

沙蔘 메탄올 추출물의 멜라닌생성 억제효과

임난영 · 권강주 · 김윤석 · 백순기¹ · 임주락² · 문연자* · 우원홍

원광대학교 한의학전문대학원, 1: 동신대학교 환경공학과, 2: 전라북도농업기술원, 진안속근약초시험장

Inhibitory Effect of Methanolic Extract from *Adenophorae Radix* on Melanogenesis

Nan Young Lim, Gang Joo Kwon, Youn Seok Kim, Soon Ki Baik¹, Ju Rak Lim²
Yeun Ja Mun*, Won Hong Woo

Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, 1: Department of Environmental Eng. Dongshin University
2: Jinan Medical Herbs Experimental Station, Jeonbuk Provincial ARES

Effects of methanolic extract from *Adenophorae Radix* (AR) on melanogenesis were investigated in mouse melanoma B16F10 cells. The methanol extract of AR was partitioned into Hexane, Ethyl acetate (EA), Butanol, H₂O, and exogenously added to the culture medium for 72 hours at the concentration of 10, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$. Of the four partitions, Hexane and EA partition of AR reduced tyrosinase activity, which is the key enzyme for a melanogenesis, as well as melanin contents. But the EA partition was less toxic for B16F10 cells and has more efficient melanin-reducing effect than the former. In addition, the EA partition dramatically lightened the color of cell pellet and significantly decreased the level of tyrosinase protein expression. In these results, EA partition of AR reduced melanin synthesis of B16F10 mouse melanoma cells by down regulating the tyrosinase activity and tyrosinase protein expression. Therefore, it is anticipated that AR is a candidate for an efficient whitening agent which suppresses melanogenesis.

Key words : *Adenophorae Radix*(沙蔘), melanogenesis, tyrosinase protein expression, melanin

서 론

피부의 질환 중 과색소증은 표피층에서 과다하게 생성된 멜라닌색소가 비정상적으로 침착되어 나타나는 질환¹⁻⁵⁾으로 원인은 자외선의 과다노출, 유전적 요인, 비정상적인 대사과정, 피부염증, 피부 전염병, 내분비 장애, 상처자국 등으로 알려져 있다⁶⁻⁸⁾.

멜라닌(melanin)은 멜라닌세포의 멜라닌소체(melanosome)에서 L-tyrosine으로부터 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)로의 hydroxylation, DOPA에서 DOPAquinone으로의 산화, DOPA quinone에서 DOPACHROME의 생성, DOPACHROME에서 5,6-dihydroxyindole(DHI)로의 전환, DHI의 산화적 중합 및 단백질과의 결합 단계를 거쳐 생성된다. 이때 tyrosinase는 멜라닌 색소형성 과정 중 L-tyrosine에서 DOPA, DOPA에서 DOPAquinone

의 과정을 촉매하는 속도조절 효소로 중요하다⁹⁻¹³⁾. 이렇게 생성된 멜라닌은 세포질 돌기를 통하여 표피의 기저층과 가시층의 각질화세포(keratinocyte)로 운반¹⁴⁻¹⁵⁾되는데, 자외선에 의한 피부의 광노화 또는 일광각화증을 억제 및 보호하는 긍정적인 기능¹⁶⁾이 있는 반면, 멜라닌의 전구물질이 세포 사멸을 촉진하거나 과다한 색소 침착 등에 의한 부정적인 기능¹⁷⁻¹⁸⁾도 가지고 있다.

그러므로 미(美)학적인 측면에서 이러한 생합성 과정에서 나타나는 부정적인 기능을 제어할 수 있는 연구, 즉 과색소증의 원인과 기전의 규명 및 이를 방지할 수 있는 약물 또는 미백화장품의 개발 연구가 활발하게 진행되고 있다.

사삼(沙蔘, *Adenophorae Radix*)은 우리나라 산야에 자생 또는 재배되는 길경과(桔梗科)의 다년생 초본인 잔대의 근(根)으로서 등¹⁹⁾은 沙蔘과 더덕, 모시대의 형상 또는 외관이 유사하다는 보고와 함께, 민간에서 혼용되어지는 더덕보다는 淸肺, 祛痰, 養胃, 滋陰作用이 강하다고 하였다. 또한 안 등²⁰⁾은 沙蔘 에탄올 추출물에서 분리한 유리당이 생쥐에서 소염효과를 나타내고, 신 등

* 교신저자 : 문연자, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의학전문대학원
· E-mail : yjmun@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6942
· 접수 : 2004/03/02 · 수정 : 2004/04/06 · 채택 : 2004/05/10

²¹⁾은 沙蔘이 면역작용에 영향을 주며, 저자 등은 이전 실험결과 사삼물추출물이 멜라닌 생성을 억제함을 보고하였다²²⁾.

