

물여뀌 에탄올 추출물의 미백 효과

황병수, 이승영, 강창희, 한웅, 오영택, 유상미, 김민진, 김철환, 엄정혜, 정상철, 이육재, 안영희, 정용태*
국립낙동강생물자원관

Received: October 18, 2018 / Revised: November 2, 2018 / Accepted: November 12, 2018

Whitening Activities of Ethanol Extract from *Polygonum amphibium* L.

Buyng Su Hwang, Seung Young Lee, Chang Hee Kang, Woog Han, Young Taek Oh, Sang Mi Yu, Min Jin Kim, Chul Hwan Kim, Jung Hye Eom, Sang Chul Jeong, Wook Jae Lee, Young Hee Ahn, and Yong Tae Jeong*
Freshwater Bioresources Utilization Bureau, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju 37242, Republic of Korea

The purpose of this study was to investigate the melanogenesis inhibiting activity of the ethanol extract from *Polygonum amphibium* L. Firstly, the n-hexane (Hx), chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (EA), n-butanol (BuOH), and water (Water) fractions were isolated from the *P. amphibium* L. ethanol extract. The efficacy of melanogenesis was found to significantly decrease via the EA and BuOH fractions when compared to the control in B16F10 cells. EA particularly showed the lowest melanin content in B16F10 cells when compared to all the other extracts. Concentration-dependent inhibition of melanin synthesis was also observed in the EA fraction at concentrations below 50 µg/ml, which did not exhibit cytotoxicity in B16F10 cells. Notably, the expression of three key proteins (tyrosinase, tyrosinase-related protein-1 (TRP-1), and TRP-2), which are involved in melanogenesis, were significantly decreased via the EA fraction. EA also inhibited body pigmentation *in vivo* in a zebrafish model. Overall, we demonstrated melanogenesis suppression using the EA fraction from *P. amphibium* L., which could be a potential candidate for an anti-melanogenesis agent.

Keywords: *Polygonum amphibium* L., melanogenesis, B16F10, zebrafish, ethanol extract

서 론

물여뀌(*Polygonum amphibium* L.)는 마디풀속 여뀌절에 속하는 식물로써 육상 및 수중 환경 모두에 서식할 수 있는 분류군이다. 현재 북미, 동아시아, 유럽 등 북반구의 온대에서 아한대 지방에 주로 자라며, 남미, 멕시코 및 남아프리카 등지에도 일부 유입되어 자라고 있는 것으로 알려져 있다[1]. 이러한 물여뀌에 대한 생리활성 연구는 많이 이루어져 있지 않으며, 림프구 활성화, 항암 및 항산화 효과에 대한 보고가 있을 뿐이다[2–4].

미백에 대한 관심은 외모에 대한 관심이 증가된 현대인에게 크게 증가된 양상이다. 이러한 미백 효과는 멜라닌의 합

성 제어와 밀접한 관계가 있다. 멜라닌은 ultraviolet (UV)와 같은 고에너지 광원으로 부터 피부를 보호하기 위해 멜라닌을 합성하지만 과생성시에는 기미 주근깨, 주름과 같은 피부 질환을 야기한다[5, 6]. 이러한 멜라닌의 과생성을 억제하고 피부에 침착되는 멜라닌을 제어하는 물질을 찾는 연구가 최근 활발하며 현재 화장품과 같은 산업적으로 이용되는 멜라닌 저해제로 대표적인 물질은 arbutin과 kojic acid 등이 있다[7]. 그러나 과다 사용 시 피부자극 및 알레르기과 같은 부작용이 발생할 위험성을 내포하고 있어 제한적으로 사용되어지고 있다[8]. 따라서 안전적이며 효과적인 멜라닌 저해제를 찾기 위한 노력이 계속되고 있으며 특히 천연물로부터의 미백활성을 가진 물질을 찾기 위한 많은 연구들이 수행되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구를 통해서 미백에 대한 연구가 전무한 물여뀌 에탄올 추출물의 미백 활성을 B16F10 흑색종 세포와 제브라피쉬 embryo 모델을 이용하여 살펴보고자 한다.

