

## 오디씨 에탄올 추출물의 멜라닌 합성 억제효과

정용태<sup>†</sup> · 강민주<sup>†</sup> · 김진희<sup>\*</sup>

에이치케이(HK)바이오, \*대구한의대학교 한방산업대학  
(2015년 6월 19일 접수, 2015년 9월 8일 수정, 2015년 9월 14일 채택)

### Melanogenesis Inhibitory Activities of Mulberry Seed Ethanol Extracts

Yong Tae Jeong<sup>†</sup>, Min Ju Kang<sup>†</sup>, and Jin Hee Kim<sup>\*</sup>

HK bio, business incubator, Daegu Haany University, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-715, Korea  
<sup>\*</sup>College of herbal Bio-Industry, Daegu Haany University, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-715, Korea  
(Received June 19, 2015; Revised September 8, 2015; Accepted September 14, 2015)

**요약:** 본 연구는 오디씨 에탄올 추출물(MSE)의 멜라닌 합성 저해 효과를 밝히는 것이다. 먼저 MSE의 mel-an-a 세포를 이용한 멜라닌 합성 저해 실험결과, 독성을 보이지 않는 10  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 멜라닌 합성 저해 효과를 나타내었다. 또한 tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) 단백질의 발현이 저해되었으며, extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)의 발현을 농도 의존적으로 증가시키는 MSE의 기전을 확인하였다. 뿐만 아니라, 제브라피쉬를 이용한 *in vivo* 모델의 실험에서도 색소 발생이 저해됨을 관찰하였다. 따라서 오디씨로부터 획득한 에탄올 추출물이 ERK 단백질의 발현으로 인해 멜라닌 생합성을 억제할 수 있음을 밝혔다.

**Abstract:** The purpose of this study was to investigate anti-melanogenesis effects of mulberry seed extracts (MSE). MSE inhibited melanogenesis in melan-a cells at 10  $\mu\text{g/mL}$  without cytotoxicity. Also, MSE decreased tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) protein expression in the melan-a cells. To identify the signaling pathway of MSE, the ability of MSE to influence extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) activation was investigated. MSE induced ERK protein expression in a dose-dependent manner. In addition, MSE presented inhibition of the body pigmentation *in vivo* zebrafish model. These results suggest that MSE may be an effective anti-melanogenesis agent regulating the expression of ERK protein and melanogenic enzymes.

**Keywords:** Mulberry seed, melanogenesis, melan-a, zebrafish, ethanol extract

## 1. 서 론

사람의 피부는 ultraviolet (UV)와 같은 고에너지 광원으로부터 피부를 보호하기 위해 멜라닌을 합성한다 [1]. 그러나 멜라닌의 과생성은 기미 주근깨, 주름과 같은 피부질환을 일으키기도 하며 [2], 외모에 대한 관심이 증가한 현대인들이 선호하는 맑고 깨끗한 피부 유지를 위해서, 멜라닌의 과생성을 억제하는 기능성 성

분에 대한 현대인들의 요구도가 증가되고 있다. 따라서 피부 속의 멜라닌 합성을 저해함으로써 미백 효과를 가지는 물질에 대한 연구가 활발히 진행되며, 현재 산업적으로 사용되는 멜라닌 저해제로는 arbutin과 kojic acid 등이 있다 [3]. 그러나 이런 물질은 미백 활성이 떨어지며 과다 사용시 부작용이 발생할 위험성을 내포하고 있어 제한적으로 사용되어지고 있다 [4]. 따라서 안전하며 고효율의 멜라닌 저해제의 개발이 요구되고 있고, 천연물로부터의 미백활성을 물질을 찾기 위한 많은 연구들이 수행되고 있는 실정이다.

멜라닌의 합성에 있어서 key protein은 tyrosinase,

<sup>†</sup> 주 저자(e-mail: franken3@gmail.com, alswn7622@nate.com)  
call: 053)851-3662

tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2가 있으며 이들 단백질에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)이 DOPA quinone으로 전환된 후 일련의 과정을 거쳐 멜라닌이 합성된다[5]. 따라서 멜라닌 생성의 첫 단계인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질의 활성을 억제함으로써 미백활성을 기대할 수 있다.

