 紫外線을 吸收하고 遮斷하는 光保護作用을 한다고 알려져 있다<sup>20</sup>.

하지만 紫外線에 長期間 露出되거나 많은 量의 紫外線을 한번에 받을 경우 皮膚 光老化가 促進되고 色소沈着, 즉 기미, 주근깨 등이 生成되기도 한다.

멜라닌은 멜라닌소체(melanosome)에서 合成되며, 멜라닌소체에는 正常的인 멜라닌을 合成하는데 必要한 特異인 효소인 tyrosinase, tyrosinase related protein 1(TRP-1)과 dopa chrome tatutomerase(DCT, TRP-2)등이 있으며<sup>4-6</sup> 이들 중 tyrosinase는 melanogenesis의 速度 決定段階인 初期反應에 作用하는 효소로서, tyrosine을 DOPA로 轉換하는 tyrosine을 hydroxylase 활성과 DOPA를 DOPAquinone으로 酸化하는 DOPA oxidase 활성을 모두 갖고 있다.

멜라닌의 合成은 細胞의 遺傳的 要因과, 代謝, 內分泌, 炎症, 感染, 腫瘍 등과 같은 物理的 및 化學的 要因들에 의해서 크게 좌우 된다<sup>21</sup>. 또한 멜라닌은 生物種 사이의 성적유인과 紫外線(UV)에 의해 生成되는 자유라디칼(free radical)을 制禦하는 scavenger로서의 役割을 함으로써 細胞의 破壞를 방지하기도 하며, 神經傳達體로서의 可能性 등이 알려져 있다<sup>22,23</sup>.

最近 美容에 대한 觀心이 增加하면서 멜라닌 合成의 否定的인 側面인 過色소沈着을 制御하는 美白化粧品에 대한 研究가 활발히 이루어졌으며, 現在 4-hydroxy-anisole, 5-hydroxyindole 및 hydroquinone과 kojic acid, arbutin, oxyresveratrol 등 tyrosinase 抑制劑들과 silbene界 化合物인 α-viniferin, isoflavonoid 류인 ferulic acid가 알려져 있다<sup>24</sup>. 이밖에도 음양과

<sup>25)</sup>, 지치<sup>26)</sup>, 백출<sup>27)</sup>, 감초<sup>28)</sup>, 더덕<sup>29)</sup> 등의 植物抽出物이 멜라닌 合成 抑制 效能이 있다고 보고되었다.

따라서 본 實驗에서는 枳椇子抽出物이 B16F10 細胞에서 멜라닌 合成에 미치는 影響을 조사하기 위하여 tyrosinase 活性를 測定한 結果 tyrosinase 효소 活性이 效果的으로 抑制되었으며 (Fig. 3), 細胞 內에서 合成된 멜라닌의 量을 測定한 結果 멜라닌 合成 또한 減少되었다(Fig. 5). 그러나 버섯 tyrosinase 효소 活性에 影響을 미치지 않았다. 이는 B16F10 細胞에서 枳椇子抽出物이 信號傳達經路를 통하여 間接的으로 tyrosinase의 活性를 抑制시켰음을 의미한다.

멜라닌세포는 신경능선(neural crest)에서 由來한 細胞로서 樹枝狀突起(dendritic)를 갖고 있으며 약 30~40개의 각질세포와 連結되어 表皮-멜라닌 單位(epidermal-멜라닌 unit)를 形成하는데, 이 突起를 통하여 melanosome이 각질세포로 이동 된다<sup>30)</sup>. 본 研究에서도 枳椇子抽出物은 B16F10 細胞의 樹枝狀突起 形成을 抑制하였다(Fig. 2).

