

원 저

## 天花粉 메탄올 추출물의 멜라닌 형성 억제 효과

김정근, 김남권, 임규상, 김진, 성병곤  
원광대학교 한의과대학 외관과학교실

### Inhibitory Effect of Methanolic Extract from *Radix Trichosanthis* on Melanin Synthesis

Jeong-Keun Kim, Nam-Kwen Kim, Kyu-sang Lim, Jin Kim, Byung-Gon Sung

Dept. of Oriental Medical Surgery, Ophthalmology & Otolaryngology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University.

**Objectives:** In order to investigate the relationship of *Radix Trichosanthis* components and the melanin synthesis, the author has analyzed the cell viability and tyrosinase activity, melanin content and morphologic changes in n-hexane, EtOAc, n-BuOH, and H<sub>2</sub>O fraction.

**Methods:** At first, in order to determine the concentration of the *Radix Trichosanthis* component, the author investigated the viability of B16 melanoma cell. To measure the effects of *Trichosanthes kirilowii* extracts (n-BuOH, n-Hexane, EtOAc, H<sub>2</sub>O fractions) on the viability of A549 cells, A549 cells were treated with various concentrations (from 0.5 to 25 µg/ml) of components of *Trichosanthes kirilowii*. After 24hrs, the cell viability was measured by MTT assay. The EtOAc components of *Trichosanthes kirilowii* decreased the viability of A549 cells in a dose-dependent manner. H<sub>2</sub>O and n-BuOH components had no cell toxicity till 25 µg/ml, the n-hexane component showed minor cell toxicity at 25 µg/ml and the EtOAc component cell toxicity was revealed at 5µg/ml concentration.

**Results:**

1. The results of tyrosinase activity and the *Radix Trichosanthis* component: n-hexane and EtOAc components controlled it effectively; the n-BuOH components were less effective.
  2. The results of melanin content analysis showed that the n-hexane and EtOAc components effectively inhibited, the n-BuOH fraction inhibited less, and H<sub>2</sub>O component didn't inhibit the terminal melanin formation.
  3. In the n-BuOH and H<sub>2</sub>O component there were no changes, but in the n-hexane component the melanin content was effectively inhibited.
  4. In the EtOAc fraction, although the melanin content was inhibited, the cell count was evidently suppressed.
- Of all of the *Radix Trichosanthis* components, the n-Hexane and EtOAc fractions inhibited the melanin synthesis best, but owing to its toxicity, the EtOAc components inhibited the cell count.

**Conclusion:** The above results demonstrated that *Radix Trichosanthis* n-hexane fraction efficiently inhibited the tyrosinase activity and melanin synthesis. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(4):45-54)

**Key Words:** Methanolic extract, *Radix Trichosanthis*, melanin synthesis

## 서 론

· 접수 : 2002년 6월 28일 · 채택 : 2002년 9월 16일  
· 교신저자 : 김정근 (Tel : 031-222-7331, E-mail :  
herbdrkim@hanmail.net) 경기도 수원시 권선구  
곡반정동 현대 1파크 108-901

인간의 피부는 인체와 외부 환경과의 경계를 이루

는 기관으로서 표피층, 진피층, 피하지방층의 3개 층으로 구성되어 있으며, 체온 조절과 외부로부터 내부 장기를 보호하는 등 생명유지를 위한 주요 기능과 부수적으로 피부 호흡, 특정 물질에 대한 선택적 흡수, 피부색 형성 등의 기능이 있다<sup>13)</sup>.

최근에는 아름다움의 중요한 기준이 되는 피부색에 대한 관심이 높아지고 있는데, 피부색은 멜라닌이나 카로틴과 같은 색소 성분과 혈관분포, 각질층의 두께 등에 의해서 결정되며 이 중 가장 중요한 역할을 하는 멜라닌 생성에 이상이 발생하면 기미나 주근깨 등과 같은 過色素 沈着症이 나타난다<sup>14)</sup>.

한의학에서 피부의 과색소 침착증에 대하여《素問·至眞要大論》에 “歲陽明在天, 燥淫所勝, 面鹿, 身無膏澤, 足外反熱” 이라 하여 처음 수록되었고, 이후 여러 醫家들은 발진의 형태와 원인에 따라 黧黯, 面黑, 雀斑 등으로 다양하게 언급하였으며<sup>5-10)</sup>, 치료방법으로는 허증과 실증으로 각각 변증하여 내복약과 외용약들을 사용하였다<sup>11-17)</sup>.

天花粉(Radix Trichosanthis)은 전국적으로 자생하는 다년생 초본식물인 박과(Cucurbitaceae)의 하늘타리 및 同屬 近緣植物의 塊根으로<sup>18)</sup>, 淸熱生津, 淸肺化痰, 消腫排膿 등의 효능이 있어 熱病傷津, 口乾煩渴, 消渴, 肺熱燥咳, 癰腫瘡瘍, 瘡腫, 乳腺炎, 咳嗽 등의 치료에도 사용되며, 黧黯, 面黑, 雀斑 등에 응용되는 玉容散, 紅玉散, 西施玉容散의 구성약물 중 하나이다<sup>13)</sup>.

멜라닌을 생성하는 멜라닌세포는 주로 표피의 기저층 사이나 기저층 아래, 털주머니 등에서 주로 관찰되는데, 생성된 멜라닌은 세포질 돌기를 통해 각질 형성세포로 운반되어 표피-멜라닌 단위를 형성하고<sup>14)</sup>, 자외선·세포의 유전적 요인·대사·내분비·염증·감염·종양 등과 같은 물리적 및 화학적 요인들에 의해 크게 좌우된다.

