

더덕 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과

김진만 · 박민철 · 홍철희 · 김남권 · 황충연*²⁾

ABSTRACT

Inhibitory Effect on Melanin Synthesis of *Radix Codonopsis Lanceolatae*

Jin-Man Kim · Chul-Min Park · Chul-Hee Hong · Nam-Kwen Kim · Chung-Yeon Hwang

The aim of this study was to investigate the effect of *Codonopsis lanceolatae* on the melanogenesis of HM3KO human melanoma cells biologically. The cells were treated for 3 days and 5 days with *Codonopsis lanceolatae* at several concentrations. The effects on tyrosinase activity and melanin contents were examined. And DOPAchrome tautomerase(TRP-2) activity was also examined to search a pathway influencing this inhibitory effect.

1. It was examined mushroom tyrosinase activity was significantly inhibited by *Codonopsis lanceolatae*.
2. Treatment with *Codonopsis lanceolatae* did not affect cell viability at the highest concentration, 1 mg/ml, and suppressed melanin contents as a time and dose dependent manner.
3. It was investigated treatment with *Codonopsis lanceolatae* inhibited tyrosinase, a key enzyme forming melanin, activity in a dose-dependent manner.
4. Treatment with *Codonopsis lanceolatae* did not affect DOPAchrome tautomerase(TRP-2) activity.
5. There was not a morphological change by *Codonopsis lanceolatae* microscopically.

2) * 원광대학교 안이비인후피부과학교실

These results suggest that *Codonopsis lanceolatae* is a candidate for an efficient whitening agent which suppresses melanogenesis by a Raper-Mason pathway.

I. 緒 論

시대와 유행의 흐름에도 변하지 않는 미인의 제일 조건은 아름답고 윤기 있는 피부이며, 최근에도 이에 대한 관심은 날로 증가되고 있다^{1,2)}. 인간의 피부는 외부로부터 표피층, 진피층, 피하지방층의 3개 층으로 구성되어 있으며^{1,3)}, 피부색은 여러因子에 의해 결정되는 것으로 그 중 중요한 것은 멜라닌과 카로틴의 量, 혈관에서 스며나온 혈액 색깔이 관여하게 된다⁴⁾.

피부는 자외선, 유전, 대사, 내분비, 감염 등과 같은 물리적·화학적 요인들로 인해 멜라닌 합성에 이상이 발생하면, 아름다운 피부에 치명적인 손상을 끼치는 기미, 주근깨 등의 과색소 침착증이 발생한다^{1,3,5-7)}.

韓醫學에서는 皮膚의 과색소 침착증에 대하여 《黃帝內經·素問》〈至眞要大論〉⁸⁾에 “歲陽明在泉, 燥淫所勝, …… 面塵, 身無膏澤, 足外反熱”이라 하여 처음 收錄되었고, 巢⁹⁾의 《諸病源候論·面皯黑黧候》에서 風邪가 皮膚에 侵入하고 痰飲이 臟腑에 쌓이면 ‘烏癩’나 ‘雀卵上之色’이 얼굴에 나타난다고 하여 병리기전과 형태에 대하여 구체적으로 언급한 이래 여러 醫家들은 黧黯, 黧點, 面黑, 雀卵, 雀斑, 黑斑 등 다양하게 表現하였다¹⁰⁻²⁶⁾.

더덕(*Radix Codonopsis Lanceolatae*)은 우리나라 전역의 고산지대의 음습한 곳에 자생하거나 재배되고 있는 도라지과(*Campanulaceae*)에 속하는 多年生 덩굴性 草本으로²⁷⁻²⁹⁾, 養陰潤肺, 生津, 祛痰排膿, 清熱解毒, 催乳 등의 효능이 있어 乾咳, 咽頭炎, 肺癰, 乳癰, 腸癰, 瘡瘍腫毒, 乳汁不足, 乳腺炎, 毒蛇咬傷, 頭痛, 皮膚疾患 등의 病症을 치료

한다^{27,29-32)}.

더덕에 대한 실험적 연구로는 徐 등³³⁾은 더덕 추출물이 thymocyte의 증식을 촉진, helper T 세포의 population 증가시키고 복강 macrophage의 탐식작용을 증강시킨다고 하였으며, 李 등³⁴⁾은 더덕의 수용성 추출물이 면역계 세포에 직·간접적으로 작용하여 생체의 세포성 면역반응을 항진시킨다고 보고 하였다.

피부의 멜라닌 형성에 미치는 한약재에 대한 실험적 연구로 李³⁵⁾는 天花粉, 金 등³⁶⁾은 續隨子, 林 등³⁷⁾은 甘草, 千 등³⁸⁾은 蘇木이 각각 멜라닌 생성 억제 효과가 있는 것으로 보고하였으며, 朴 등³⁹⁻⁴⁰⁾은 白朮과 西施玉容散이 전사활성인자인 AP-1의 활성을 억제하고, α-MSH에 의해 활성화되는 c-Jun N-terminal kinase(JNK)의 활성을 억제함으로써 B16 melanoma 세포의 멜라닌 합성 증가를 억제시킨다고 보고하였다. 또한 李 등⁴¹⁾은 牡丹皮에 tyrosinase에 대하여 활성을 증가시키는 물질과 활성을 억제하는 물질이 공존한다고 보고 하였다.

이에 저자는 얼굴에 발생하는 皮膚疾患에 대하여 養陰潤肺, 生津, 祛痰排膿, 清熱解毒 등의 효능이 있는 더덕이 피부의 멜라닌 합성과정에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 HM3KO human melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 생성과정에서 가장 중요한 효소인 tyrosinase 활성도와 최종산물인 멜라닌량을 측정하였고, 광학현미경을 이용하여 세포구조를 관찰하였다. 또한 더덕이 멜라닌 합성경로에서 중요한 역할을 하는 DOPAchrome tautomerase (TRP-2)에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 試料調製

본 실험에 사용한 더덕은 시중 건재약방에서 규격품을 구입하였으며, 더덕 추출물 100g에 물 1ℓ를 가하여 3시간 동안 끓인 후 거즈로 여과하고 3,200rpm으로 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. -70℃에서 freeze dryer로 동결건조 시킨 후 9.4g의 試料(수득률: 9.4%)를 얻었다. 試料는 세포에 투여하기 전 0.22 μ m pore의 여과지로 멸균하여 사용하였다.