오디(Mulberry)는 뽕나무(*Morus alba* L.)의 열매로써 5월에서 6월에 걸쳐 과실이 검은색 또는 자홍색을 나타낼 때 채취하여 식용하거나 건조하여 사용하고 있다[6]. 한방에는 백발을 검게 하며 소갈(당뇨)을 덜어주며 오장을 이롭게 하는 자양, 강장제로써 이용되어져 왔다[7]. 이러한 오디를 이용한 많은 생리활성 연구가 이루어져 왔으나 오디씨에 대한 연구는 미비한 실정이다. 최근 오디 와인 제조 시 획득되는 부산물인 오디씨로부터 향산화, 항암, 항당뇨 성분인 폴리페놀 화합물이 분리되었다[8,9]. 하지만 오디씨로부터 멜라닌 합성 저해능은 아직 보도된 바 없다. 따라서 본 연구는 오디씨 에탄올 추출물이 가지고 있는 멜라닌 합성 저해 효과를 melan-a 세포와 제브라피쉬를 이용하여 살펴보고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 기기 및 시약

본 실험에서 사용된 시약은 L-tyrosine, 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, 1-phenyl-2-thiourea (PTU)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, anti-ERK1/2, anti-phosphorylated ERK1/2 (p-ERK), anti-rabbit IgG antibodies는 Cell Signaling Technology (USA)에서 구입하였다. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) antibody는 Thermo Fisher Scientific (USA)에서 구입하였으며, Tyrosinase, TRP-1, TRP-2는 National Institutes of Health, Bethesda, MD의 Dr. VJ Hearing으로부터 기증받아 사용하였다.

### 2.2. 시료추출

본 실험에 사용한 오디씨는 (주)한국와인으로부터 획득, 사용하였다. 오디씨는 수세 및 침지를 여러 번 반복하여 실시하고 탈수한 후  $50 \pm 5$  °C에서 열풍건조한 다음 추출에 사용하였다. 건조된 오디씨를 분쇄한 후 95% 에탄올로 2주간 추출한 다음 감압농축하여 에

탄올 추출물을 획득하였다.

### 2.3. 세포배양

Melan-a 세포는 런던대학 St. George 의과대학의 D.C. Bennett 박사가 C57BL/6 mice에서 채취하여 만들어낸 것으로 immortalized melanocyte이다(St George's Hospital Medical School, London, UK). 세포는 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건인 CO<sub>2</sub>배양기(Thermo, USA)에서 배양되었다. 사용된 배지는 10% fetal bovine serum (Gibco Co., USA)이 포함된 RPMI-1640 배지에 1% penicillin/streptomycin과 200 nM 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate를 첨가하였으며, 약 24 h 주기로 RPMI-1640 배양액을 교체하였다. 세포독성은 cell counting kit-8 (CCK-8, Dojindo Lab., Japan)을 사용하여 측정하였다.

### 2.4. 멜라닌 양 측정

멜라닌 양은 Hosoi 등의 방법을 변형하여 사용하였다[10]. Melan-a 세포  $1 \times 10^5$ 개를 24-well plate의 각 well에 분주하여 하룻밤 배양하여 실험에 사용하였다. MSE를 농도별로 배지에 처리하여 3일 동안 배양했다. 이후 phosphate-buffered saline으로 세척하고 1 N NaOH를 200  $\mu$ L씩 각 well에 처리하여 용해시켰다. 용해된 세포를 96 well plate로 옮겨 microplate reader (Bio-Rad 3550, Bio-Rad, USA)를 사용하여 optical density를 405 nm에서 측정하고 melanin 생성 억제율은 대조군과 대비해 %로 계산한다.

