

白芨이 B16 흑색종세포의 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향

윤화정* · 윤정원* · 윤소원* · 고우신* · 우원홍**

Inhibitory Effect of *Rhizoma Bletillae* on Melanogenesis of B16 Melanoma Cell

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 α -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/F10 mouse melanoma cells, and on the α -MSH or forskolin-induced melanogenesis.

Rhizoma Bletillae alone markedly suppressed melanin content and tyrosinase activity in a dose-dependent manner. Pretreatment of the cells with *Rhizoma Bletillae* also suppressed the increase of α -MSH (100 nM) or forskolin (20 μ M)-induced melanin content and tyrosinase activity. The decrease in the tyrosinase activity was paralleled by a decrease in the abundance of tyrosinase protein and tyrosinase promoter activity. Pretreatment of the cells with *Rhizoma Bletillae* also inhibited the increase of forskolin(20 μ M) induced the amount of tyrosinase protein and tyrosinase promoter activity. The results of DOPA staining revealed that pretreatment of the cells with *Rhizoma Bletillae* showed less intensity than B16 melanoma cells stimulated with α -MSH or forskolin.

These results suggest that *Rhizoma Bletillae* inhibits melanogenesis and abrogates α -MSH and cAMP-induced melanogenesis in B16 melanoma cells.

* 동의대학교 한의과대학 안이비인후과학교실 ** 원광대학교 한의과대학 병리학교실
· 교신저자 : 윤화정, 동의대학교 한의과대학 안이비인후과학교실
(Tel : 051-850-8933, E-mail : yhj1226@dmc.or.kr)

서론

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 중요하다¹⁾.

피부색의 이상을 초래하는 과색소 침착성 질환은 기미, 주근깨, 흑자, 담갈색 색소침착, 염증후 과색소침착 등으로 구분할 수 있다.^{2,3)} 韓醫學에서는 여러 醫家들에 의하여 形態와 色調에 따라 黧黯⁴⁻⁶⁾, 黧點⁷⁾, 面黑⁸⁻¹¹⁾, 面黧黯⁷⁻¹²⁾, 雀卵⁶⁻¹³⁾, 斑黧黯⁶⁾, 鬚子^{6,13)}, 雀斑¹⁴⁻¹⁸⁾, 黧黑斑^{14,15)}, 黧黯²⁰⁾, 黧黑黧黯¹⁷⁾, 黑斑¹⁸⁾ 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 것이다¹⁻³⁾.

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.^{2,21)}

특히 미백소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 한의학적 문헌에서도 피부미용에 관한 本草, 處方, 鍼灸등의 내용이 많이 서술되어 있으며 특히 외용제제에 대해 기재되어 있고^{22,21)}, 이러한 외용제제에 대한 미백 연구는 활발히 이루어지고 있다.^{24,25)}

白芨(*Rhizoma Bletillae*)은 과색소 침착성

질환에 효과가 있는 것으로 연구된 西施玉容散²⁶⁻²⁸⁾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 다스린다²⁹⁾.

백급은 멜라닌 생성억제 효과를 가지고 있으며, 이러한 과정은 B16 흑색종세포의 tyrosinase 활성과 tyrosinase protein 발현을 억제하여 멜라닌 형성을 억제시켰음을 알 수 있었다³⁰⁾.

이에 본 연구에서는 白芨의 멜라닌 형성 억제 과정의 구체적 기전을 알아보기 위하여 B16 흑색종세포를 이용하여 α -MSH와 cyclic AMP의 증가에 의하여 유도된 과색소 현상에 있어서 활성도를 조사하고 DOPA 염색을 시행하여 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 1 l에 24시간 sonication 시킨 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 μ 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, α -melanocyte stimulating hormone (α -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 CO₂ 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(6 cm dish)에 well당 1x10⁵씩 분주한 후 24 시간 배양하여 배양용기에 세포를 부착하였다. 白芨을 실험농도별로 알맞게 조정하여 다음 사용하였다, 白芨을 농도별로 시약 처리하여 1 시간 배양한 후에 100 nM α -MSH 과 20 µM forskolin을 각각 처리하였다.

과 20 µM forskolin을 각각 처리하였다.

3) 세포 증식 측정

세포를 배양판(6 cm dish)에 well당 1x10⁵씩 분주한 후 24 시간 배양하여 배양용기에 세포를 부착하였다. 白芨을 각 농도별로 처리하고 72 시간 배양하였으며, 배양 완료 후 각 well에 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액을 가하여 세포를 분리수거한 후, PBS로 2회 세척 한 다음 Fuchs-Rosenthal cytometer(Germany)를 이용하여 각 well 당 세포수를 산정하여 증식 상태를 측정하였다.

