

## 赤何首烏의 멜라닌 생성 억제와 작용기전에 관한 연구

대전대학교 한의과대학 부인과교실

송종석, 유동열

### ABSTRACT

#### Inhibitory Effect of Polygonum Multiflorum on Melanin Synthesis and Its Action Mechanism in B16F10

Jong-Sek Song, Dong-Youl Yoo

Dept. of Oriental Medicine Graduate School, Daejeon University

**Purpose:** This study was performed to determine the inhibitory effect of Polygonum multiflorum(PM) on melanin synthesis in B16F10.

**Methods:** The Inhibitory effects of Polygonum multiflorum(PM) on melanin synthesis were determined by in-vitro assay. To elucidate inhibitory effects of Polygonum multiflorum on melanin synthesis, we determined the melanin release and melanin production in B16F10. And to investigate the action mechanism, we assessed the gene expression of tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MMP-2, PKA, PKC, ERK-1 ERK-2, AKT-1, MITF in B16F10.

**Results:**

1. PM inhibited melanin-release, melanin production in B16F10.
2. PM inhibited tyrosinase activity in vitro and in B16F10.
3. PM suppressed the expression of tyrosinase, TRP-1 in B16F10.
4. PM suppressed the expression of PKA in B16F10.
5. PM suppressed the expression of ERK-1, ERK-2, AKT-1 in B16F10.
6. PM suppressed the expression of MITF in B16F10.

**Conclusion:** From these results, it may be concluded that PM possesses the antimelanogenetic effects.

**Key Words:** Polygonum multiflorum(PM), whitening, melanogenesis, Tyrosinase.

## I. 서 론

최근 환경오염으로 인한 오존층의 감소로 자외선 조사량이 늘어나고, 야외 여가활동의 증가로 인한 노출 또한 늘어나, 자외선으로 인한 피부의 손상과 광노화(光老化)가 증가함으로써<sup>1,2)</sup> 피부미백에 대한 관심이 더욱 높아지고 있다.

한의학에서 색소침착증은 《黃帝內經·素門》〈至眞要大論〉<sup>3)</sup>에 ‘면진(面塵)’이라 하여 처음 언급된 이래, 《諸病源候論》〈面皦黑黧候〉<sup>4)</sup>에서 그 병리기전과 형태에 대하여 구체적으로 언급하였고, 이후 형태와 색조에 따라 간증(黥黯), 간점(黥點), 면흑(面黑), 면간증(面黥黯), 작란(雀卵), 반간증(斑黥黯), 염자(黥子), 작반(雀斑), 여흑반(鰲黑斑), 흑반(黑斑) 등으로 다양하게 표현되어 있다<sup>5-8)</sup>.

피부의 색은 표피에 존재하는 멜라닌 세포에서 생성되는 멜라닌의 양과 분포에 의해 대부분 결정된다. 따라서 미백 효과의 검정을 위해서는 멜라닌 합성세포에서 멜라닌 색소의 생성 억제정도를 밝히는 것이 중요하다<sup>9-11)</sup>.

최근 미백효과에 대한 연구는 피부미백효과와 항산화작용 및 피부 노화방지를 포함하는 포괄적인 개념으로 진행되고 있는데, 자외선 차단소재 연구, 멜라닌세포에 멜라닌의 합성을 명령하는 신호전달물질인 cytokine의 작용을 조절하는 연구, 유전자발현 억제, tyrosinase 작용 억제, 색소환원 등 다양하게 진행되고 있다. 이 중에서도 tyrosinase의 활성을 억제하여 멜라닌의 초기 생성을 감소시키는 기전이 주로 많이 연구되고 있다<sup>9-11)</sup>.

한약재를 이용한 미백 관련 연구로 이

상희<sup>12)</sup>는 마황(麻黃) 및 마풍고(摩風膏)가, 김성옥<sup>13)</sup>은 사백산(瀉白散)이, 손동석 등<sup>14-16)</sup>은 가감서시옥용산(加減西施玉容散)이 미백효과가 있다고 보고하였으며, 이관순 등<sup>17)</sup>은天花粉 추출물이, 윤화정 등<sup>18)</sup>은 白芨이 멜라닌 생성억제 효과를 가지고 있다고 보고하였다.

적하수오는 마디풀과의 여러해살이풀 何首烏(*Polygonum multiflorum* THUNB.)의 덩이뿌리로 補肝益腎 養血祛風의 효능이 있어 肝腎陰虧, 鬚髮早白, 血虛頭暈, 腰膝軟弱 등을 치료하는 데에 활용되고 있다<sup>19-21)</sup>.

본 연구는 補肝益腎 養血祛風의 효능이 있는 적하수오가 모발이외에 피부에도 영향을 미칠 것으로 사료되어 적하수오의 미백효과를 확인하고자, mouse melanoma cell인 B16F10을 이용하여 적하수오가 melanin 생합성과 tyrosinase의 활성에 미치는 영향을 측정하였으며, 그 작용 기전을 밝히기 위하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA, PKC, MMP-2, ERK-1, ERK-2, AKT-1, MITF 등의 유전자 발현에 대하여 연구한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실 험

### 1. 재 료

#### 1) 세포주

본 실험에 사용한 melanocyte는 서울대학교 한국세포주은행에서 분양한 B16F10 mouse melanoma cell을 사용하였다.