이에 세포에 직접적인 독성이 적으면서 멜라닌 합성을 감소시키고, 동시에 non-mutagenic한 미백 효능을 가지는 활성 물질을 탐색, 분리하고자, 沙蔘의 유기용매 추출물이 세포독성, melanin 합량, tyrosinase 효소 활성, tyrosinase 단백질 발현 양상에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 沙蔘(잔대, *Adenophorae Radix*)은 3년 근(根)으로 전라북도 진안 속근 약초 시험장에서 제공(2002년 9월 30일) 받아 실온에서 20일 동안 음건하여 세절한 후에 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 추출 및 분리

沙蔘 600 g을 MeOH 3 l 에 혼합하고 밀봉하여 20일간 실온에서 냉침 시킨 후 거즈로 여과하여 2.7 l 의 1차 MeOH 추출액을 수집하고 동일한 방법으로 추출하여 얻은 2차 MeOH 추출액을 합하여 총 5.7 l 를 얻었다. MeOH 1, 2차 추출 혼합액을 vacuum evaporator(45 °C)로 증발 농축시켜 3차 증류수에 용해시키고 n-hexane으로 분획하여 0.5193 g(0.08 %)의 n-hexane 분획물을 얻었다. 나머지를 다시 ethyl acetate(EA)에 용해시킨 후에 감압 농축하여 沙蔘 EA 분획물 1.1843 g(0.19 %)을 얻었다. 남은 층을 n-BuOH로 분획하여 7.5518 g(1.25 %)을 얻었으며, H₂O 분획물 19.7672 g(3.29 %)을 얻어 본 실험에 사용하였다(Fig. 1).

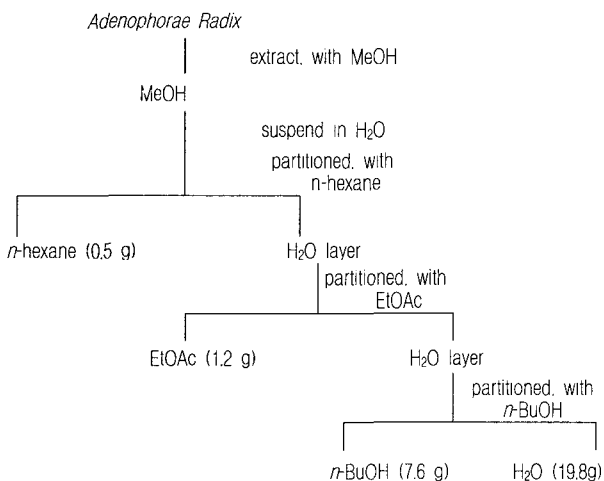


Fig. 1. Extraction process of *Adenophorae Radix* (AR)

2) 세포생존율(Cell viability) 측정

한국 세포주 은행에서 분양 받은 B16/F10 mouse melanoma 세포를 10 % Fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 Dulbecco's

modified eagle medium(DMEM)을 사용하여 CO₂ 배양기(37 °C, 5 %의 CO₂)에서 배양하였다. 세포생존을 측정하는 Mosmann의 방법²³⁾에 의하여 실시하였다.

96 well plate에 B16/F10 세포를 1×10⁴ cell/200 μl 씩 분주하고 24시간 후 沙蔘 각 분획물을 5, 25, 50, 100 μg/ml 농도로 72시간 배양하였으며, 대조군으로는 沙蔘 각 분획물에 상당하는 양의 DMSO를 처리하였다. 배양 후 0.05 % MTT 용액으로 37 °C에서 3시간 동안 처리하고 formazan 침전물은 DMSO에 녹여 540 nm의 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 계산하였다.

3) 세포내 tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Matinez-Esparza 등²⁴⁾의 방법으로 측정하였다. 직경 6 cm의 배양접시에 B16/F10 세포(1.2×10⁵ cell)를 분주하여 24시간 세포를 안정화시킨 후 각각의 沙蔘 분획물을 72시간 처리한 다음 trypsin/EDTA로 세포를 수확하였다. 세포침전물에 세포 용해액(nonidet P-40, sodium dodecyl sulphate, 0.1 mol/l tris-HCL, pH 7.2, 100 mM/l PMSF, 10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml leupeptin)으로 세포를 파괴 시킨 후 4 °C, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성 측정용액으로 사용하였다. 상층액에 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)와 100 mM catechol을 넣고 반응시킨 다음 ELISA reader로 37 °C, 405 nm에서 흡광도의 변화를 10분에 한번씩 1시간 동안 측정하였다.