최근 tyrosinase 저해제로 잘 알려진 4-hydroxyanisole, 5-hydroxyindole 및 hydroquinone 등은 강력한 멜라닌 생합성 저해활성을 보이지만 색소세포의 변성 또는 치사를 일으키고 세포 본래의 기능을 손상시키는 등의 부작용이 있으며<sup>19)</sup>, kojic acid나 arbutin 등은 이미 상품화되어 화장품과 식품 등에 미

백제로 사용되고 있지만 활성 및 안전성에 문제점이 있는 것으로 보고되고 있어<sup>20-22)</sup>, 부작용이 없는 안전한 멜라닌 생합성 저해물질의 개발이 요구되고 있다.

멜라닌 형성에 관한 천연물에 대한 실험적 연구로 Hiroshi Morita 등은 태자삼의 뿌리로부터 tyrosinase 와 멜라닌 생성을 억제하는 cyclic peptide인 pseudostellarin A, B, C, D, E, F, G를 분리 보고하였고, 朴 등<sup>23)</sup>은 白朮이  $\alpha$ -MSH에 의하여 활성화 되는 JNK 활성을 억제시키고, AP-1과 같은 전사활성인자(transcriptional activator)를 불활성화시켜 멜라닌 생성을 억제시켰다고 보고하였다.

이에 저자는 실험적으로 피부의 멜라닌 합성을 억제한다고 보고된 天花粉으로 부터 구체적인 개별적 활성 물질을 추적 단리하고자 메탄올에 의하여 추출하는 법을 추구하였고 그리하여, 天花粉의 n-Hexane, EtOAc, n-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물을 만들고 B16 흑색종세포주를 이용하여 tyrosinase 활성과 멜라닌생성 및 세포독성 등을 조사하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

칼럼크로마토그래피는 silica gel 60(230-400mesh, Merk)과 Sephadex LH-20 (20-100 $\mu$ , Pharmacia)을, 박층크로마토그래피용 precoated plate는 silica gel 60F254(Me가 Art. 5715)를 사용하였다. HPLC column은 YMC pack-sil column을, mass spectra는 AutoSpec mass spectrometer(Micromass, Manchester, UK)를 사용하였다. 추출 및 분획용 용매는 1급 시약(E. P.)을 사용하였으며, 세포배양을 위해 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS(fetal bovine serum), antibiotics와 Trypsin-EDTA는 Gibco(USA)에서 구입하였으며, forskolin, methylthiazol tetrazolium(MTT)는 Sigma(USA)에서 구입하였고, 그 외 각종 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 추출 및 분획

본 실험에 사용한 天花粉은 圓光大學校 附屬 韓方病院에서 구입하여 사용하였으며, 天花粉 1 kg을 상온에서 MeOH을 이용하여 24시간 추출하였다. 추출액을 여과한 후 여액을 감압농축하고 얻어진 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 n-hexane, ethyl acetate, butanol을 사용하여 연속적으로 분획하였다. 각각의 분획물중 일부를 취하여 감압농축시킨 후 생리활성검토에 사용하였다(Scheme 1).

2) B16 흑색종세포주 배양

B16 mouse melanoma(흑색종) 세포주(ATCC)의 배양은 CO<sub>2</sub> 배양기(37℃, 5%)에서 10% FBS(Hyclones)이 포함된 DMEM 배지를 이용하였으며 약 48시간 주기로 배양액을 교체해주었다.

3) 세포 생존을 측정

세포의 생존율은 MTT assay 방법을 이용하였다. 세포를 세포배양판(24-well plate)에 well당 1x10<sup>5</sup> 씩 1ml의 배양액을 넣어 분주한 후 24시간 배양하여 배양용기에 세포를 부착하였다. 실험에 필요한 각 농도별 天花粉 분획물을 처리한 다음, 2일간 배양한 후 MTT 검사를 실시하였다. MTT assay는 Mosmann의 방법을 변형하여 측정하였다. MTT 용액을 최종농도가 100µg/ml이 되도록 넣고 37℃에서 3시간 동안 배양하였다. 생존율의 판정은 MTT 처리후 3시간 후에

살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 불용성의 formazan을 100µl의 dimethyl sulfoxide(DMSO) 용액으로 30분 shaking하여 녹인 다음, ELISA reader로 540nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4) Tyrosinase 활성도 측정

Tyrosinase 활성도는 Martinez-Esparza M 등의 방법에 의하여 측정하였다. 멜라닌세포를 수확하여 세포침전물을 만들고, 100µl 세포용해액(lysis buffer: 1% Triton X-100, 10mM sodium phosphate, pH7.0, 0.1 mM PMSF)을 넣고 4℃ 얼음에서 30분간 때때로 흔들어주면서 세포를 파괴시킨 후 원심분리하여 상층액을 취하여 tyrosinase 활성측정용액으로 사용하였다. 50µl의 상층액에 100mM sodium phosphate(pH 7.0) 100µl를 넣고 30℃ 물중탕기에서 5분간 보온한 후 100mM catechol 50µl를 넣고 온도조절장치가 있는 분광광도계로 37℃, 405nm에서 흡광도의 변화를 1시간 관찰하였다.

