

## 소목의 부탄올 추출물에 의한 Melan-a 세포의 멜라닌생성 억제효과

천현자\* · 황상구<sup>1</sup> · 이진선<sup>2</sup> · 백승화 · 전병훈<sup>1</sup> · 우원홍

원광대학교 한의학 전문대학원, <sup>1</sup>원광대학교 한의과대학 병리학교실, <sup>2</sup>태평양 기술연구원

### Inhibitory Effects of Butyl Alcohol Extract from *Caesalpinia sappan* L. on Melanogenesis in Melan-a Cells

Hyun Ja Chun\*, Sang-Gu Hwang<sup>1</sup>, Jin Seon Lee<sup>2</sup>, Seung Hwa Baek,  
Byung Hun Jeon<sup>1</sup> and Won Hong Woo

Professional Graduate School of Oriental Medicine and <sup>1</sup>Department of Chonbuk Pathology,  
College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk

<sup>2</sup>Amore-Pacific R&D Center, Bora-ri, Kiheung-eup, Yongin-shi, Kyunggi-do, Korea

**Abstract** – Melanogenesis is a physiological process resulting in the synthesis of melanin pigments, which play a crucial protective role against skin photocarcinogenesis. The heart wood of *Caesalpinia sappan* L. (*C. sappan*) has long been commonly used in Oriental folk medicines to promote blood circulation, and as an emmenagogue, analgesic or anti-inflammatory agent as well as a remedy for thrombosis. From the heartwood, many constituents have been purified and among them, brazilin and hematoxylin are two of the most abundant. This present study was designed to investigate the inhibitory effect of butanol extract from *C. sappan* on proliferation and melanogenesis in Melan-a cells. After 48 h treatment of these cells with various concentrations of butanol extract, the cells showed a dose-dependent inhibition in their proliferation without apoptotic cell death. Therefore, the growth retardation by the extract may be due to the cell arrest or cell differentiation. We also estimated total melanin content as a final product and activity of tyrosinase, a key enzyme, of melanogenesis in Melan-a cells. The melanin content and tyrosinase activity were decreased in extract-treated cells in a dose dependent manner compared to control group. The butanol extract also resulted in a decrease of melanin content in  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone (MSH)-induced melanogenesis, indicating that butanol extract of *C. sappan* could be developed as skin whitening components of cosmetics.

**Key words** – *Caesalpinia sappan* L., Melanogenesis, Melan-a, Tyrosinase activity, Melanin content

멜라닌은 자연계에 널리 분포하는 페놀류의 생체고분자 물질로 물과 대부분의 유기 용매에 녹지 않으며, 화학적으로는 극히 비활성을 나타낸다. 검은 색소와 단백질의 복합체이며 사람의 머리카락과 피부색을 이루는 색소 중 하나로 그 양이 많으면 피부색이 황갈색에서 흑갈색을 띠고, 적을수록 색이 옅어진다.<sup>1)</sup> 멜라닌은 세포 내의 소기관인 리보솜에서 tyrosinase라는 효소의 생합성에서 합성되기 시작한다. 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌세포에서 아미노산의 일종인 tyrosine이 tyrosinase 효소의 작용으로 여러 단계를 거쳐 멜라닌이 합성되어 멜라노솜이라는 과립을 형성하고, 생성된 멜라닌은 각질형성세포로 이동되어 자외선 등에 의한 피부의 노화나 일광각화증을 억제하여 피부를 보

호하는 긍정적인 기능을 가지고 있는 반면에, 과잉생산에 의한 피부의 색소침착 및 멜라닌 전구물질들에 의한 독성으로 세포사멸을 촉진하는 부정적인 기능을 동시에 가지고 있다.<sup>2-4)</sup>

한약재로 이용되는 소목(*Caesalpinia sappan* L.)은 소방목, 소방, 홍자 등으로도 불리며 콩과(Legminosae)에 속한 낙엽소교목 또는 관목인 소방목의 심재이다. 이 식물은 인디아, 말레이시아 반도, 중국 남부 등 열대 아시아지역에 분포하며, 그 높이가 5-10m에 달하며, 줄기에는 작은 가지가 있고 작은가지는 회록색이며 원형의 돌출된 껍질눈이 있다. 새 가지에는 짧은 부드러운 털이 있으며 잎은 2회 깃꼴 겹잎이며 협과는 비스듬한 타원형이며 성숙하면 암홍색으로 되고 짧은 가늘고 보드라운 털이 있으며 벌어지지 않고 종자 4-5개가 들어 있다. 개화기는 5-6월이며 결실기는 9-10