#### 2) 약 물

실험에 사용한 적하수오(*Polygonum multiflorum* THUNB.)는 대전대학교 부

속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

### 3) 시약 및 기기

#### (1) 시 약

본 실험에 사용된 시약 중 methanol,  $\text{CHCl}_3$ , n-BuOH, Hank's balanced salt solution, dimethyl sulfoxide (DMSO),  $\text{CO}_2$ ,  $\alpha$ -MSH, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), NaOH, 합성 멜라닌, mushroom tyrosinase, tyrosinase, L-tyrosine, phenol, isoamyl alcohol, isopropyl alcohol, ethanol, DTT, diethyl pyrocarbonate (DEPC), magnesium chloride ( $\text{MgCl}_2$ )는 Sigma (Sigma, USA) 제품을, normal saline은 중외제약 제품을, TRIzol, Superscript II RT는 Invitrogen (Invitrogen, USA) 제품을, fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), trypsin-EDTA는 Gibco/BRL (Gibco/BRL, USA) 제품을, RNase는 Pharmingen (Torreyana, USA) 제품을, TRP-1, TRP-2, PKA, PKC 등 ELISA kit는 R&D system (Minneapolis, USA) 제품을, dATP, dGTP, dTTP, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV-RT)는 Promega (Promega, USA) 제품을, deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), Taq polymerase는 Biotools (Biotools, Spain) 제품을, DNA marker는 Bioneer (Bioneer, USA) 제품을, DNA ligase는 BMS (BMS, USA) 제품을, cyanine3-dCTP, cyanine5-dCTP는 Amersham (Amersham, USA) 제품을, PCR purification kit는 Nucleogen (Nucleogen, USA) 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

#### (2) 기 기

본 실험에 사용된 기기는 centrifuge (Hanil unicon 54R, Korea), rotary vaccum evaporator (Büchi 461, Swiss), deep freezer (Sanyo, Japan), freeze dryer (Eyela, Japan), roller Mixer (Gowon scientific technology, Korea), 96 well plate, 48 well plate, 6 well plate (Seolin, Korea),  $\text{CO}_2$  incubator (Sanyo, Japan), hematocytometer (Fuchs-Rosenthal, Germany), clean bench (Sejong, Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific, Korea), vortex mixer (Vision scientific, Korea), MALDI-TOP (Shimadzu, Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific, Korea), corneal tube (Falcon, USA), homogenizer (OMNI, USA), UV illuminator (VL TFX-20M, USA), liquid handler (Packard, USA), PCR Apparatus (Biometra T1, USA), Image Analyser (VL, USA), Electrophoresis (BMS, USA), ELISA reader (BMS, USA), quantitative real time PCR apparatus (ABI Prism 7000, USA), Gel-Pro analyzer 3.1 (Media Cybernetics, USA) 등을 사용하였다.

## 2. 방 법

### 1) 시료 추출 및 분획 조제

적하수오 100 g을 MeOH로 2시간 환류 추출한 다음 이를 감압 농축하여 MeOH 추출물 7.3 g을 얻었다. MeOH 추출물을 증류수에 현탁한 다음  $\text{CHCl}_3$ 로 추출, 분획하여 감압 농축한 다음 냉동건조 시켜  $\text{CHCl}_3$  분획층 1.8 g을 얻었

다. 계속하여 n-BuOH 분획층을 얻고, 나머지 수층을 감압 농축한 후 냉동건조로 고형물을 얻었다.

#### 2) 검액 조제

실험용 검액은  $\text{CHCl}_3$  분획층을 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹인 후 0.22  $\mu\text{m}$  pore size를 가지는 여과지를 이용하여 멸균하고 사용 시까지 냉장 보관하였다. 배양된 세포에 사용하기 직전에 실험농도에 맞도록 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco/BRL Co., USA) 배지로 조정된 다음 사용하였다.

#### 3) 세포 배양

세포 배양에 사용된 배지는 10% FBS (fetal bovine serum, Gibco/BRL Co., USA)와 penicillin, streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하였으며 1일 1회 배지를 교환하였다. FBS는 잔존하는 보체성분을 불활성화시키기 위해 실온에서 녹인 후 heat inactivation (56°C water bath에서 30분간 가열)하여 사용하였으며, 배지는 0.2  $\mu\text{m}$  membrane filter로 여과 후 사용하였다. B16F10 mouse melanoma cell에 각 조건 별로 96well plate에는 well 당 100  $\mu\text{l}$ , 24well plate에는 well 당 500  $\mu\text{l}$ 로 medium을 넣어주었다. 세포를 회수할 때는 trypsin-EDTA (Gibco/BRL Co., USA) 1 ml을 가하여 37°C에서 1분간 반응시킴으로써 부착된 세포를 분리하고 배지 4 ml을 넣고 원심 분리(1,000 rpm, 3분)를 하여 세척한 후 실험에 사용하거나 필요시 액체질소에서 냉동 보관하였다. 세포는 37°C, 5%  $\text{CO}_2$ 를 사용한  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였다.