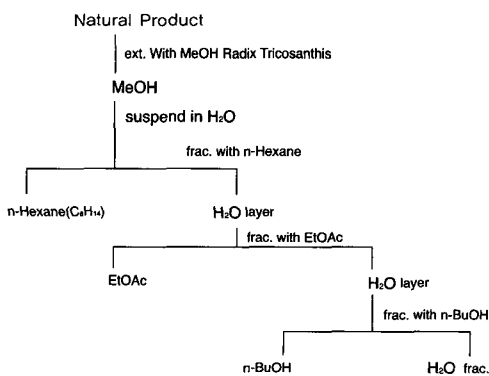
5) 멜라닌 정량(Melanin content) 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등의 방법<sup>31)</sup>을 변형하여 사용하였다. 배양세포는 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척, 원심분리하여 수확하였다. 세포침전물에 1ml의 증류수를 넣어 현탁 후 초음파로 분쇄한 후, 원심분리하여 침전물을 수확하였다. Acid-insoluble material을 얻기 위해 10%의 DMSO가 첨가된 1N NaOH 200µl를 넣어 80℃에서 1시간 동안 처리하여 용해시켰다. 475nm에서 흡광도를 측정하였으며 멜라닌 정량은 합성멜라닌(Sigma chemical Co.)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

6) 세포 포집(cell pellet)의 육안적 관찰

B16 흑색종세포를 10cm Petri dish에 2x10<sup>6</sup> 개를 분주하여 부착시켰다. 24시간 후 배양액을 교체하고 天花粉 분획물을 처리한 후, 72시간 동안 배양한 후 0.25% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확하고, 원심분리하여 세포포집(cell pellet)을 얻었다. 이를 다시 각 군당 1x10<sup>6</sup> 세포씩 수확하여 포집을 만들고 관찰하였다.

7) 통계처리



Scheme 1. Extraction and Fractionation Procedure

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들을 평균과 표준편차로 표시하였고, 각 군간의 차이는 one-way ANOVA 후 Scheff's test하여 P<0.05를 통계학적으로 의미있다고 판정하였다.

### 실험성적

#### 1. 天花粉 분획물이 B16 melanoma 세포의 생존률에 미치는 영향

天花粉 분획물의 처리농도를 결정하기 위하여 먼저 天花粉 분획물이 B16 melanoma 세포의 생존율에 미치는 영향을 조사하였다. 天花粉 분획물을 0.5  $\mu\text{g/ml}$ 에서 25  $\mu\text{g/ml}$  농도까지 처리하고 48시간 후 MTT 정량법으로 세포생존율을 측정하였다.

실험 결과, H<sub>2</sub>O 분획과 n-BuOH 분획은 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 101.0 $\pm$ 3.4%, 94.2 $\pm$ 4.3%로 대조군과 비교하여 변화가 없었으나, n-Hexane 분획에서는 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서 100.6 $\pm$ 4.8%, 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서 61.1 $\pm$ 2.0%로 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 약간의 세포독성이 있는 것으로 나타났다. EtOAc 분획에서는 1  $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군의 99.2 $\pm$ 2.3%, 5  $\mu\text{g/ml}$ 에서 27.8 $\pm$ 6.2%, 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서 24.5 $\pm$ 3.0%, 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서 24.4 $\pm$ 5.7%로 현저히 감소하였고, 특히 1  $\mu\text{g/ml}$ 과 5  $\mu\text{g/ml}$  농도 사이에서 급격히 감소하여 세포독성이 심한 것으로 나타났다(Fig. 1).

#### 2. 天花粉 분획물이 tyrosinase 활성에 미치는 영향

天花粉 분획물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 멜라닌 합성과정의 가장 중요한 효소인 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 天花粉 분획물을 0.5  $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 25  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하고 48시간 후 tyrosinase 활성을 조사한 결과, n-Hexane 분획의 경우 5  $\mu\text{g/ml}$  처리농도에서 대조군의 63.9 $\pm$ 4.8%, 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서 33.5 $\pm$ 7.7%, 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서 12.3 $\pm$ 7.0%로 tyrosinase 활성을 효과적으로 억제하였다. 또한 EtOAc 분획에서도 1  $\mu\text{g/ml}$  처리농도에서 대조군의 59.7 $\pm$ 2.7%, 5  $\mu\text{g/ml}$ 에서 6.2 $\pm$ 7.4%, 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서 7.0 $\pm$ 4.6%로 tyrosinase 활성을 매우 효과적으로 억제하였다. 그러나 H<sub>2</sub>O 분획에서는 25  $\mu\text{g/ml}$  처

리농도에서도 대조군의 98.7 $\pm$ 8.3%로 tyrosinase 활성에 전혀 영향을 주지 않았으며, n-BuOH 분획은 5  $\mu\text{g/ml}$  처리농도에서 대조군의 96.2 $\pm$ 6.0%, 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서 78.7 $\pm$ 3.8%, 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서 53.5 $\pm$ 2.9%로 tyrosinase 활성을 약간 억제하였다 (Fig. 2).

이상의 결과 n-Hexane 분획과 EtOAc 분획에서 효과적으로 tyrosinase 활성을 억제함을 알 수 있었다.

#### 3. 天花粉 분획물의 멜라닌 정량분석 결과

天花粉 분획물이 직접적으로 멜라닌 생합성의 최종산물인 멜라닌양에 미치는 영향을 조사하였다. 세포배양액에 天花粉 분획물을 0.5  $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 25  $\mu\text{g/ml}$  농도까지 처리하고 72시간 후 세포를 수확하여 총 멜라닌양을 측정하였다. n-Hexane 분획의 경우 1  $\mu\text{g/ml}$  처리농도에서 대조군의 84.7 $\pm$ 1.9%, 5  $\mu\text{g/ml}$ 에서 65.5 $\pm$ 5.9%, 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서 49.9 $\pm$ 7.9%, 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서 20.1 $\pm$ 2.9%로 최종 멜라닌 생성량을 효과적으로 억제하였다. 또한 EtOAc 분획에서도 1  $\mu\text{g/ml}$  처리농도에서 대조군의 79.6 $\pm$ 2.3%, 5  $\mu\text{g/ml}$ 에서 8.6 $\pm$ 9.0%, 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서 6.3 $\pm$ 15.8%로 최종 멜라닌 생성량을 매우 효과적으로 억제하였다. 그러나 H<sub>2</sub>O 분획