\*교신저자(E-mail) : hjchun@wonkwang.ac.kr

월이다.<sup>5)</sup> 중약대사전에는 소목의 약리작용으로서 황색포도상 구균을 포함한 여러 종류의 세균에 대한 항균작용, 쥐와 토끼의 중추신경 억제작용, 혈관수축과 같은 심혈관에 대한 작용 등이 기록되어 있다.<sup>6)</sup> 국내에서 소목에 대한 연구로는 Park<sup>7)</sup> 등의 위암 세포주에 대한 세포독성 효과와 Lim<sup>8)</sup> 등의 용매 추출물 분획에 대한 항산화 효과 및 Kim<sup>9)</sup> 등의 항염 효과와 항균 소취 가공 등에 관한 보고가 있으며, Jeon<sup>10)</sup> 등은 세포독성 효과와 topoisomerase I 억제활성에 관한 *in vitro* 연구를 보고하였다. 소목의 주요 성분으로는 flavonoid 구조를 갖는 무색의 원색소인 brazilin이 주성분이며 brazilin은 공기 중에 산화되어 brasilein이 된다.<sup>11)</sup> 이와 관련된 연구로는 Moon<sup>12)</sup> 등이 소목의 주성분인 brazilin을 이용하여 고혈압에 효과가 있음을 보고하였고, Hwang<sup>13)</sup> 등은 brazilin이 혈소판에서 칼슘농도를 조절함을 보고하였으며, Kim<sup>14)</sup> 등은 혈액에서 brazilin의 혈당저하 작용을 보고하였다. 또한 Lee<sup>15)</sup> 등은 brazilin이 그늘음제(tanning agent)로 효과가 있음을 보고하였다.

우리 나라의 산야에는 약용 및 식용으로 이용할 수 있는 식물이 많이 자생하고 있고, 이들 중에는 인체의 질병을 예방하는데 효능을 가진 식물이 상당히 많이 있을 것으로 사료된다. 그러나 아직까지 우리 나라에 자생하는 식물에 대한 광범위한 연구가 이루어지지 않고 있으며, 예전에는 막연히 민간 전승요법과 경험에 의해서 이들을 소극적으로 이용하여 왔으나 최근 과학의 발달과 천연물에 대한 인식이 새로워짐에 따라 추출성분을 적극적으로 이용하려는 시도가 행해지고 있다. 즉, 천연물은 새로운 신약 및 신약 후보 물질을 얻을 수 있는 좋은 재료로서 고려되어 지고 있다. 또한 이러한 천연물 및 한약재의 효능과 작용기전이 밝혀진 약물을 대상으로 임상적으로 유용한 처방을 개발하기 위하여 pharmacokinetics와 pharmacodynamics의 연구방법을 통하여 새로운 치료법으로서 가능성을 확인하고 pharmacogenomics등의 최신 연구를 통하여 한의학적 치료법의 새로운 연구분야의 개척을 선도하고자 한다. 최근에 생약이나 한약재 같은 천연물을 이용하여 멜라닌색소와 관련된 연구가 많은 연구자들에 의해 진행되고 있다.<sup>16-19)</sup> 본 연구팀은 피부질환 치료제 및 미백제 개발의 일환으로서 소목의 부탄을 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16 melanoma 세포를 이용하여 그 결과를 이미 얻었다. 그러나 melanoma 세포와 정상적인 melanocyte 사이에 일부 신호기전이 틀릴 수 있으므로 소목의 부탄을 추출물이 melanocyte에서도 동일한 영향을 끼치는지 알아보는 것이 필수적이다. 본 연구에서는 Melan-a 정상세포에 추출물을 처리하고 세포의 증식과 tyrosinase 활성 및 melanin 양을 측정할 결과 유의한 효과를 보았기에 보고하는 바이다.

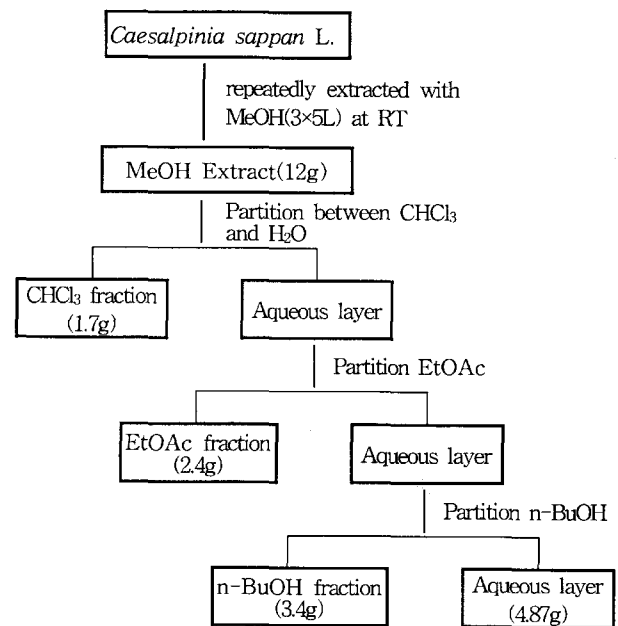


Fig. 1. Extraction and Fractionation of *Caesalpinia sappan* L.