4) 멜라닌(Melanin Content) 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등²⁵⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포내 tyrosinase 활성 측정 방법과 동일하게 시료를 처리하고 세포를 수확하였다. 세포침전물에 5 % trichloroacetic acid를 첨가하여 부유시킨 후 원심분리하여 멜라닌침전물을 수확하였고 Ethanol : Ether(3:1) 용액과 Ether로 반복 세척한 후 건조시켰다. 1 N-NaOH 용액으로 100 °C에서 10분 동안 용해시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 멜라닌 정량은 합성멜라닌(Sigma chemical Co.)을 대조 물질로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

5) 광학현미경적 관찰

직경 6 cm 배양접시에 B16/F10 세포(1.2×10⁵ cell)를 분주하고 세포내 tyrosinase 활성 측정 방법과 동일한 방법으로 세포를 부착시켰다. 여기에 沙蔘 각 분획물 200 μg/ml 농도를 첨가하고, 대조물질인 DMSO와 양성대조군인 α-MSH(10 nM)를 동량 처리하여 72시간 배양한 후 B16/F10 세포의 수지상 돌기의 변화를 Inverted microscope를 이용하여 관찰하였다.

6) 멜라닌색소 침착의 육안적 관찰

B16/F10 세포를 10 cm 세포 배양 접시에 4×10⁵ cells/dish로 분주하여 24시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 沙蔘 EA 분획물 200 μg/ml 농도로 72시간 동안 처리하였다. 한편 멜라닌 세포의 멜라닌화를 자극하는 것으로 알려진 α-MSH(10 nM)²⁶⁾을 처리하여 양성 대조군으로 하였다. 배양이 완료된 세포는 trypsin/EDTA로 분리하여 세척하고, 각 군당 동일한 세포수를 산정하여 수집한 후에 육안으로 세포 침전물의 색 변화를 관

찰하였다.

7) Western blotting

B16/F10 세포에서 tyrosinase의 발현을 관찰하고자 沙蔘 EA 분획(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 대조물질인 DMSO와 양성대조군인 α -MSH(10 nM)를 72시간 처리하였다. 세포 용해액(Nonidet P-40, sodium dodecyl sulphate, 0.1 mol/l Tris-HCL, pH 7.2, 100 mM/l PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin)으로 세포를 용해시킨 후 4 $^{\circ}\text{C}$, 13,000 rpm에서 25분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다.

Protein 양은 protein assay kit를 사용하여 정량하였고, bovine serum albumin (BSA)으로 표준곡선을 만들어 단백질 양을 계산하여 일정량의 단백질에 sample buffer(1.0 ml glycerol, 0.5 ml β -mercaptoethanol, 3.0 ml 10 % SDS, 1.25 ml 1.0 M Tris-HCL, 1 to 2 mg bromophenol blue)를 가하고 7.5 % SDS polyacrylamide gel에서 P3, 100 V, 400 mA(Electrophoresis Power Supply)로 전기영동한 후에 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. Nitrocellulose membrane을 5 % non-fat skim milk로 blocking하고 항체로는 anti-rabbit tyrosinase와 anti-rabbit HRP antibody를 사용하였으며 각각 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하고 염색하여 현상하였다. Protein level 확인은 α -tubulin으로 하였고 densitometer를 이용하여 대조군에 대한 백분율을 구하여 %로 나타내었다.

8) 통계학적 분석

실험 결과는 one-way ANOVA test를 이용하였으며, P 값이 0.05 이하인 경우 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 沙蔘 각 분획물이 세포생존율에 미치는 영향

B16/F10 세포에 沙蔘 각 분획물을 72 시간동안 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 세포생존율을 측정한 결과, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 hexane 분획은 61 %, EA 분획은 70 %, BuOH와 H₂O 분획은 각각 89 %와 90 % 세포생존율을 나타내었다. Hexane 분획은 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 세포생존율이 각각 96 %, 83 %, 74 %, 61 %로 농도 의존적으로 세포증식이 억제되었다. 沙蔘 각 분획물의 세포생존율은 hexane, EA, BuOH, H₂O 분획 순으로 나타나 沙蔘 hexane 분획이 세포증식을 가장 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

2. 沙蔘 각 분획물의 Tyrosinase 활성 억제효과

沙蔘 분획물 중 hexane 분획은 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 97 %, 89 %, 83 %, 76 %로 농도 의존적으로 tyrosinase 활성을 억제하는 것으로 나타났으며, EA 분획은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 90 %, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 73 %로 tyrosinase 활성이 억제되었다. 그러나 BuOH 분획과 H₂O 분획에서는 tyrosinase 활성이 감소되지 않았다(Fig. 3). 따라서 沙蔘 분획물 중에서 hexane과 EA 분획물이 tyrosinase 활성을 유의하게 억제하는 것으로 관찰되었다.