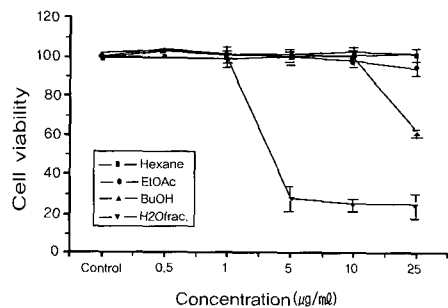
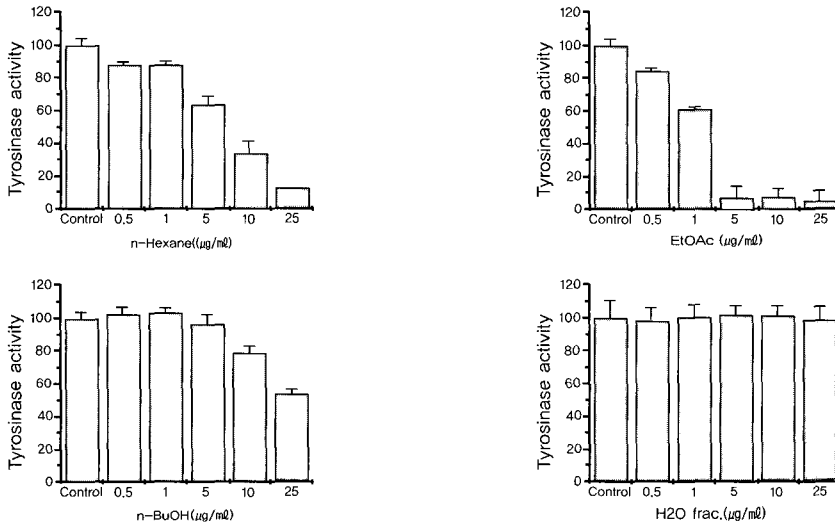
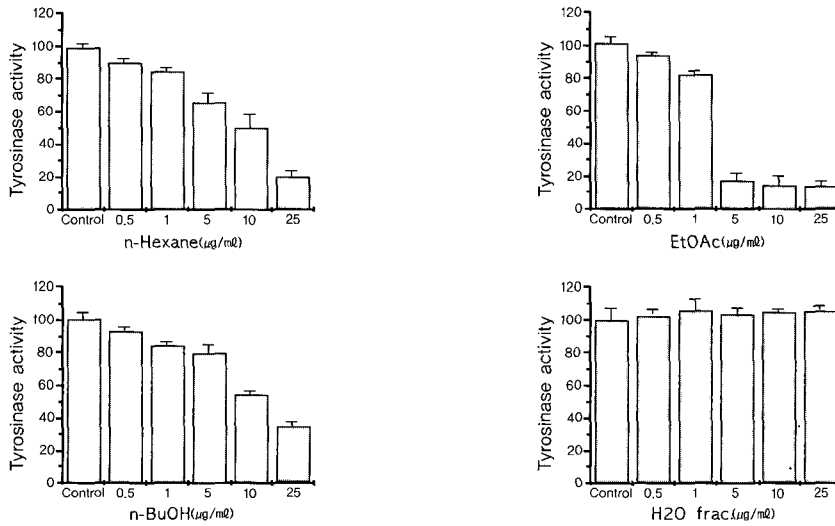


Fig. 1. Effects of *Trichosanthes kirillowii* extracts (n-BuOH, n-Hexane, EtOAc, H<sub>2</sub>O fractions) on the viability of A549 cells. A549 cells were treated with various concentrations (from 0.5 to 25  $\mu\text{g/ml}$ ) of fractions of *Trichosanthes kirillowii*. After 24hr later, the cell viability was measured by MTT assay. EtOAc fraction of *Trichosanthes kirillowii* decreased the viability of A549 cells in a dose-dependent manner. Results are expressed as percent (%) of control and data represented as mean  $\pm$  S.D. of quadruplicates.



**Fig. 2.** Inhibitory effects of various fractions on tyrosinase activity. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/well. After 24 hr, cells were treated with various fractions of *Radix Trichosanthis* at 48 hr. Then tyrosinase activity was measured as described in Materials and Methods. Results are expressed as percent (%) of control and data represented as mean  $\pm$  S.D. of quadruplicates.



**Fig. 3.** Inhibitory effects of various fractions on melanin contents. Cells were seeded at  $1 \times 10^6$  cells/well. After 24 hr, cells were treated with various fractions of *Radix Trichosanthis* at 48 hr. Then, melanin contents was measured as described in Materials and Methods. Results are expressed as percent (%) of control and data represented as mean  $\pm$  S.D. of quadruplicates.

은  $10 \mu\text{g/ml}$  처리농도에서 대조군의  $105.7 \pm 0.4\%$ ,  $25 \mu\text{g/ml}$ 에서  $105.9 \pm 2.2\%$ 로 총 멜라닌양에 전혀 영향을 주지 않았으며, n-BuOH 분획은  $5 \mu\text{g/ml}$  처리농도

에서 대조군의  $79.3 \pm 4.9\%$ ,  $10 \mu\text{g/ml}$ 에서  $53.8 \pm 1.6\%$ ,  $25 \mu\text{g/ml}$ 에서  $34.5 \pm 1.1\%$ 로 총 멜라닌양을 약간 억제하였다 (Fig. 3).

이상의 결과 n-Hexane 분획과 EtOAc 분획에서 매우 효과적으로 최종 멜라닌 생성을 억제하였고, n-BuOH 분획에서도 약간 억제함을 알 수 있었다.