## 재료 및 방법

**시료의 추출 및 분리** - 실험재료 800 g을 실온에서 MeOH로 3회 추출한 후 이를 감압하여 농축물인 MeOH 추출물 12 g을 얻었다. MeOH 추출물 전체를 증류수에 현탁시킨 다음  $\text{CHCl}_3$ 로 3회 분획하여  $\text{CHCl}_3$  가용부를 감압 농축하여  $\text{CHCl}_3$  분획 1.7 g을 얻었다. 계속하여 잔류층인 수층을 EtOAc로 3회 분획하여 상층인 EtOAc층을 얻어 감압 농축하여 EtOAc 분획 2.4 g을 얻었다. 남은 수층에 대하여 *n*-BuOH 가용부를 얻고 이를 감압 농축하여 *n*-BuOH 분획 3.4 g을 얻었다(Fig. 1).

**검액조제** - 시료로 사용한 소목의 부탄을 추출물은 DMSO에 먼저 녹인 후, 0.22  $\mu\text{m}$  pore 여과지로 여과 멸균하여 저장용액으로 냉장실에 보관하였다가 세포에 투여하기 직전 실험농도에 알맞게 RPMI 1640 배지로 조정하여 사용하였다.

**세포주 및 세포배양** - Melan-a 세포는 런던대학 St. George 의과대학의 D.C. Bennett 박사가 C57BL/6 mice에서 채취하여 만들어낸 것으로 immortalized melanocyte이다. 세포는 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ 의 조건을 갖춘 Sanyo회사 제품의  $\text{CO}_2$  세포배양기에서 배양되었다. 사용된 배양매지는 10% fetal bovine serum(Gibco Co.)이 포함된 RPMI 1640배지에 penicillin-streptomycin(Sigma Chemical Co., USA) 100 I.U. - 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하고 사용하기 직전에 200 nM Phorbol-12-myristate 13-acetate(Sigma Chemical Co., USA)를

첨가하였으며, 약 24시간 주기로 RPMI 1640 배양액을 교체하였다.

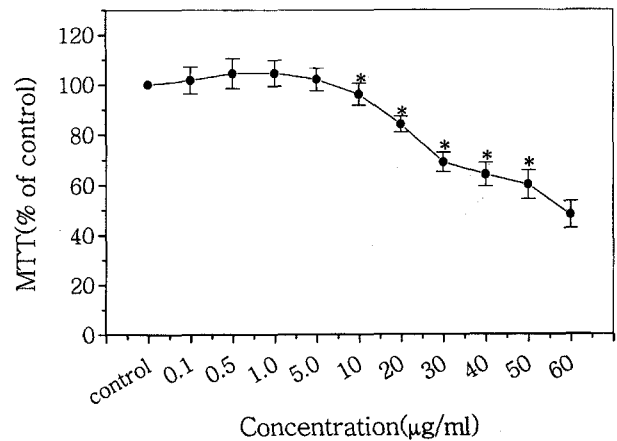
**MTT Assay** - 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 측정은 Mosmann의 방법<sup>20)</sup>을 변형하여 실시하였다. 추출물을 처리하여 세포를 48시간 배양하였으며 그 후 상층액을 버리고 당일 제조한 500 µg/ml 농도의 MTT를 배양 용기당 1 ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3시간 동안 배양하였다. 살아 있는 세포는 MTT와 반응하여 보라색의 불용성 formazan 침전물이 형성되었으며 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 10% DMSO를 200 µl씩 넣고 15분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

**Trypan blue 검사** - 대조군과 실험군의 각 well에 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액을 가하여, 각 well로부터 세포를 분리 수거하였다. 이 분리 수거한 세포를 PBS로 2회 세척한 후 표본 0.02 ml와 동량의 0.4% (w/v) trypan blue 용액을 잘 섞은 다음 hemocytometer에 넣고 광학현미경을 이용하여 trypan blue에 염색되지 않고 살아 있는 세포수를 계수하였다.

**형태학적 변화** - Melan-a 세포를 각 well당  $1 \times 10^5$  개씩 넣고 24시간 배양하여 안정화시켰고 그 후 부탄올 추출물을 농도별로 첨가하여 48시간 배양한 다음 위상차현미경(Diaphot 300, Nikon, Japan)의 100배율하에서 대조군과 실험군의 형태학적 변화를 관찰, 비교하였다.

**멜라닌 양 측정** - 멜라닌 양은 Hosoi<sup>21)</sup> 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 2회 세척한 후 원심분리하여 세포 침전물을 만들었다. 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액을 200 µl 첨가하고 80°C에서 1시간 동안 용해하였으며, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 합성 멜라닌(Sigma Co.)을 사용하여 작성된 표준 직선에서 구하고, 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하였다.

**Tyrosinase 활성도 측정** - Tyrosinase 활성도는 Matinez-Esparza<sup>22)</sup>의 방법에 의하여 측정하였다. 각 well의 세포를 원심분리하여 세포 침전물을 만들고, 100 µl의 세포 용해액(1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)을 가하였다. 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고 원심분리한 후 상층액을 취하여 효소용액으로 사용하였다. 100 mM sodium phosphate(pH 7.0) 용액 100 µl에 시료인 효소용액 50 µl를 가하고 37°C에서 5분간 보온하였다. 100 mM catechol 50 µl를 넣은 후 ELISA reader로 37°C, 405 nm의 조건에서 흡광도의 변화를 1시간 동안 관찰하였다.