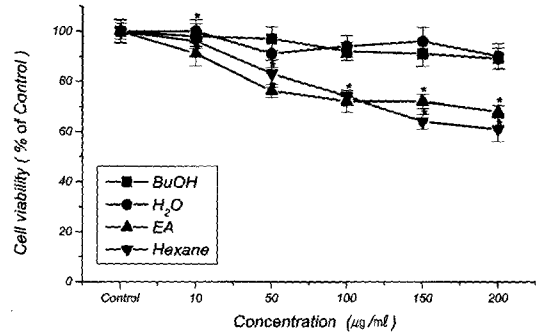


Fig. 2. Cell viability on B16/F10 cells after treatment with *Adenophorae Radix* partitions. The cells were incubated with various concentrations of AR partitions for 72 hours. Values are means \pm S.D. of experiments performed in triplicate. Asterisks indicate a significant difference compared with control (DMSO treated) group. * $p < 0.05$

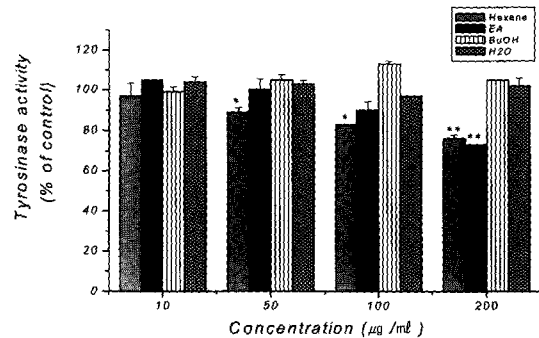


Fig. 3. The change of tyrosinase activity on B16/F10 cells after treatment with *Adenophorae Radix* partitions. Cells were seeded at 1.5×10^4 cells/dish. After 24 hours, cells were incubated with various concentrations of AR partitions (hexane, EA, BuOH, or H₂O) during a period of 72 hours. Then, tyrosinase activity was measured as described in materials and methods. Values are means \pm S.D. of experiments performed in triplicate. Asterisks (*) indicate significant decrease compared with control (DMSO treated) group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3. 沙蔘 각 분획물의 멜라닌 생성억제효과

B16/F10 세포에 沙蔘 각 분획물을 72 시간동안 농도별로 처리한 후 1×10^3 개의 세포 당 최종적으로 생성된 멜라닌의 양을 측정된 결과, 100과 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 hexane 분획은 각각 대조군의 95 %와 88 %로 나타났으며, EA 분획에서도 각각 65 %, 62 %로 멜라닌 생성을 유의하게 억제하였다(Fig. 5. A, B). 그러나 BuOH와 H₂O 분획은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 138 %와 150 %로 멜라닌 생성이 증가하였다(Fig. 4). 따라서 沙蔘 분획물중 hexane 분획과 EA 분획이 세포내 멜라닌 생성을 억제하였으며, 특히 沙蔘 EA 분획이 가장 효과적으로 멜라닌 생성을 억제시키는 것으로 나타났다.

4. 세포의 형태학적 관찰

B16/F10 세포에 沙蔘 각 분획물을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하여 72시간 배양한 다음 형태학적인 변화를 관찰한 결과, hexane 분획에서는 대조군(Fig. 5A)보다 세포의 수가 감소하였고(Fig.

5B), EA 분획에서는 세포의 수적인 감소는 나타났으나 형태학적으로는 대조군과 유사한 것으로 관찰되었다(Fig. 5C). BuOH 분획과 H₂O 분획의 경우 대조군의 세포에 비하여 수지상 세포 돌기가 약간 발달되었다(Fig. 5D, E). 한편 멜라닌 세포의 멜라닌화를 자극하는 것으로 알려진 α-MSH²⁶⁾을 처리하여 양성 대조군으로 하였으며, α-MSH 처리군에서는 잘 발달된 수지상 돌기가 관찰되었다(Fig. 5F). 따라서 沙蔘 EA 분획 200 μg/ml 농도에서는 세포의 형태적인 변화 없이 세포증식이 약간 억제되었음을 확인하였다.

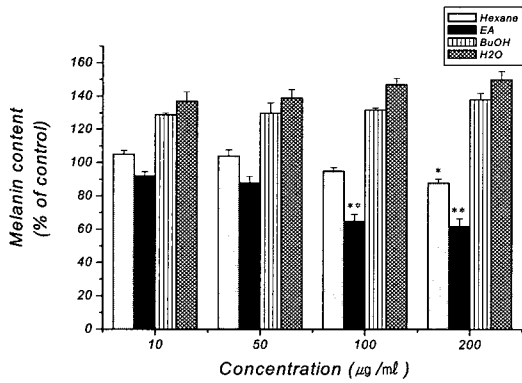


Fig. 4. Melanin content on B16/F10 cells after treatment with *Adenophorae Radix* partitions. Cells were incubated with various concentrations of AR partitions (hexane, EA, BuOH, or H₂O) during a period of 72 hours. Then, melanin content was measured as described in Materials and Methods. Values are means ± S.D. of experiments performed in triplicate. Asterisks (*) indicate significant decrease compared with control (DMSO treated) group, *p<0.05, **p<0.01