4) 세포내 tyrosinase 활성도 측정

Tyrosinase 활성도는 Martinez-Esparza M 등³¹⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 멜라닌세포를 수확하여 세포 침출물을 만들고, 100 µl 세포용해액(lysis buffer; 1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM PMSF)을 넣고 4°C 얼음에서 30 분간 때때로 흔들어주면서 세포를 파괴시킨 후 원심분리하여 상층액을 취하여 tyrosinase 활성측정용액으로 사용하였다. 50 µl의 상층액에 100 mM sodium phosphate(pH 6.8) 100 µl를 넣고 30°C 물중탕기에서 5 분간 보온한 후 100 mM catechol 50 µl를 넣고 온도조절장치가 있는 분광광도계로 37°C, 405 nm에서 흡광도의 변화를 1시간 관찰하였다.

5) 세포내 멜라닌 정량(Melanin content) 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등³²⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 후 원심분리하여 수확한 다음, 세포침출물에 1 ml의 증류수를 넣어 현탁하고, 초음파로 분쇄한 다음, 원심분

리하여 침전물을 수확하였다. Acid-insoluble material을 얻기 위해 10%의 dimethyl sulfoxide(DMSO)가 첨가된 1N NaOH 300 μ l를 넣어 80°C에서 1 시간 처리하여 용해시켰다. 얻어진 재료는 475 nM에서 흡광도를 측정하였으며, 멜라닌 정량은 합성멜라닌(Sigma chemical Co.)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

6) Western blotting assay

B16 흑색종세포(5×10^6)를 PBS로 세척하고, 4°C에서 30 분 동안 lysis buffer(phosphate buffer, pH 6.8, 100 IU Aprotinin, 1% AEBSF)에 용해한 다음 20,000 \times g로 30 분 동안 원심분리 시킨 후, 얻어진 상층액은 Amicon system을 이용하여 단백질을 농축시켰다. 농축된 단백질은 Bradford assay로 정량하고, 정량하여 얻어진 단백질을(50-100 μ g)을 7.5%나 10%의 SDS-PAGE상에서 전기영동하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 Nitrocellulose membrane에 옮긴 후 실온에서 2 시간 blocking buffer(5% skim milk in TBST)에서 incubation시켰다. Tyrosinase antibody(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 1:500으로 희석하여 1 시간 반응시킨 후 TBST에 3회 세척하고 1:1,000으로 희석시킨 secondary peroxidase-conjugated anti-mouse antibody(Sigma)에 반응된 단백질을 Amersham ECL system으로 확인하였다.

7) DOPA 염색

DOPA 염색은 chamber slide(Nunc Inc., Naperville, IL., USA)의 well에 1×10^4 개의 세포를 분주하여 실험한 후 배양액을 제거하고 PBS로 씻은 다음 5% formylsalin 용액으로 30

분간 고정하였다. PBS로 2회 세척하고 0.1% L-dihydroxyphenylalanine(Sigma Chemical Co.)을 함유하는 0.1M PBS(pH 7.2) 용액으로 4 시간 실온에서 반응시켰다. 10% formylsalin 용액으로 재고정하고 50%, 70%, 95% 및 100% 에탄올로 탈수시킨 다음 glycerol로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

실험결과

1. α -MSH에 의한 과색소생성시 白芨의 멜라닌 생성 억제효과

자외선과 같은 여러 가지 자극은 피부에서 α -MSH의 생성을 촉진하며, 이는 멜라닌 생성을 증가시키는 것으로 잘 알려져 있다. 따라서 본 실험에서 白芨이 α -MSH receptor를 경유한 멜라닌 생성에 영향을 미치는지 조사하고자 α -MSH 증가에 의한 과색소형성을 유도한 후 白芨의 효과를 관찰하였다.

白芨을 농도별로 처리하고 30 분 후 α -MSH를 처리하여 72 시간 배양한 후 멜라닌 양을 측정된 결과, α -MSH만을 처리한 군은 대조군에 비하여 $185 \pm 15.3\%$ 로 약 2 배 정도의 멜라닌 양이 증가하였다. 白芨 300 μ g/ml 전처리군은 $156 \pm 16.2\%$, 350 μ g/ml 전처리군은 $87 \pm 11.3\%$, 400 μ g/ml 전처리군은 $50 \pm 12.3\%$ 로 α -MSH 단독처리군의 185%에 비하여 현저히 감소하였음을 알 수 있었다 (Fig. 1).