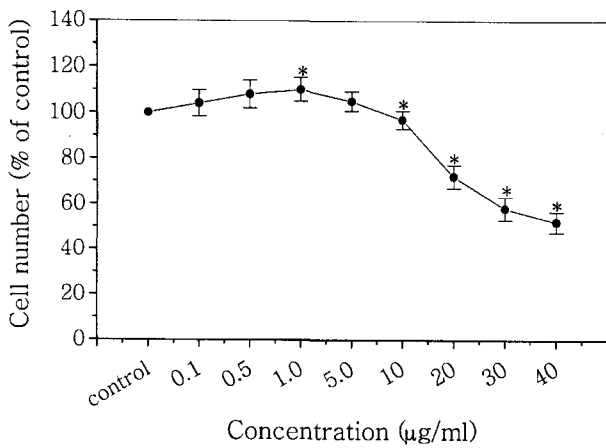


**Fig. 2.** Effect of Butanol extract from *Caesalpinia sappan* L. on the proliferation of Melan-a cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of butanol extract for 48 h. The proliferation rate of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % of control and data were mean  $\pm$  SD of at least five determinations. \*significantly different from control group (\* $p < 0.01$ ).

**통계방법** - 실험결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's *t*-test를 이용하였다.

## 결과 및 고찰

**소목이 세포의 증식에 미치는 영향** - 부탄올 추출물이 쥐의 정상적인 melanocyte인 Melan-a 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 부탄올 추출물을 0.1 µg/ml에서 60 µg/ml까지 다양한 농도로 처리하고, 세포를 48시간 배양한 후에 MTT 측정 방법으로 세포의 증식을 관찰하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이, 부탄올 추출물에 의한 세포의 증식은 5 µg/ml 이하의 낮은 농도에서는 대조군에 비해 약간 증가하였으나 통계학적으로 유의할만한 변화를 나타내지 않았다. 그러나 10 µg/ml 농도부터는 세포의 증식이 서서히 억제되는 경향을 보였으며 계속적으로 60 µg/ml 농도까지 처리한 실험군에서는 대조군에 비교하여 처리 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 증식이 억제되는 경향을 보여 주었으며 그 경향이 통계학적으로 유의함을 보여 주었다. 다른 실험 방법으로서 부탄올 추출물을 0.1 µg/ml에서 40 µg/ml까지 다양한 농도로 처리하고, 세포를 48시간 배양한 후에 trypan blue 용액을 이용하여 살아 있는 세포 수를 조사해 본 결과 MTT 측정의 결과와 마찬가지로 세포 수가 추출물 처리 농도에 의존적으로 유의성 있게 감소하는 경

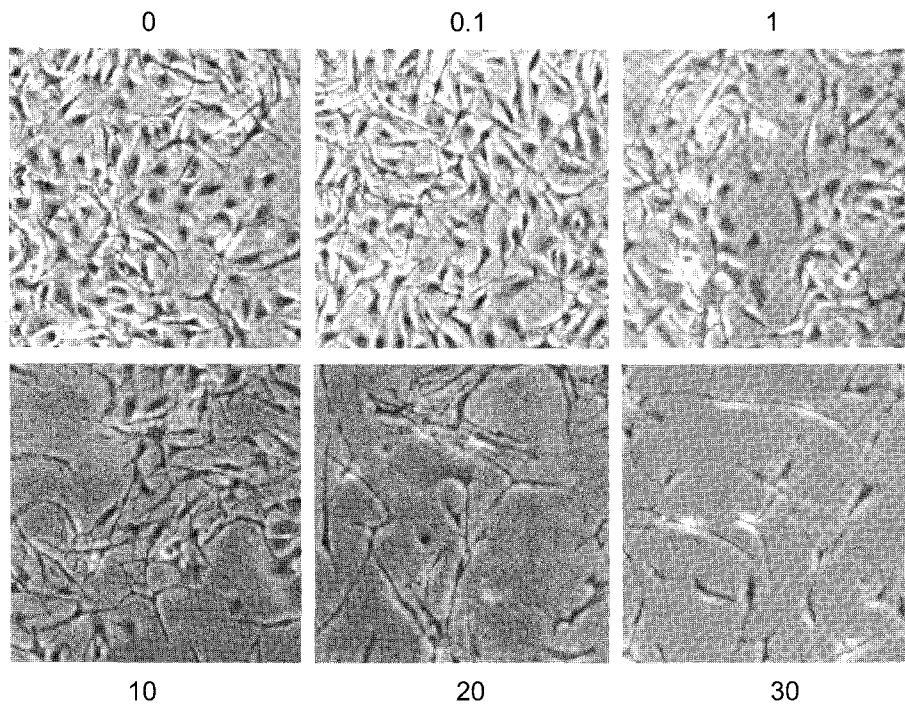


**Fig. 3.** Effect of Butanol extract from *Caesalpinia sappan* L. on the viability of Melan-a cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of butanol extract for 48 h. The viability of the cells was measured by Trypan blue test. Results were expressed as % of control and data were mean±SD of at least five determinations. \*significantly different from control group (\*p<0.01).