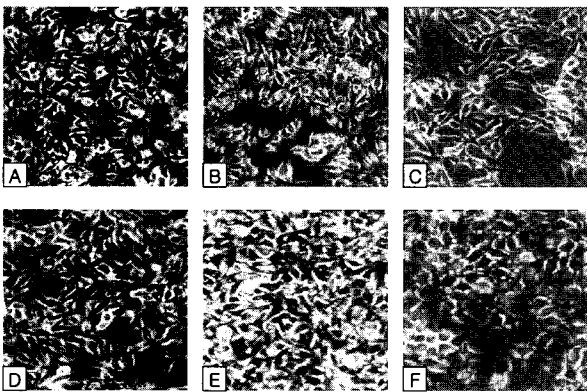


Fig. 5. Light micrographical observation of B16/F10 cells after treatment with different partition of *Adenophorae Radix*. Cells were incubated with AR partitions or α-MSH. After 72 hours, cell were photographed with phase contrast inverted microscope. A: DMSO treated, B: hexane 200 μg/ml C: EA 200 μg/ml D: BuOH 200 μg/ml E: H₂O 200 μg/ml, F: α-MSH 10 nM.

5. 沙蔘 EA 분획물에 대한 pellet 관찰

위의 연구 결과에서 沙蔘의 각 분획물 중 EA 분획이 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성을 효과적으로 억제한 것으로 나타나, EA 분획을 200 μg/ml 농도로 72시간 처리한 후 멜라닌색소 억제효과를 육안으로 확인하였다. 대조군의 세포는 회색

pellet, α-MSH를 처리한 세포는 검정색 pellet이 관찰되어 육안으로도 많은 멜라닌이 형성되었음을 알 수 있었다. 그러나 沙蔘 EA 분획을 처리한 세포는 대조군에 비하여 상대적으로 연한 회색의 pellet을 형성하여 멜라닌색소의 생성이 감소되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

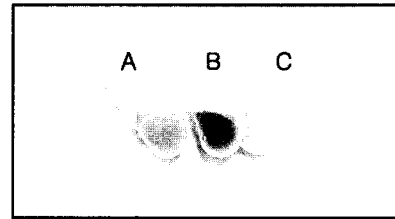


Fig. 6. The formation of pellet on the B16/F10 cells after treatment with EA partition of *Adenophorae Radix*. A: DMSO treated, B: α-MSH 10 nM, C: EA partition of AR 200 μg/ml.

6. 沙蔘 EA 분획의 Tyrosinase 발현 억제효과

沙蔘 EA 분획이 tyrosinase 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여 western blot을 실시한 결과, 200 μg/ml 농도에서 대조군에 비하여 tyrosinase 발현이 감소되었으며, 양성 대조군으로 사용된 α-MSH 처리군에서는 증가되었다(Fig. 7A). Internal standard protein인 α-tubulin의 발현은 모든 군에서 동일하게 나타났으며, densitometer를 이용하여 백분율로 환산한 결과, EA 분획은 62 %로 대조군에 비하여 약 40 % 감소하였고, 양성 대조군인 α-MSH를 처리한 경우에는 tyrosinase 발현이 153 %로 크게 증가하였다(Fig. 7B).

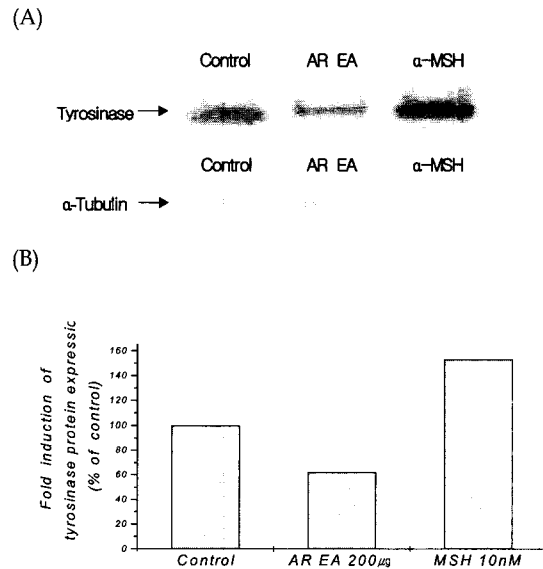


Fig. 7. Tyrosinase expression on B16/F10 cells after treatment with EA partition of *Adenophorae Radix*. A: Western blotting of tyrosinase in B16/F10 cells treated with DMSO (control), EA partition of, AR (200 μg/ml), and α-MSH (10 nM) for 72 hours as described in materials and methods. Arrows indicate the representative bands and similar results were obtained in repeated experiments. B: Fold induction of tyrosinase protein expression quantified by densitometer, control: DMSO treated B16/F10 cells.