*Corresponding author

Tel: +82-54-530-0936, Fax: +82-54-530-0949

E-mail: ytjeong@nnibr.re.kr

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

재료 및 방법

기기 및 시약

본 실험에서 사용된 시약은 L-tyrosine, NaOH, 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate, 1-phenyl-2-thiourea (PTU)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin 및 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)은 Gibco Co. (USA)에서 구입하여 세포를 배양하였으며 cell counting kit-8 (CCK-8)은 Dojindo Lab. (Japan)에서 구입하였다.

시료추출

물여뀌를 ethanol로 먼저 추출한 후 water로 현탁한 다음, 동량의 hexan으로 진탕 추출하여 hexan 분획(Hx)을 회수

하였다. 증류수층을 다시 동량의 클로로포름으로 진탕 추출하여 클로로포름 분획(CHCl₃)을 회수하고 증류수층을 다시 동량의 에틸 아세테이트로 진탕 추출하여 에틸 아세테이트 분획(EA)을 회수하며 증류수 층을 위 방법과 동일하게 부탄올로 진탕 추출하여 부탄올 분획(BuOH)을 얻었으며, 나머지 증류수 층으로 네 종류의 분획을 Fig. 1과 같이 분리하였다.

세포배양

미백 활성 실험에 널리 이용되는 B16F10 mouse melanoma 세포 배양은 37°C, 5% CO₂의 조건인 CO₂ 배양기 (Thermofisher, USA)에서 배양되었다. 사용된 배지는 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 세포독성은 CCK-8을 사용하여 측정하였다.

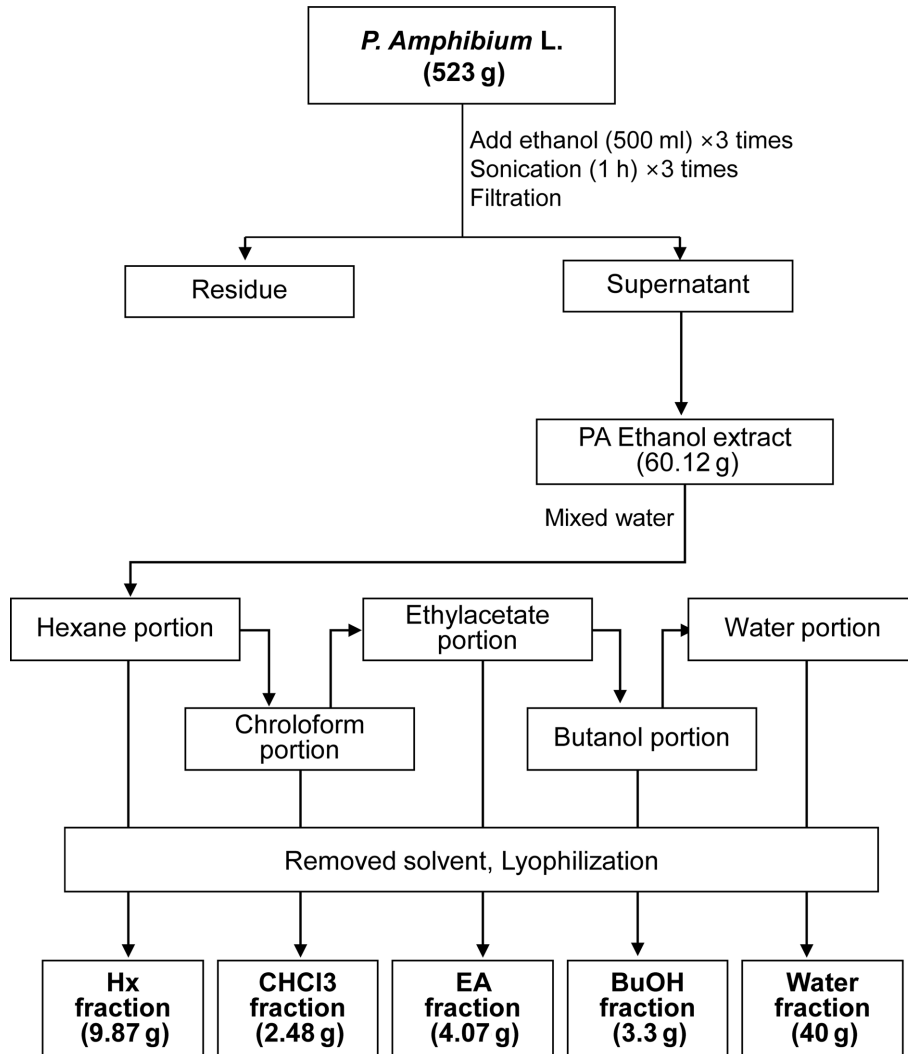


Fig. 1. The schematic diagram for the recovery of purified extract produced from the *P. amphibium* L.