또한 白芨을 전처리하고 72 시간 배양 후 B16 흑색종세포의 tyrosinase 활성도를 측정된 결과, α -MSH 처리군은 대조군에 비하여 2 배 ($212 \pm 21.2\%$) 이상의 tyrosinase 활성도가 증가하였으며, 白芨 250 μ g/ml 전처리군은

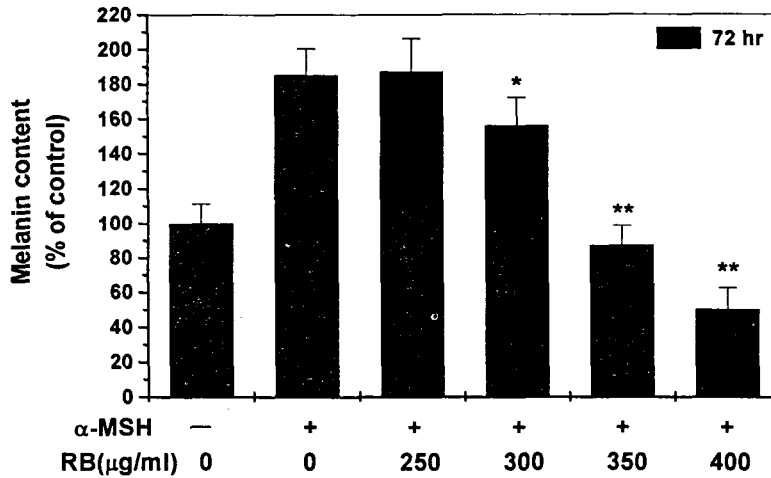


Fig. 1. Effect of *Rhizoma Bletillae* extract on melanin content in B16 cells stimulated with α -MSH. B16 cells were pretreated with various concentrations *Rhizoma Bletillae* extract for 30 min, and cells were treated with 10 μ M α -MSH for 72 hr.

Melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.D. of three experiments performed in triplicate. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

134.7 \pm 9.1%, 300 μ g/ml 전처리군은
 115.3 \pm 11.8%, 350 μ g/ml 전처리군은
 72.7 \pm 11.4%, 400 μ g/ml 전처리군에서는
 58.6 \pm 13.9%로 억제되어, α -MSH에 의해 촉진
 되어진 tyrosinase 활성을 白芨이 농도 의존적
 으로 억제하였음을 알 수 있었다 (Fig. 2).

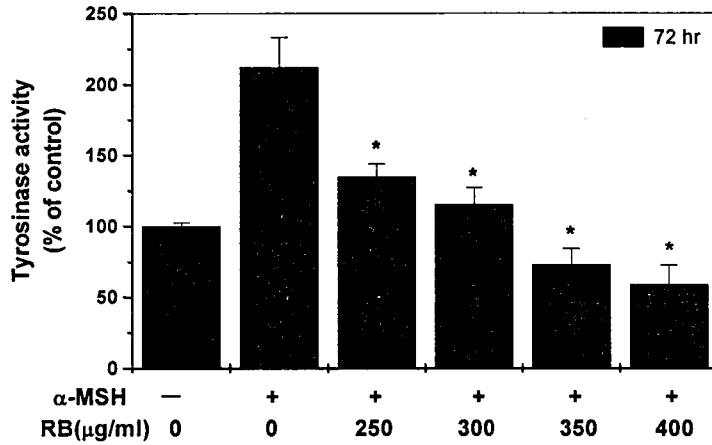


Fig. 2. Effect of *Rhizoma Bletillae* extract on tyrosinase activity in B16 cells stimulated with α -MSH. B16 cells were pretreated with various concentrations *Rhizoma Bletillae* extract for 30 min, and cells were treated with 100 nM α -MSH for 72 hr.

Melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.D. of three experiments performed in triplicate. (* $p < 0.01$)

2. cAMP에 의한 과색소생성시 白芨의 멜라닌 생성 억제효과

α -MSH는 멜라닌세포의 표면에 존재하는 특이적인 수용체와 결합하고, α -MSH와 그 수용체의 복합체가 세포내의 cAMP를 증가시킴으로써 멜라닌 생합성이 증가되는 것으로 알려져 있다. 따라서 白芨이 cAMP pathway를 경유한 멜라닌 생성에 영향을 미치는지 조사하고자, cAMP-inducing agent인 forskolin을 처리하여 adenylate cyclase를 활성화시킴으로써 세포내 cAMP농도를 높여 cAMP 증가에 의한 과색소형성시 白芨의 효과를 관찰하였다.

白芨을 농도별로 처리하고 30 분 후 cAMP-inducing agent인 forskolin을 처리하여 72 간 배양한 후 멜라닌 양을 측정한 결과, forskolin을 단독으로 처리한 군의 멜라닌 양은 대조군에 비하여 $322.5 \pm 17.9\%$ 로 멜라닌 양이 3 배 이상 증가하였다. 白芨 300 $\mu\text{g/ml}$ 전처리군은 $262.5 \pm 17.4\%$, 350 $\mu\text{g/ml}$ 전처리군은 $123.5 \pm 17.8\%$, 400 $\mu\text{g/ml}$ 전처리군에서는 $54.5 \pm 14\%$ 로 forskolin을 단독으로 처리한 군의 332.5% 에 비하여 현저히 감소하였다 (Fig. 3).