#### 4) B16F10 cell proliferation 측정

세포를  $2 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 6 well plate에 넣고 6시간 배양하여 plate에 부

착한 다음, 분획하여 조제한 검액을 농도별로 첨가하여 1, 2, 3일간 배양하였다. 배양완료 후 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리한 다음, D-PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Sigma Co., USA)로 희석하여 hemacytometer (Fuchs-Rosenthal, Germany)로 B16F10 세포수를 계측하였다.

#### 5) Melanin 유리 및 생성량 측정

Melanin 유리 및 생성량 측정은 Hosei 등의 방법<sup>22)</sup>을 사용하였다. Melanin 생성 세포로는 마우스에서 얻은 흑색종의 일종인 B16F10 melanoma cell을 이용하였다. 배양된 B16F10 세포에  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone, 10  $\mu\text{M}$ )를 처리한 다음(대조군), 다시 300, 150, 75, 37  $\mu\text{g/ml}$  농도의 PM을 가하여 3일간 배양한 후(실험군), 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양을 측정하였는데, 약 24시간 후 부터 세포내 melanin의 생성을 현미경으로 관찰할 수 있었다.

또한 세포내의 melanin 생성량을 측정하기 위하여 B16F10 세포에  $\alpha$ -MSH를 처리한 다음 PM을 가하여 3일간 배양하였다. 배양세포는 PBS로 2회 씻고 1,500 rpm으로 5분간 원심분리하여 수확하였다. 세포침전물에 1ml의 증류수를 넣어 현탁 후 초음파로 분쇄하고, 다시 원심분리하여 침전물을 얻었다. 침전물을 10% DMSO가 함유된 1 N NaOH 300  $\mu\text{l}$ 에 넣고 80°C에서 1시간 동안 처리하여 melanin을 용해시켰다. 405 nm에서 흡광도 (optical density)를 측정하였으며, melanin 정량은 합성멜라닌(Sigma Co., USA)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

#### 6) Mushroom tyrosinase 활성에 미치

는 영향 측정

Tyrosinase 활성에 미치는 영향은 Mason and Peterson 등의 방법<sup>23)</sup>을 사용하였다. 즉, 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) 150  $\mu$ l, 3 mM L-tyrosine 수용액 20  $\mu$ l, 검액 20  $\mu$ l을 차례대로 가한 다음 2,500 U/ml mushroom tyrosinase 10  $\mu$ l를 가하여 반응을 시작하였다. 반응은 37°C에서 30분간 incubation 시켰으며 매 10분 간격으로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 활성은 아래에 표시한 식으로 구하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성도 (\%)} = \frac{(B-B')}{(A-A')} \times 100$$

A: 대조군 반응 액의 흡광도

A': 대조군의 tyrosinase 대신 buffer를 가한 반응액의 흡광도

B: 검액이 첨가된 반응 액의 흡광도

B': B 반응액 중 tyrosinase 대신 buffer를 가한 반응액의 흡광도

7) B16F10 cell의 tyrosinase 활성도 측정  
B16F10 세포의 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 등의 방법<sup>24)</sup>을 사용하였다. 배양된 세포를 trypsin-EDTA를 처리하여 수확한 다음 11,000 rpm에서 30초간 원심분리하고 100 ml 세포 용해용 buffer (10 mM sodium phosphate containing 1% Triton X-100 and 0.1 mM PMSF)를 첨가한 다음 얼음 상에서 30분간 흔들면서 세포를 용해시켰다. 다시 원심분리하고 얻어진 세포용액을 사용하여 tyrosinase 활성을 측정하였다.

8) 유전자 발현에 대한 영향

(1) 총 RNA 분리

배양하고 있는 B16F10 세포에 1 ml TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한

RNA에 100  $\mu$ l phenol과 100  $\mu$ l chloroform/isoamyl alcohol (24:1)을 넣고 잘 섞은 후 원심 분리하는 과정을 2번 반복함으로써 상층액을 분리하였다. 0.5 ml isopropyl alcohol을 이용하여 RNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하고 자연 건조시켰다. RNase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase-free DNase를 첨가하고 -70°C에서 저장하였다.

(2) cDNA 제조

대조군 및 실험군에서 각각 분리한 total RNA 액(13  $\mu$ g RNA 함유)에 oligo dT (Promega, USA) 1  $\mu$ l를 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 70°C에서 5분간 incubation하였다. Primer가 annealing 하도록 실온에서 약 10분간 방치한 다음, cyscript buffer, 0.1 M DTT, dUTP nucleotide, dUTP Cydye-labelled nucleotide, cyscript reverse transcriptase를 첨가한 후, 조심스럽게 혼합하였다. 이후, 42°C에서 90분간 incubation 한 후, 얼음물에 방치하였다. 여기에 2.5 M NaOH을 가한 후 37°C에서 15분간 incubation하였으며, 2 M Hepes buffer를 가하여 중화시켰다.