### 2.5. Western blot 분석

웨스턴 블롯 방법을 이용하여 melanin 합성에 작용하는 단백질(tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2 등)의 발현을 분석하였다. 상기의 melan-a 세포를 배양하여 1.25 ~ 10  $\mu$ g/mL의 농도의 MSE를 24 h 처리한 후, 상기 세포를 단백질분해효소 저해제(protease inhibitor cocktail, Sigma, St. Louis, MO USA)를 첨가한 RIPA 완충용액(10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% NP-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA)으로 용해시켰다. 이후, 얻어진 세포 용해물을 4 °C에서 5 min 간 12,000  $\times$  g으로 원심 분리한 후, BCA 단백질 키트를 이용하여 단백질의 농도를 측정하였다. 세포에서 추출한 단백질에 전기영동용 완충용액(sample buffer)을 첨가하고 100 °C에서 5 min간

가열한 후 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하였다. 전기영동 후, 분자량별로 분리된 단백질은 젤에서 nitrocellulose (NC) membrane에 전이시켰다. 이때, 비특이적 반응을 최소화하기 위해 완충용액(phosphate buffered saline; PBS (pH 7.4), 0.1% Tween 20, 5% skimmed milk)을 1 h 동안 상온에서 반응시킨 후, 1차 항체를 다음과 같이 희석하여 사용하였다. 항체 희석은 5% Skim milk 용액을 이용하여 상온에서 1 h 동안 반응시켜 희석하였다. 반응 후, 세척 완충액(0.1 % Tween-20, PBS)으로 5 min 간 3 ~ 4회 세척한 후 1 : 5000으로 희석시킨 2차 항체 (HRP-conjugated anti-goat IgG antibody) 용액으로 1 h 동안 상온에서 반응시켰다. 2차 항체 반응 후, ECL (enhanced chemiluminescence) 시약을 사용하여 분석대상 단백질 밴드를 발색시켜 정량하였다.

## 2.6. 제브라피쉬 사육

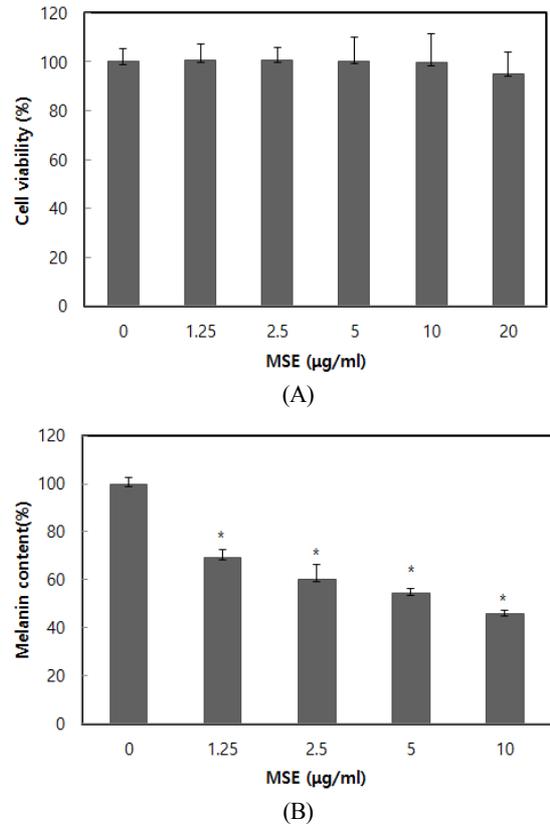
성숙 zebrafish는 14 : 10 h의 낮과 밤의 주기로 28.5 °C의 수온을 유지, 폐쇄 순환 여과 시스템을 갖춘 수조에서 사육하였다[11,12]. 성숙 zebrafish는 20 L 수조에 3 ~ 5마리 넣고 살아있는 brine shrimp (San Francisco BayBrand, Inc., USA)를 하루에 3번 먹이 하였다. 적정 생육온도인 28.5 °C의 수온을 유지한 어항에서 사육하였다.