또한 白芨을 전처리하고 72 시간 배양 후 B16 흑색종세포의 tyrosinase 활성도를 측정한다

결과, forskolin을 단독으로 처리한 군의 tyrosinase 활성도는 멜라닌 양의 변화와 마찬가지로 대조군에 비하여 3배(302.3±7.6%) 이상 tyrosinase 활성도가 증가하였다. 白芨 전처리 군의 tyrosinase 활성도는 300 µg/ml에서 277.6±8.6%, 350 µg/ml에서는 177.5±7.4%, 400 µg/ml에서는 95.98±7.5%로 현저히 억제되어, 白芨이 forskolin 의해 촉진되어진 tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 억제하였음을 알 수 있었다 (Fig. 4).

3. 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 조사하였다.

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

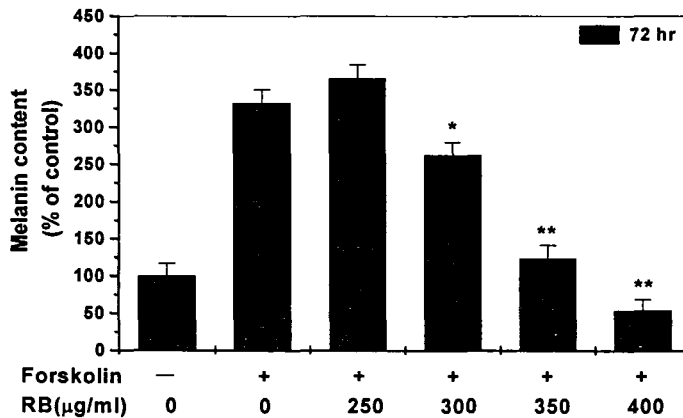


Fig. 3. Effect of *Rhizoma Bletillae* extract on melanin content in B16 cells stimulated with forskolin. B16 cells were pretreated with various concentrations *Rhizoma Bletillae* extract for 30 min, and cells were treated with 20 µM forskolin for 72 hr.

Melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means±S.D. of three experiments performed in triplicate. (* p<0.05, ** p<0.01)

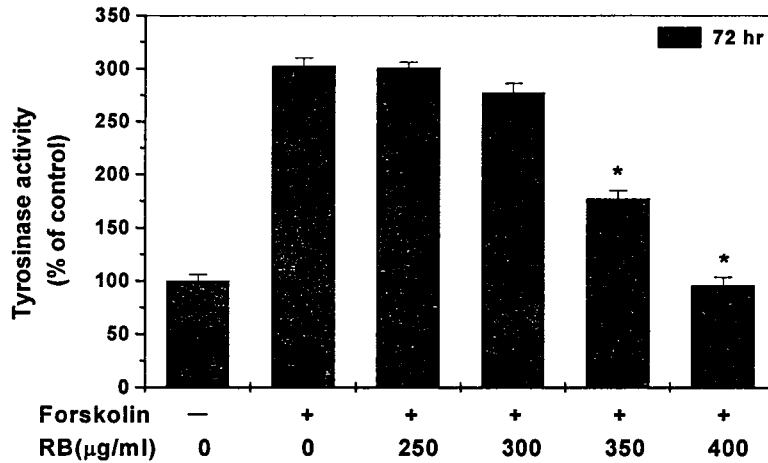


Fig. 4. Effect of *Rhizoma Bletillae* extract on tyrosinase activity in B16 cells stimulated with forskolin. B16 cells were pretreated with various concentrations *Rhizoma Bletillae* extract for 30 min, and cells were treated with 20 μM forskolin for 72 hr.

Melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means±S.D. of three experiments performed in triplicate. (* p<0.01)

색소생성 유도시 α-MSH 처리군은 대조군보다 에 의해 증가된 tyrosinase protein level을 농 tyrosinase protein level이 증가하였으며, 白芨 도 의존적으로 감소시켰다 (Fig. 6). 300, 400 μg/ml을 전처리한 군에서는 α-MSH

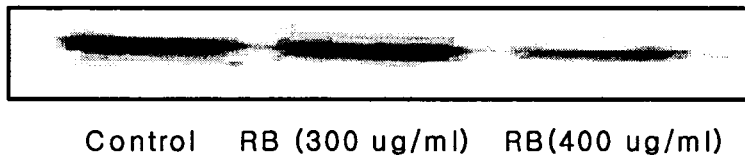


Fig. 5. *Rhizoma Bletillae* extract inhibits expression of tyrosinase in B16 melanoma cells. B16 cells were treated for 72 hr with 300 μg/ml and 400 μg/ml *Rhizoma Bletillae* extract. Total protein were electrophoresed in 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membrane. Specific detection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

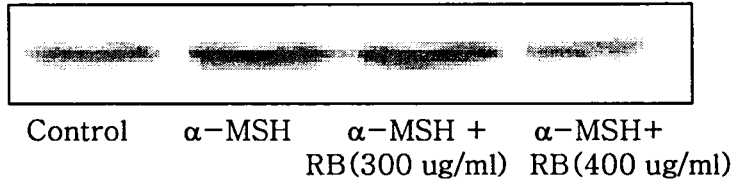


Fig. 6. *Rhizoma Bletillae* extract inhibits expression of tyrosinase in B16 melanoma cells stimulated with 100 nM α -MSH. B16 cells were pretreated with 300 μ g/ml and 400 μ g/ml *Rhizoma Bletillae* extract for 30 min, and cells were treated with 100 nM α -MSH for 72 hr. Total protein were electrophoresed in 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membrane. Specific detection of tyrosinase was performed with the antibody tyrosinase.