(3) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Oligo (dT) 12-18, reaction buffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, pH 8.3), 1 mM dNTP (Biotools, Spain)과 200 unit M-MLV-RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega, USA)를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR은 total volume 15  $\mu$ l에 10배의 PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 pmole의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액

에 cDNA와 1.25 unit의 Taq polymerase (Biotools, Spain)을 넣어 PCR을 시행하였다. Tyrosinase의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT이었으며, antisense는 TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC를 사용하였다. TRP-1의 sense primer는 GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC, antisense는 AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT를 사용하였으며, TRP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT, antisense는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC를 사용하였으며, MMP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT, antisense는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC이었다. PKA의 sense primer는 TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT, antisense는 TATA GGC TGG TCA GCG AAG AA 을 사용하였으며, PKC- $\beta$ 의 sense primer는 AGA ACC ACA AAT TCA CCG CC, antisense는 TGA GAA CCT CTC TGT CGA TG, Erk-1의 sense primer는 ATC AGA TCC TGA GAG GGC TA, antisense는 CAG AGC TTT GGA GTC AGC AT 를 사용하였다. Erk-2의 sense primer는 CAT TGT TCA GGA CCT CAT GG, antisense는 AGA GCA TCT CAG CCA GAA TG이었으며, Akt-1의 sense primer는 CCG CTA CTA TGC CAT GAA GA, antisense는 AGC CCG AAG TCC GTT ATC TT를 사용하였다. 또한, MITF의 sense primer는 TAG ACA TGC CAG CCA AGT CC, antisense는 CGC TGT GAG CTC CCT TTT TA이었다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG

ACA AA이었으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC이었다. PCR 조건은 94°C 4분, 30 cycles의 (94°C 30초, 59°C 30초, 72°C 45초), 72°C 10분이었다. 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동(Perkin Elmer, USA)하였다. 전기영동 결과 나온 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1 (Media Cybernetics, USA)을 이용하여 구했다.

#### (4) Real time RT-PCR

먼저 시험관에 정량한 RNA 5  $\mu$ g, random hexamer (50 pmol/3  $\mu$ l), 10 mM dNTP 1  $\mu$ l를 넣고 DEPC 처리된 증류수를 가하여 10  $\mu$ l의 RNA/primer mixture를 만들었다. 실험용 sample을 65°C에서 5분간 incubation 시킨 후 1분 이상 얼음물에 방치하였다. Reaction mixture로 10배의 RT buffer 2  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l, 0.1 M DTT 2  $\mu$ l, RNase 1  $\mu$ l을 섞어 준비하였다. Tyrosinase의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT이었으며, antisense는 TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC를 사용하였다. TRP-1의 sense primer는 GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC, antisense는 AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT를 사용하였으며, TRP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT, antisense는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC를 사용하였으며, MMP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT, antisense는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC이었다. PKA의 sense primer는 TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT, antisense는 TATA GGC TGG TCA

GCG AAG AA를 사용하였으며, PKC- $\beta$ 의 sense primer는 AGA ACC ACA AAT TCA CCG CC, antisense는 TGA GAA CCT CTC TGT CGA TG, ERK-1의 sense primer는 ATC AGA TCC TGA GAG GGC TA, antisense는 CAG AGC TTT GGA GTC AGC AT를 사용하였다. Erk-2의 sense primer는 CAT TGT TCA GGA CCT CAT GG, antisense는 AGA GCA TCT CAG CCA GAA TG이었으며, Akt-1의 sense primer는 CCG CTA CTA TGC CAT GAA GA, antisense는 AGC CCG AAG TCC GTT ATC TT를 사용하였다. 또한, MITF의 sense primer는 TAG ACA TGC CAG CCA AGT CC, antisense는 CGC TGT GAG CTC CCT TTT TA이었다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA이었으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC이었다. Reaction mixture를 RNA/primer mixture에 가하여 섞고 실온에 2분간 방치한 후, Superscript II RT 1  $\mu$ l(50 units)를 가하고 25°C에 10분간 incubation 시켰다. 다시 42°C에서 50분간 incubation 시킨 다음, 70°C에서 15분간 가열하여 inactivate 시키고 얼음물에서 식혔다. RNase 1  $\mu$ l를 가하고 다시 37°C에서 20분간 incubation 시킨 다음, 사용시까지 -20°C에 보관하였다. 각각의 optical tube에 2배의 SYBR green mix 12.5  $\mu$ l, cDNA 0.2  $\mu$ l, 5 pmol/ $\mu$ l primer pair mix 1  $\mu$ l, 11.3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O를 넣고, 50°C 2분 1 cycle, 95°C 10분 1 cycle, (95°C 15초, 60°C 30초, 72°C 30초) 40 cycles, 72°C 10분 1 cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸

다음, 반응액 5  $\mu$ l를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정했다. SDS 7000 software를 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다.