## 2.7. 제브라피쉬 멜라닌 저해 실험

성숙 zebrafish 암수를 알 채취 전날 알 채취용 수조에 넣고 다음날 광주기 시기 1 ~ 2 h 이후에 알을 채취하였다. 채취된 알은 zebrafish embryo medium에 넣고 24 h 발생 시킨 후, 각 샘플을 농도별로 처리하였다. 샘플 처리 시 코리온(chorion)의 샘플 투과 정도를 알 수 없기에 각 알의 코리온에 구멍을 내어 처리하였고, MSE 처리 후 24 h 이후 샘플의 독성이 나타난 알은 제거하고, 나머지 알의 코리온을 완전 제거 후 2번째 샘플을 처리하였다. MSE 처리 48 h 이후에 대조구 대비 샘플 처리구의 색소 발생 정도를 실체현미경으로 관찰하였다.

## 2.8. 통계처리

본 연구의 모든 결과는 3회 반복 실험에 대한 평균(mean) ± 표준오차(standard deviation, SD)로 나타내었으며, 통계분석은 Student's t-test를 실시하여 관찰하였다.

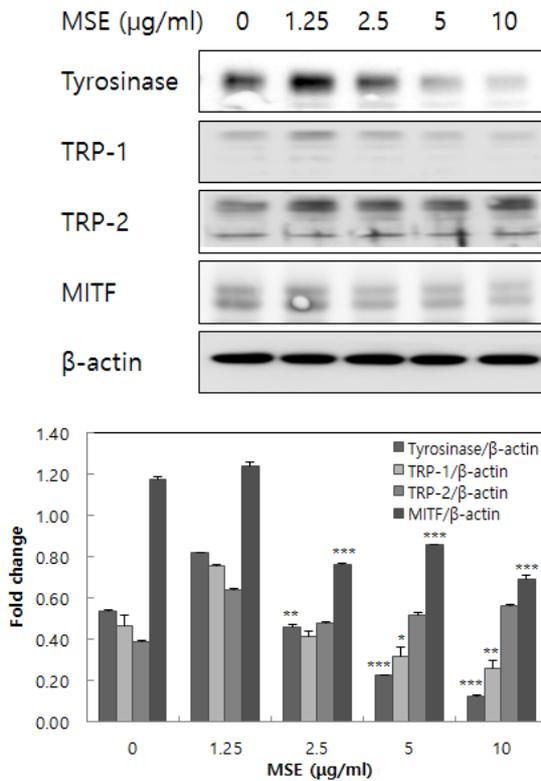


**Figure 1.** Effects of mulberry seed ethanol extract (MSE) on cell cytotoxicity and melanogenesis in melan-a cells. (A) Effect of cell cytotoxicity was measured with triplicate experiment. The cells were cultured with 0 ~ 20 µg/mL of MSE for 3 days, and cell cytotoxicity was determined by CCK-8 cell counting kit. (B) Inhibition of melanin synthesis was measured with triplicate experiment. The cells were cultured with 0 ~ 10 µg/mL of MSE for 3 days. Each value is expressed a means ± SD of triplicate determinations. \* $p < 0.001$  versus of untreated group.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 오디씨 에탄올 추출물이 melan-a 세포의 멜라닌 합성에 미치는 영향

생체 내에서의 멜라닌 합성과정은 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase에 의해 hydroxylation 반응을 거쳐 3,4-dihydroxyindolephenylamine (L-DOPA)으로 되고 이것은 다시 L-DOPA quinone으로 산화된다[13]. 이후 아미노산 혹은 단백질과 중합 반응에 의해 멜라닌이 합성되는 것으로 알려져 있다[14]. MSE에 의한 melan-a 세포에서의 세포독성을 CCK-8 assay kit를 이용하여