4. DOPA 염색을 통한 형태학적 관찰

멜라닌세포는 일반적인 염색방법으로 염색되지 않으나 DOPA를 처리하면 멜라닌세포의 tyrosinase 효소에 의하여 산화되어 암갈색 침착물을 형성하므로 DOPA 염색을 통하여 관찰할 수 있다. 따라서 DOPA 염색을 이용하여 멜라닌세포 내에 생성된 멜라닌 양을 형태적으로 관찰하였다.

B16 흑색종세포는 DOPA 염색시 양성 소견

을 보였고, 白芨 400 μ g/ml 처리군은 대조군에 비해 DOPA 염색의 강도가 약하게 나타나 멜라닌 생성이 감소되었음을 알 수 있었다. 또한 α -MSH 처리군과 forskolin 처리군은 DOPA 염색 정도가 대조군보다 강하게 나타났으며, 白芨 400 μ g/ml 전처리군에서는 DOPA 염색 양성의 강도가 현저히 약하게 나타나, α -MSH과 forskolin에 의해 증가된 멜라닌생성을 白芨이 감소시켰음을 알 수 있었다 (Fig. 7).

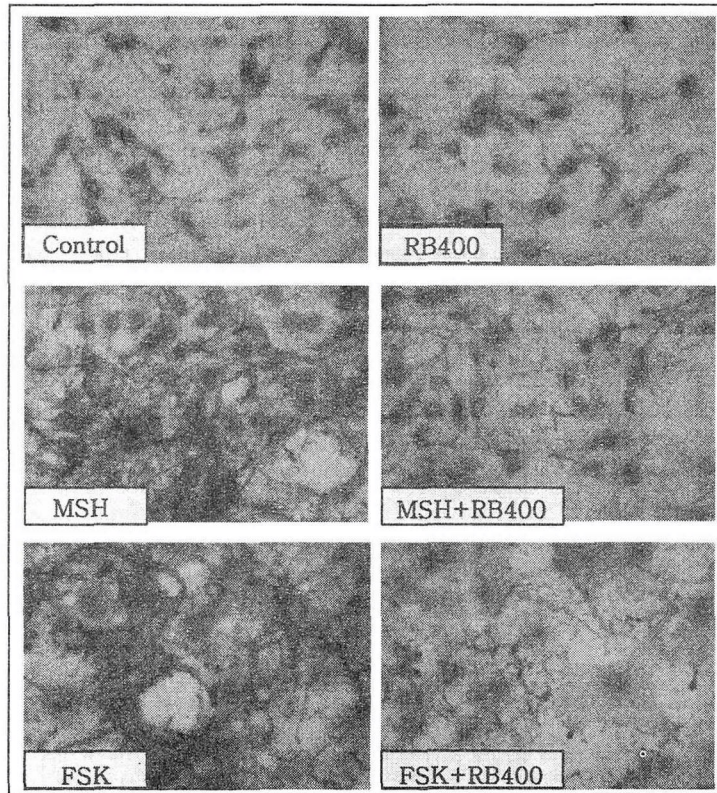


Fig. 7. Morphological findings of B16 cells treated with *Rhizoma Bletillae* extract by DOPA staining. All cells showed DOPA-positive ($\times 200$). Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hr, cells were treated with 400 $\mu\text{g/ml}$ *Rhizoma Bletillae* extract, α -MSH (100 nM) or forskolin (20 μM) for 72 hr.

고찰

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^{33,34)}.

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 발생한다¹⁻³⁾.

皮膚의 과색소 침착증에 대해 韓醫學 文獻

을 살펴보면, 《黃帝內經·素問》〈至眞要大論〉³⁵⁾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³⁶⁾의 《諸病源候論·面皯黑黯候》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 黧黯⁴⁻⁶⁾, 黧點⁷⁾, 面黑⁸⁻¹¹⁾, 面黧黯⁷⁻¹²⁾, 雀卵⁶⁻¹³⁾, 斑黧黯⁶⁾, 鰐子^{6,13)}, 雀斑¹⁴⁻¹⁸⁾, 鰐黑斑^{14,15)}, 黧黯²⁰⁾, 鰐黑黧黯¹⁷⁾, 黑斑¹⁸⁾ 등 다양하게 表現되어 왔다.

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^{1,2,37-39)}.