2. 實驗方法

1) HM3KO 세포주 배양

Human melanoma 세포주인 HM3KO 세포의 배양은 CO₂ 배양기(37℃, 5%)에서 10% fetal bovine serum(Hyclones)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle medium(DMEM, Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지를 이용하였으며 약 48시간 주기로 배양액을 교체하여 주었다.

2) 細胞 증식 測定

細胞를 배양판(6 cm dish)에 well당 1x10⁵ 씩 분주한 후 24시간 培養하여 배양용기에 細胞를 부착하였다. 더덕 추출물을 각 농도별로 처리하고 3, 5일간 배양하였고, 배양 완료후 각 well에 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액을 가하여 세포를 분리 수거하고, PBS로 2회 세척 한 후 혈구계산판을 이용하여 각 well 당 세포수를 측정하였다.

3) 시험관 내 tyrosinase 활성도 실험

시험관내 tyrosinase 억제효과는 Dopachrome 방법(42)을 이용하여 조사하였다. 더덕 추출물을 농

도별로 첨가한 sodium phosphate buffer(pH 7.0)와 150 unit의 mushroom tyrosinase(Sigma Chemical Co.), 2.5mM L-tyrosine을 넣고 온도조절장치가 있는 분광광도계로 37℃, 405nm에서 흡광도의 변화를 30분동안 관찰하였다.

4) 세포내 tyrosinase 활성도 측정

Tyrosinase 활성도는 Martinez-Esparza M 등(43)의 방법에 의하여 측정하였다. 멜라닌세포를 수확하여 세포침전물을 만들고, 100 μ l 세포용해액(lysis buffer; 1% Triton X-100, 10mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM PMSF)을 넣고 4℃ 얼음에서 30분간 때때로 흔들어주면서 세포를 파괴시킨 후 원심분리하여 상층액을 취하여 tyrosinase 활성측정용액으로 사용하였다. 50 μ l의 상층액에 100mM sodium phosphate(pH 7.0) 100 μ l를 넣고 30℃ 물중탕기에서 5분간 보온한 후 100mM catechol 50 μ l를 넣고 온도조절장치가 있는 분광광도계로 37℃, 405nm에서 흡광도의 변화를 1시간 관찰하였다.

5) 세포내 멜라닌 정량(melanin content) 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등(43)의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양세포는 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 후 혈구계산판을 이용하여 각 well당 세포수를 계산하고, 원심분리하여 수확하였다. 세포침전물에 1ml의 증류수를 넣어 현탁 후 초음파로 분쇄한 후, 원심분리하여 침전물을 수확하였다. Acid-insoluble material을 얻기 위해 2배의 dimethyl sulfoxide (DMSO)가 첨가된 1N NaOH 300 μ l를 넣어 80℃에서 1시간 동안 처리하여 용해시켰다. 405nm에서 흡광도를 측정하였으며 멜라닌 정량은 합성멜라닌(Sigma chemical Co.)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

6) 세포내 DOPAchrome tautomerase(TRP-2) 활성도 측정

DOPAchrome tautomerase(TRP-2) 활성도는 Funasaka 등⁴³⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 멜라닌 세포를 수확하여 세포침천물을 만들고, 100 μ l 세포용해액(lysis buffer; 1% Triton X-100, 10mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM PMSF)을 넣고 4 $^{\circ}$ C 얼음에서 30분간 때때로 흔들어주면서 세포를 파괴시킨 후 원심분리하여 상층액을 취하여 DOPAchrome tautomerase 활성측정 용액으로 사용하였다. DOPAchrome을 기질로 사용하고, Ag2O와 L-DOPA를 반응시켜 온도 조절 장치가 있는 분광광도계로 37 $^{\circ}$ C, 475nm에서 흡광도의 변화를 1시간 관찰하였다.

7) 광학현미경적 관찰

세포의 형태는 배양완료후 Inverted Microscope(phase contrast, Leica, Germany)를 이용하여 관찰하였다.

III. 實驗結果

1. 더덕의 시험관내 tyrosinase 활성 억제효과

Tyrosinase는 melanin 합성의 key enzyme으로 작용하기 때문에 버섯 tyrosinase를 이용한 시험관 내 tyrosinase 활성억제실험은 피부 미백제의 개발에 있어서 유용한 일차평가법으로 인정되고 있다^{44,45)}.

더덕이 tyrosinase 효소에 미치는 영향을 조사하기 위하여 버섯 tyrosinase를 이용하여 시험관 내 tyrosinase 활성도를 측정한 결과, 0.01 mg/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 92%, 0.1 mg/ml

농도에서 86%, 0.5 mg/ml 농도에서 68%, 1 mg/ml 농도에서는 67%로 버섯 tyrosinase 활성도가 유의하게 감소하였다(Fig. 1). 이상의 결과 더덕 추출물은 시험관내 tyrosinase 활성도를 효과적으로 억제하였다.

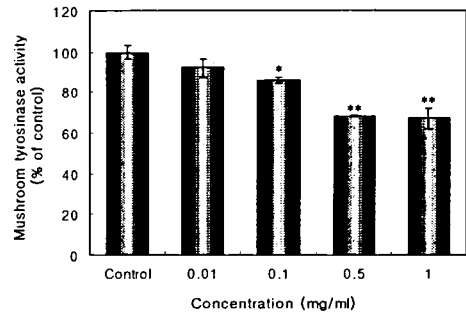


Fig. 1. Inhibitory effect of the mushroom tyrosinase by *Codonopsis lanceolatae* extract. Tyrosinase activity was measured using L-tyrosine as the substrate. Values are means \pm S.E. of experiments performed in triplicate. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, **P<0.01 and *P<0.05.