멜라닌 양 측정

멜라닌 양은 Hosoi 등의 방법을 변형하여 사용하였다[9]. B16F10 세포 1×10^5 개를 24-well plate의 각 well에 분주한 후 200 nM의 α -MSH를 첨가하여 하룻밤 배양하여 실험에 사용하였다. 각 화합물을 농도별로 배지에 처리하여 4일 동안 배양했다. 이후 phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4)으로 세척하고 1 N NaOH를 200 μ l씩 각 well에 처리하여 용해시켰다. 용해된 세포를 96 well plate로 옮겨 microplate reader (Biotek cytation3)를 사용하여 optical density를 405 nm에서 측정하고 멜라닌 함량은 대조군과 대비해 %로 계산한다.

Western blot 분석

Western blot 방법을 이용하여 melanin 합성에 작용하는 단백질(tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2 등)의 발현을 분석하였다. 상기의 B16F10 세포를 배양하여 25, 50 μ g/ml 농도의 EA 분획을 72 h 처리한 후, 상기 세포를 단백질분해효소 저해제(protease inhibitor cocktail, Sigma, 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 g로 원심분리한 후, BCA 단백질 키트를 이용하여 단백질의 농도를 측정하였다. 세포에서 추출한 단백질에 전기영동용 완충용액을 첨가하고 100°C에서 5 min간 가열한 후 sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)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.

제브라피쉬 사육

성숙 제브라피쉬는 14:10 h의 낮과 밤의 주기로 28.5°C의 수온을 유지, 폐쇄 순환 여과 시스템을 갖춘 수조에서 사육하였다[10, 11]. 성숙 제브라피쉬는 20 L 수조에 3-5마리 넣고 살아있는 brine shrimp (San Francisco BayBrand, Inc.,

USA)를 하루에 3회 식이하였다. 적정 생육온도인 28.5°C의 수온을 유지한 어항에서 사육하였다.

제브라피쉬 멜라닌 저해 실험

제브라피쉬의 멜라닌 저해실험은 Choi 등의 방법을 변형하여 사용하였다[12]. 성숙 제브라피쉬 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 발생시킨 후, 각 샘플을 농도별로 처리하였다. 샘플 처리 시 코리온(chorion)의 샘플 투과 정도를 알 수 없기에 각 알의 코리온에 구멍을 내어 처리하였고, 샘플 처리 후 24 h 이후 샘플의 독성이 나타난 알은 제거하고, 나머지 알의 코리온을 완전 제거 후 2번째 샘플을 처리하였다. 샘플 처리 48 h 이후에 대조군 대비 샘플 처리구의 색소 발생 정도를 실체현미경으로 관찰하였다. 제브라피쉬 멜라닌 생성량은 코리온에 구멍 낸 100마리의 제브라피쉬 알에 샘플 처리를 48 h 처리하였다. 멜라닌 추출은 동량의 Pro-prep protein extraction solution (Intron) 처리 후 sonication하고 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물에 1 N NaOH (70°C)를 처리하여 용해시켰다. 용해된 침전물을 96 well plate로 옮겨 microplate reader (Biotek cytation3)를 사용하여 optical density를 405 nm에서 측정하고 멜라닌 함량은 대조군과 대비해 %로 계산한다.

통계처리

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

결과 및 고찰

물여뀌 에탄올 추출물의 B16F10 세포의 멜라닌 합성에 미치는 영향

물여뀌 전초 523 g을 에탄올로 추출하여 60.12 g의 에탄올 추출물의 회수하였다. 회수한 물여뀌 에탄올 추출물을 B16F10 세포를 이용하여 멜라닌 합성 저해능을 실험한 결과, 50 μ g/ml의 농도에서 16.4% 저해하였다(Fig. 2A). 이렇게 멜라닌 합성 저해능을 확인한 물여뀌 에탄올 추출물은 다시 유기용매로 분획처리하여 hexan 분획(9.87 g), 클로로포름 분획(2.48 g), 에틸 아세테이트 분획(4.07 g), 부탄올 분획(3.3 g), 그리고 Water 분획(40 g)으로 분리하였다. 각 분획 중 가장 높은 멜라닌 합성 저해능은 Fig. 2B에서와 같이 에틸 아세테이트 분획이 대조군 대비 통계적으로 유의미하게 감소하여 32.6%로 가장 높은 효과를 보였다.