현재 응용되고 있는 미백제제의 기전은 다양하다. 자외선 차단, 멜라닌 세포로의 신호전달물질차단, 활성산소의 제거, tyrosinase 억제, 멜라닌색소의 환원 및 각질층의 턴-오버 촉진 등의 기전이 활용되고 있다. 자외선 차단 즉 UVA, UVB를 흡수하거나 차단하는 물질로서는 이산화티탄, γ -oryzanol, oxybenzone 등이 있으며 멜라닌 세포에 멜라닌의 합성을 명령하

는 신호전달물질인 cytokine의 작용을 조절하는 물질을 이용하기도 한다⁴⁰⁾. Tyrosine의 산화반응을 억제함으로써 멜라닌 생성을 억제하는 것으로는 비타민 C, Glutathione 등이 있다. Tyrosine의 산화를 촉매하는 tyrosinase의 활성을 저해하는 물질로는 kojic acid⁴¹⁻⁴³⁾, albutin, 감초추출물⁴⁴⁾, 닥나무추출물, Transforming growth factor-beta I (TGF- β I)⁴⁵⁾ 등이 이에 속한다. 또 하나는 피부박리를 촉진하여 멜라닌 색소제거를 촉진시키는 것인데, 살리실산, 제조르신, retinoic acid, 알파-히드록시산^{46,47)} 등이 있다.

한약복합제제에 대한 미백 연구로는 麻黃 및 麻黃膏의 미백효과²⁴⁾에 관한 연구와 瀉白散의 미백효과 검정에 관한 연구²⁵⁾, 加減西施玉容散의 미백효과에 관한 연구²⁶⁻²⁸⁾ 등이 있으나, 구성 本草 각각의 미백효과보다는 미약하게 나타났다.

단일 본초 중의 하나인 白芨 또한 멜라닌 형성 억제 효과가 나타났으며³⁰⁾, 이에 본 연구에서는 白芨이 멜라닌 형성과정에 어떻게 관여하여 효과를 나타낼 수 있는지에 대한 구체적인 기전을 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, 白及, 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 재취하여 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^{29,48)}.

멜라닌 생성 과정은 복합적이고 다원적이지만 아직까지 주된 생성과정은 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase 효소에 의하여 DOPA, DOPAquinone으로 전환되고 이는 다시 DOPAchrome, DHI나 DHICA를 형성하고 최종적으로 중합반응에 의하여 멜라닌 polymer를 형성하는 것으로 알려져 있다. 이 과정 중 초기의 두 단계의 반응이 tyrosinase의 촉매작용을 통하여 일어나며, 일단 반응이 개시되면 매우 빠르게 진행된다. 따라서 멜라닌세포에서의 tyrosinase 활성화는 피부 멜라닌 생성에 결정적으로 영향을 미치게 되고, 피부 멜라닌 생성 억제제 개발에 있어서 tyrosinase 활성 억제제는 매우 큰 의미를 갖게된다⁴⁹⁻⁵¹⁾.

멜라닌세포의 멜라닌 생성을 촉진시키는 여러 가지 원인으로는 melanocyte-stimulating hormone(MSH), forskolin, cholera toxin, vitamin D 대사과정, isobutylmethylxanthine, diacylglycerol analogs, 자외선(ultraviolet) 등이 있으며, 인체의 경우 자외선이 멜라닌 생성을 촉진시키는 가장 주요한 요인으로 알려져 있다. 자외선과 같은 여러 가지 자극은 피부에서 α -MSH의 생성을 촉진하여 멜라닌 생성을 증가시키는 것으로 잘 알려져 있다⁵²⁻⁵⁵⁾.

따라서 본 실험에서 白芨이 α -MSH receptor를 경유한 멜라닌 생성에 영향을 미치는지 조사하고자 α -MSH 증가에 의한 과색소형성을 유도한 후 白芨의 효과를 관찰하였다. α -MSH로 과색소 침착을 유발시킨 경우 tyrosinase 활성화와 멜라닌생성이 증가하여 Hunt 등⁵⁶⁾의 배양 인체 멜라닌세포에서의 결

과와 일치하였으며, 또한 Hill 등⁵⁷⁾의 B16 흑색종세포에서 α -MSH에 의해 멜라닌 합성이 증가된 결과와 일치하였다. 또한 白芨은 α -MSH에 의해서 유도된 멜라닌 합성 증가 현상에 대하여 白芨을 전처리하였을 경우 tyrosinase 활성화와 멜라닌생성을 억제시켰음을 알 수 있었다.

α -MSH는 G-protein linked signal transduction pathway의 활성화에 의해 cAMP level을 증가시켜 멜라닌 합성을 유도하는데, cAMP-elevating agent로 알려진 Forskolin, cholera toxin, isobutylmethylxanthine(IBMx)와 같은 물질에 의해서도 유사한 효과를 나타내게 되며, 이는 cAMP pathway가 멜라닌 합성 조절에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다^{53,58,59)}.