2. 더덕이 HM3KO human melanoma 세포의 증식에 미치는 영향

HM3KO human melanoma 세포에서 더덕 추출물의 멜라닌 생성 억제효과를 조사하기 위하여, 더덕 추출물의 농도에 따라 human melanoma 세포에 미치는 영향을 조사하였다.

더덕 추출물을 농도별로 3일, 5일간 human melanoma 세포에 투여한 후 세포수를 측정, 관찰하였다. 처리 후 3일에서는 처리하지 않은 대조군에 대한 백분율이 99.5%, 95%, 94.2%로 세포증식에 변화가 없었으며, 5일에서는 대조군에 대한 백분율이 117.5%, 124.2%, 127.1%로 나타나 더덕 추

출물에 의하여 유의하게 세포증식이 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 2).

따라서, 더덕 추출물은 HM3KO 세포에 1 mg/ml의 농도까지 세포독성을 나타내지 않았다.

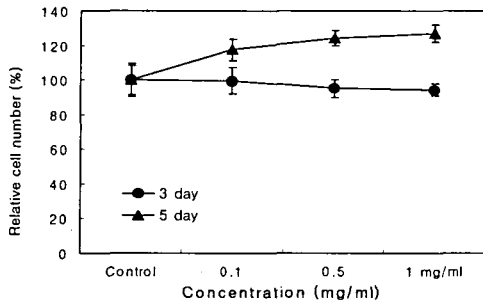


Fig. 2. Effect of the *Codonopsis lanceolatae* extract on the cell proliferation of the human melanoma cells. Cells were treated with several concentrations of *Codonopsis lanceolatae* extracts for a period of 3 days and 5 days. Data are means±S.E. of experiments performed in four times.

3. 더덕이 멜라닌 생성에 미치는 영향

더덕이 직접적으로 멜라닌 생합성의 최종산물인 멜라닌량에 미치는 영향을 조사하였다.

더덕 추출물을 0.1 mg/ml에서 1 mg/ml 농도까지 처리하고 3일, 5일 후 103 cell당 멜라닌량을 측정된 결과, 3일 후 0.1 mg/ml 처리군에서 대조군에 비하여 백분율이 95.8%, 0.5 mg/ml에서 89.1%, 1 mg/ml에서 81.9%로 약간 감소하였다 (Fig. 3. A). 5일 후 더덕 0.1 mg/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 백분율이 94.6%, 0.5 mg/ml에서 86.3%, 1 mg/ml에서 70.1%로 농도에 의존적으로 감소하는 경향이 나타났다. 이상의 결과 더덕은 멜라닌 생성을 억제하였고, 더덕의 처리농도와 처리시간이 길어짐에 따라 억제효과도 증가하였다

(Fig. 3. A and B).

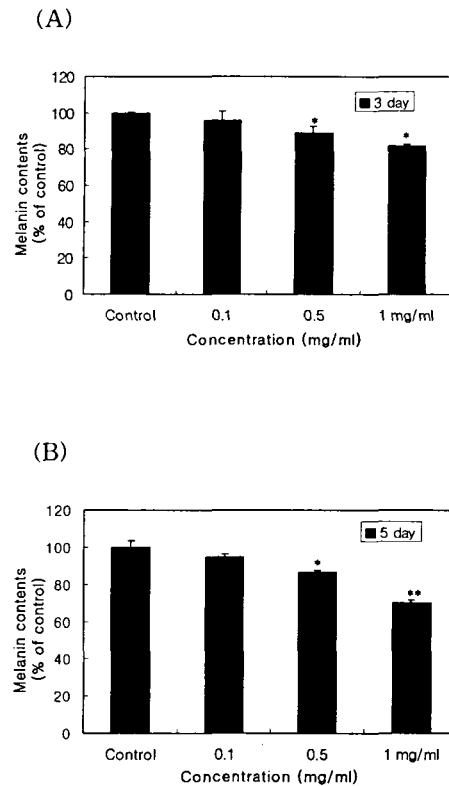
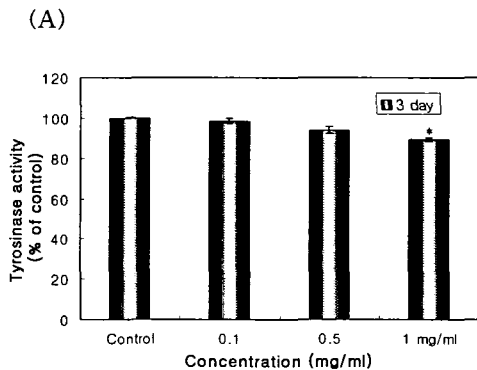


Fig. 3. The effect of *Codonopsis lanceolatae* extract on melanin contents in HM3KO human melanoma cells. Cells were treated with several concentrations of *Codonopsis lanceolatae* extract for a period of (A) 3 days and (B) 5 days. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means±S.E. of three experiments performed in triplicate. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, **P<0.01 and *P<0.05.

4. 더덕이 세포내 tyrosinase 활성에 미치는 영향

멜라닌세포에서 멜라닌은 tyrosine으로부터 세 가지 단계, 즉 tyrosinase, tyrosinase related protein 1(TRP-1), DOPAchrome tautomerase (TRP-2)에 의해서 합성되는데 이중 tyrosinase는 rate-limiting step으로 멜라닌색소 형성과정 중 가장 중요한 효소이다^{43,46,47}.

따라서, 본 실험에서는 더덕이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 멜라닌 합성과정중 rate-limiting 효소인 tyrosinase의 활성도를 측정하였다. 더덕을 0.1 mg/ml에서 1 mg/ml 농도까지 처리하고 3일, 5일 후 tyrosinase 활성도를 측정하였다. 3일 후 더덕 0.1 mg/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 98.6%, 0.5 mg/ml 농도에서 94%, 1 mg/ml 농도에서 89.4%로 감소하였으며 (Fig. 4. A), 5일 후 더덕 0.1 mg/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 97.5%, 0.5 mg/ml 농도에서 86.2%, 1 mg/ml 농도에서 75.6%로 감소하였다 (Fig. 4. B). 따라서 더덕은 세포내 tyrosinase 활성도를 억제하였고, 더덕의 농도가 증가함에 따라 억제효과도 증가하였다.