향을 보였다(Fig. 3). 이상의 결과를 종합해 볼 때 소목의 부탄올 추출물은 Melan-a 세포의 증식과 성장을 억제시키는 것으로 판단된다. 대조군에 비하여 실험군의 세포 수가 줄어드는 현상은 외부 자극물질의 세포독성에 의한 세포사멸

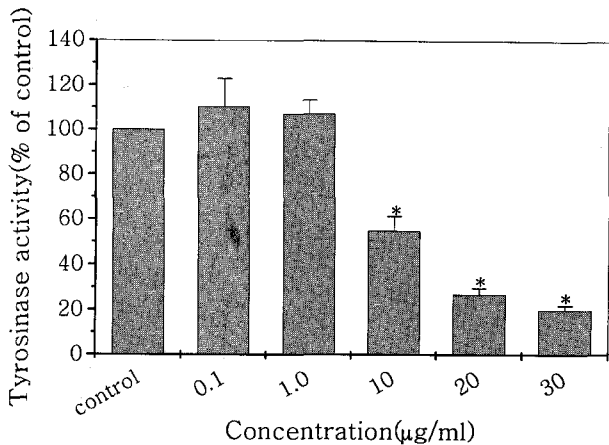
로 인한 생존 세포수가 감소하는 경향과 여러 가지 신호기전을 통한 세포분열의 일시적인 정지로 세포 증식이 감소하는 경향으로 나누어 고려해 볼 수 있다. 그러므로 소목의 부탄올 추출물에 노출된 Melan-a 세포의 숫적인 감소가 어떠한 원인에 의한 것인지를 조사해 볼 필요가 있다.

**세포의 형태학적 변화** - 일반적으로 부착성의 세포들은 세포독성 유발물질, 성장인자의 결핍, 바이러스의 감염 등을 포함하는 다양한 종류의 외부 자극에 의해 세포사멸이 유도되어지면 세포의 크기가 축소되어 지고 배양배지 속에 사멸소체들이 발견된다. 그러므로 부탄올 추출물에 노출된 Melan-a 세포의 증식이 감소한 이유가 세포사멸에 기인하는 것인지를 알아보기 위하여 Melan-a 세포에 추출물을 농도별로 처리하고 48시간이 지난 후에 실험군 세포의 형태학적 변화를 위상차현미경으로 대조군과 비교하여 관찰하였다. 그 결과 0.1과 1.0 µg/ml의 저농도에서는 대조군과 비교하여 실험군에서 세포밀도가 약간 증가하거나 변화가 없는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4B, C). 그러나 그 이상의 처리농도에서는 농도 의존적으로 대조군에 비하여 실험군에서의 세포 밀도는 점차 감소하였으며 오히려 세포의 크기는 약간 커졌고 또한 수직상 돌기의 형태가 나타나면서 길이가 약간 길어짐을 관찰할 수 있었다(Fig. 4D-F). 이러한 결과는 높은 농도의 부탄올 추출물이 Melan-a 세포의 성장을 억제함으로써 세포 증식을 억제시키고 세포의 분화를 촉

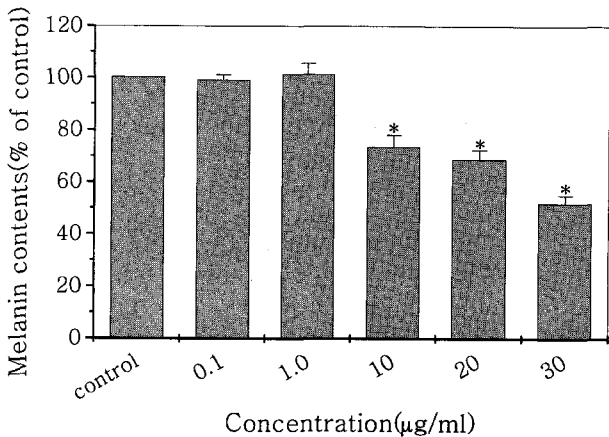


**Fig. 4.** Morphology of control and Butanol extract-treated Melan-a cells. Morphology of control (A) and 0.1, 1.0, 10, 20, and 30 µg/ml of butanol extracts-treated samples (B, C, D, E, and F) were observed by inverted microscopy.

진하는 것을 보여준다. 그러나 세포사멸의 특징인 세포막 외부 용기의 돌출 현상과 배양배지 속에 세포사멸이 유도된 부유세포도 또한 관찰할 수 없었다. 즉, 부탄을 추출물은 처리된 고농도에서 Melan-a 세포의 성장을 억제시키지만 세포사멸을 유도하지는 않는 것으로 보인다. 세포의 성장이 정지되는 시기로는 크게 2가지 즉 G1 checkpoint와 G2 checkpoint로 구분할 수 있으며 부탄을 추출물에 노출된 Melan-a 세포의 경우에 어느 시기에 해당하는지는 DNA 농도를 결정함으로써 차후 결정할 수 있을 것으로 사료된다.