따라서 본 실험에서 白芨이 멜라닌합성과정에서 cAMP pathway에 의한 합성과정에 관여하는지 조사하기 위하여 白芨을 전처리한 후 forskolin을 처리하여 白芨의 효과를 관찰하였다. forskolin 처리군에서는 tyrosinase 활성화와 멜라닌생성량이 증가하여 Park⁵⁹⁾의 결과와 일치하였으며, 白芨 전처리군에서는 tyrosinase 활성화와 멜라닌생성 양이 현저히 감소되었다. 또한 western blotting 방법으로 tyrosinase protein level을 확인한 결과, 白芨 처리군에서 tyrosinase 활성화 감소와 같은 경향으로 감소하였으며, α -MSH에 의한 과색소생성 유도시 증가된 tyrosinase protein level 역시 白芨 전처리군에서 감소하였음을 알 수 있었다.

아울러 白芨의 효과를 세포의 형태학적인 관찰을 통하여 확인하기 위하여 DOPA 염색을 시행한 결과, 白芨은 대조군에 비해 DOPA 염색 양성의 강도가 약하였으며, α -MSH와

forskolin 처리군은 DOPA 염색 양성의 강도가 대조군보다 강하였다. 아울러 白芨 전처리군에서는 DOPA 염색 양성의 강도가 현저히 약하게 관찰되어, 白芨은 tyrosinase 활성을 억제함으로써 멜라닌 형성을 억제시키는 것으로 추정된다.

이상의 연구 결과 白芨의 멜라닌 억제효과는 α -MSH와 cAMP signal pathway에 의한 멜라닌 합성 경로를 억제하는 것으로 생각된다. 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 효과의 기전을 알아보기 위하여 B16 흑색종세포를 이용하여 실험한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 白芨은 α -MSH에 의한 과색소생성 유도시 tyrosinase 활성과 멜라닌생성을 억제하였다.
2. 白芨은 forskolin에 의한 과색소생성 유도시 tyrosinase 활성도와 멜라닌생성을 억제하였다.
3. 白芨은 tyrosinase 단백질 발현을 억제하였으며, α -MSH와 forskolin 으로 유도된 과색소 생성시에도 tyrosinase 단백질 발현을 억제하였다.

4. 白芨은 DOPA 염색에 의한 형태학적 관찰에 있어서 α -MSH와 forskolin 처리에 의한 DOPA 염색의 강도를 현저히 감소시켰다.

참고문헌

1. 대한피부과학회 : 피부과학, 서울, 여문각, pp.8-9, 402-412, 2001.
2. 안성구 외 : 흔히보는 피부질환, 서울, 고려의학, pp.131-135, 1993.
3. 대한병리학회 : 병리학, 서울, 고문사, pp.1124-1125, 1995.
4. 陳昭遇 外 : 太平聖惠方, 北京, 人民衛生出版社, p.1208, 1986.
5. 李挺 : 偏註醫學入門. 서울. 大星文化社. 雜病篇. p.29, 224. 1990.
6. 許俊 : 東醫寶鑑 서울, 南山堂, p.211,212, 1981.
7. 趙佶 : 聖濟總錄, 北京, 人民衛生出版社, p.1763, 1987.
8. 朱震亨 : 丹溪醫集, 北京, 人民衛生出版社, p.24, 1993.
9. 樓英 : 醫學綱目, 서울, 大星文化社, p.1081, 1986.
10. 龔廷賢 : 萬病回春, 서울, 醫聖堂, p.271, 1993.
11. 王肯堂 : 證治準繩, 北京, 人民衛生出版社, 卷1, p.824, 1991.
12. 辛民教 外 : 鄉藥集成方, 서울, 永林社, p.1039, 1989.
13. 周命新 : 醫門寶鑑, 서울, 杏林書院, pp.186-187, 1975.
14. 陳實功 : 外科正宗, 上海, 上海科學技術出版社, p.290, 298, 1989.

