

## 白芨이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향

윤화정 · 윤정원 · 윤소원 · 고우신\* · 우원홍\*\*

### Inhibitory Effect on Melanogenesis of *Rhizoma Bletillae*

Hwa-Jung Yoon · Jung-Won Yoon · So-Won Yoon · Woo-Shin Ko · Won-Hong Woo

Recently many efforts were focused to understand the mechanical insights of melanogenesis to develop the agents for hyper-pigmentation and hypo-pigmentation. In the melanin biosynthetic pathway, tyrosinase is the rate limiting enzyme, and  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone(MSH) or cAMP-elevating agents stimulate melanogenesis and enhance the melanin synthesis and the tyrosinase activity. The author has analyzed the effects of *Rhizoma Bletillae* on the basal melanogenic activities of B16 mouse melanoma cells.

*Rhizoma Bletillae* alone markedly suppressed melanin content and tyrosinase activity in a dose-dependent manner. Pretreatment of the cells with *Rhizoma Bletillae*. The decrease in the tyrosinase activity was paralleled by a decrease in the abundance of tyrosinase protein and tyrosinase promoter activity.

These results suggest that *Rhizoma Bletillae* inhibits melanogenesis of B16 melanoma cells via suppression of tyrosinase activity.

**Key words** : *Rhizoma Bletillae*, Melanogenesis, Tyrosinase activity, Melanin content

### 서론

최근 대기오염으로 인한 오존층의 파괴와

이에 따른 자외선의 유해성에 대한 관심이 날로 증가하고 있다. 이러한 환경오염에 따른 피부의 자외선 노출이 증가되면서, 이로 인한 피부노화에 따른 피부색의 변화, 침착이 심해지고 있으며, 또한 미용적인 이유에서 피부 착색에 대한 관심이 높아지고 있다. 이에 보다 안정적이고 효과적인 피부색소질환의 치료를 위하여 미백 소재를 발견하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>1-3)</sup>.

\* 동의대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실

\*\* 원광대학교 한의과대학 병리학교실

· 교신저자 : 윤화정, 동의대학교 한의과대학  
안이비인후피부과교실

(Tel. 051-850-8933, E-mail : yhj1226@demc.or.kr)

인간의 피부색은 멜라닌(melanin), 혈관분포와 혈색소, 각질층의 두께 및 카로틴 등 여러 가지에 의해 좌우되며 이 중 멜라닌이 주된 역할을 한다. 따라서 미백효과를 검증하기 위해서는 멜라닌 형성을 억제하는지 여부를 밝히는 것이 중요하다<sup>4)</sup>.

피부색의 이상을 초래하는 과색소 침착성 질환은 기미, 주근깨, 흑자, 담갈색 색소침착, 염증후 과색소침착 등으로 구분할 수 있다.<sup>5,6)</sup> 韓醫學에서는 여러 醫家들에 의하여 形態와 色調에 따라 黚黚<sup>7-9)</sup>, 黚點<sup>10)</sup>, 面黑<sup>11-14)</sup>, 面黚黚<sup>10-15)</sup>, 雀卵<sup>9-16)</sup>, 斑黚黚<sup>9)</sup>, 顰子<sup>9,16)</sup>, 雀斑<sup>17-22)</sup>, 鰲黑斑<sup>17,18)</sup>, 黚黚<sup>23)</sup>, 鰲黑黚黚<sup>20)</sup>, 黑斑<sup>21)</sup> 등 다양하게 表現되어 왔다.

이러한 질환의 원인은 확실하게 밝혀져 있지 않으나, 주로 자외선, 유전적인 요인, 대사, 내분비, 감염 등과 같은 물리적, 화학적 요인들로 인해 멜라닌 합성에 이상이 생긴 것이다<sup>4-6)</sup>.

과색소 침착성 질환에 대한 확실한 치료법은 아직 정립이 되지 않은 상태이며, 현재 임상가에서 널리 이용되는 방법으로는 미백성 약물, 화학박피술, 레이저 등이 있으며, 최근에는 이온영동법을 이용하여 비타민 C의 흡수를 최대화시켜 치료하는 방법이 시도되고 있다.<sup>5,24)</sup>

특히 미백소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 한의학적 문헌에서도 피부미용에 관한 本草, 處方, 鍼灸 등의 내용이 많이 서술되어 있으며 특히 외용제재에 대해 기재되어 있고<sup>25,26)</sup>, 이러한 외용제재에 대한 미백 연구는 활발히 이루어지고 있다.<sup>27,28)</sup>

白芨(*Rhizoma Bletillae*)은 과색소 침착성 질환에 효과가 있는 것으로 연구된 西施玉容散<sup>29-31)</sup>의 구성약물 중 하나로 난초과(Orchidaceae)에 속한 多年生草本인 대암풀(자란)의 塊莖을 말하며, 收斂止血하고, 消腫生肌하는 效能이 있어 여러 出血疾患과 瘡瘍腫痛이나 手足皸裂 등의 證을 다스린다<sup>32)</sup>.