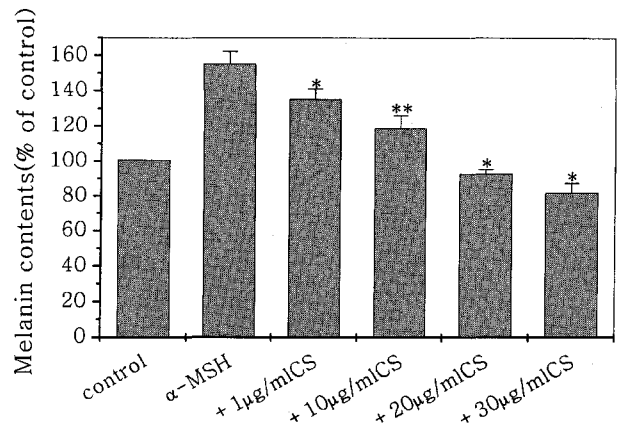
**Fig. 5.** Effect of Butanol extract from *Caesalpinia sappan* L. on tyrosinase activity in Melan-a cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of butanol extract for 48 h. Results were expressed as % of control and data were mean±SD of at least five determinations. \*significantly different from control group (\*p<0.01).



**Fig. 6.** Effect of Butanol extract from *Caesalpinia sappan* L. on melanin contents in Melan-a cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of butanol extract for 48 h. Results were expressed as % of control and data were mean±SD of at least five determinations. \*significantly different from control group (\*p<0.01).

**Tyrosinase 활성도에 미치는 영향** - Tyrosinase는 활성 부위에  $Cu^{2+}$  이온이 있는 금속함유 단백질로서 멜라닌 생성에 있어 중요한 역할을 하고 있으며 멜라노솨내에서 tyrosine을 산화시켜 dopa를 만드는 tyrosine hydroxylase와, dopa를 산화시켜 dopachrome을 만드는 dopa oxidase로 작용하여 최종적으로 멜라닌을 합성하는데 있어서 주요 효소로 작용한다.<sup>23)</sup> 본 연구에서는 부탄을 추출물이 티로신 물질대사의 최종산물인 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 주 효소로 작용하는 tyrosinase의 활성도를 먼저 측정하였다. 이를 위하여 세포에 부탄을 추출물을 0.1 µg/ml에서 30 µg/ml의 다양한 농도로 처리하고 48시간 배양한 후 tyrosinase 활성도를 측정한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 추출물의 처리농도가 0.1과 1.0 µg/ml 농도에서는 활성도가 약간 증가하거나 비슷하여 통계적인 유의성을 얻을 수 없으나 10 µg/ml 농도부터는 처리농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성도는 대조군에 비하여 모두 통계적으로 유의성 있게 감소하였다. 이러한 결과는 소목의 부탄을 추출물이 tyrosinase의 활성을 억제시켜 결국 멜라닌합성의 과정을 진행시키지 못할 것으로 생각된다. 이를 증명하기 위하여 최종 산물인 멜라닌의 양을 측정 해 볼 필요가 있다.

**멜라닌 생성에 미치는 영향** - 생체에서의 멜라닌 합성과정은 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase에 의해 hydroxylation 반응을 거쳐 3,4-dihydroxyindolephenylamine(L-DOPA)로 되고 이것이 다시 phenylalanine-3,4-quinone(L-dopaquinone)으로 산화된다. 그리고 dopaquinone은 dopachrome으로 전환된 후 5, 6-dihydroxyindole을 거쳐 멜라닌 고분자를



**Fig. 7.** Effect of Butanol extract from *Caesalpinia sappan* L. on melanin contents in 5 nM of α-MSH-treated Melan-a cells. The cells were cultured in the presence of various concentrations of butanol extract for 48 h. Results were expressed as % of control and data were mean±SD of at least five determinations. \*significantly different from control group (\*p<0.01, \*\*p<0.05).

형성하는 것으로 알려져 있다.<sup>24)</sup> 부탄을 추출물이 *in vitro* 상태에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접 확인하기 위하여 Melan-a 세포에 부탄을 추출물을 0.1 µg/ml에서 30 µg/ml의 다양한 농도로 처리하고 48시간 배양한 다음 멜라닌 생성을 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 부탄을 추출물의 첨가량이 1.0 µg/ml까지는 멜라닌 생성이 대조군에 비하여 비슷하거나 약간 증가되는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다. 그러나 10 µg/ml 이상에서는 처리농도가 증가함에 따라 멜라닌 생성이 점점 감소되는 경향을 보였으며 통계학적으로도 유의성이 관찰되었다. 이러한 결과는 부탄을 추출물에 노출된 Melan-a 세포의 *in vitro* tyrosinase 활성도 변화와 매우 잘 일치함을 보여주었다.