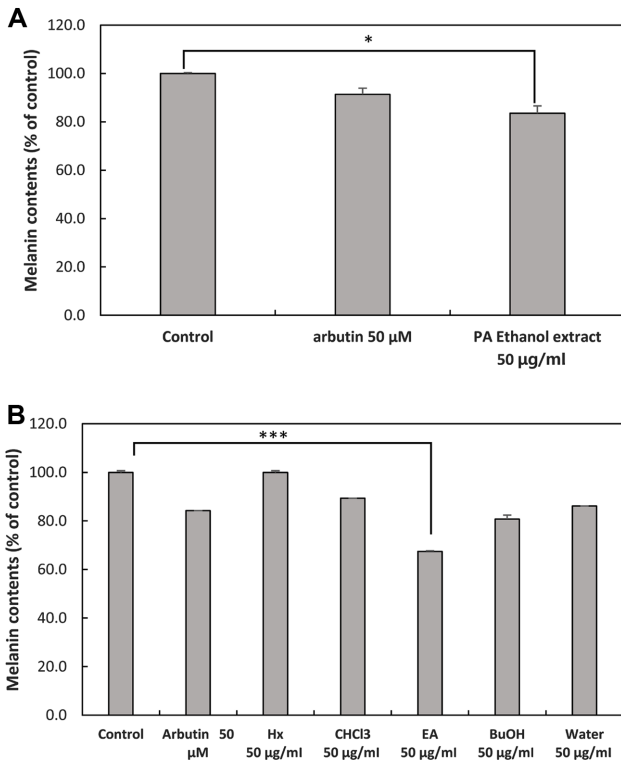


Fig. 2. Effects of *P. amphibium* L. ethanol extract on melanogenesis in B16F10 cells. (A) PA ethanol extract. (B) PA fractions. Inhibition of melanin synthesis was measured with triplicate experiment. The cells were cultured with 50 µg/ml of PA ethanol extract and PA fractions for 3 days. Each value is expressed a mean ± SD of triplicate determinations. **p* < 0.05, ****p* < 0.001 versus of control group.

물여뀌 에틸아세테이트(EA) 분획의 B16F10 세포의 멜라닌 합성에 미치는 영향

EA 분획에 의한 B16F10 세포에서의 세포독성을 CCK-8 assay kit를 이용하여 분석하였다(Fig. 3A). 그 결과, 100 µg/ml의 농도에서 부터 세포독성을 나타내어 50 µg/ml 이하의 농도에서 B16F10 세포의 멜라닌 합성 저해 효과를 실험하였다. Fig. 3B에서와 같이 농도 의존적으로 B16F10 세포내의 멜라닌 함량이 감소되는 경향을 보였으며, 이전 실험과 동일하게 50 µg/ml의 농도에서 대조군 대비 32.6% 감소되는 것을 확인하였다.

또한 EA 분획의 멜라닌 합성 저해 기전을 알아보기 위하여 멜라닌 합성에 관련한 주요 효소인 tyrosinase, TRP-1, TRP-2에 대한 단백질 발현 정도를 western blot을 이용하여 확인하였다(Fig. 4). 그 결과, tyrosinase 단백질이 확인되는 농도 의존적으로 감소되고 TRP-1, -2 단백질 발현은 tyrosinase 단백질에 비해 약하게 감소됨을 확인하였다. 따