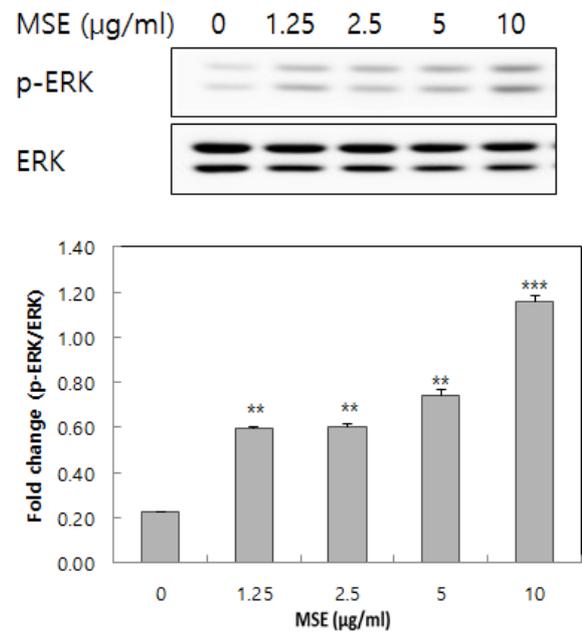


**Figure 2.** Effects of mulberry seed ethanol extract (MSE) on melanogenesis and expression of melanogenesis-related protein in melan-a cells. The cells were cultured with 0 ~ 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of MSE for 24 h. Whole-cell lysate were then subjected to western blot analysis using antibodies against tyrosinase, TRP-1, TRP-2, and MITF. Equal protein loading was confirmed using  $\beta$ -actin antibody. The blot shown is representative of three independent experiments performed in triplicate. Each values are expressed a means  $\pm$  SD of triplicate determinations. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus of untreated group.

분석하였다(Figure 1A). 그 결과, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 약한 독성을 나타내었다. 따라서 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이하에서 melan-a 세포의 멜라닌 합성 저해 효과를 실험하였다. Figure 1B에서와 같이 농도 의존적으로 melan-a 세포 내의 멜라닌 함량이 감소되는 경향을 보였으며, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 무처리군 대비 54% 감소되는 것을 확인하였다.

### 3.2. 오디씨 에탄올 추출물 멜라닌 합성 저해에 관한 기전 연구

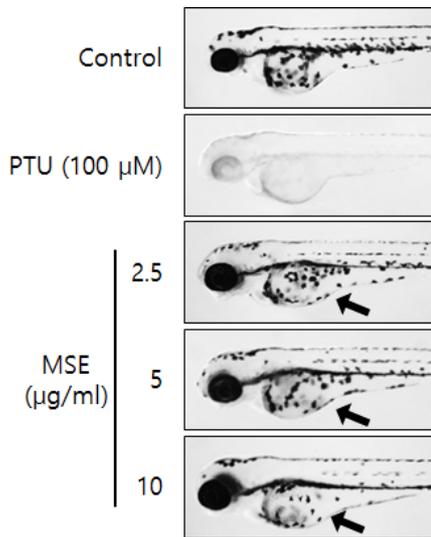
MSE의 멜라닌 합성 저해 기전을 알아보기 위하여



**Figure 3.** Effects of mulberry seed ethanol extract (MSE) on ERK protein expression in melan-a cell. The cells were cultured with 0 ~ 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of MSE for 24 h. Whole-cell lysate were then subjected to western blot analysis using antibodies against p-ERK, and ERK. The blot shown is representative of three independent experiments performed in triplicate. Each values are expressed a means  $\pm$  SD of triplicate determinations. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus of untreated group.