이에 본 연구에서는 피부색소 질환에 효과

가 있는 많은 외용약 처방 중 구성약물의 하나인 白芨이 피부의 멜라닌 합성과정에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 멜라닌 연구에 많이 활용되어지는 B16 흑색종세포를 이용하여 白芨의 멜라닌 생성량과 멜라닌 생성과정에서 가장 중요한 효소인 tyrosinase 활성도를 측정하고, 또한 白芨이 tyrosinase protein 발현양상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 tyrosinase antibody를 이용한 western blotting 방법으로 세포내 tyrosinase protein level을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 시료조제

본 실험에 사용한 白芨(*Rhizoma Bletillae*)은 동의대학교 부속한방병원에서 구입, 정선하여 사용하였다. 백급 100g을 메탄올 1ℓ에 24시간 sonication시킨 다음 추출액을 여과하고 감압농축하여 동결건조시켰다. 얻어진 3.52g의 동결건조 추출물(수득률: 3.52%)을 試料로 사용하였으며, 試料는 세포에 투여하기 전 0.22 $\mu$ m pore의 여과지로 멸균하여 사용하였다.

#### 2) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM)은 Gibco BRL Co (Gaithersburg, MD) 배지를 이용하였고, fetal bovine serum은 Hyclones (USA)을, glutamine, penicillin, streptomycin,  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), forskolin, Aprotinin,

L-dihydroxyphenylalanine 등은 Sigma (USA)를 사용하였다. Tyrosinase antibody는 Santa Cruz Biotechnology (USA)을, secondary peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody는 Sigma (Amersham)를 ECL kit는 Amersham (UK)을 사용하였다. 측정기기로는 분광광도계 (Power WaveX, Bio-tek Instrument, Inc)를 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 1) B16 흑색종세포 배양

B16 흑색종세포의 배양은 CO<sub>2</sub> 배양기(37°C, 5%)에서 10% fetal bovine serum (Hyclones)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM, Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지를 이용하였고, 1 mM/L glutamine, 500 U penicillin과 20 µg/ml streptomycin을 첨가하여 사용하였으며, 약 48 시간 주기로 배양액을 교체하여 주었다.

### 2) 시료 및 시약처리

세포를 배양판(6cm dish)에 well당  $1 \times 10^5$  씩 분주한 후 24시간 배양하여 배양용기에 세포를 부착하였다. 白芫을 실험농도별로 알맞게 조정하여 다음 사용하였다. 白芫을 농도별로 시약 처리하여 1시간 배양한 후에 100nM α-MSH 과 20µM forskolin을 각각 처리하였다.

### 3) 세포 증식 측정

세포를 배양판(6cm dish)에 well당  $1 \times 10^5$  씩 분주한 후 24시간 배양하여 배양용기에 細胞를 부착하였다. 白芫을 각 농도별로 처리하고 72시간 배양하였으며, 배양 완료 후 각 well에 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액을 가하여 세포를 분리수거한 후, PBS로 2회 세척한 다음 Fuchs-Rosenthal

cytometer(Germany)를 이용하여 각 well 당 세포수를 산정하여 증식상태를 측정하였다.

### 4) 세포내 tyrosinase 활성도 측정

Tyrosinase 활성도는 Martinez-Esparza M 등<sup>33)</sup>의 방법에 의하여 측정하였다. 멜라닌 세포를 수확하여 세포 침천물을 만들고, 100µl 세포용해액(lysis buffer: 1% Triton X-100, 10mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1mM PMSF)을 넣고 4°C 얼음에서 30분 간 때때로 흔들어주면서 세포를 파괴시킨 후 원심분리하여 상층액을 취하여 tyrosinase 활성측정용액으로 사용하였다. 50µl의 상층액에 100mM sodium phosphate(pH 6.8) 100 µl를 넣고 30°C 물중탕기에서 5분간 보온한 후 100 M catechol 50µl를 넣고 온도조절장치가 있는 분광광도계로 37°C, 405nm에서 흡광도의 변화를 1시간 관찰하였다.

### 5) 세포내 멜라닌 정량(Melanin content) 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등<sup>34)</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 후 원심분리하여 수확한 다음, 세포침천물에 1ml의 증류수를 넣어 현탁하고, 초음파로 분쇄한 다음, 원심분리하여 침전물을 수확하였다. Acid-insoluble material을 얻기 위해 10%의 dimethyl sulfoxide(DMSO)가 첨가된 1N NaOH 300µl를 넣어 80°C에서 1시간 처리하여 용해시켰다. 얻어진 재료는 475nm에서 흡광도를 측정하였으며, 멜라닌 정량은 합성멜라닌(Sigma chemical Co.)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

### 6) Western blotting assay

B16 흑색종세포( $5 \times 10^6$ )를 PBS로 세척하고, 4°C에서 30분 동안 lysis buffer(phosphate buffer, pH 6.8, 100IU Aprotinin, 1% AEBSF)에 용해한 다음

20,000×g로 30분 동안 원심분리 시킨 후, 얻어진 상층액은 Amicon system을 이용하여 단백질을 농축시켰다. 농축된 단백질은 Bradford assay로 정량하고, 정량하여 얻어진 단백질(50-100µg)을 7.5%나 10%의 SDS-PAGE상에서 전기영동하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 Nitrocellulose membrane에 옮긴 후 실온에서 2시간 blocking buffer(5% skim milk in TBST)에서 incubation시켰다. Tyrosinase antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 1:500으로 희석하여 1시간 반응시킨 후 TBST에 3회 세척하고 1:1,000으로 희석시킨 secondary peroxidase-conjugated anti-mouse antibody(Sigma)에 반응된 단백질을 Amersham ECL system으로 확인하

였다.