멜라닌은 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 일련의 反應에 의해 合成된다. 특히 tyrosinase는 tyrosine을 DOPA, DOPAquinone으로 轉換시키는 初期 反應段階와 마지막 eumelanin 形成 段階의 反應을 觸媒하고, TRP-1은 tyrosinase를 安定化 시키는 機能을 하는 것으로 알려져 있기 때문에 tyrosinase는 eumelanin 形成에 중요한 役割을 하고 있다<sup>31)</sup>. 본 실험에서 Western blot을 통해 tyrosinase, TRP-1 및 TRP-2의 단백질 발현정도를 조사한 결과 枳椇子抽出物은 TRP-1과 TRP-2에 비하여 tyrosinase의 發現을 현저히 抑制하였음을 알 수 있었다.

이상의 結果를 종합해 보면, 枳椇子抽出物은 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 合成을 抑制하여 멜라닌의 生成을 抑制하는 것으로 確認되어, 枳椇子抽出物은 美白化粧品의 原料物質로서의 開發 可能性이 높은 것으로 기대되어 진다.

## 결 론

枳椇子抽出物이 멜라닌 合成 調節 기전에 미치는 影響을 調査하고자, B16F10 細胞를 利用하여 tyrosinase 活性 및 멜라닌의 量, 멜라닌 色素 沈着의 肉眼的인 觀察과 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 蛋白質 發現양상을 調査하였다. 實驗 結果, 枳椇子抽出物 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  濃度에서 細胞生存率은  $90\pm 1.5\%$ 로 細胞毒性은 매우 미약하였으며, tyrosinase 活性과 멜라닌 生成을 유의성 있게 抑制하였고, 形態學的 觀察에서도 細胞의 樹枝狀突起를 감소시켰다. 그러나 버섯 tyrosinase 活性의 경우 枳椇子抽出物은 어떠한 影響도 미치지 않았다. 멜라닌의 合成에 關여하는 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2 등의 蛋白質 發現變化를 測定한 結果 枳椇子抽出物은 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 蛋白質 發現을 유의하게 감소시켜 멜라닌 生成을 抑制하는 것으로 나타났다.

이상의 結果 枳椇子抽出物은 B16F10 細胞에서 細胞毒性이 적으면서 tyrosinase 活性과 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 發現을 抑制하여, 멜라닌 生成을 效果的으로 감소시켰으며, 추후 美白效果와 안정성을 보다 체계적으로 규명하기 위한 實驗과 미백기능성

물질의 구조 규명이 필요할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2007년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

## 참고문헌

1. 안영희, 최정숙. The Whitening Effect by Water Extracts of Bombyx Mori Linne. Korean Society of Fashion and Beauty 4(4):81-86, 1996.
2. Walter, E., Philippe, B., Corine, B., Roser, B., Benoit, D., Antonia, L.J.F.P., Jean-Paul, O. and Robert, B. Tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition of melanogenesis is dependent on nuclear factor kappa B activation. Oncogene 18: 1553-1559, 1999.
3. Sugai, T. Clinical effects of arbutin in patients with chlosma in Japanese. Hifu. Skin Res. 34: 522-529, 1992.
4. Hearing, V.J., Jimenez, M. Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. Int J Biochem 19(12):1141-1147, 1987.
5. Manga, P., Sato, K., Ye, L., Beermann, F., Lamoreux, M.L., Orlow, S.J. Mutational analysis of the modulation of tyrosinase by tyrosinase-related proteins 1 and 2 in vitro. pigment Cell Res 13(5):364-374, 2000.
6. Abdel, M.Z., Scott, M.C., Suzuki, I., Tada, A., Im, S., Lamoreux, L., Ito, S., Barsh, G., Hearing, V.J. The melanocortin I receptor is a key regulator of human cutaneous pigmentation. Pigment Cell Res 8(2):156-162, 2000.
7. Prota, G. Recent advance in the chemistry of melanogenesis in mammals. J. Invest. Dermatol 75: 122, 1990.
8. Pavel, S., Muskiet, F.A. Eumelanine(precursor) metabolites as marker for pigmented malignant melanoma, a preliminary report. Cancer Detection and Prevention 6: 317, 1980.
9. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典. 서울,鼎談, pp 3938-3939, 1997.
10. 金在佶外. 東洋天然藥物原色圖鑑. 서울, 영림사, pp 291-292, 1995.
11. 李時珍. 本草綱目. 北京, 人民衛生出版社, pp 1845-1846, 1982.
12. 巖浩等. 得配本草. 北京, 中國中醫藥出版社, pp 111-112, 1997.
13. 達美君. 植物本草. 北京, 人民衛生出版社, pp 529-531, 1994.
14. Park, K.H., Moon J.H. Isolation and Identification of 3-Methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-Methoxy-4-hydroxycinnamic acid from Hot Water Extracts of Hovenia dulcis Thunb and Confirmation of their Antioxidative and antimicrobial Activity. 한국식품과 학회지 32(6):1403-1408, 2000.