(B)

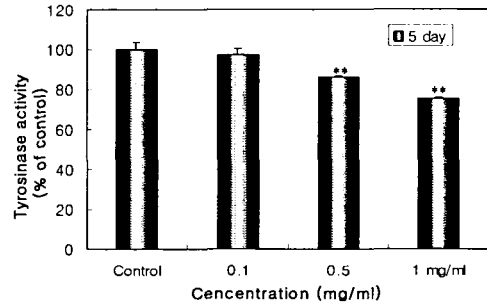


Fig. 4. The effect of *Codonopsis lanceolata* extract on tyrosinase activity of HM3KO human melanoma cells. Cells were seeded at 105 cells/well. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of *Codonopsis lanceolata* extract for a period of (A) 3 days and (B) 5 days. Then, tyrosinase activity was measured as described in Materials and Methods. Data are means±S.E. of three experiments performed in triplicate. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, **P<0.01 and *P<0.05.

5. 세포내 tyrosinase-related protein (TRP-2) 효소활성 억제 효과

DOPAchrome은 L-tyrosine으로부터 tyrosinase에 의해 생성된 후 DOPAchrome tautomerase(TRP-2)에 의해 DHICA(5, 6-dihydroxyindole- 2-carboxylic acid)로 전환되며 이는 다시 DHICA-oxidase(TRP-1)에 의해 eumelanin을 형성하는 것으로 알려져 있다^{43,46,47}.

본 실험에서 더덕 추출물이 HM3KO 세포에서 DOPA tautomerase (TRP-2)의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, HM3KO 세포에 더덕 추출물을 각 농도별로 3일, 5일간 처리한 후 세포내 DOPAchrome tautomerase 활성을 조사한 결과, 3일 처리군의 경우 대조군에 비하여 각각 99.57%,

100%, 99.69%로 변화가 없었으며, 5일 처리군의 경우에도 각각 100%, 100%, 99.56%로 변화가 없었다(Fig. 5).

이상의 결과 더덕 추출물은 HM3KO 세포의 DOPA tautomerase (TRP-2)의 활성에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

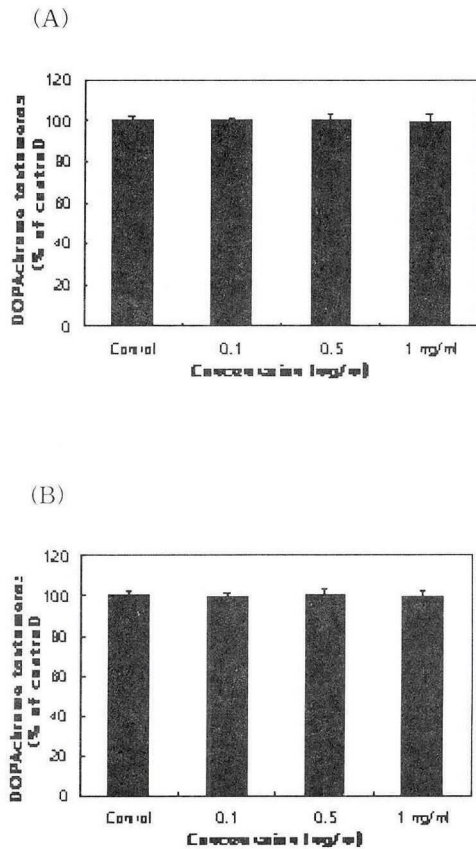


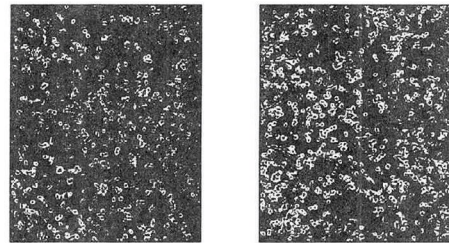
Fig. 5. The effect of *Codonopsis lanceolata* extract on DOPAchrome tautomerase activity of HM3KO human melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of *Codonopsis lanceolata* extract for a period of (A) 3 days and (B) 5 days. Then, DOPA tautomerase activity was measured as

described in Materials and Methods. Data are means \pm S.E. of three experiments performed in four times.

6. 세포의 형태적 관찰

더덕 추출물이 HM3KO 세포의 형태에 미치는 영향을 관찰하였다. 더덕 추출물을 3일, 5일 동안 처리하고 광학현미경으로 관찰한 결과, 0.1, 0.5 mg/ml 농도에서는 처리하지 않은 대조군과 유사하였고, 1 mg/ml 농도에서는 대조군에 비하여 세포증식이 약간 증가한 경향을 나타냈다. 따라서, 더덕 추출물은 1 mg/ml 농도까지 HM3KO human melanoma 세포의 형태에 영향을 미치지 않았음이 관찰되었다.

(B) 5 days



(A) 3 days

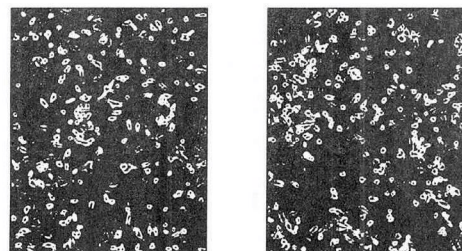


Fig. 6. Light micrographs of HM3KO human melanoma cells observed for (A) 3 days and (B) 5 days. 1: HM3KO nontreated 2: HM3KO treated with 1 mg/ml of *Codonopsis lanceolata* extract.

IV. 考 察

사람의 피부는 몸 속의 다른 기관에 비해 더욱 중요한 기능과 예민한 생리를 가지고 있으며, 특히 얼굴은 다섯 가지 감각기관이 모여 있을 뿐만 아니라 아름다움을 재는 척도가 되며 또한 얼굴을 통해 그 사람의 성격, 심지어는 인격까지 짐작할 수 있어 다른 사람들과 끊임없이 관계를 맺으며 살아가고 있는 인간에 있어서 얼굴이란 더없이 소중한 것이다^{1,5)}.