멜라닌 합성에 관련된 주요 효소인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF에 대한 단백질 발현 정도를 western blot 을 이용하여 확인하였다(Figure 2). 그 결과, tyrosinase, TRP-1, MITF 단백질 발현을 농도 의존적으로 감소시켰음을 확인하였다. 그러나 TRP-2 단백질의 발현에는 변화가 없는 것으로 나타나 MSE에 의한 멜라닌 합성 저해 효과에 영향을 미치지 않았다. 따라서 tyrosinase, TRP-1과 MITF 단백질이 MSE에 의해 저해됨으로써 멜라닌 합성 저해 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

최근 논문에 의하면 세포 내 신호전달 단백질로 알려져 있는 ERK의 신호기전에 의해 멜라닌 생합성을 조절한다고 알려져 있다[14]. 따라서, MSE가 melan-a 세포에서 ERK를 발현시키는지 확인하였다(Figure 3). 그 결과, MSE의 농도가 증가할수록 phosphorylation ERK가 증가되었다. 특히 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 현저하게 증가되었다. MITF는 멜라닌의 합성 과정에서 중요



**Figure 4.** Effects of mulberry seed ethanol extract (MSE) on melanogenesis in zebrafish. Decline of pigment cells is shown (black arrowhead). Synchronized embryos were treated with melanogenic inhibitors at the indicated concentrations. MSE were dissolved in 0.1% DMSO then added to the embryo medium. The effects on the pigmentation of zebrafish were observed under the stereomicroscope.

한 전사 조절 인자로 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 전사를 촉진하는 것으로 알려져 있다[15-17]. phosphorylation-ERK의 증가로 인해 MITF의 serine-73 잔기의 phosphorylation을 유도하여 MITF의 ubiquitination이 이루어져 proteosomal degradation을 일으키게 됨으로써 멜라닌 합성을 저해시키는 것으로 알려져 있다[18]. Figure 2, 3에서와 같이 p-ERK가 증가할수록 MITF가 감소됨을 확인하였다.

### 3.3. 제브라피쉬의 멜라닌 합성 저해 활성

MSE를 zebrafish embryo에 처리한 후 48 h 후에 멜라닌 합성에 미치는 영향을 살펴본 결과 Figure 4와 같이 MSE가 증가됨으로써 zebrafish의 요크(yolk) 부분의 색소 침착이 대조구 대비 저해되는 것이 관찰되었다. zebrafish는 발생이 빠르며 한번에 알을 100 ~ 200개를 낳는다. 최근 동물실험을 동물윤리 문제로 인해 하등동물 또는 세포 실험으로 대체하려 하나 생리활성의 복잡한 메카니즘으로 인해 연구에 한계가 있다[19]. 이와 같은 이유로 zebrafish는 새로운 동물모델로 각광을 받고 있다[20]. 더욱이 zebrafish embryo의 몸 색깔이 투명

해 색소 관찰이 용이함으로써 미백제 탐색에 많이 이용되고 있다[21,22].

## 4. 결 론

오디씨 에탄올 추출물의 멜라닌 합성 저해 효과를 살펴보기 위해 melan-a 세포와 zebrafish를 이용하였다. 그 결과, melan-a 세포의 멜라닌 합성이 저해되었는데 이는 melan-a 세포 내의 p-ERK의 증가로 인해 MITF가 저해 되며, tyrosinase와 TRP-1이 감소됨으로써 멜라닌 합성이 저해되는 것으로 사료된다. 또한 zebrafish의 멜라닌 합성이 저해됨을 확인하여 미백 화장품 천연 소재로서의 활용 가능성이 높을 것으로 생각된다.

## Reference

1. M. Tsatmali, J. Ancans, and A. J. Thody, Melanocyte function and its control by melanocortin peptides, *J. Histochem. Cytochem.*, **50**(2), 125 (2002).
2. S. Briganti, E. Camera, and M. Picardo, Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment Cell Res.*, **16**(2), 101 (2003).
3. N. Fujimoto, H. Watanabe, T. Nakatani, G. Roy, and A. Ito, Induction of thyroid tumours in (C57BL/6N × C3H/N)F1 mice by oral administration of kojic acid, *Food Chem. Toxicol.*, **36**(8), 697 (1998).
4. J. F. Hermanns, C. Pierard-Franchimont, and G. E. Pierard, Skin colour assessment in safety testing of cosmetics. An overview, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **22**(1), 67 (2000).
5. S. Y. Lee, H. I. Jun, I. C. Lee, and J. Y. Lee, Down-regulation of tyrosinase, MITF, TRP-1, and TRP-2 expressions by *Juniperus rigida* sieb. in murine B16F10 melanoma, *J. Life Sci.*, **23**(12), 1445 (2013).
6. S. G. Kim and K. O. Kang, Effects of extraction method on physiological activity and antibiosis of mulberry powder, *J. East Asian Soc. Diet. Life*, **22**(3), 392 (2012).
7. S. K. Kim, Beneficial medicine, mulberry fruit. In