#### 4. 天花粉 분획물의 멜라닌의 형태적 관찰 결과

위의 결과에서 天花粉 분획물을 72시간 동안 처리한 후 세포를 수확하여 총 멜라닌을 측정할 경우, 天花粉 분획물이 B16 mouse melanoma 세포의 증식에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 天花粉 분획물을 72시간 처리하고 세포를 수집한 후, 동일한 세포수당 멜라닌양을 조사하기 위하여  $1 \times 10^6$ 개의 세포를 microcentrifuge에 수확한 후 사진 촬영하여 멜라닌양을 관찰하였다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이  $1 \times 10^6$ 개의 세포에서 멜라닌양을 비교하였고, 天花粉 분획물을 처리하지 않은 것을 대조군(A)으로 하였고, 멜라닌 생성을 촉진시키는 물질로 잘 알려진 cyclic AMP elevating agent 인 forskolin을  $20 \mu\text{M}$ 을 처리한 균을 양성 대조군(F)으로 하였다.

H<sub>2</sub>O 분획(C)과 n-BuOH 분획(B)은 대조군(A)과 비교하여 차이가 없었으나, n-Hexane 분획(D)은 멜라닌을 현저히 억제함을 알 수 있었다. 한편 EtOAc 분획(E)에서는 멜라닌양은 감소하였으나 세포증식 또한 현저히 억제되어 세포증식 억제에 의한 멜라닌 생성 감소로 사료된다.

이상의 결과 n-Hexane 분획에서 멜라닌 생성을 효과적으로 감소되었고, EtOAc 분획에서는 멜라닌양이 현저히 감소되었으나 세포증식 또한 강하게 억제하였다.

### 고 찰

피부는 인체와 외부 환경과의 경계를 이루는 기관으로서 표피층, 진피층, 피하지방층의 독특한 3개 층으로 구성되어 있고, 체온을 조절하고 외부로부터 내부 장기를 보호하는 등의 생명유지를 위한 주요 기능과, 피부 호흡을 하거나, 피부색을 형성하거나, 특정 물질을 선택적으로 흡수하는 등의 부수적인 기능

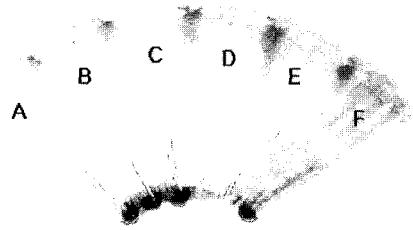


Fig. 4. Appearance of pellets of B16 cells following treatment with various fractions of *Radix Trichosanthis*. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/well. After 24 hr, cells were treated with various fractions of *Radix Trichosanthis* for 72 hr. Then, Cell pellet was observed as described in Materials and Methods. A, Control; B, BuOH fraction; C, H<sub>2</sub>O fraction; D, n-Hexane fraction; E, EtOAc fraction; F, forskolin (positive control)

을 갖고 있다<sup>22)</sup>. 특히 표피에 분포하는 멜라닌 세포는 멜라닌을 합성하여 피부의 색소 침착에 중요한 역할을 할 뿐 아니라 생성된 멜라닌이 각질형성세포로 이동하여 과도한 자외선을 흡수하고 차단하는 광보호 작용을 한다고 알려져 있다.

사람에 있어서 이 색소는 인종에 따라 차이가 있지만 특정 피부색의 사람이라도 신체의 건강상태에 따라 얼굴의 눈 밑 또는 뺨에 특이적으로 짙은 반점을 형성하기도 하고, 노화의 과정에서 얼굴, 팔, 다리에 검버섯을 형성하기도 한다. 최근에는 아름다움에 대한 관심이 높아지면서, 이러한 피부 미용을 해치는 기미나 주근깨 등과 같은 과색소 침착으로 인한 피부질환에 관한 인식이 높아지고 있다.

韓醫學에서는 기미 주근깨 등의 과색소 침착증에 해당하는 질환이 《素問·至真要大論》<sup>7)</sup>에 “歲陽明在天, 燥淫所勝... 面黧, 身無膏澤, 足外反熱”이라하여 처음 기록된 이래, 以後 많은 醫家들<sup>4,9,11,12,15-17,19,20,23)</sup>에 의해 面黑, 黧黧, 雀斑, 蠱黑斑 등의 異名으로 기록되었다.

과색소 침착증의 원인을 樓 등<sup>6)</sup>은 內經의 面塵에 대한 문헌을 인용하여 陽明病으로 보았으며, 顧 등<sup>3,11,17)</sup>은 憂思過多와 飲食失節로 인한 脾胃損傷을 원인으로 보았다. 또, 李 등<sup>15,20)</sup>은 巢의 문헌을 인용하여

風邪와 痰飲이 증상을 유발한다고 보았고, 陳 등<sup>3,6,19)</sup>은 발병기전 중에서 여성에게 주로 나타난다는 언급과 함께 陰虛火動을 원인으로 보았다. 近來 文獻들<sup>4,18,28,29)</sup>은 肝鬱氣滯, 瘀血內停, 腎陰不足, 陰虛火旺, 脾虛不運, 濕熱內蘊, 日曬熱毒, 火鬱孫絡, 風邪外搏 등의 원인으로 자세히 분류하였는데, 이상의 문헌을 종합하면 內因으로는 肝鬱氣滯, 瘀血內停, 腎陰不足, 陰虛火旺, 脾虛不運 등이, 外因으로는 風邪, 火邪, 濕熱邪, 熱毒 등이 각각 과색소 침착증을 유발하는 것으로 나타났다. 치료방법으로는 辨證施治에 의한 內治법과, 軟膏劑나 粉未 洗劑 등을 사용하는 外治法, 體鍼, 耳鍼 등을 이용하는 針治療法으로 분류할 수 있다. 內治法은 肝鬱氣滯에 疏肝解鬱하는 逍遙散을, 瘀血內停에는 通經活絡하는 通竅活血湯을, 腎陰不足에는 滋補肝腎하는 知柏地黃丸을, 脾虛不運에는 健脾益氣하는 加味歸脾湯 등을 위주로 가미하여 각각 사용하였다. 外治法에 사용된 外用藥은 玉容散, 紅玉散, 西氏玉容散, 玉肌散, 黃柏霜, 祛斑霜 등을 여러 가지 제법으로 얼굴에 사용하였다.