7) 광학현미경적 관찰

세포의 형태학적 변화는 배양완료 후 Inverted Microscope (phase contrast, Leica, Germany)를 이용하여 관찰하였다.

실험성적

1. 白芨의 최종 멜라닌 생성 억제효과

멜라닌은 멜라닌세포의 세포소기관인 멜라닌소체(melanosome)에서 일련의 효소 반응에 의해 생성되므로, 멜라닌세포주인 B16 흑

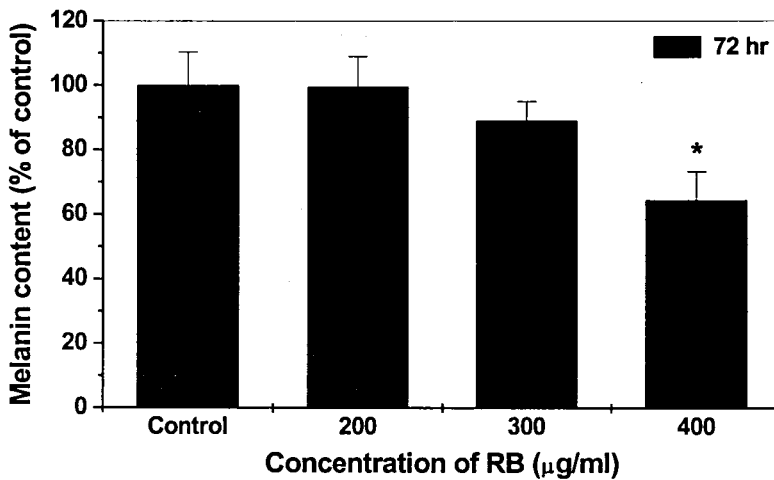


Fig. 1. Inhibitory effect of *Rhizoma Bletillae* extract on melanin contents in B16 melanoma cells. B16 cells were treated with various concentrations of *Rhizoma Bletillae* extract for 72hr. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means±S.D. of three experiments performed in triplicate. (\* p<0.05 )

색종세포를 이용하여 白芨의 멜라닌 생성 억제 효과를 조사하였다.

白芨을 B16 흑색종세포에 처리하고 72시간 배양한 다음, 세포를 수집하여 멜라닌 세포수에 따른 멜라닌 양을 측정하였다. 白芨을 200, 300, 400 $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리한 결과  $1 \times 10^5$ 개의 세포당 멜라닌 양은 대조군에 비하여 각각  $99.48 \pm 9.4\%$ ,  $89.1 \pm 5.9\%$ ,  $64.4 \pm 8.8\%$ 로 白芨은 B16 흑색종세포에서 최종적인 산물인 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 나타났다 (Fig 1).

## 2. 白芨의 세포내 tyrosinase 활성 억제효과

白芨 처리 후 최종산물인 멜라닌 양이 억제

된 것은 멜라닌 합성에 관여하는 효소들의 활

성과 관련이 있음을 나타내므로, 白芨을 B16 흑색종세포에 각 농도별로 처리하고 72시간 배양한 후 세포내 tyrosinase 효소 활성을 조사하였다.

白芨 250, 300, 350, 400 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 tyrosinase 활성은 각각 대조군에 비교하여  $105.3 \pm 1.8\%$ ,  $94.6 \pm 2.6\%$ ,  $81.3 \pm 4.2\%$ ,  $60.7 \pm 5.9\%$ 로 저농도에서는 약간 증가하였으나, 300 $\mu\text{g/ml}$  이상에서는 농도 의존적으로 감소한 것으로 나타났다. 특히 白芨 400 $\mu\text{g/ml}$  농도에서 B16 흑색종세포의 tyrosinase 활성을 강하게 억제시키는 것으로 나타났다(Fig. 2).

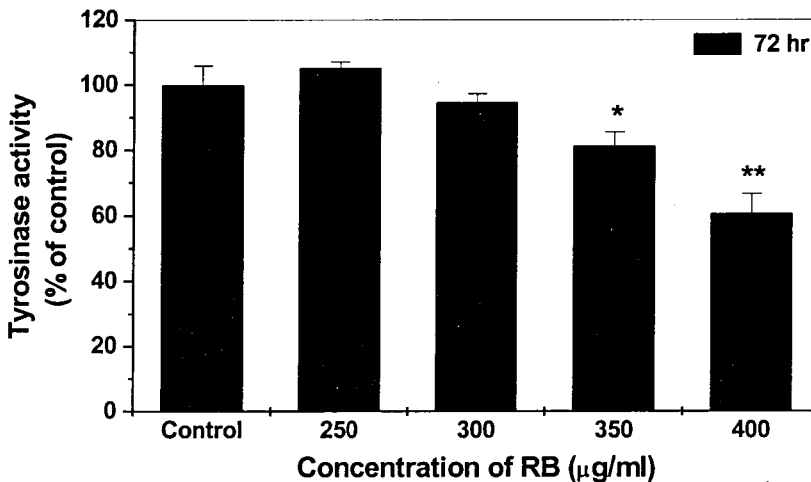


Fig. 2. Effect of *Rhizoma Bletillae* extract on tyrosinase activity in B16 melanoma cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/well. After 24 hr, cells were treated with various concentrations *Rhizoma Bletillae* extract for 72 hr. Then, tyrosinase activity was measured as described in Materials and Methods. Data are means $\pm$ S.D. of three experiments performed in triplicate. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ )

3. 白芨이 B16 흑색종세포의 증식에 미치는 영향

B16 흑색종세포를 배양용기에  $1 \times 10^5$ 개(세포수/well)씩 분주하고 72 시간 배양하면서 24 시간 간격으로 세포수를 측정 한 결과, 배양 48시간 후 대조군은  $6.72 \times 10^5$ 개의 세포로 증식하였으나, 300 $\mu$ g/ml 농도에서는  $2.82 \times 10^5$ , 400 $\mu$ g/ml 농도에서는  $1.9 \times 10^5$ 개의 세포로 대조군에 비하여 세포 증식이 현저히 억제되었다. 또한 배양 72시간 후 대조군은  $13.4 \times 10^5$ 개의 세포로 증식하였으나 300 $\mu$ g/ml 농도에서는  $5.6 \times 10^5$ 개의 세포, 400 $\mu$ g/ml 농도에서는  $3.8 \times 10^5$ 개의 세포로 대조군에 비하여 세포 증식이 현저하게 억제되었다(Fig. 3).

이러한 세포증식 억제 효과가 세포괴사나 세포손상 등 白芨의 독성작용에 의한 것인지를 알아보기 위하여 세포독성 검사의 직접적인 지표가 되는 형태학적인 관찰을 시도하였다. 白芨 400 $\mu$ g/ml을 처리하고 72시간 배양 후 현미경적인 소견은 대조군에 비하여 세포 증식은 감소되었으나, 괴사나 세포손상 등의 독성을 나타내는 소견은 관찰되지 않아 白芨은 B16 흑색종세포의 증식을 억제하였으나 괴사나 세포손상 등은 일으키지 않는 것으로 관찰되었다 (Fig. 4).

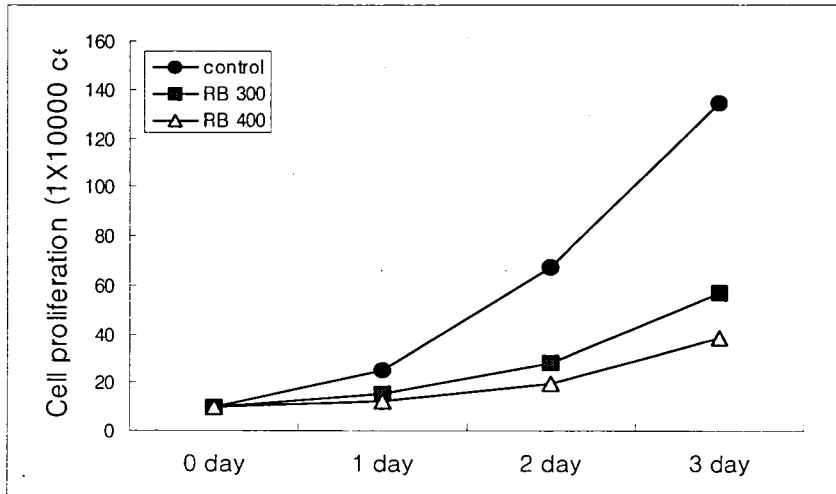


Fig. 3. Cell proliferation of B16 cells after treatment with *Rhizoma Bletillae* extract, compared with control cells. Cells were counted with a Fuchs-Rosenthal cytometer after treatment with *Rhizoma Bletillae* extract, as described in Materials and Methods. Results are expressed as percent of control and data reported are means $\pm$ S.D. of at least three determinations.

사하였다.

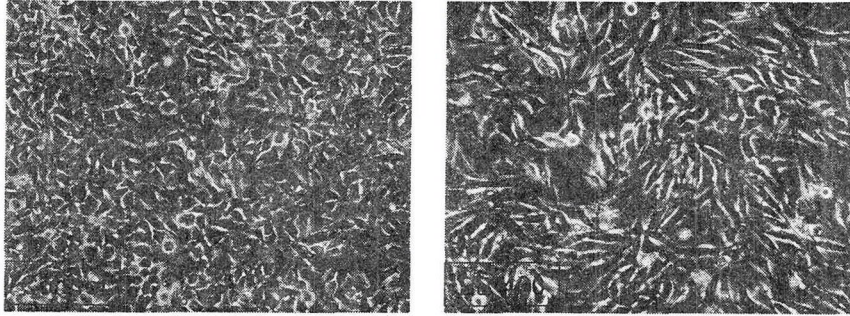


Fig. 4. Phase-contrast microscopic findings of B16 cells treated with Rhizoma Bletillae extract. There were no significant morphologic changes of cells between control group (A) and experimental group (B: 400µg/ml) after 72 hr.