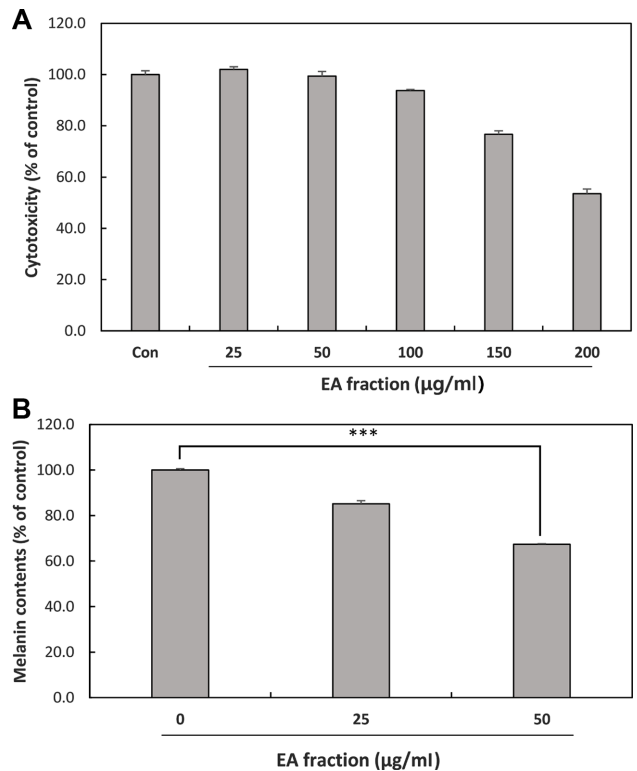


Fig. 3. Effects of EA fraction isolated from *P. amphibium* L. on cell cytotoxicity and melanogenesis in B16F10 cells. (A) Effect of cell cytotoxicity was measured with triplicate experiment. The cells were cultured with 0-200 µg/ml of EA fraction for 3 days, and cell cytotoxicity was determined by CCK-8 cell counting kit. (B) Inhibition of melanin synthesis was measured with triplicate experiment. The cells were cultured with 0-50 µg/ml of EA fraction for 3 days. Each value is expressed a mean ± SD of triplicate determinations. ****p* < 0.001 versus of control group.

라서 tyrosinase 단백질이 주요기전으로 작용하여 EA 분획에 의해 저해됨으로써 멜라닌 합성 저해 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

생체 내에서의 멜라닌 합성과정은 tyrosinase을 기질로 하여 tyrosinase에 의해 hydroxylation 반응을 거쳐 3,4-dihydroxyindolephenylamine (L-DOPA)로 되고 이것은 다시 L-DOPA quinone으로 산화된다[13]. 이후 아미노산 혹은 단백질과 중합 반응에 의해 멜라닌이 합성되는 것으로 알려져 있다[14]. 또한 멜라닌의 합성에 있어서 key protein은 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), TRP-2가 있으며 이들 단백질에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 DOPA quinone으로 전환된 후 일련의 과정을 거쳐 멜라닌이 합성된다[15]. 물여뀌에 대한 미백효과는 보고되지 않았지만 여뀌(*P. hydropiper* L.)에서 추출한 에틸 아세테이트 분획과 aglycon 분획에서 tyrosinase 활성 저해 효

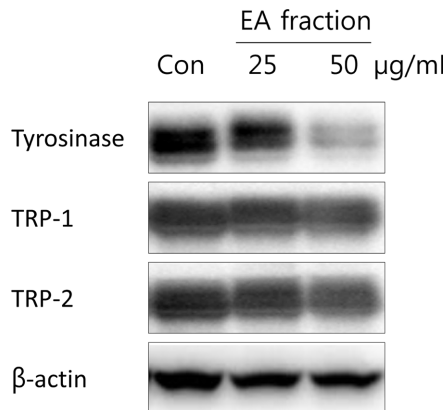


Fig. 4. Effects of EA fraction isolated from *P. amphibium* L. on melanogenesis and expression of melanogenesis-related protein in B16F10 cells. The cells were cultured with 0-50 µg/ml of MSE for 72 h. Whole-cell lysate were then subjected to western blot analysis using antibodies against tyrosinase, TRP-1 and TRP-2. Equal protein loading was confirmed using β-actin antibody.

과와 elastase의 활성 저해효과를 확인함으로써 항미백과 항주름 효과를 보고하였다[16]. 또한 붉은털여귀(*Persicaria orientalis*) 추출물이 B16F1 세포에 대한 약한 저해효과(0.1% 저해율)가 특허로 보고되었다.