고찰

沙蔘은 도라지과(Campanulaceae)에 속한 다년생 초본인 잔대(Adenophora triphylla var. japonica HARA)와 그 동속식물의 뿌리를 건조한 것으로²⁷⁻²⁸⁾, 《神農本草經》에 “微苦微寒 主血脈驚氣 除寒熱 補中 益肺氣 久服利人 一名 知母 生 川谷”이라 기록된 이래 養陰淸肺, 益胃生津, 祛痰止咳, 排膿消腫, 祛風止痒 등의 효능으로 肺熱咳嗽, 口渴, 胃痛, 皮膚瘙癢 등의 治療에 使用되었으며, 《太平聖惠方》에서는 面黥瘡를 治療하고 滅瘢去黑痣하는 處方에 沙蔘을 活用하였다²⁹⁾.

沙蔘의 種類에 대한 記錄으로는 《本經逢源》에 처음 記錄되어 있는데 “沙蔘 南北二種 南者質堅性寒 北者體虛力微”라고 南·北沙蔘을 나누어 놓았으며, 신 등³⁰⁾은 沙蔘은 잔대의 根, 齊蔴는 모시대의 根, 羊乳는 더덕의 根으로 文獻 考察 후 각각 分類하였고, 서 등¹⁹⁾은 沙蔘과 더덕, 모시대의 형상 또는 외관이 유사하다는 보고와 함께, 沙蔘과 羊乳의 특징을 구체적으로 구분하면서, 沙蔘은 淸肺, 祛痰, 養胃, 滋陰作用이 강하고, 더덕은 養陰潤肺, 祛痰排膿, 淸熱解毒, 催乳作用이 강한 것이 특징이라고 하였다. 민간에서는 더덕이라 하여 식용으로 쓰이고 있으며, 상업적으로도 구분 없이 통용되는 실정이지만, 더덕은 양유(羊乳, *Codonopsis radix*)의 근(根) 또는 산해라(山海螺)라고도 하여, 최근에는 沙蔘과는 구분되고 있다³¹⁾.

沙蔘의 약리작용에 관한 연구로는 안 등²⁰⁾이 沙蔘 에탄올 추출물에서 분리한 유리당이 생쥐에서 소염효과가 있고, 신 등²¹⁾은 沙蔘을 처리한 CD4 T cell, T cell, CD19 B cell의 변화의 관찰에서 면역작용에 영향을 미친다고 하였다. 또한 저자 등은 이전 실험결과에서 사삼물추출물이 멜라닌 생성을 억제하는 것을 관찰, 보고하였다²²⁾.

이에 저자 등은 沙蔘으로부터 미백활성 물질을 분리, 규명하고자 hexane, EA, BuOH, H₂O 순으로 분획하여 B16/F10 세포의 증식, 세포 내 tyrosinase 활성, 멜라닌 생성 및 tyrosinase 단백질 발현 변화 등 沙蔘 각 분획물이 멜라닌 생합성 과정에 미치는 영향을 조사하였다.

멜라닌세포에서의 tyrosinase 활성은 멜라닌 생성에 결정적으로 영향을 미치게 되고, 피부 멜라닌 생성 억제제 개발에 있어서 tyrosinase 활성 억제는 매우 큰 의미를 갖게 된다³²⁻³⁴⁾. 그러므로 세포내 tyrosinase 활성에 미치는 효과를 관찰한 결과 Fig. 4에서 보논바와 같이 沙蔘 hexane 분획은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 tyrosinase 활성을 억제하였으며, 沙蔘 EA 분획의 경우 100 µg/ml 농도에서 90 %, 200 µg/ml 농도에서 73 %로 tyrosinase 활성이 가장 효과적으로 감소되었다(Fig. 4A, B). 한편 tyrosinase 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 western blot을 실시한 결과에서도 沙蔘 EA 분획은 tyrosinase 단백질 발현을 감소시켰다.

沙蔘 각 분획물이 B16/F10의 세포생존에 미치는 영향을 조사한 결과, 200 µg/ml 농도에서 hexane 분획은 대조군의 61 %, EA 분획은 70 %, BuOH과 H₂O 분획은 각각 89 %와 90 %로 나타나 hexane, EA, BuOH, H₂O 분획물 순으로 세포증식의 억제

하였다(Fig. 2). 따라서 沙蔘 각 분획물 중에서 EA 분획은 hexane 분획보다 세포독성이 적으면서 tyrosinase 활성 억제효과가 높은 것으로 나타났다.

Mishima 등³⁵⁾은 멜라닌 생성 억제 물질을 크게 두 가지 형태로 분류하였는데, 하나는 tyrosinase 자체를 직접 억제하는 것이고, 다른 하나는 tyrosinase에 대해서는 직접적인 억제를 나타내지 않지만 멜라닌세포 내에서 멜라닌 생성을 억제하는 것이라 하였다. 본 실험에서 멜라닌양을 측정된 결과 Fig. 5에서와 같이 沙蔘 EA 분획은 200 µg/ml 농도에서 대조군의 62 %였고, hexane은 88 %였으며, 다른 분획은 대조군보다 증가하여 沙蔘 EA 분획이 가장 효과적으로 멜라닌 생성을 억제하였다.