### 3. 통계학적 분석

각 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하였다. p<0.05 인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

## III. 실험성적

### 1. 적하수오가 melanocyte의 melanin 유리에 미치는 영향

실험결과 적하수오 추출물(이하 PM)은 300, 150  $\mu$ g/ml의 농도에서 melanin 생성을 현저히(p<0.01) 억제하였으며, 75  $\mu$ g/ml의 농도에서 유의하게(p<0.05) 억제하였다(Fig. 1).

Fig. 1. Inhibitory effects of Polygonum multiflorum(PM) on melanin released from B16F10. Melanin were determined in the culture medium after 72hrs incubation. C :  $\square$ -MSH (10  $\mu$ M)

PM300 :  $\square$ -MSH (10  $\mu$ M) + 300  $\mu$ g/ml of PM

PM150 :  $\square$ -MSH (10  $\mu$ M) + 150  $\mu$ g/ml of PM

PM75 :  $\square$ -MSH (10  $\mu$ M) + 75  $\mu$ g/ml of PM

PM37 :  $\square$ -MSH (10  $\mu$ M) + 37  $\mu$ g/ml of PM

\*\* : p<0.01 vs C, \* : p<0.05

### 2. 적하수오가 melanocyte의 melanin

### 생성에 미치는 영향

실험결과 PM은 300, 150, 75  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 melanin 생성을 현저히( $p<0.01$ ) 억제하였으며, 37  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의하게( $p<0.05$ ) 억제하였다(Fig. 2).

Fig. 2. Inhibitory effects of Polygonum multiflorum(PM) on melanin synthesis in B16F10. Melanin were determined in the cell after 72hrs incubation.

C :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu\text{M}$ )

PM300 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu\text{M}$ ) + 300  $\mu\text{g/ml}$  of PM

PM150 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu\text{M}$ ) + 150  $\mu\text{g/ml}$  of PM

PM75 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu\text{M}$ ) + 75  $\mu\text{g/ml}$  of PM

PM37 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu\text{M}$ ) + 37  $\mu\text{g/ml}$  of PM

\*\* :  $p<0.01$  vs C, \* :  $p<0.05$

### 3. 적하수오가 mushroom tyrosinase 활성에 미치는 영향

실험결과 PM은 300, 150  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 tyrosinase 활성을 현저히( $p<0.01$ ) 억제하였으며, 75  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의하게( $p<0.05$ ) 억제하였다(Fig. 3).

Fig. 3. Inhibitory effects of Polygonum multiflorum(PM) on mushroom tyrosinase

activity in vitro.

C : vehicle

PM300 : 300  $\mu\text{g/ml}$  of PM

PM150 : 150  $\mu\text{g/ml}$  of PM

PM75 : 75  $\mu\text{g/ml}$  of PM

PM37 : 37  $\mu\text{g/ml}$  of PM

\*\* :  $p<0.01$  vs C, \* :  $p<0.05$

### 4. 적하수오가 melanocyte의 tyrosinase 활성에 미치는 영향

실험결과 PM은 300, 150  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 tyrosinase 활성을 현저히( $p<0.01$ ) 억제하였으며, 75  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의하게( $p<0.05$ ) 억제하였다(Fig. 4).

Fig. 4. Inhibitory effects of Polygonum multiflorum(PM) on tyrosinase activity in B16F10 cells.

C :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu\text{M}$ )

PM300 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu\text{M}$ ) + 300  $\mu\text{g/ml}$  of PM

PM150 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu\text{M}$ ) + 150  $\mu\text{g/ml}$  of PM

PM75 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu\text{M}$ ) + 75  $\mu\text{g/ml}$  of PM

PM37 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu\text{M}$ ) + 37  $\mu\text{g/ml}$  of PM

\*\* :  $p<0.01$  vs C, \* :  $p<0.05$  vs C

### 5. 적하수오가 tyrosinase 발현에 미치는 영향

실험결과 tyrosinase는  $\alpha$ -MSH(10  $\mu\text{M}$ ) 처리시 발현이 증가하였으며, PM은 200, 100, 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 증가한 유전자 발현을 현저히( $p<0.01$ ) 억제하였고, 25  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의하게( $p<0.05$ ) 억제하였다(Fig. 5).



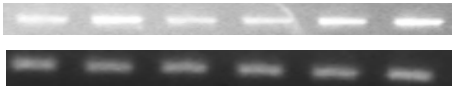


Fig. 5. Effects of Polygonum multiflorum (PM) on the expression of tyrosinase (TRS) in B16F10 cells.

N : Vehicle

C :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)

PM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of PM

PM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of PM

PM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of PM

PM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of PM

\*\* :  $p < 0.01$  vs C, \* :  $p < 0.05$

### 6. 적하수오가 TRP-1 발현에 미치는 영향

실험 결과 TRP-1은  $\alpha$ -MSH(10  $\mu$ M) 처리시 발현이 증가하였으며, PM은 200, 100, 50  $\mu$ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 현저히( $p < 0.01$ ) 억제하였다(Fig. 6).