天花粉(Radix Trichosanthis)은 雀斑, 黧黯, 黑黧斑, 子 등의 과색소 침착증의 치료에 응용되는 外用藥인 玉容散 · 紅玉散 · 西施玉容散의 구성약물중의 하나이며, 清熱生津, 清肺化痰, 消腫排膿 등의 효능이 있어 熱病傷津, 口乾煩渴, 消渴, 肺熱燥咳, 癰腫瘡瘍, 瘡腫, 乳腺炎, 咳嗽 등의 치료에도 사용된다고 하였다<sup>21,25,26)</sup>. 박과(Cucurbitaceae)에 속하며 하늘다리 및 同屬 近緣植物의 塊根으로서 전국적으로 자생하는 다년생 草本植物인 天花粉은, 7-8월에 개화하고 10월에 원형으로 황색과실이 달리며, 이 종자를 瓜蒌根, 括蒌根, 蒌根, 瑞雪 등으로 부르기도 한다. 그 뿌리는 큰 塊根을 형성하고 있으며 껍질을 제거한 후 건조하여 분쇄한 것을 天花粉이라 하는데 다량의 전분을 함유하고 있어 단방약으로도 피부병의 치료에 사용된다고 하였다<sup>21,24,26)</sup>.

피부에 존재하는 멜라닌은 표피기저층에 존재하는 멜라닌세포(melanocyte)라고 불리는 색소세포 내의 melanosome에서 생합성되고, 細胞質 돌기를 통하여 표피의 기저층과 가시층의 세포로 운반된다<sup>22,30)</sup>.

피부에 가해지는 여러 가지 자극에 의해 멜라닌세포의 유사분열이 일어나고 이어서 멜라닌세포가 활성화 된다. 활성화된 멜라닌세포에서는 tyrosinase 합성이 촉진되고 멜라닌의 생성이 항진되어 이를 표피 밖으로 운반 배출하게 된다. 피부 멜라닌 생성에 있어서 Tyrosinase는 매우 중요한 역할을 하고 있으며, melanosome 내에서 tyrosine을 산화시켜 dopa를 만드는 tyrosine hydroxylase로, dopa를 산화시켜 dopachrome을 만드는 dopa oxidase로 작용하여 최종적으로 멜라닌 중합체를 합성하는 데 중요한 효소로 작용한다. 그러므로 tyrosinase 활성억제제는 피부 내에서의 멜라닌 중합체 합성을 효과적으로 저해할 수 있으며, tyrosinase 활성 억제 실험은 유용한 일차 평가법으로 인정되고 있다<sup>40)</sup>.

Tyrosinase에 의해 생성이 촉매되는 멜라닌은 노란색-적갈색의 pheomelanin과 갈색-검은색의 eumelanin으로 구분되는데, 1980년대까지 멜라닌은 L-tyrosine으로부터 dopa(L-3,4-dihydroxy-

phenylalanine)를 거치는 Raper-Mason pathway를 통해 합성되는 것으로 생각되었다. 이 경로에 의하면 L-tyrosine으로부터 dopa로 hydroxylation, dopa에서 dopaquinone으로의 산화, dopaquinone에서 leucochrome으로의 산화, leucochrome의 산화에 의한 dopachrome의 생성, dopachrome에서 DHI(5,6-dihydroxyindole)로의 전환, dihydroxyindole의 산화적 중합 및 단백질과 결합을 통해 최종적으로 멜라닌을 합성한다고 하였다. 1980년대 이후의 멜라닌 생합성 경로에 대한 연구는 피부암 관련 연구그룹에 의해 집중적으로 연구되었으며, 그 결과 생체내에서 dopachrome이 DHI로 전환되는 경로 외에 dopachrome tautomerase(EC 5.3.2.3) 작용에 의해 DHICA(5,6-dihydroxyindole carboxylic acid)로 전환되는 새로운 경로가 존재한다는 사실이 밝혀졌다. Dopachrome에서 DHICA를 거쳐 멜라닌을 합성하는 경로는 세포가 멜라닌 생성 중간대사 물질의 독성으로부터 자신을 보호하기 위한 파생경로로 추정되고 있다<sup>40)</sup>.

현재까지 천연물에서 분리된 tyrosinase 활성 억제

물질로는 감초에서 분리된 formononetin, glabridin, glabrol, 우 바 우 르 시 의 arbutin, 상 백 피 의 oxyresveratrol, dihydromoriin, artocarbene, 4-prenyloxyresveratrol, 누룩곰팡이의 secondary metabolite인 kojic acid 등이 있으며, 이 중 arbutin과 mulberin, Kojic acid는 현재 미백을 목표로 한 기능성 화장품에 첨가제로 이용되고 있다<sup>32,33)</sup>. 또한 최근 태 자삼의 뿌리로부터 tyrosinase와 멜라닌 생성을 억제 하는 cyclic peptide인 pseudostellarin A, B, C, D, E, F, G가 분리보고 된 바 있으며, 이 등<sup>36)</sup>은 박태기나무의 잎에 대한 활성지향적 분리를 실시하여 7종의 화합 물을 분리, 구조를 구명하였다. Ishihara 등<sup>32)</sup>은 Streptomyces bikiniensis 멜라닌 생합성 저해활성을 나타내는 물질을 방선균 배양액으로부터 탐색하여 신규 멜라닌 생합성 저해물질 melanostatin을 보고하였으 며, Imae 등<sup>34)</sup>에 의해 melanostatin 및 그 유도체가 합성되었다. Terao 등<sup>35)</sup>에 의한 저해 메카니즘 연구 결과 melanostatin은 in vitro에서 tyrosinase 저해활성을 나타내지 않고, B16 멜라노마 세포에서의 tyrosinase 단백질 생산 과정도 저해하지 않지만, 생성된 tyrosinase의 배당체를 변형시키는 것으로 보고하였다.