멜라닌 생성에 대한 천연물의 연구를 살펴보면 문 등³⁶⁾은 감초가 B16/F10 세포의 멜라닌 형성을 억제 하였고, 이 등³⁷⁾은 더덕 물추출물이 HM3KO 세포의 멜라닌 형성을 억제한다고 하였다. 또한 천 등³⁸⁾은 소목의 부탄올 추출물이 B16/F10 세포의 멜라닌 생성을 억제하였고, 소목 에틸아세테이트 추출물³⁹⁾ 역시 40 µg/ml 농도에서 57 %의 세포생존을 나타내며 멜라닌 생성은 대조군의 17 % 정도 억제한다고 하였다. 이는 본 실험 결과 沙蔘 EA 분획이 200 µg/ml의 높은 농도에도 불구하고 70 %의 세포생존율을 나타냈으며 38 % 정도 멜라닌 생성을 억제한 것과 비교하여 볼 때, 沙蔘 EA 분획이 보다 안전하면서도 미백효과가 우수한 것으로 생각된다. 또한 沙蔘 EA 분획은 Fig. 7C에서와 같이 육안적으로도 멜라닌 생성이 억제되었음이 확인되었다.

이상의 실험결과를 종합하면 沙蔘 EA 분획물은 tyrosinase 활성과 tyrosinase 단백질 발현의 감소를 통하여 멜라닌 생성을 억제함을 알 수 있었으며, 보다 안전한 미백 효능물질로 생각된다.

결론

沙蔘으로부터 미백 활성물질을 탐색 및 분리하고자 沙蔘의 유기용매 추출물에 대한 세포독성효과, tyrosinase 활성, 멜라닌 생성, 沙蔘 EA 분획에 대한 멜라닌 색소 침착의 육안적인 관찰과 tyrosinase 단백질 발현양상을 조사한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

沙蔘의 각 분획물의 세포생존율은 BuOH, H₂O, EA, hexane 분획 순으로 나타났으며, hexane 분획이 세포증식을 가장 억제하는 것으로 나타났다. 沙蔘의 hexane 분획과 EA 분획은 tyrosinase 활성을 억제 하였고, BuOH, H₂O 분획은 tyrosinase 활성을 증가시켰다. 沙蔘 hexane 분획과 EA 분획은 멜라닌 생성을 억제하였으며, EA 분획이 가장 효과적으로 멜라닌 생성을 억제하였다. 沙蔘 EA 분획은 약간의 세포독성이 있었으나, 형태학적으로 대조물질인 DMSO 처리군과 유사한 정상세포로 관찰되었다. 세포의 pellet 관찰에서 沙蔘 EA 분획은 멜라닌 형성 억제 효과가 육안적으로 확인되었다. 沙蔘 EA 분획은 tyrosinase의 단백질 발현을 현저하게 억제시켰다.

이상의 결과 沙蔘 메탄올 추출물 중 EA 분획은 B16/F10 세포에서 세포독성이 적으면서 tyrosinase 활성과 tyrosinase 발현을 억제하여, 멜라닌 생성을 효과적으로 감소시켰으며, 추후 미