**α-Melanocyte-stimulating hormone (α-MSH)에 의해 유도된 멜라닌 생성에 미치는 소목의 영향** - α-MSH는 생체내 멜라닌 합성에 관여하는 물질 중 하나로서 뇌하수체에서 분비되며 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), forskolin, dibutyryl cAMP와 마찬가지로 cAMP 의존형 신호전달 경로인 PKA(cAMP-dependent protein kinase) 경로를 통하여 멜라닌 합성을 자극하는 것으로 알려져 왔다.<sup>25)</sup> α-MSH와 같은 외부자극에 의해 유발되는 Melan-a 세포의 멜라닌 생성에 미치는 소목의 효과를 관찰하기 위하여 Melan-a 세포를 5 nM의 α-MSH로 자극함과 동시에 소목의 부탄을 추출물을 다양한 농도로 처리하여 48시간 배양한 후 멜라닌 양을 측정하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이, α-MSH만을 처리한 대조군은 아무것도 처리하지 않은 정상군에 비해서 55%의 멜라닌 생성 증가를 보였다. α-MSH에 의해 증가된 멜라닌 생성은 부탄을 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 점점 억제하는 효과를 나타내었다(Fig. 7). α-MSH와 20 µg/ml 농도의 부탄을 추출물을 동시에 처리한 실험군에서는 α-MSH만 처리한 대조군에 비교하여 약 60% 정도의 멜라닌 생성 억제효과를 보여 주었다. Fig. 6에서 20 µg/ml 농도의 부탄을 추출물을 Melan-a 세포에 단독 처리한 경우에는 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비하여 42%의 멜라닌 생성 억제효과를 보였주었다. 이와같이, 소목의 부탄을 추출물은 Melan-a 세포의 고유한 멜라닌 양과 α-MSH에 의해 생성된 멜라닌을 모두 억제시키는 효과를 나타내었다.

멜라닌세포의 멜라닌화가 발생하는 주요 기전은 멜라닌 세포의 증식, 멜라닌소체의 합성증가 및 tyrosinase 활성도의 증가 등에 의해서 이루어진다.<sup>24,26)</sup> 본 연구의 결과를 종합해 볼 때, Melan-a 세포에 소목의 부탄을 추출물을 처리하였을 때 저농도에서는 tyrosinase 활성도와 멜라닌 생성에 큰 영향을 미치지 못하였으나 고농도에서는 처리농도가 증가함에 따라 대조군에 비하여 tyrosinase 활성도와 멜라닌 생성이 모두 감소하는 경향을 보여 주었다. 이것은 Melan-

a 세포에 소목의 부탄을 추출물을 처리하게 되면 세포의 성장이 억제되면서 세포분화가 유도되고, 티로신 물질대사의 주요 효소로서 작용하는 tyrosinase 활성도를 감소시킴으로써 최종산물인 멜라닌의 합성이 감소, 억제되는 것으로 사료된다. 따라서 소목의 부탄을 추출물에 함유된 활성물질의 분리 및 구조를 밝히고 활성물질에 의한 멜라닌 생성의 반응경로를 규명하는 연구가 진행된다면 소목이 피부 미백제 치료에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

소목이 피부의 멜라닌 색소 형성에 어떠한 영향을 미치는지를 연구하기 위하여 Melan-a 세포에 소목의 부탄을 추출물을 다양한 농도로 처리한 후 세포의 증식, 형태적 변화, 멜라닌 양의 변화 및 tyrosinase 활성도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 부탄을 추출물이 1.0 µg/ml 농도까지는 세포증식에 유의할 만한 차이는 없었으나 10 µg/ml 농도 이상에서는 유의성 있게 세포증식이 억제되고 세포분화는 촉진되었다. Tyrosinase 활성도는 부탄을 추출물의 처리농도가 10 µg/ml 농도 이상에서는 농도 의존적으로 tyrosinase 활성도가 감소하였다. 멜라닌 생성은 tyrosinase 활성도와 마찬가지로 1.0 µg/ml까지는 유의성이 없었으며 그 이상의 농도에서는 멜라닌 생성이 유의성 있게 감소하였다. α-MSH에 의해 유도된 멜라닌 생성은 부탄을 추출물을 처리함에 따라 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다. 결론적으로 소목의 부탄을 추출물은 Melan-a 세포의 증식을 억제하면서 동시에 멜라닌화도 억제시킨다.