제브라피쉬의 멜라닌 합성 저해 활성

제브라피쉬는 한 번에 다수(100-200개)의 알을 낳으며 발생이 빨라 실험 결과를 빠르게 도출할 수 있고, 세포실험에

서 알 수 없는 여러 가지 결과를 알 수 있는 장점이 있다. 또한 동물실험을 통한 동물윤리 문제로 인해 하등동물 또는 세포 실험으로 대체하려 하나 생리활성의 복잡한 메커니즘으로 인해 연구에 한계가 있다[17]. 이와 같은 이유로 제브라피쉬는 새로운 동물모델로 각광을 받고 있다[18]. 특히 새로운 미백제 탐색하는데 있어 여러 가지 제약을 회피할 수 있는 장점이 있으며 몸 색깔이 투명하여 색소 관찰이 용이해 많이 이용되고 있다[12, 19, 20]. 이러한 장점을 가지고 있는 제브라피쉬 모델을 이용하여 EA 분획을 제브라피쉬 embryo에 48 h 처리한 후 멜라닌 합성에 미치는 영향을 살펴본 결과 Fig. 5A와 같다. 양성대조군으로 이미 알려진 미백인 PTU (phenylthiourea)를 사용하였으며, PTU (50 µg/ml)를 처리하였을 때 대조군 대비 70.4% 저해됨을 확인하였다. EA 분획 50 µg/ml을 처리했을 때 요크(yolk) 부분의 색소 침착이 저해될 뿐만 아니라 EA 분획 처리 농도가 증가됨으로써 멜라닌 합성이 저해됨을 확인하였고 EA 분획 25 µg/ml 처리군에서는 대조군 대비 유의미한 저해를 보이지 않았지만 EA 분획 50 µg/ml 처리군에서는 통계적으로 유의미하게 대조군에 비해 저해됨(13.1%)을 확인하였다(Fig. 5B).

물여귀 에탄올 추출물의 멜라닌 합성 저해 효과를 살펴보기 위해 B16F10 세포와 제브라피쉬 embryo를 이용하였다. 그 결과, B16F10 세포의 멜라닌 합성이 저해되며 하위 분획 중 에틸 아세테이트 분획이 가장 높은 미백 효과를 나타내었다. 또한 제브라피쉬 embryo의 멜라닌 합성이 높게 저해됨을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 에틸 아세테이트 분획의 활성단일물질 규명과 기전연구가 이루어져야 될 것이며 이를 바탕으로 이제껏 연구되지 않았던 담수 수변식물

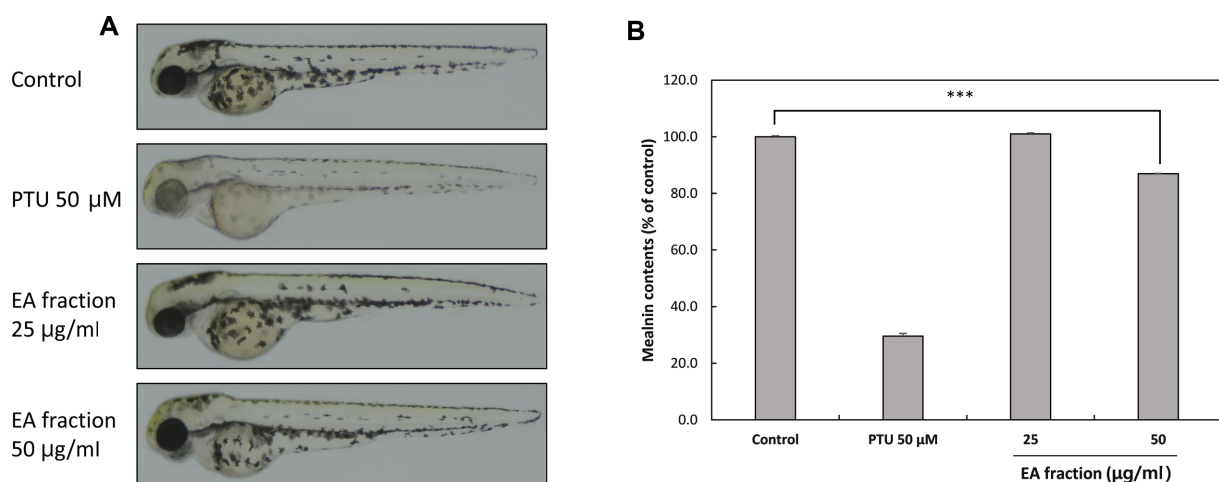


Fig. 5. Effects of EA fraction isolated from *P. amphibium* L. on melanogenesis in zebrafish. Synchronized embryos were treated with melanogenic inhibitors at the indicated concentrations. EA fraction were dissolved in 0.1% DMSO then added to the embryo medium. The effects on the pigmentation of zebrafish were observed under the stereomicroscope. Each value is expressed a means ± SD of triplicate determinations. *** $p < 0.001$ versus of control group