15. Ramiya, VK. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med*, 6: 278-282, 2000.
16. Lechner, A. Stem cells and regenerative medicine for the treatment of type 1 diabetes: the challenges lying ahead. *Pediatr Diabetes* 5(Supply2):88-93, 2004.
17. Kodama, S., Faustman, D.L. Routes to regenerating islet cells: stem cells and other biological therapies for type 1 diabetes *Pediatr Diabetes* 5(Supply2):38-44, 2004.
18. Hase, K., Ohsugi, M., Xiong, Q., Basnet, P., Kadota, S., Namba, T. Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* Thunb. on experimental Liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide. *Biol Pharm Bull* 20: 381-385, 1997.
19. Yoshikawa, M., Murakami, T., Ueda, T., Yoshizumi, S., Ninomuya, K., Yamahara, J. Bioactive constituents of Chinese natural medicines, III. Absolute stereostructures of new dihydroflavonols, hovenitins I, II, and III, Isolated from *Hovenia Semen Seu fructus*, the seed and fruit of *Hovenia dulcis* Thunb (Rhamnaceae): Inhibitory effect on alcohol-induced muscular relaxation and hepatoprotective activity. *Yakukaku Zasshi* 117: 108-118, 1999.
20. Friedmann, P.S. and Gilcrest, B.A. Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocytes. *J. Cell Physiol* 133(1):88-94, 1987.
21. De Leeuw, S.M., Smit, N.P., Van, V.M., Penning, E.M., Pavel, S., Simons, J.W., Schothorst, A.A. Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. *J Photochem Photobiol B*. 30, 61(3):106-113, 2001.
22. Hearing, V.J. Mammalian monophenol monoxygenase (Tyrosinase): purification properties and reaction catalyzed. *Method in Enzymology* 142: 154-165, 1987.
23. Hearing, V.J., Tsukamoto, K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J*. 5: 2902-2909, 1991.
24. Maeda, K., Fukuda, M. In vivo effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem* 42: 361-368, 1991.
25. 천현자, 문연자, 김정훈, 김일광, 전병훈, 우원홍. 음약과 물추출물이 B16 Mouse Melanoma 세포의 melanin 생성에 미치는 영향. *약학회지* 44(5):455-462, 2000.
26. 이황희, 배석, 진종언. 지치 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과. *한국식품영양과학회지* 34(9):1325-1329, 2005.
27. 천현자, 최은영, 윤성찬, 남향우, 백승화, 우원홍. 백출의 에탄올 추출물에 의한 melanin 생성 억제 효과. *약학회지* 45(3): 296-275, 2001.
28. 문연자, 김진, 임난영, 이승연, 곽섭, 황충연, 우원홍. 감초 물 추출물의 멜라닌 형성 억제효과. *동의생리병리학회지* 16(6): 1230-1235, 2002.
29. 이승연, 김진만, 오현철, 임숙정, 황충연, 문연자, 우원홍. 더덕추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향. *대한한의학 방제학회지* 10(2):199-211, 2002.
30. Provance, D.W., Jr, Wei, M., Ipe, V., Mercer, J.A. Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melano some distribution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(25):14554-14558, 1996.
31. Kobayashi, T., Imokawa, G., Bennett, DC., Hearing, V.J. Tyrosinase stabilization by Tyrpl (the brown locus protein). *J Biol Chem* 273(48):31801-31805, 1998.