피부는 인체와 외부 환경과 경계를 이루는 기관으로서 표피층, 진피층, 피하지방층의 3개 층으로 구성되어 있으며^{1,3)}, 유해한 물질이나 주위 환경의 영향으로부터 몸을 보호하고 체온을 조절하는 등의 주요 기능과, 노폐물 배설 및 피부색을 형성하거나 특정 물질을 선택적으로 흡수하는 등의 부수적인 기능을 갖고 있다⁴⁾.

인간의 피부색은 3가지 요인에 의하여 결정되는데, 피부 속에 들어있는 카로틴 및 진피에 있는 혈관에서 스며나온 혈액 색깔과 멜라닌 색소(갈색)가 피부 색깔을 결정하는 데 중요한 요인이 되며⁴⁾, 자외선, 세포의 유전적 요인, 대사, 내분비, 염증, 감염, 종양 등과 같은 물리적 및 화학적 요인들로 인해 멜라닌 합성에 이상이 발생되면 기미, 주근깨 등의 과색소 침착증이 발생한다^{1,3,5-7)}.

최근에는 아름다움에 대한 관심이 높아지면서 피부에 치명적인 손상을 끼치는 기미, 주근깨 등의 과색소 침착증에 대한 인식이 높아지고 있다²⁾.

韓醫學에서는 皮膚의 과색소 침착증에 대하여 《黃帝內經·素問》〈至眞要大論〉⁸⁾에 “歲陽明在泉，燥淫所勝，……面塵，身無膏澤，足外反熱”이라 하여 처음 收錄되었고, 巢⁹⁾의 《諸病源候論·面皯黑黧候》에서 風邪가 皮膚에 侵入하고 痰飲이 臟腑에 쌓이면 ‘烏癩’나 ‘雀卵上之色’이 얼굴에 나타난다고 하여 병리기전과 형태에 대하여 구체적으

로 언급한 이래 醫家들에 의하여 따라 黧黧, 黧點, 面黑, 面黧黧, 雀卵, 斑黧黧, 顰子, 雀斑, 鰲黑斑, 黧黯, 鰲黑黧黧, 黑斑 등 다양하게 表現되어 왔다¹⁰⁻²⁶⁾.

과색소 침착질환에 대한 韓醫學의 原因으로 《內經》⁹⁾의 面塵에 대한 說을 따른 樓 등¹⁵⁻¹⁷⁾은 顏面이 陽明經에 속하므로 陽明之氣의 不足을 그 原因으로 보았고, 巢⁹⁾의 說을 따른 陳 등^{10-13,18,21,26,48)}은 風邪와 痰飲으로 氣血이 不和됨을 原因으로 보았으며, 李 등^{11,17,19,23)}은 思慮過多와 飲食失節로 인한 脾胃 損傷을 原因으로 보았다. 또 祁 등^{20,21,24,25)}은 腎水不足으로 인한 陰虛火動을 주된 原因으로 보았고, 朱 등^{14,22,48)}은 熱을 주된 原因으로 보았으며, 陳²¹⁾과 顧²⁴⁾는 부부관계까지 확대하여 부부관계로 인한 스트레스를 原因의 하나로 보았다. 현대로 와서 楊 등^{49,50)}은 腎陽不足을 原因의 하나로 제시하고 있는데, 이것은 내분비 장애로 인한 경우에 해당되는 한의학적인 접근으로 생각된다. 近來 文獻들⁵¹⁻⁶²⁾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, 日晒熱毒, 火鬱孫絡, 風邪外搏 등의 原因으로 자세히 분류하였는데, 이상을 종합하면 內因으로는 肝鬱氣滯, 瘀血內停, 腎陰不足, 腎陽不足, 陰虛火旺, 脾虛不運 등이, 外因으로는 風邪, 火邪, 熱毒, 濕熱邪 등이 각각 과색소 침착증의 原因이 되는 것으로 나타났다.

治法으로는 實證에 疎肝理氣, 涼血活血, 涼血消斑, 活血退斑, 化瘀退斑, 養陰清熱, 祛風散火, 散火解毒, 清肺涼血, 祛風通絡 등이 活用되었고, 虛證에는 補益肝腎, 滋陰降火, 降火散結, 滋腎化源, 滋腎養血, 健脾化濕, 溫陽益腎 등의 治法이 사용되었다.^{49,51-53,63-65)}

辨證施治에 의한 內服藥으로는 六味地黃丸^{20,21,23,25,26,49,64)}, 犀角升麻丸^{23,49,51)}, 酒製四物湯加減¹⁴⁾, 升麻順氣湯¹¹⁾ 등이 사용되었고, 外治法에 사용된 外用藥은 玉容西施散¹²⁾, 玉容散^{12,20,22)}, 紅玉散¹²⁾, 玉

肌散²¹⁾ 등이 사용되었다.

더덕(*Radix Codonopsis Lanceolatae*)은 우리나라 전역의 고산지대의 음습한 곳에 자생하거나 재배되고 있는 도라지과(*Campanulaceae*)에 속하는 多年生 덩굴性 草本으로 뿌리가 도라지처럼 굵고 줄기는 가늘고 긴 덩굴로 더덕의 根을 사용한다. 더덕은 8-9월이 開花期로, 이때 뿌리를 캐서 깨끗이 씻어 햇볕에 말려 사용하는데 羊乳, 四葉蓼, 山海螺, 牛奶子, 地黃 등으로 불리기도 한다²⁷⁻²⁹⁾. 효능은 養陰潤肺, 生津, 祛痰排膿, 清熱解毒, 催乳 등이 있어 乾咳, 咽頭炎, 肺癰, 乳癰, 腸癰, 瘡瘍腫毒, 乳汁不足, 乳腺炎, 毒蛇咬傷, 頭痛, 皮膚疾患 등의 病症을 치료한다^{27,29-32)}.