## 감사의 말씀

본 연구는 BK 21 사업의 연구비 지원과 2002년 학술진흥재단의 연구비(KRF-2002-F00240) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Bell, A. A. and Weeler, M. H. (1986) Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 411-451.
2. Weixiong, L. and Helene, Z.H. (1997) Induced melanin reduces mutations and cell killing in mouse melanoma. *Phytochem. Phytobiol.* **65**: 480-484.
3. Kaufman, R.J. (1991) Vectors used for expression in mammalian cells. *Meth. In. Enzymol.* **205**: 87-92 .
4. Kameyama, K., Takemura, T., Hamada, Y., Sakai, C.,

- Kondoh, S. and Nishi-yama, S. (1993) Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP 1), dopachrome tautomerase (TRP 2) and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* **100**: 126-132.
5. 정진섭. 신민교(1990): 도해 생약대사전, p.666-667.
  6. 김창민 외(1997) 중약대사전, 청담출판사 p.2420-2423.
  7. Park, K.J., Kim, E.H., Eun, Y.A., Kang, B.J. and Sung, H.J. (1997) Cytotoxic effect of Korean traditional prescription on the human gastric cancer cell lines. *Kor. J. Pharmacogn.* **28**(4): 233-238.
  8. Lim, D.K., Choi, L.U. and Shin, D.h. (1996) Antioxidative activity of some solvent extract from *Caesalpinia sappan* L. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**(1): 77-82.
  9. Kim, Y.S., Noh, Y.K., Lee, G.I., Kim, Y.K., Lee, K.S. and Min, K.R. (1995) Inhibitory effects of herbal medicines on hyaluronidase activity. *Kor. J. Pharmacogn.* **26**(3): 265-272.
  10. Jeon, W.K., Park, K.J., Kim, S.Y., Ma, J.Y. and Sung, H.J. (1999) *In vitro* studies on the anticancer effect and topoisomerase I inhibition activity of *Caesalpinia sappan* L. extract. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**(1): 1-6.
  11. Moon, C.K., Chung, J.H., Lee, Y.M., Lee, S.H., Hwang, G.S., Park, K.S., Mock, M.S., Kim, S.G., Ahn, Y.S. and Ann, J.H. (1988) Effects of Brazilin on erythrocyte deformability and its regulated biochemical factors in streptozotocin induced diabetic rats, *Arch. Pharm. Res.* **11**(2): 149-154.
  12. Moon, C.K., Park, K.S., Kim, S.G., Won, H.S. and Chung, J.H. (1992) Brazilin protects cultured rat hepatocytes from BrCCl<sub>3</sub>-induced toxicity. *Drug Chem. Toxicol.* **15**(1): 81-91.
  13. Hwang, G.S., Kim, J.Y., Chang, T.S., Jeon, S.D., So, D.S. and Moon, C.K. (1998) Effects of Brazilin on the phospholipase A2 activity and changes of intracellular free calcium concentration in rat platelets. *Arch. Pharm. Res.* **21**(6): 774-778.
  14. Kim, S.G., Kim, Y.M., Khil, L.Y., Jeon, S.D., So, D.S., Moon, C.H. and Moon, C.K. (1998) Brazilin inhibits activities of protein kinase C and insulin receptor serine kinase in rat liver. *Arch. Pharm. Res.* **21**(2): 140-146.
  15. 이강대, 김정하(1997) Brazilin as a new sunless tanning agent, *대한화장품학회지*, **23**(3): 82-85.
  16. Chun H. J., Hwang S. G., Kim C. K., Jeon B. H., Baek S. H. and Woo W. H. (2002) In vitro Modulation of proliferation and melanization of B16/F10 melanoma cells by Quercetin. *J. Pharm. Soc. Kor.* **46**(1): 75-80.
  17. Yang M. J., Kim M. G., Lim S., Ann H. S. and Ahn R. M. (1999) Inhibitory effects of water-acetone extracts of chestnut inner shell, pine needle and hop on the melanin biosynthesis. *J. Pharm. Soc. Kor.* **43**(4): 494-498.
  18. Chun H. J., Mun Y. J., Kim J. H., Kim I. K., Jeon B. H. and Woo W. H. (2000) Effect of the aqueous extract of *Epimedium koreanum* Nakai on melanin formation in B16 mouse melanoma cell line. *J. Pharm. Soc. Kor.* **44**(5): 455-462.
  19. Chun, H. J., Choi, E. Y., Yoon, S. C., Nam, H. W. and Woo, W. H. (2001) Inhibitory effects of *Atractylodes Rhizoma alba* on melanin biosynthesis. *J. Pharm. Soc. Kor.* **45**(3): 269-275.
  20. Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods* **65**: 55-63.
  21. Hosoi J., Abe E., Suda T. and Kuroki T. (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 a-25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**: 1474-1478.
  22. Matinez-Esparza M. (1998) Mechanisms and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- $\alpha$  in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **225**: 139-146.
  23. Hearing V. J. (1999) Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *Soc. Invest. Dermatol.* **4**(1): 24-28.
  24. Jimbow, K., Quevedo, W.C., Fitzpatrick, T.B., et al. (1993) Biology of melanocyte. In: Fitzpatrick, T.B., Eisen, A.Z., Wolff, K., et al. ed *Dermatology in general medicine*, 4th ed. New York :McGraw-Hill Book, 261-289.
  25. Hadley, M. E. (1988) Source synthesis, chemistry, secretion and metabolism in the melanotropic peptides, Vol 1, CRC press Boca, Raton FL.
  26. Yaar, M. and Gilchrist B.A. (1991) Human melanocyte growth and differentiation: A decade of new data. *J. Invest. Dermatol.* **97**: 611-615.

(2002년 4월 5일 접수)