이에 본 저자는 玉容散, 紅玉散, 西施玉容散 등의 구성약물이면서, 이 <sup>27)</sup>등이 멜라닌 생성의 억제 효과가 있다고 보고한 天花粉으로부터 멜라닌 생성을 억제하는 물질에 대하여 탐색, 분리하고 구조를 구명하기 위하여, 天花粉의 n-Hexane, EtOAc, n-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물이 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

실험결과 tyrosinase 활성은 天花粉 분획물의 n-Hexane 분획과 EtOAc 분획에서 효과적으로 억제하였으며, n-BuOH 분획에서는 약간 억제하였다. 이와 더불어 天花粉 분획물이 직접적으로 멜라닌 생합성의 최종산물인 멜라닌양에 미치는 영향을 알아보기 위하여 멜라닌에 대한 정량분석 결과, n-Hexane 분획과 EtOAc 분획에서 최종 멜라닌 생성을 활성을 효과적으로 억제하였으며, n-BuOH 분획에서도 약간 억제하였으나 H<sub>2</sub>O 분획에서는 전혀 억제효과가 나타나지 않았다. 이는 Tyrosinase 활성 억제효과와 유사

한 경향으로 나타났다.

MTT 검사는 미토콘드리아 효소의 활성도를 알아봄으로써 세포에 대한 화학물질들의 세포독성 또는 증식정도를 발색의 차이에 의해 알아보는 방법이다. 이런 방법은 많은 시료를 이용한 실험에서 세포독성이나 증식에 미치는 영향을 빠르게 알아볼 수 있으며 방사선 동위 원소를 사용하지 않는다는 장점 때문에 최근에 많이 이용되고 있다. 본 실험에서도 MTT 검사를 이용한 天花粉 분획물의 세포생존률 조사 결과, 天花粉 H<sub>2</sub>O 분획과 n-BuOH 분획에서는 25  $\mu\text{g/ml}$  농도까지 세포독성이 없었고, n-Hexane 분획에서는 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서 약간의 세포독성을 보였으며, EtOAc 분획에서는 5  $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 부터 세포독성이 나타났다.

멜라닌 생성 억제는 크게 두 가지로 세포독성에 의한 세포사멸과 멜라닌 생성단계에서 효소활성억제로 나눌 수 있는데, B16 mouse melanopma 세포에서 MTT 결과 n-Hexane 분획에서는 세포독성이 없는 것으로 보아 멜라닌 생성억제는 세포독성에 의한 세포사멸에 의해서 보다는 멜라닌 생성 단계중 추출물에 의한 tyrosinase의 활성 억제, dopa 자동산화 억제와 같은 효소활성 억제에 의한 것으로 생각할 수 있으며, 아직 밝혀내지 못한 dopa 이후 여러단계에서 멜라닌 생성 억제 작용이 일어나는 것으로 사료된다. 또한 EtOAc 분획에서는 5  $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 부터 세포독성이 나타나 이는 멜라닌 생성단계에서 효소 활성 억제보다는 세포독성에 의한 효소 활성억제 결과로 추정된다. 이는 본 실험의 Fig. 4에서 보는 바와 같이 n-Hexane 분획에서는 대조군과 동일한 세포수( $1 \times 10^6$  cell)에서 총 멜라닌양이 현저히 감소하였으나, EtOAc 분획에서는 대조군보다 세포증식이 억제되어 멜라닌양이 감소된 것임을 알 수 있었다.

이상의 연구 결과 메탄올에 의한 개별적 성분 추출을 통하여 각각의 특성을 확실히 구분하여 알 수가 있었는데, 天花粉 n-Hexane, EtOAc, n-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획물 중 n-Hexane 분획이 세포독성이 적으면 서도 tyrosinase 활성 억제효과와 멜라닌 생성 억제 효과는 우수한 것으로 나타났으며, 차후 n-Hexane 분



획을 이용한 멜라닌 합성 억제효과와 작용기전과 응용법의 개발 등에 대한 체계적인 연구가 이루어진다면, 미백작용이 우수하면서도 피부 부작용이 없는 화장품이나 기미나 주근깨 등의 과색소 침착증을 치료하는 천연 피부약품 및 미백용 식품 첨가제 등으로 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결론

天花粉 분획물이 B16 mouse melanoma 세포에서 멜라닌 생성 억제 물질을 조사하기 위하여 n-hexane, EtOAc, n-BuOH, H<sub>2</sub>O 분획에서 세포독성과 tyrosinase 활성, 멜라닌 생성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 天花粉 분획물의 세포생존률 조사 결과, 天花粉 H<sub>2</sub>O 분획과 n-BuOH 분획에서는 25  $\mu\text{g/ml}$  농도까지 세포독성이 없었고, n-Hexane 분획에서는 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서 약간의 세포독성을 보였으며, EtOAc 분획에서는 5  $\mu\text{g/ml}$  농도에서부터 세포독성이 나타났다.
2. 天花粉 분획물의 tyrosinase 활성 조사 결과, n-Hexane 분획과 EtOAc 분획에서 tyrosinase 활성을 효과적으로 억제하였으며, n-BuOH 분획에서는 약간 억제하였다.
3. 天花粉 분획물의 멜라닌 정량분석 결과, n-Hexane 분획과 EtOAc 분획에서 최종 멜라닌 생성을 효과적으로 억제하였으며, n-BuOH 분획에서도 약간 억제하였으나 H<sub>2</sub>O 분획에서는 전혀 효과가 나타나지 않았다.
4. 天花粉 분획물 처리 후  $1 \times 10^6$  세포의 멜라닌양을 형태적으로 관찰한 결과, n-BuOH 분획과 H<sub>2</sub>O 분획에서는 대조군과 비교하여 변화가 없었으나 n-Hexane 분획에서 효과적으로 멜라닌양이 감소되었다. EtOAc 분획에서는 멜라닌양이 감소하였으나 세포증식이 현저히 억제되었음을 알 수 있었다.
5. 天花粉 분획물중 n-Hexane 분획과 EtOAc 분획

에서 효과적으로 멜라닌 생성을 억제하였으나, EtOAc 분획에서는 세포증식억제가 심하게 나타나 세포독성에 의한 멜라닌 억제로 사료된다.