더덕의 性味는 甘·辛·平·無毒하고 肺·肝·大腸의 3經에 歸經하며, 더덕의 약리 작용으로는 적혈구 및 헤모글로빈을 증가시키고 백혈구를 감소시키는 조혈계에 대한 작용, 항피로작용, 혈압강화작용, 혈당상승작용 등이 있다^{29,32)}. 그리고 辛²⁷⁾은 우리나라에서는 더덕을 沙蔘으로 사용해 왔으나, 文獻 考證 결과 더덕은 羊乳임이 밝혀졌으므로 바로 써야 한다고 하였다.

멜라닌의 어원은 그리스어로 melas로 검은색이란 뜻이다⁶⁶⁾. 멜라닌은 내인성이며 비혈색소성 유도물이고 흑갈색을 띠는 색소로 가시층의 깊은 층과 기저층에 많이 분포되어 있다^{4,66)}. 멜라닌세포의 멜라닌소체(melanosome)에서 생성된 멜라닌은 세포질 돌기를 통하여 표피의 기저층과 가시층의 각질화세포(keratinocyte)로 운반되는데, 이때 한 개의 멜라닌세포와 이에 관계하는 여러 개의 각질화세포 사이에 기능적인 연관성이 있으며, 이를 표피-멜라닌 단위(epidermal-melanin unit)라고 한다^{3,67)}.

멜라닌의 과잉생산은 인체에 기미, 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하며, 더 나아가 피부암의 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다. 멜라닌의 생합성은 주로 tyrosinase의 작용에 의해 이루어

어지는 것으로 보고되어 있다⁴⁶⁾. Tyrosinase는 phenolase, monophenolase, monophenol oxidase, cresolase, monophenol monooxygenase 등으로 불리며, catechol oxidase와는 기능이 유사하여 혼용되기도 한다. tyrosinase는 한 쌍의 구리이온을 함유하고 있는 금속단백질 군에 속하며, monophenol의 ortho hydroxylation(cresolase activity)과 catechols의 o-quinone으로의 산화(catecholase activity)의 두 가지 반응을 촉매한다^{44,68)}.

양송이버섯(*Agricus bisprus*) tyrosinase는 분자량 1.2×10⁵의 α, β, γ 세 개의 동위효소로 구성되고, 분자당 2개씩 존재하는 활성부위에는 각각 한 쌍의 구리이온이 존재한다. 활성부위의 구리이온은 deoxytyrosinase(Cu+Cu+) 상태에서 산소와 반응하여 oxytyrosinase(Cu²⁺+Cu²⁺+O₂)를 형성한다. Oxytyrosinase는 기질인 tyrosine의 hydroxylation 및 산화과정을 촉매한 후 deoxytyrosinase 상태로 환원된다. 따라서, 버섯 tyrosinase의 저해제는 tyrosinase 활성부위 구리이온의 상태변화에 관여함으로써 tyrosinase의 산화, 환원과정을 조절할 수 있기 때문에, 버섯 tyrosinase를 이용한 시험관 내 tyrosinase 활성억제 실험은 피부 미백제의 개발에 있어서 유용한 일차평가법으로 인정되고 있다^{44,45)}.

이에 더덕이 tyrosinase 효소에 미치는 영향을 조사하기 위하여 버섯 tyrosinase를 이용하여 시험관 내 tyrosinase 활성도를 측정한 결과, 더덕 물추출물은 시험관 내 tyrosinase 활성도를 효과적으로 억제하였다(Fig. 1).

멜라닌은 멜라닌세포의 세포소기관인 멜라닌소체(melanosome)에서 일련의 효소 반응에 의해 생성되므로, in vitro에서 tyrosinase 활성을 직접적으로 억제하는 실험 결과만으로 더덕 추출물이 멜라닌 생성을 억제한다고 말하기는 불충분하다. 따라서 본 실험에서는 HM3KO human melanoma 세포에서 더덕 추출물의 멜라닌 생성 억제효과를

조사하기 위하여, 더덕 추출물의 농도에 따라 HM3KO 세포에 미치는 영향을 조사한 결과, 더덕 추출물은 HM3KO 세포에 1 mg/ml까지 세포증식에 영향을 미치지 않았다(Fig. 2). 또한 광학현미경을 이용한 HM3KO 세포형태 관찰결과 세포의 형태에 영향을 미치지 않았는데, 이는 위의 세포 증식 실험결과와 일치함을 나타낸다(Fig. 6).

이상의 결과 더덕의 멜라닌 생성억제 효과는 세포독성에 의한 세포사멸에 의해서 보다는 멜라닌 생성의 여러 단계를 통하여 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 사료된다.

생체에서 피부 색소침착을 일으키는 가장 주요한 자극은 자외선으로서, 자외선은 멜라닌세포를 직접 자극하게 된다. 멜라닌 세포에서 멜라닌은 tyrosine으로부터 세가지 단계, 즉 tyrosinase, tyrosinase related protein 1(TPR-1), DOPAchrome tautomerase (TRP-2)에 의해서 합성되는데, 이 중 tyrosinase는 rate-limiting step으로 멜라닌색소 형성과정 중 가장 중요한 효소이다(43,46). 따라서, 본 실험에서는 더덕이 멜라닌 세포에서 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 HM3KO human melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 생합성의 최종산물인 멜라닌양 및 tyrosinase 효소 활성을 측정된 결과, 더덕 추출물에 의하여 최종산물인 멜라닌양이 감소하였으며, tyrosinase 효소활성 또한 유의하게 억제되었다(Fig. 3, Fig. 4).

멜라닌 생성 조절에 관한 연구에 있어서, 1980년대까지의 연구는 멜라닌 생합성 경로의 key enzyme인 tyrosinase에 영향을 주는 인자에 초점을 두는 Raper-Mason pathway를 통해 생합성되는 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 단백질과의 결합을 통해 최종적으로 멜라닌이 합성된다(69). 그러나, 1980년대 이후 멜라닌 생합성 경로에 관한 연구는 피부암 관련 연구그룹에 의해 집중적으로 연구되었으며, 그 결과 생체 내에서 DOPAchrome이 DHI로 전환되는 경로 외에 DOPAchrome tautomerase(TRP-2) 작용에 의해 DHICA(5, 6-dihydroxyindole carboxylic acid)로 전환되는 새로운 경로가 존재한다는 사실이 밝혀졌다^{43,46,67,68,70-72}.