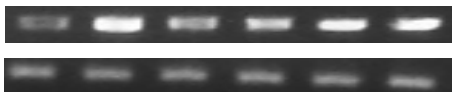


Fig. 6. Effects of Polygonum multiflorum (PM) on the expression of TRP-1 in B16F10 cells.

N : Vehicle

C :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)

PM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of PM

PM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of PM

PM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of PM

PM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of PM

\*\* :  $p < 0.01$  vs C

### 7. 적하수오가 TRP-2 발현에 미치는 영향

실험 결과 TRP-2는  $\alpha$ -MSH(10  $\mu$ M) 처리시 발현이 증가하였으며, PM은 200, 100  $\mu$ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 현저히( $p < 0.01$ ) 억제하였다(Fig. 7).

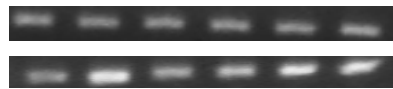


Fig. 7. Effects of Polygonum multiflorum (PM) on the expression of TRP-2 in B16F10 cells.

N : Vehicle

C :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)

PM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of PM

PM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of PM

PM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of PM

PM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of PM

\*\* :  $p < 0.01$  vs C

### 8. 적하수오가 PKA 발현에 미치는 영향

실험 결과 PKA는  $\alpha$ -MSH(10  $\mu$ M) 처리시 발현이 증가하였으며, PM은 200  $\mu$ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 현저히( $p < 0.01$ ) 억제하였으며, 100  $\mu$ g/ml 농도에서 유의하게( $p < 0.05$ ) 억제하였다(Fig. 8).

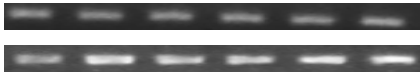


Fig. 8. Effects of Polygonum multiflorum (PM) on the expression of PKA in B16F10 cells.

N : Vehicle

C :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)

PM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of PM

PM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of PM

PM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of PM

PM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of PM

\*\* :  $p < 0.01$  vs C, \* :  $p < 0.05$

### 9. 적하수오가 PKC $\beta$ 발현에 미치는 영향

실험 결과 PKC $\beta$ 는  $\alpha$ -MSH(10  $\mu$ M) 처리시 발현이 증가하였으며, PM은 200, 100, 50, 25  $\mu$ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 현저히( $p < 0.01$ ) 억제하였다(Fig. 9).

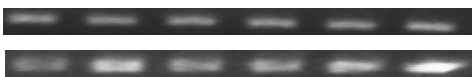


Fig. 9. Effects of Polygonum multiflorum (PM) on the expression of PKC in B16F10 cells.

N : Vehicle

C :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)

PM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of PM

PM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of PM

PM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of PM

PM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of PM

\*\* :  $p < 0.01$  vs C, \* :  $p < 0.05$

### 10. 적하수오가 MMP-2 발현에 미치는 영향

실험 결과 MMP-2는  $\alpha$ -MSH(10  $\mu$ M) 처리시 발현이 증가하였으며, PM은 200, 100, 50  $\mu$ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 현저히( $p < 0.01$ ) 억제하였으나, 25  $\mu$ g/ml 농도에서는 영향을 주지 못했다(Fig. 10).

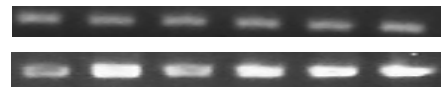


Fig. 10. Effects of Polygonum multiflorum (PM) on the expression of MMP-2 in B16F10 cells.

N : Vehicle

C :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)

PM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of PM

PM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of PM

PM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of PM

PM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of PM

\*\* :  $p < 0.01$  vs C, \* :  $p < 0.05$

### 11. 적하수오가 ERK-1 발현에 미치는 영향

실험 결과 ERK-1은  $\alpha$ -MSH(10  $\mu$ M) 처리시 발현이 감소하였으며, PM은 200, 100  $\mu$ g/ml 농도에서 감소한 유전자 발현을 현저히( $p < 0.01$ ) 증가시켰으며, 25  $\mu$ g/ml 농도에서 유의하게( $p < 0.05$ ) 증가시켰다. 그러나 50 $\mu$ g/ml 농도에서는 영향이 없었다(Fig. 11).

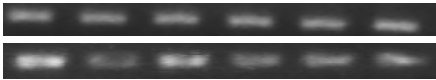


Fig. 11. Effects of Polygonum multiflorum (PM) on the expression of ERK-1 in B16F10 cells.

N: Vehicle  
 C: α-MSH (10 μM)  
 PM200: α-MSH (10 μM) + 200 μg/ml of PM  
 PM100: α-MSH (10 μM) + 100 μg/ml of PM  
 PM50: α-MSH (10 μM) + 50 μg/ml of PM  
 PM25: α-MSH (10 μM) + 25 μg/ml of PM  
 \*\*: p<0.01 vs C, \*: p<0.05

**12. 적하수오가 ERK-2 발현에 미치는 영향**

실험 결과 ERK-2는 α-MSH(10 μM) 처리시 발현이 감소하였으며, PM은 200, 25 μg/ml 농도에서 감소한 유전자 발현을 현저히(p<0.01) 증가시켰다. 그러나 100, 50 μg/ml 농도에서는 영향이 없었다(Fig. 12).