#### 4. 白芨이 세포내 tyrosinase 단백질 발현에 미치는 영향

白芨이 tyrosinase protein 발현양상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 tyrosinase antibody를 이용한 western blotting 방법으로 세포내 tyrosinase protein level을 조

白芨 400µg/ml 처리군의 경우 tyrosinase protein level은 대조군에 비하여 감소하였으며, 이는 tyrosinase 활성 감소와 같은 경향으로 감소하였다(Fig. 5).

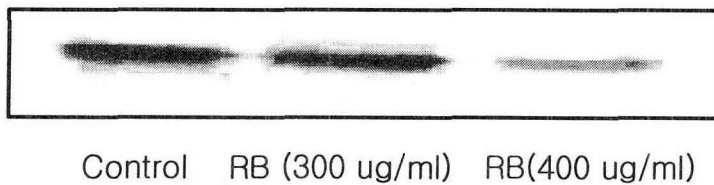


Fig. 5. Rhizoma Bletillae extract inhibits expression of tyrosinase in B16 melanoma cells. B16 cells were treated for 72 hr with 300 µg/ml and 400 µg/ml Rhizoma Bletillae extract. Total protein were electrophoresed in 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membrane. Specific detection of tyrosinase was performed with the antibody tyrosinase.

## 고찰

韓醫學에서 皮膚는 臟腑의 生理作用과 밀접한 관계를 가지고 있으며 각각의 臟腑기능은 그 특징이 서로 같지 않아 皮膚에 대한 작용도 같지 않은데, 心은 血脈을 주관하여 心氣의 盛衰가 얼굴색으로 반영되고, 肺는 宣發作用을 주관하기 때문에 외부적으로 피부와 결합되어 있고, 脾는 運化作用을 하여 음식물의 소화와 영양분의 수송작용으로 肌肉을 潤澤하고 부드럽게 하며, 肝에는 疏泄作用이 있어 血을 저장하고 조절하는 작용을 하여 皮膚의 혈액순환을 원활하게 하며, 腎은 衛氣와 津液의 化生輸布作用에 관여하여 皮膚의 체온을 유지, 조절하게 하고 부드럽게 한다<sup>35)</sup>.

皮膚의 과색소 침착증에 대해 韓醫學 文獻을 살펴보면, 《黃帝內經·素問》〈至眞要大論〉<sup>36)</sup>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<sup>37)</sup>의 《諸病源候論·面皯黑黧候》에서 病理機轉과 形態에 대하여 구체적으로 언급한 이래, 여러 醫家들에 의하여 形態와 色調에 따라 黧<sup>7-9)</sup>, 黧點<sup>10)</sup>, 面黑<sup>11-14)</sup>, 面黧<sup>10-15)</sup>, 雀卵<sup>9-16)</sup>, 斑<sup>9)</sup>, 黧子<sup>9,16)</sup>, 雀斑<sup>17-22)</sup>, 鰐黑斑<sup>17,18)</sup>, 黧<sup>23)</sup>, 鰐黑黧<sup>20)</sup>, 黑斑<sup>21)</sup> 등 다양하게 表現되어 왔다.

과색소 침착질환에 대한 韓醫學의 原因으로 樓 등<sup>12,14)</sup>은 《內經》<sup>36)</sup>의 面塵에 대한 說을 따라 顏面이 陽明經에 속하므로 陽明之氣의 不足을 그 原因으로 보았고, 趙 등<sup>7-10,15,18,23,38)</sup>은 巢<sup>37)</sup>의 說을 따라 風邪와 痰飲으로 氣血이 不和됨을 原因으로 보았다. 또 李 등<sup>8,14,16,20)</sup>은 思慮過多와 飲食失節로 인한 脾胃 損傷을 原因으로 보았고, 陳 등<sup>17,18,21,22)</sup>은 腎水不足으로 인한 虛火의 發生을 주된 原因으로 보았으며, 朱 등<sup>11,19,38)</sup>은 熱을 주된 原因으로 보

았다. 近來 文獻들<sup>39-45)</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 原因으로 자세히 분류하였는데, 이상의 文獻을 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.

治法에 있어 實證에서는 涼血活血, 祛風散火, 散火解毒, 養陰清熱, 清肺涼血, 祛風通絡, 涼血消斑, 疎肝理氣, 活血退斑, 化瘀退斑 등이 活用되었고, 虛證에서는 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<sup>46-50)</sup>.

辨證施治에 의한 內服藥으로는 酒製四物湯加減<sup>11)</sup>, 沖和順氣湯<sup>12,14)</sup>, 升麻順氣湯<sup>8)</sup>, 升麻白芷湯<sup>13)</sup>, 連翹散<sup>9)</sup>, 六味地黃丸<sup>17,18,20,22,23,47,48)</sup>, 人蔘養胃湯<sup>23)</sup>, 犀角升麻丸<sup>20)</sup>, 腎氣丸<sup>21)</sup>, 知柏地黃湯<sup>48)</sup> 등이 사용되었고, 外治法에 사용된 外用藥은 玉容散<sup>9,18,19)</sup>, 紅玉散<sup>9)</sup>, 玉容西施散<sup>9)</sup>, 皇帝塗容金面方<sup>9)</sup>, 玉容膏<sup>9)</sup>, 玉容丸<sup>17,21,22)</sup>, 玉肌散<sup>17)</sup>, 改容丸<sup>19,22)</sup>, 正容散<sup>20)</sup> 등이 사용되었다.