15. 祁坤 : 外科大成, 臺北, 文光圖書有限公司, p.218, 1968.
16. 程國彭 : 醫學心悟, 香溝, 友聯出版社, p.290, 1961.
17. 吳謙 : 醫宗金鑿, 北京, 中國醫藥學出版社, pp.1680-1682, 1982.
18. 顧世澄 : 瘍醫大全, 北京, 人民衛生出版社, p.479, 481-482, 1987.
19. 孫震元 譯 : 瘍科會粹, 北京, 人民衛生出版社, pp.364-365, 1987.
20. 張璐 : 張氏醫通, 上海, 上海科學技術出版社, pp.442-443, 1995.
21. 하병조 : 기능성화장품, 서울, 신광출판사, pp.66-84, 138-140, 143-147, 2001.
22. 戴玉 : 中醫美容大全, 北京, 중국중의약출판사, pp.1-8, 1999.
23. 劉德軍 : 中藥材綜合開發技術與利用, 北京, 중국중의약출판사, pp.34-41, 1998.
24. 이상희 : 마황 및 마황고의 미백효과에 관한 연구, 경희대학교 동서의학대학원, 2001.
25. 金成珏 : 사백산의 미백효과 검정에 관한 연구, 경희대학교 한의과대학, 1991.
26. 손동석 외 : 가감서시옥용산의 미백효과에 관한 연구, 대한안ibi인후피부과학회지15(2):104-117, 2002.
27. 박지선 외 : B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 대한 西施玉容散의 효과, 대한동의병리학회지, 14(1):160-170, 2000.
28. 전병훈 외 : 멜라닌 합성의 신호전달기전에 미치는 西施玉容散의 효과, 대한동의병리학회지, 15(1):73-83, 2001.
29. 辛民教 : 원색 임상본초학, 서울, 영림사, pp.432-433, 1991.
30. 윤화정 외 : 白芨이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향. 대한안ibi인후피부과학회지, 16(1):100-111, 2003.
31. 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.
32. Hosei J, Abe E, Suda T, Kuroki T : Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α ,25-dehydroxyvitamin D3 and retinoic acid, Cancer Res 45:1474-1478, 1985.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 巢元方 : 巢氏諸病原候論, 서울, 大星文化社, p.200, 1992.
37. 하병조 : 화장품학, 壽文社 pp.92-94, 1999.
38. 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.
39. Masuda, M., Tejima, T. and Suzuki, T. Skin lighteners. *Cosmetics & Toiletries*, 111:65-77, 1996.
40. Jens-Michael Schroder : Cytokine networks in the skin, *J. Invest Dermatol.* 105:20-24, 1995.
41. Cabanes J, Chazarra S, Garcia -Carmona F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J Pharm Pharmacol*, 46(12): 982-985, 1994.
42. Moon KY, Ahn KS, Lee J, Kim YS, Kojic acid, a potential inhibitor of NK-kappaB activation in transfectant human HaCaT and SCC-13 cells, *Arch Pharm Res*, 24(4):107-111, 2001
43. Lim JK. Treatment of melasma using Kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid, *Dermatol Surg*, 25(4): 282-284, 1999.
44. Yokata T, Nishio H, Kubota Y, Mizoguchi M. The inhibitory effect of glabrdin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation, *Pigment Cell Research*, 11(6):355-361, 1998.
45. Martinez-Esparza M, Ferrer C, Castells M, Garcia-Borron JC, Zuasti A. Transforming growth factor beta 1 mediates hypopigmentation of B16 mouse melanoma cells by inhibition of melanin formation and melanosome maturation, *Int J Biochem Cell Biol*, 33(10):971-993, 2001.
46. Joachim RG. Increased expression of protein kinase C-alpha plays role in retinoic acid-induced melanoma differentiation, *J Biol Chem*, 267:13356-13360, 1992.
47. Yoshimura K, Tsukamoto K, Okazaki M, Virador VM, Lei TC, Suzuki Y, Uchida G, Kitano Y, Harri K. Effect of all-trans retinoic acid on melanogenesis in pigmented skin equivalents and monolayer culture of melanocytes, *J Dermatol Sci*, 27(1):68-75, 2001.
48. 隆昌洙 : 아세아 본초학, 서울, 계축문화사, pp.300-302, 1998.
49. 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
50. 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
51. 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
52. Friedman PS, Gilchrest BA: Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocytes. *J. Cell Physiol* 133(1): 88-94, 1987
53. Luger TA, Scholzen T, Grabbe S: The role of α -melanocyte-stimulating hormone in cutaneous biology. *Jid. Symposium Proceedings* 2(1):87-93, 1977
54. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Beermann F, Aparicio P, Lozano JA, Garcia-Borron JC: Transforming growth factor- β 1 inhibits basal melanogenesis in B16/F10 mouse melanoma cells by increasing the rate of degradation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1. *J Biol Chem* 272(7):3967-3972, 1997
55. Thody AJ and Graham A: Dose α -MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Res* 11:265-274, 1998 35.
56. Hunt G, Todd C, Cresswell JE, Thody AJ: Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4Dphe7 α -MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J Cell Sci* 107:205-211, 1994
57. Hill SE, Buffey J, Thody AJ, Oliver I, Bleehen SS, MacNeil S: Investigation of the regulation of pigmentation in alpha-melanocyte stimulating hormone responsive and unresponsive cultured B16 melanoma cells. *Pigment Cell Res* 2(3):161-166, 1989
58. Bertolotto C, Busca R, Abbe P, Bille K, Aberdam E, Ortonne JP, Ballotti R: Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: Pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Molecular and Cellular Biology* 18(2):694-702, 1998
59. Park HY, Russakovsky V, Ao Y, Fernandez E, Gilchrest BA: Alpha-melanocyte stimulating hormone-induced pigmentation is blocked by depletion of protein kinase C. *Exp Cell Res* 227(1):70-79, 1996