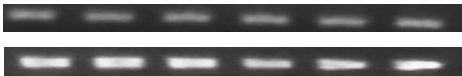


Fig. 12. Effects of Polygonum multiflorum (PM) on the expression of ERK-2 in B16F10 cells.

N : Vehicle  
 C : α-MSH (10 μM)  
 PM200 : α-MSH (10 μM) + 200 μg/ml of PM  
 PM100 : α-MSH (10 μM) + 100 μg/ml of PM  
 PM50 : α-MSH (10 μM) + 50 μg/ml of PM  
 PM25 : α-MSH (10 μM) + 25 μg/ml of PM  
 \*\*: p<0.01 vs C, \*: p<0.05

**13. 적하수오가 AKT-1 발현에 미치는 영향**

실험 결과 AKT-1은 α-MSH(10 μM) 처리시 발현이 감소하였으며, PM은 200, 100, 50, 25 μg/ml 농도에서 모두 α-MSH에 의해 감소한 유전자 발현을 현저히(p<0.01) 증가시켰다(Fig. 13).



Fig. 13. Effects of Polygonum multiflorum (PM) on the expression of AKT-1 in B16F10 cells.

N : Vehicle  
 C : α-MSH (10 μM)  
 PM200 : α-MSH (10 μM) + 200 μg/ml of PM  
 PM100 : α-MSH (10 μM) + 100 μg/ml of PM  
 PM50 : α-MSH (10 μM) + 50 μg/ml of PM  
 PM25 : α-MSH (10 μM) + 25 μg/ml of PM  
 \*\*: p<0.01 vs C

**14. 적하수오가 MITF 발현에 미치는 영향**

실험 결과 AKT-1은 α-MSH(10 μM) 처리시 발현이 증가하였으며, PM은 200, 100, 50, 25 μg/ml 농도에서 모두 α-MSH에 의해 증가된 유전자 발현을 현저히(p<0.01) 감소시켰다(Fig. 14).

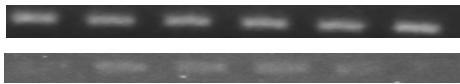


Fig. 14. Effects of Polygonum multiflorum (PM) on the expression of MITF in B16F10 cells.

N : Vehicle

C :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)

PM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of PM

PM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of PM

PM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of PM

PM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of PM

\*\* :  $p < 0.01$  vs C, \* :  $p < 0.05$

## IV. 고 찰

환경오염에 따른 피부의 자외선 노출 증가로 야기되는 피부의 광노화(光老化)는 피부미백에 대한 관심을 증가시키고 있다<sup>1,2)</sup>.

피부가 자외선에 노출되면 멜라닌세포는 그 파장에 따라 즉시형 색소침착과 지연형 색소침착이 발생하는데 주근깨, 기미, 밀크커피색 반점, 모반, 흑자 등<sup>9)</sup>이 이에 해당한다.

한의학에서 색소침착증은 형태와 색조에 따라 먼진(面塵), 먼흑(面黑), 간점(黥點), 작란(雀卵), 반간증(斑點), 염자(鰐子), 작반(雀斑), 흑반(黑斑), 여흑반(鰐黑斑) 등으로 다양하게 표현되어 왔으며<sup>8)</sup>, 피부의 과색소침착증에 대해서는 《黃帝內經·素門》〈至眞要大論〉<sup>3)</sup>에

“歲陽明在天, 燥淫所勝... 面鹿, 身無膏澤, 足外反熱”이라 하여 처음 언급되었다.

자외선 등의 외부 스트레스는 피부각질세포로부터  $\alpha$ -MSH( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone)와 같은 growth hormone과 함께 TGF $\beta$ , PGE<sub>2</sub> 등을 분비하는데, 이러한 cytokine類는 melanocyte에 존재하는 수용체에 결합하여 세포기능을 활성화 시킨다<sup>25)</sup>. 활성화된 melanocyte는 melanosome에서 페놀류의 고분자 물질인 melanin을 합성하는데, 이러한 melanin은 외부 스트레스로부터 피부를 방어하는 기전의 일환으로 작용하게 된다<sup>26)</sup>. Keratinocyte(각질형성세포)에 의해 분비된  $\alpha$ -MSH에 의해 자극을 받은 melanocyte로부터 생성된 melanin은 dendrite 등을 통하여 다시 keratinocyte등에 전해져서 스트레스에 의한 세포상해를 억제하는 작용을 나타내게 한다<sup>27)</sup>.