피부의 주요 기능 중 하나는 외부로부터 인체를 보호하는 기능인데, 특히 자외선 노출 시에 멜라닌 세포는 멜라닌을 합성하여 피부의 색소 침착에 중요한 역할을 할 뿐 아니라 생성된 멜라닌이 각질형성세포로 이동하여 과도한 자외선을 흡수하고 차단하는 광 보호작용을 한다고 알려져 있다<sup>51,52)</sup>.

인간의 피부색은 여러 가지 요인에 의하여 결정되는데, 멜라닌, 혈관분포와 혈색소, 각질층의 두께 및 카로틴 등에 의해 좌우되며, 특히 멜라닌이 주된 역할을 하며, 자외선, 세포의 유전적 요인, 대사, 내분비, 염증, 감염, 종양 등과 같은 물리적, 화학적 요인들로 인해 멜라닌 합성에 이상이 발생되면 기미, 주근깨, 흑자 등의 과색소 침착증이 발생한다<sup>4-6)</sup>.

최근에는 대기오염으로 인한 오존층의 파괴



와 이에 따른 자외선의 유해성에 대한 관심이 증가하면서, 이로 인한 피부노화에 따른 피부색의 변화, 칙착이 심해지고 있으며, 또한 미용적인 이유에서 피부 착색에 대한 관심이 높아지고 있다<sup>1-3)</sup>.

과색소 질환에 대한 확실한 치료법은 아직 정립이 되지 않은 상태이나, 현재 임상가에서 널리 이용되는 방법으로는 미백성 약물, 화학박피술, 레이저 등이 있다. 미백성 약물로는 페놀성 유도체(phenolic derivatives)와 비페놀성 유도체(nonphenolic derivatives)가 있다. 페놀성 유도체는 이미 널리 사용되고 있고 FDA의 승인을 얻은 hydroquinone이 있고 비페놀성 유도체로는 tretinoin과 azelaic acid가 있다. 또한 비타민 C도 멜라닌 생성을 억제하여 기미 치료에 효과가 있다고 알려져 있으나 수용액에서 빨리 산화되어 분해되기 때문에 국소 제제로서의 임상적 사용에는 한계가 제시되어 왔다. 하지만 이온영동법을 이용하여 비타민 C의 흡수를 최대화시키는 방법이 시도되고 있다<sup>1,4,5,53,54)</sup>.

한약복합제에 대한 미백 연구로는 麻黃 및 麻黃膏의 미백효과<sup>27)</sup>에 관한 연구와 瀉白散의 미백효과 검증에 관한 연구<sup>28)</sup>, 加減西施玉容散의 미백효과에 관한 연구<sup>29-31)</sup> 등이 있으나, 구성 本草 각각의 미백효과보다는 미약하게 나타났다.

이에 본 연구에서는 西施玉容散의 구성약물 중의 하나이며 外用藥으로 사용되는 미백약물 중의 하나인 白芨으로 멜라닌 형성에 어떠한 영향을 미치는지 연구하였다.

白芨(*Rhizoma Bletillae*)은 난초과(Orchidaceae)에 속한 다년생초본인 대암풀(자란)의 塊莖으로 異名으로 甘根, 白根, 白給, 白芨, 地螺絲, 羊角七 등으로 불리며, 우리나라 고산에 자생하며 중국의 중부이남지방에 자생하거나 재배한다. 따뜻한 기후를 선호하며 배수가 잘되는 비옥한 사양토나 부식토에서 잘 자라며 여름, 가을의 양계절에 채취하여

햇볕에 말려 사용한다. 性味는 苦, 甘, 澁, 涼, 無毒하며 肺, 脾, 腎 三經으로 歸經하고, 收斂 止血하고, 消腫生肌하는 效能이 있어, 咯血, 嘔血, 衄血, 外傷出血 등의 症을 다스리고, 瘡瘍腫痛이나 潰瘍의 未潰, 已潰를 막론하고 다스리며, 手足皸裂 등의 症을 다스린다<sup>32,55)</sup>.

멜라닌은 인체 내에서 표피 이외에 진피, 점막상피, 모낭, 망막, 포도막, 연수막, 내이 및 기타 조직에서도 관찰되며, 멜라닌 세포 주변의 섬유아세포, 각질형성세포, 내피세포 등에서 분비되는 많은 내적 환경 요소의 작용에 의해 멜라닌 세포의 기능에 변화를 주어 생성된다. 특히 각질형성세포에서 분비된 여러 인자가 멜라닌 세포의 성장과 형태 및 분화에 영향을 미치며 궁극적으로 피부의 색소 침착에 영향을 미친다<sup>4,56,57)</sup>.