인 물여뀌 추출물이 미백 화장품 천연 소재로서의 활용 가능성이 높을 것으로 생각된다.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Nakdonggang National Institute of Biological Resources (NNIBR), funded by the Ministry of Environment(MOE) of the Republic of Korea (NNIBR201902105).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Yaqian G, Bhandari GS, Park JH, Park CW. 2013. A systematic study of the *Polygonum amphibium* L. complex (Polygonaceae) based on chloroplast DNA sequences. *Korean J. Pl. Taxon.* **43**: 34-45.
2. Smolarz HD, Surdacka A, Roliński J. 2003. Influence of quercetin-3-methyl ether from *Polygonum amphibium* on activation lymphocytes from peripheral blood of healthy donor *in vitro*. *Phytother. Res.* **17**: 744-747.
3. Smolarz HD, Budzianowski J, Bogucka-Kocka A, Kocki J, Mendyk E. 2008. Flavonoid glucuronides with anti-leukaemic activity from *Polygonum amphibium* L. *Phytochem. Anal.* **19**: 506-513.
4. Kwon SH, Na HL, Jeong JD, Baek NI, Park SG, Choi HK. 2012. A comparison of radical scavenging activity and cyanobacteria growth inhibition of aquatic vascular plants. *Korean J. Limnol.* **45**: 11-20.
5. Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. 2002. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J. Histochem. Cytochem.* **50**: 125-133.
6. Briganti S, Camera E, Picardo M. 2003. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* **16**: 101-110.
7. Fujimoto N, Watanabe H, Nakatani T, Roy G, Ito A. 1998. Induction of thyroid tumours in (C57BL/6N x C3H/N)F1 mice by oral administration of kojic acid. *Food Chem. Toxicol.* **36**: 697-703.
8. Hermanns JF, Pierard-Franchimont C, Pierard GE. 2000. Skin colour assessment in safety testing of cosmetics. An overview. *Int. J. Cosmet. Sci.* **22**: 67-71.
9. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. 1985. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α -25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**: 1474-1478.
10. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**: 253-310.
11. Westerfield M. 1993. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Brachydanio rerio)*, pp.385. 4th Ed. M. Westerfield, Eugene, OR.
12. Choi TY, Kim JH, Ko DH, Kim CH, Hwang JS, Ahn S, et al. 2007. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment Cell Res.* **20**: 120-127.
13. Jimbow K, Quevedo WC, Fitzpatrick TB, Szabo G. 1993. *Biology of Melanocyte*. Dermatology in General Medicine, pp. 261-289. 4th Ed. McGraw-Hill Book, New York.
14. Yoon HS, Lee SR, Ko HC, Choi SY, Park JG, Kim JK, et al. 2007. Involvement of extracellular signal-regulated kinase in nobiletin-induced melanogenesis in murine B16/F10 melanoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 1781-1784.
15. Lee SY, Jun HI, Lee IC, Lee JY. 2013. Down-regulation of tyrosinase, MITF, TRP-1, and TRP-2 expressions by *Juniperus rigida* sieb. in murine B16F10 melanoma. *J. Life Sci.* **23**: 1445-1453.
16. Kim EH, Kim JE, Park SN. 2009. Antioxidative and antiaging effects of *Persicaria hydropiper* L. extracts. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **359**: 293-300.
17. Baek SH, Park JH, Kim JH. 2013. Screening of medicinal herbs against melanin biosynthesis inhibition *in vivo* zebrafish model. *Korean J. Aesthetics Cosmetol.* **11**: 505-511.
18. Stanley KA, Curtis LR, Simonich SL, Tanguay RL. 2009. Endosulfan I and endosulfan sulfate disrupts zebrafish embryonic development. *Aquat. Toxicol.* **95**: 355-361.
19. O'Reilly-Pol T, Johnson SL. 2008. Neocuproine ablates melanocytes in adult zebrafish. *Zebrafish* **5**: 257-264.
20. Lajis AF. 2018. A zebrafish embryo as an animal model for the treatment of hyperpigmentation in cosmetic dermatology medicine. *Medicina* **54**: 3.