따라서, 본 실험에서는 최종 멜라닌양과 tyrosinase 효소활성에서 억제효과를 나타내는 더덕 추출물이 위 두 가지 경로 중 어떠한 경로에 의하여 멜라닌 생성을 억제하는지 조사하기 위하여 DOPAchrome tautomerase(TRP-2) 활성을 측정된 결과, 더덕 추출물은 DOPAchrome tautomerase(TRP-2) 활성에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다(Fig. 5).

이상의 결과에 의하여 더덕에 의한 멜라닌 생성 억제효과는 DOPAchrome tautomerase(TRP-2)의 작용에 의해 DHICA로 전환되는 경로가 아닌, DOPAchrome에서 DHI로 전환되어 dihydroxyindole의 산화적 중합 및 단백질과의 결합을 통해 최종적으로 멜라닌이 합성되는 Raper-Mason의 경로에 의한 것으로 사료된다. 그러나 지금까지 연구된 바로는 위의 두 가지 경로가 존재하지만, 멜라닌 생합성 과정에는 여러 효소들이 작용하며 멜라닌 색소에는 각각의 특성을 가진 여러 종류의 단일물질 및 강한 탄소결합들이 존재하기 때문에, 어느 한 가지로 단정지을 수는 없으며, 이에 대한 심도있는 연구가 필요하다.

V. 結 論

參考文獻

더덕이 피부의 멜라닌 합성과정에서 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 HM3KO human melanoma 세포를 이용하여 tyrosinase 활성도와 최종산물인 멜라닌량을 측정하고, 멜라닌 생성 억제 효과의 효과가 어떠한 경로로 이루어지는지 DOPAchrome tautomerase (TRP-2)에 미치는 영향을 조사한 결과, 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 더덕 추출물은 시험관내 버섯 tyrosinase 활성도를 효과적으로 억제하였다.

2. 더덕 추출물은 1 mg/ml의 농도까지 세포독성을 나타내지 않았으며, 더덕추출물의 처리농도와 처리시간에 의존적으로 멜라닌 생성을 억제하였다.

3. 더덕 추출물은 세포내 tyrosinase 활성도를 처리농도와 처리시간에 의존적으로 억제하였다.

4. 더덕 추출물은 DOPA tautomerase (TRP-2)의 활성에는 영향을 미치지 않았다.

이상의 결과 더덕은 우수한 멜라닌 생성억제효과를 가지고 있으며, 이러한 과정이 일반적인 멜라닌 생성과정인 DOPAchrome tautomerase(TRP-2)의 작용에 의해 DHICA로 전환되는 경로가 아닌 다른 경로에 의한 것으로 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

1. 국홍일 : 고운피부 젊은 피부, 서울, 아침나라, pp.17,18, 1999.

2. 전완길 외 : 한국생활문화100년, 서울, 장원, pp.19-21, 1995.

3. 박경아 외 : 조직학, 서울 고려의학, pp.405-411, 1999.

4. 강호석 외 : 조직학 제 2판, 서울, 고문사, pp.319,327, 1994.

5. 대한피부과학회 : 피부과학, 서울, 여문각, pp.1-9, 409-412, 2001.

6. 은희철 외 : 피부면역학, 서울, 서울대학교출판부, p.143, 1999.

7. 최국주 : 피부미인, 서울, 동명사, pp.17-23, 1996.

8. 楊維傑 編 : 黃帝內經 素問, 臺北, 樂羣出版事業有限公司, pp.624-679, 1994.

9. 巢元方 : 巢氏諸病原候論, 서울, 大星文化社, p.200, 1992.

10. 陳昭遇 外 : 太平聖惠方, 北京, 人民衛生出版社, p.1208, 1986.

11. 李梴 : 偏註醫學入門, 서울, 大星文化社, 雜病篇, pp.29, 224. 1990.

12. 許俊 : 東醫寶鑑 서울, 南山堂, pp.211,212, 1981.

13. 趙佶 : 聖濟總錄, 北京, 人民衛生出版社, p.1763, 1987.

14. 朱震亨 : 丹溪醫集, 北京, 人民衛生出版社, p.24, 1993.

15. 樓英 : 醫學綱目, 서울, 大星文化社, p.1081, 1986.

16. 龔廷賢 : 萬病回春, 서울, 醫聖堂, p.271, 1993.

17. 王肯堂 : 證治準繩, 北京, 人民衛生出版社, 卷1, p.824, 1991.