멜라닌 생성 과정은 복잡적이고 다원적이지만 아직까지 주된 생성과정은 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase 효소에 의하여 DOPA, DOPAquinone으로 전환되고 이는 다시 DOPochrome, DHI나 DHICA를 형성하고 최종적으로 중합반응에 의하여 멜라닌 polymer를 형성하는 것으로 알려져 있다. 이 과정 중 초기의 두 단계의 반응이 tyrosinase의 촉매 작용을 통하여 일어나며, 일단 반응이 개시되면 매우 빠르게 진행된다. 따라서 멜라닌세포에서의 tyrosinase 활성은 피부 멜라닌 생성에 결정적으로 영향을 미치게 되고, 피부 멜라닌 생성 억제제 개발에 있어서 tyrosinase 활성 억제제는 매우 큰 의미를 갖게된다<sup>58-60)</sup>.

본 실험에서 白芨은 최종산물인 멜라닌 양을 억제하였으며, B16 흑색종세포의 tyrosinase 활성을 억제하였다. 따라서 白芨은 피부 미백제로서 개발 가능성이 높은 물질로 사료되어 멜라닌 형성과정에 관여하는 작용 기전을 분석하였다.

일반적으로 많은 천연물들이 in vitro screening test인 mushroom tyrosinase 효소의 활성은 억제하지만, 세포에서는 독성이

심한 것으로 알려져 실제 응용에는 많은 문제점으로 대두되고 있다. 따라서 白芨이 B16 흑색종세포에서 멜라닌 생성과 tyrosinase 효소 활성을 억제하는 것으로 나타났으나 세포에 대한 독성효과가 있는지를 관찰한 결과 B16 흑색종세포의 증식을 억제하였으나 괴사나 세포 손상 등은 일으키지 않았다.

또한 western blotting 방법으로 tyrosinase protein level을 확인한 결과, 白芨 처리군에서 tyrosinase 활성 감소와 같은 경향으로 감소하였음을 알 수 있다. 즉, 白芨은 tyrosinase 활성을 억제함으로써 멜라닌 형성을 억제시키는 것으로 추정된다.

이상의 연구 결과 白芨은 B16 흑색종세포의 tyrosinase 활성과 tyrosinase protein 발현을 억제하여 멜라닌 형성을 억제시켰음을 알 수 있다. 따라서 앞으로 白芨의 멜라닌 합성 억제효과에 대한 더욱 정확한 작용기전과 천연물에 대한 응용방법 등의 개발 등 많은 한약재의 체계적인 연구가 필요하리라 사료된다.

### 결론

피부 과색소 질환의 치료에 활용되어진 약물의 하나인 白芨의 멜라닌 형성 억제 효과를 알아보기 위하여 B16 흑색종세포를 이용하여 실험한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 白芨은 B16 흑색종세포의 tyrosinase 활성도를 억제하였다.
2. 白芨은 B16 흑색종세포의 최종산물인 멜라닌생성을 억제하였다.
3. 白芨은 B16 흑색종세포의 세포증식 농도 의존적으로 억제하였다.

4. 白芨은 tyrosinase 단백질 발현을 억제하였다.

이상의 결과 백급은 멜라닌 생성억제 효과를 가지고 있으며, 이러한 과정은 B16 흑색종세포의 tyrosinase 활성과 tyrosinase protein 발현을 억제하여 멜라닌 형성을 억제시켰음을 알 수 있었고, 이러한 경로뿐 아니라 더욱 정확한 작용기전에 대한 계속적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. 하병조 : 화장품학, 壽文社 pp.92-94, 1999.
2. Maeda K and Fukuda M : In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes, J Soc Cosmet Chem, 42:361-368, 1991.
3. Mishima Y, Kondoh H and Hatae. S : Overview for development of future innovative skin whitening agents, Fragrance J, 24(13), 1996.
4. 대한피부과학회 : 피부과학, 서울, 여문각, pp.8-9, 402-412, 2001.
5. 안성구 외 : 흔히보는 피부질환, 서울, 고려의학, pp.131-135, 1993.
6. 대한병리학회 : 병리학, 서울, 고문사, pp.1124-1125, 1995.
7. 陳昭遇 外 : 太平聖惠方, 北京, 人民衛生出版社, p.1208, 1986.
8. 李槿 : 偏註醫學入門. 서울. 大星文化社. 雜病篇. p.29, 224. 1990.
9. 許俊 : 東醫寶鑑 서울, 南山堂, p.211,212, 1981.