이상의 연구 결과 天花粉 분획물중 n-Hexane 분획이 세포독성이 적고, tyrosinase 활성 억제효과와 멜라닌 생성 억제 효과가 우수한 것으로 나타났으며, 차후 효과와 안정성을 보다 체계적으로 규명하기 위한 동물실험과 n-Hexane 분획물을 이용한 다양한 제형의 임상실험이 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 乾祖望. 實用中醫外科學. 1985: 530-532.
2. 顧伯康. 中醫外科臨床手冊. 中國: 上海科學技術出版社. 1983: 426.
3. 顧世澄. 瘍醫大全. 北京: 人民衛生出版社. 1987: 479, 481-482.
4. 龔廷賢. 萬病回春. 서울: 醫聖堂. 1993: 271.
5. 南京中醫學院. 諸病源候論校釋. 北京: 人民衛生出版社. 1983.
6. 樓英. 醫學綱目. 서울: 大星文化社. 1986: 1081.
7. 楊維傑. 黃帝內經素問. 臺北: 樂羣出版事業有限公司. 1994: 624-679.
8. 范瑞強. 實用皮膚病性病驗方精選. 廣東出版社. 1994: 336.
9. 辛民教. 鄉藥集成方. 서울: 永林社. 1989: 1039.
10. 失數道明. 漢方治療百話. 서울: 동남출판사. 1984: 181.
11. 吳謙. 醫宗金鑒. 北京: 中國醫藥學出版社. 1982: 1680-1682.
12. 王壽. 外臺秘要. 上海: 文光圖書有限公司. 1968: 870-880.
13. 柳基遠. 診療及優秀處方. 서울: 成輔社. 1992: 328.
14. 劉愛民. 損容性皮膚病的診斷與治療. 中國: 中國中醫藥出版社. 1992: 177.
15. 張璠. 張氏醫通. 上海: 上海科學技術出版社. 1995: 442-443.

16. 程國彭. 醫學心悟. 香溝: 友聯出版社. 1961: 290.
17. 周命新. 醫門寶鑑. 서울: 杏林書院. 1975: 186-187.
18. 中醫研究院. 中醫症狀鑑別診斷學. 中國: 人民衛生出版社. 1987: 524.
19. 陳實功. 外科正宗. 上海: 上海科學技術出版社. 1989: 290,298.
20. 許俊. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂. 1981: 211,212.
21. 辛民教. 臨床本草學. 서울: 永林社. 1987: 369-372.
22. 박경아, Jungueira, L. Carlos. 조직학. 서울: 고려의학. 1999: 405-411.
23. 이선동. 백반증의 한방치료. 서울: 도서출판 정담. 1996: 30-54.
24. 이창복. 대한식물도감. 鄉文社. 1989: 718.
25. 강병수, 김영관. 臨床配合本草學. 서울: 永林社. 1994: 635-637.
26. 辛民教. 原色臨床本草學. 서울: 永林社. 1992: 223.
27. 이관순, 김재주, 송채석, 오춘근, 임규상. 천화분이 멜라닌 형성에 미치는 영향. 대한외관과학회지. 2001;14(1):209-225.
28. 박혜준, 고유신. 雀斑의 原因, 症狀 및 治方에 關한 文獻의 考察. 大韓外官科學會誌. 1997; 10:1,247-262.
29. 신연상, 노석선. 기미에 關한 文獻의 考察. 大韓外官科學會誌. 1988; 11(1):82-98.
30. Bloom W, Fawcett DW. A textbook of histology, 11th ed. USA: W.B. Saunders Company. 1986: 543-558.
31. Y. Funasaka, A. K. Chakraborty, M. Komoto, A. Ohashi, M. Ichihashi. The depigmenting effect of  $\alpha$ -tocopherol ferulate on human melanoma cells. British J. Dermatolohy. 1999; 141: 20-29.
32. Ishihara Y, Oka M, Tsunakawa M, Tomota K, Hatori M, Yamamoto H, Kamei H, Miyaki T, Konish M, Oki T. Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor. J. Antibioti. 1991: 44, 25.
33. Akju S, Suzuki Y, Asahara T, Fujinuma Y, Fukuda M. Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis. 日皮會誌. 1991; 101:609.
34. Imae K, H Kamashi, H Yamashita, T Okita, S. Okuyama, T Tsuno, T Yamasaki, Y Sawada, M Ohbayashi, T Naito, T Oki. Ssynthesis, stereochemistry, and biological properties of the depigmenting agents, melanostatin, feldamycin and analogs, J. Antibiot. 1991:44, 76-85.
35. Terao M., K. Tomita, T Oki, L Tabe, M Gianni, and E Garattini,. Inhibition of melanogenesis by BMY-28565, a novel compound depressing tyrosinase activity in B16 melanoma cells. Biochem. Pharmacol. 1992;43:183-189.
36. 이승호, 정시연, 김소영, 김진준, 장태수. 박태기나무의 잎으로부터 피부 멜라닌 색소생성 억제성분의 분리. 생약학회지. 1999; 30:397-403.
37. 한대석, 정승원, 안병학, 김석중. Tyrosinase 저해제가 검은특눈봉어의 멜라닌 생성에 미치는 영향. Korean j. food sci. technol. 1996; 28(6):1089-1094.