18. 辛民教 外 : 鄉藥集成方, 서울, 永林社, p.1039, 1989.
19. 周命新 : 醫門寶鑑, 서울, 杏林書院, pp.186-187, 1975.
20. 祁坤 : 外科大成, 臺北, 文光圖書有限公司, p.218, 1968.
21. 陳實功 : 外科正宗, 上海, 上海科學技術出版社, pp.290,298, 1989.
22. 程國彭 : 醫學心悟, 香溝, 友聯出版社, p.290, 1961.
23. 吳謙 : 醫宗金鑒, 北京, 中國醫藥學出版社, pp.1680-1682, 1982.
24. 顧世澄 : 瘍醫大全, 北京, 人民衛生出版社, pp.479, 481-482, 1987.
25. 孫震元 譯 : 瘍科會粹, 北京, 人民衛生出版社, pp.364-365, 1987.
26. 張璠 : 張氏醫通, 上海, 上海科學技術出版社, pp.442-443, 1995.
27. 신민교 : 원색 임상본초학, 서울, 영림사, pp.230-231, 1991.
28. 신민교 : 임상본초학, 서울, 영림사, p.273, 2000.
29. 鄭普燮 외: 향약대사전, 서울, 영림사, p.1087, 1990.
30. 陸昌洙 : 한국본초학, 서울, 癸丑文化社, p.220, 1981.
31. 상해중의학원 : 中草藥學, 商務印書館香港分館, p.579, 1983.
32. 陸昌洙 : 아세아 본초학, 서울, 癸丑文化社, p.412, 1998.
33. 서정숙, 은재순 : 더덕으로부터 면역세포 활성 성분의 분리, 한국영양학회지 31(6): 1076-1081, 1998.
34. 이용진 외: 더덕추출물이 세포성 면역 반응에 미치는 영향, 한국수의공중보건학회지, 제19권 제3호, pp.273-279, 1995.
35. 이관순 외 : 천화분이 멜라닌 형성에 미치는 영향, 대한외관과학회지, 14:1, pp.209-225, 2001.
36. 김청택 외 : 속수자의 멜라닌 생성 억제물질, 생약학회지 31(2):168-173, 2000.
37. 임덕우 외 : 감초추출액이 멜라닌세포의 증식과 멜라닌화에 미치는 영향, 동서의학연구소 논문집, vol.2000 NO 1, 2001.
38. 천현자 외 : 소목의 부탄올 추출물에 의한 Melan-a 세포의 멜라닌 생성 억제효과, 생약학회지 33(2):130-136, 2002.
39. 박지선 외 : 백출추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향, 대한동의병리학회지, 13(2):91-98, 1999.
40. 박지선 외 : B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 대한 西施玉容散의 효과, 대한동의병리학회지, 14(1):160-170, 2000.
41. 이승호 외 : 목단피부터 멜라닌 생성 억제성분의 분리, 약학회지 42(4):353-358, 1998.
42. JK No, DY Soung, YJ Kim, KH Shim, YS Jun, SH Rhee, T okozawa, HY Chung : Inhibition of tyrosinase by green tea components. Life Science, 65(21): 241-246, 1999.
43. Y. Funasaka, A. K. Chakraborty, M. Komoto, A. Ohashi, and M. Ichihashi : The depigmenting effect of α -tocopherol ferulate on human melanoma cells. British J. Dermatolohy, 141: 20-29, 1999.
44. Prota G. : Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. J. Invest. Dermatol, 75(122): 31-36, 1990.
45. SH Lee, JS Park, SY Kim, JJ Kim, SR Chung : Isolation of inhibitory components on tyrosinase activity from the bark of Paeonia moutan. Yakhak Hoeji, 42(4): 353-358, 1998.
46. K. Wakamatsu and S. Ito : Advanced chemical methods in melanin determination. Pigment Cell Res, 15: 174-183, 2002.

47. Kametama, K., T. Takemura, Y. Hamada, C. Sakai, S. Kondoh, S. Nishiyama, K. Urabe, and J. Hearing : Pigment production in murine melanoma cell is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1(TRP-1), DOPAchrome tautomerase(TRP-2), and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol*, 2: 126-131, 1993.
48. 沈金鰲 : 沈氏尊生書, 臺北, 自由出版社, p.530, 1979.
49. 楊思澍 外 : 中醫臨床大全, 中國, 北京科學技術出版社, pp.923-924, 1991.
50. 胡照明 : 中國中醫秘方大全, 上海, 文匯出版社, pp.405,406, 1992.
51. 陳貴廷 外 : 實用中西醫結合診斷治療學, 서울, 一中社, p.1501, 1991.
52. 中醫研究院 : 中醫症狀鑑別診斷學, 中國, 人民衛生出版社, p.524, 1987.
53. 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, p.177, 1992.
54. 周洪範 : 白話中醫秘方全書, 대만, p.494, 1986.
55. 徐宜厚 外 : 皮膚病中醫診療學, 北京, 人民衛生出版社, pp.8-17, 1997.
56. 梁勇才 : 實用皮膚病診療全書, 北京, 學苑出版社, pp.17-24, 27-30, 1996.
57. 辺天羽 外 : 中西醫結合皮膚病學, 天津, 天津科學技術出版社, pp.46-49, 1999.
58. 宋兆友 : 中醫皮膚科臨床手冊, 北京, 人民衛生出版社, pp.3-6, 1996.
59. 李林 : 實用中醫皮膚病學, 北京, 中醫古籍出版社, pp.1-17, 1998.
60. 南惠貞 外 : 肝斑에 關한 文獻의 考察, 大韓外官科學會誌, 9:1, pp.16-23, 1996.
61. 朴惠峻 外 : 雀斑의 原因, 症狀 및 治方에 關한 文獻의 考察, 外官科學會誌, 10:1, pp.247-262, 1997.
62. 申廷祥 外 : 기미에 關한 文獻의 考察, 大韓外官科學會誌, 11:1, pp.82-98, 1998.
63. 顧伯華 外 : 實用中醫外科學, 上海, 上海科學技術出版社, p.529-530, 1985.
64. 顧伯康 : 中醫外科臨床手冊, 中國, 上海科學技術出版社, p.426, 1983.
65. 范瑞強 : 實用皮膚病性病驗方精選, 廣東出版社, p.336, 1994.
66. 대한병리학회 : 병리학 제2판, 서울, 고문사, p.58, 1995.
67. Bloom W, Fawcett DW : A textbook of histology, 11th ed, W.B. Saunders Company, USA, pp. 543-558, 1986.
68. 이충환, 고영희, 멜라닌 생합성 저해물질의 탐색, 신물질 탐색 연구 동향(IV), 생물산업 9(2): 32-35, 1996.
69. Korner A, Pawelek J: Mammalian tyrosinase catalases three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* 217:1163-1165, 1982.
70. Pawelek J M: After dopachrome Pigment *Cell Res.* 4: 53-62, 1991.
71. Aroca P, Solano F, Salinas C, Garcia-Borron JC, Lozano JA: Regulation of final phase of melanogenesis. *Eur. J Biochem* 208: 155-163, 1992.
72. Chakraborty A K, Funasaka Y, Komoto M and Ichihashi M. Effect of Arbutin on melangenic Proteins in Human Melanocytes. *Pigment Cell Res.* 11:206-212, 1998.