10. 趙佶 : 聖濟總錄, 北京, 人民衛生出版社, p.1763, 1987.
11. 朱震亨 : 丹溪醫集, 北京, 人民衛生出版社, p.24, 1993.
12. 樓英 : 醫學綱目, 서울, 大星文化社, p.1081, 1986.
13. 龔廷賢 : 萬病回春, 서울, 醫聖堂, p.271, 1993.
14. 王肯堂 : 證治準繩, 北京, 人民衛生出版社, 卷1, p.824, 1991.
15. 辛民教 外 : 鄉藥集成方, 서울, 永林社, p.1039, 1989.
16. 周命新 : 醫門寶鑑, 서울, 杏林書院, pp.186-187, 1975.
17. 陳實功 : 外科正宗, 上海, 上海科學技術出版社, p.290, 298, 1989.
18. 祁坤 : 外科大成, 臺北, 文光圖書有限公司, p.218, 1968.
19. 程國彭 : 醫學心悟, 香溝, 友聯出版社, p.290, 1961.
20. 吳謙 : 醫宗金鑑, 北京, 中國醫藥學出版社, pp.1680-1682, 1982.
21. 顧世澄 : 瘍醫大全, 北京, 人民衛生出版社, p.479, 481-482, 1987.
22. 孫震元 譯 : 瘍科會粹, 北京, 人民衛生出版社, pp.364-365, 1987.
23. 張璐 : 張氏醫通, 上海, 上海科學技術出版社, pp.442-443, 1995.
24. 하병조 : 기능성화장품, 서울, 신광출판사, pp.66-84, 138-140, 143-147, 2001.
25. 戴玉 : 中醫美容大全, 北京, 中國中醫藥出版社, pp.1-8, 1999.
26. 劉德軍 : 中藥材綜合開發技術與利用, 北京, 中國中醫藥出版社, pp.34-41, 1998.
27. 이상희 : 마황 및 마황고의 미백효과에 관한 연구, 경희대학교 동서의학대학원, 2001.
28. 金成珪 : 사백산의 미백효과 검정에 관한 연구, 경희대학교 한의과대학, 1991.
29. 손동석 외 : 가감서시옥용산의 미백효과에 관한 연구, 대한안아비인후피부과학회지15(2):104-117, 2002.
30. 박지선 외 : B16 melanoma 세포주에 멜라닌 합성에 대한 西施玉容散의 효과, 대한동의병리학회지, 14(1):160-170, 2000.
31. 전병훈 외 : 멜라닌 합성의 신호전달기전에 미치는 西施玉容散의 효과, 대한동의병리학회지, 15(1):73-83, 2001.
32. 辛民教 : 원색 임상본초학, 서울, 영림사, pp.432-433, 1991.
33. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, Garcia-Borron JC : Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. Eur J Biochem 255(1):139-146, 1998.
34. Hosei J, Abe E, Suda T, Kuroki T : Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 $\alpha$ ,25-dehydroxyvitamin D3 and retinoic acid, Cancer Res 45:1474-1478, 1985.
35. 李林 : 實用中醫皮膚病學, 北京, 中醫古籍出版社, pp.1-7, 1998.
36. 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.
37. 巢元方 : 巢氏諸病原候論, 서울, 大星文化社, p.200, 1992.
38. 沈金鰲 : 沈氏尊生書, 臺北, 自由出版社, p.530, 1979.
39. 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.

40. 周洪範 : 白話中醫秘方全書. 대만. p.494. 1986.
41. 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.
42. 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.
43. 南惠貞 外 : 肝斑에 關한 文獻的 考察, 大韓外官科學會誌, 9(1):16-23, 1996.
44. 朴惠峻 外 : 雀斑의 原因, 症狀 및 治方에 關한 文獻的 考察, 大韓外官科學會誌, 10(1):247-262, 1997.
45. 申延祥 外 : 기미에 關한 文獻的 考察, 大韓外官科學會誌, 11(1):82-98, 1998.
46. 顧伯華 外 : 實用中醫外科學. 上海. 上海科學技術出版社. pp.529-530. 1985.
47. 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.
48. 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.
49. 范瑞強 : 實用皮膚病性病驗方精選, 廣東出版社, p.336, 1994.
50. 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.
51. Friedmann, P. S, and Gilcrest, B. A. Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocyte. *J. Cell Physiol* 133(1):88-94, 1987.
52. Aberdan, E., Romero, C., and Ortonne, J. P. Repeated UVB irradiations do not have the same potential to promote stimulation of melanogenesis in cultured normal human melanocytes. *J. Cell Sci.* 106:1015-1022, 1993.
53. Ando, S., Ando, O., Suemoto, Y. and Mishima, Y. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor. *J. Invest Dermatol.* 100:150-155, 1993.
54. Masuda, M., Tejima, T. and Suzuki, T. Skin lighteners. *Cosmetics & Toiletries*, 111:65-77, 1996.
55. 隆昌洙 : 아세아 본초학, 서울, 계축문화사, pp.300-302, 1998.
56. 박경아 외 : 조직학, 서울 고려의학, pp.405-411, 1999.
57. Bloom W, Fawcett DW. A textbook of histology, 11th ed, W.B. Saunders Company, USA, pp.543-558, 1986.
58. Kuzumaki T, Matsuda A, Wakamatsu K, Ito S, Ishikawa K: Eumelanin biosynthesis is regulated by coordinate expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 genes. *Exp Cell Res* 207(1):33-40, 1993.
59. Rungta D, Corn TD, Fuller BB: Regulation of tyrosinase mRNA in mouse melanoma cells by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Invest Dermatol* 107(5):689-693, 1996.
60. Jimbow K, Gomez PF, Toyofuku K, Chang D, Miura S, Tsujiya H, Park JS: Biological role of tyrosinase related protein and its biosynthesis and transport from TGN to stage I melanosome, late endosome, through gene transfection study. *Pigment Cell Res* 10:206-213, 1997.