백효과와 안정성을 보다 체계적으로 규명하기 위한 실험과 미백 기능성 물질의 구조 규명이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Sugai, T. Clinical effects of arbutin in patients with chloasma in Japanese. *Hifu. Skin Res.* 34, pp. 522-529, 1992.
2. Kim, C. W. Experimental study on the hyperpigmentation of skin graft. *Plast Reconstr. Surg.* 85, pp. 162, 1990.
3. Mishima, Y. and Imokawa, G. Selective aberration and pigment loss in melanosomes of malignant melanoma cells in vitro by glycosylation inhibitors: Premelanosomes as glycoprotein. *J. Invest. Dermatol.* 81, pp. 106-114, 1983.
4. Imokawa, G. and Mishima, Y. Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glucosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res.* 42, pp. 1994-2002, 1982.
5. Hearing, V. J. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Dermatol. Proc.* 4, pp. 24-28, 1999.
6. Imokawa, G., Kawai, M., Mishima, Y. and Motegi, I. Differential analysis of experimental hypermelanosis induced by UVB, PUVA and allergic dermatitis using a brownish guinea pig model. *Arch Dermatol. Res.* 278, pp. 352-362, 1986.
7. Abdel-Malek, Z., Swope, V. B., Smalara, D., Babcock, G., Dawes, S. and Nordlund, J. J. Analysis of the UV-induced melanogenesis and growth arrest of human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 7, pp. 326-332, 1994.
8. Stipic, V. Skin infections caused by protozoa. In: Dobric, I., ed., *Dermatovenerologija*, Zagreb. Dobric. Grafoplast, pp. 101-102, 1994.
9. Kobayashi T, Urabe K, Winder Aj etal, Tyrosinase related protein (TRP-1)functions as a DHICA oxidase activity in melanin biosynthesis. *EMBO j.* 13, pp. 5818-5825, 1994.
10. Curto E V, Kwong C, Hermersdorfer H, Glatt H, Santis C, Virador V, Hearing V J and Dooley P: Inhibitors of mamalian melanocytes tyrosinase: In vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology.* 57, pp. 663-672, 1999.
11. Jk NO, DY Soung, YJ Kim, KH Shim, YS Jun, SH Rhee, T Yokizawa, HY Chung: Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Science.* 65 (21), pp. 241-246, 1999.
12. Prota G.: Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.* 75 (122), pp. 31-36, 1990.
13. SH Lee, JS Park, SY kim, JJ kim, SR Chung: Isolation of inhibitory components oa tyrosinase activity from the bark of *Paeonia moutan*. *Yakhak Hoeji.* 42 (4), pp. 353-358, 1998.
14. 박경아 등, 조직학, 서울 고려의학, pp. 405-411, 1999.
15. Bloom W, Fawcett DW: A textbook of histology, 11th ed, W.B. Saunders Company, USA, pp. 543-558, 1986.
16. Sandra M. De Leeuw, Nico P. M. Smit, Monique Van Veldhoven, Ed M. Pennings, Stan Pavel, Johannes W. I. M. Simons, Albert A. Schothorst: Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytoxicity. *J. Photochemistry and Photobiology B. Biology* 61, pp. 106-113, 2001.
17. Sugai, T: Clinical effects of arbutin in patients with chloasma in Japanese. *Hifu. Skin Res.* 34, pp. 522-529, 1992.
18. Curto E V, Kwong C, Hermersdorfer H, Glatt H, Santis C, Virador V, Hearing V J and Dooley P: Inhibitors of mamalian melanocytes tyrosinase: In vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology.* 57, pp. 663-672, 1999.
19. 서영배, 신동훈, 사삼 (沙參)에 대한 문헌적 고찰, *한의학논문집*, 8 (2), pp. 107-123, 2000.
20. 안덕균, 김재학, 제니와 사삼종의 유리당 함량 및 효능에 관한 비교연구, *본초학회지* 7 (1), pp. 3-14, 1992.
21. 신동훈, 서영배, 사삼의 면역조절 작용에 대한 실험적 연구, *대한 본초학회*, vol. 15 (1), pp. 31-44, 2000.
22. 강현성, 임난영, 문연자, 임홍진, 박민철, 임규상, 김남권, 우원홍, *沙參* 물 추출물의 멜라닌 형성 억제 효과, *동의생리병리학회지*, 18(2), pp , 2004.
23. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods.* 65, pp. 55, 1983.
24. Martinez - Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J.A. and Garcia - Borron, J. C. Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor - alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* 255, pp. 139 - 146, 1998.
25. Hosei, J., 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, pp. 1474 - 1478, 1985.
26. Anthony J. Thody and Alison Graham: Does α -MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans. *Original Res*, pp. 265-274, 1998.
27. 신민교, 임상본초학, 영림사, 서울, pp.270-271, 1992.
28. 최태섭, 한국의 보약, 열린책들, 서울, pp.300-301, 1990.
29. 이경순 외, *中藥大辭典*, 서울, 정담, pp.4927-4928, 1998.
30. 안덕균, *한국 본초도감*, 교학사, pp. 63, 666, 1998.
31. 문연자, 김 진, 임난영, 이승연, 곽 섭, 황충연, 우원홍, 감초 물추출물의 멜라닌 형성 억제효과, *동의생리병리학회지*, 16 (6), pp. 1230-1235, 2002.

32. 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), pp. 33-40, 1993.
33. Rungta D, Corn TD, Fuller BB: Regulation of tyrosinase mRNA in mouse melanoma cells by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Invest Dermatol* 107 (5), pp. 689-693, 1996.
34. Mishima Y., Hatta S., Ohyma, Y. and Inazu, M. : Induction of melanogenesis suppression: Cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res*, 1, pp. 367, 1988.
35. 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, pp. 206-213, 1997.
36. 신동훈 외, 沙蔘에 관한 문헌적 고찰, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 8(2): 107-122, 2000.
37. 이승연, 김진만, 오현철, 임숙정, 황충연, 문연자, 우원홍, 더덕추출물이 멜라닌생성에 미치는 영향, 대한한의학 방제학회지, 10 (2), pp. 199-211, 2002.
38. 천현자, 황상구, 정동훈, 백승화, 전병훈, 우원홍, 소목의 부탄올 추출물이 B16/F10 흑색종세포의 멜라닌 합성에 미치는 효과, 약학회지, 46 (2), pp. 137-142, 2002.
39. 천현자, 김용수, 남향우, 윤성찬, 우원홍, 소목의 에틸아세테이트 추출물이 B169. 천현자, 김용수, 남향/F10 흑색종세포의 멜라닌 합성에 미치는 효과, 동의생리병리학회지, 15 (6), pp. 961-966, 2001.