- Bonchohak, 598, Younlimsa, Seoul (1991).
8. E. O. Kim, M. H. Yu, Y. J. Lee, H. H. Leem, S. A. Kim, D. H. Kang, and S. W. Choi, Comparison of functional constituents and biological activity of the seed extracts from two mulberry fruits, *J. Food Sci. Nutr.*, **15**(2), 98 (2010).
  9. Y. J. Lee, E. O. Kim, and S. W. Choi, Isolation and identification of antioxidant polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba L.*) Seeds, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **40**(4), 517 (2011).
  10. J. Hosoi, E. Abe, T. Suda, and T. Kuroki, Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 $\alpha$ -25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid, *Cancer Res.*, **45**(4), 1474 (1985).
  11. C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, and T. F. Schilling, Stages of embryonic development of the zebrafish, *Dev. Dyn.*, **203**(3), 253 (1995).
  12. M. Westerfield, The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), University of Oregon Press, Eugene, Oregon (1993).
  13. K. Jimbow, W. C. Quevedo, T. B. Fitzpatrick, and G. Szabo, Biology of melanocyte, *Dermatology in general medicine*, 4th Ed., 261, McGraw-Hill Book, New York (1993).
  14. H. S. Yoon, S. R. Lee, H. C. Ko, S. Y. Choi, J. G. Park, J. K. Kim, and S. J. Kim, Involvement of extracellular signal-regulated kinase in nobiletin-induced melanogenesis in murine B16/F10 melanoma cells, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **71**(7), 1781 (2007).
  15. K. Yasumoto, K. Yokoyama, K. Takahashi, Y. Tomita, and S. Shibahara, Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes, *J. Biol. Chem.*, **272**(1), 503 (1997).
  16. C. Bertolotto, K. Bille, J. P. Ortonne, and R. Ballotti, In B16 melanoma cells, the inhibition of melanogenesis by TPA results from PKC activation and diminution of microphthalmia binding to the M-box of the tyrosinase promoter, *Oncogene*, **16**(13), 1665 (1998).
  17. J. H. Kim, S. H. Baek, D. H. Kim, T. Y. Choi, T. J. Yoon, J. S. Hwang, M. R. Kim, H. J. Kwon, and C. H. Lee, Downregulation of melanin synthesis by hagin A and its application to *in vivo* lightening model, *J. Invest. Dermatol.*, **128**(5), 1227 (2008).
  18. F. Solano, S. Briganti, M. Picardo, and G. Ghanem, Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects, *Pigment Cell Res.*, **19**(6), 550 (2006).
  19. S. H. Baek, J. H. Park, and J. H. Kim, Screening of medicinal herbs against melanin biosynthesis inhibition *in vivo* zebrafish model, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **11**(3), 505 (2013).
  20. K. A. Stanley, L. R. Curtis, S. L. Simonich, and R. L. Tanguay, Endosulfan I and endosulfan sulfate disrupts zebrafish embryonic development, *Aquat. Toxicol.*, **95**(4), 355 (2009).
  21. T. Y. Choi, J. H. Kim, D. H. Ko, C. H. Kim, J. S. Hwang, S. Ahn, S. Y. Kim, C. D. Kim, J. H. Lee, and T. J. Yoon, Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds, *Pigment Cell Res.*, **20**(2), 120 (2007).
  22. T. O'Reilly-Pol, and S. L. Johnson, Neocuproine ablates melanocytes in adult zebrafish. *Zebrafish*, **5**(4), 257 (2008).