한약재를 이용한 미백 관련 연구로 이상희<sup>12)</sup>는 마황(麻黃) 및 마풍고(摩風膏)가, 김성옥<sup>13)</sup>은 사백산(瀉白散)이, 손동석 등<sup>14-16)</sup>은 가감서시옥용산(加減西施玉容散)이 미백효과가 있다고 보고하였으며, 이관순 등<sup>17)</sup>은 天花粉 추출물이, 윤화정 등<sup>18)</sup>은 白芨이 멜라닌 생성억제 효과를 가지고 있다고 보고하였다. 또한 하수오에 대한 실험적 연구로 권학철 등<sup>28,29)</sup>은 적하수오의 세포독성 성분에 대하여 보고하였고, Chan 등<sup>30)</sup>은 하수오가 인식능력과 기억력을 향상시킨다고 보고하였다.

적하수오는 마디풀과의 여러해살이풀 何首烏(*Polygonum multiflorum* THUNB.)의 덩이뿌리로, 性은 溫 無毒하고 味는 苦甘澁하며, 補肝益腎 養血祛風의 효능이 있어 肝腎陰虧, 鬚髮早白, 血虛頭暈,

腰膝軟弱, 筋骨痠痛, 遺精, 崩帶 등을 치료하는 데에 활용되고 있다<sup>19-21)</sup>.

저자는 補肝益腎 養血祛風의 효능이 있는 적하수오가 모발이외에 피부에도 영향을 미칠 것으로 사료되어 적하수오의 미백효과를 확인하고자 하였다.

본 연구에서는 적하수오(Polygonum multiflorum) 추출물을 분획한 다음 얻어진  $\text{CHCl}_3$  분획층(PM)을 이용하여 melanin 생성, tyrosinase의 활성 및 melanin 생합성에 관여하는 여러 효소에 미치는 영향과, 이 과정에서 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하였다.

Melanin은 외부 스트레스로부터 피부를 방어하는 기전의 일환으로 melanocyte에서 합성된다<sup>26)</sup>. 그러나 피부미백에 부정적 영향을 주기 때문에 melanin 합성을 차단하기 위한 다양한 시도가 있었다. 본 연구에서는 적하수오 추출물(이하 PM)을 이용하여 melanin 억제를 시도하였다. Melanin 생성세포로는 마우스에서 얻은 흑색종의 일종인 B16F10 melanoma cell을 이용하였다.

실험 결과 B16F10 melanoma cell은  $\alpha$ -MSH(10  $\mu\text{M}$ )를 처리한 경우 정상군에 비해 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양이 현저하게 증가하였다. 그러나 PM은 300, 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유출되는 melanin의 양을 현저하게( $p < 0.01$ ) 억제하였으며, 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의하게( $p < 0.05$ ) 억제 하였다(Fig. 1).

또한 세포내 용액으로부터 melanin을 정량한 결과, PM은 300, 150, 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 melanin 생성을 현저히( $p < 0.01$ ) 억제하였으며, 37  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의하게( $p < 0.05$ ) 억제 하였다(Fig. 2).

Melanin 합성은 melanosome 내에 존

재하는 tyrosinase의 작용을 통해 이루어진다. 이 tyrosinase는 L-tyrosine을 산화시켜 L-DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase로 작용하며, DOPA를 산화시켜 DOPAquinone을 만드는 DOPA oxidase로 작용하여 melanin을 합성하는 중요한 효소로 알려져 있다. 그러므로 melanin 생성을 억제하는 피부 미백제 개발에는 tyrosinase의 활성을 억제하는 것이 필수적이다. 따라서 PM이 melanin 합성을 억제하는 것을 확인하고, tyrosinase 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 mushroom의 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정하였다. Mushroom tyrosinase의 저해제는 tyrosinase 활성부위 구리이온의 상태변화에 관여함으로써 tyrosinase의 산화, 환원과정을 조절할 수 있기 때문에, 버섯 tyrosinase를 이용한 시험관내 tyrosinase 활성억제실험은 피부미백제의 개발에 있어서 유용한 일차 평가법으로 인정되고 있다<sup>31)</sup>. 실험결과 PM은 300, 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 현저한( $p < 0.01$ ) 효소활성 억제를 보였으며, 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의한( $p < 0.05$ ) 억제 효과를 나타냈다(Fig. 3).

약물이 실제로 세포 상태의 tyrosinase 활성을 저해할 수 있는지를 평가하는 것은 중요한 일이다. 실험결과 PM을 300, 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 경우 대조군에 비해 현저한( $p < 0.01$ ) 효소활성 억제를 보였으며, 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의한( $p < 0.05$ ) 억제 효과를 나타냈다(Fig. 4).

본 연구에서는 PM이 melanin 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 tyrosinase의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. 실

험결과 PM은 200, 100, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 현저히( $p < 0.01$ ) 억제하였으며, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의한( $p < 0.05$ ) 억제 효과를 나타냈다(Fig. 5).

TRP-1은 tyrosinase related protein으로 알려져 있는 단백질로서 TRP-2에 의해 생성된 DHICA(5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid)를 oxidation 시켜 IQCA(indole-2-carboxylic acid)를 생성하는데, IQCA는 흑갈색을 나타낸다<sup>32,33</sup>. 따라서 TRP-1, TRP-2 발현을 억제하면 미백효과를 기대할 수 있다. 실험 결과 PM은 200, 100, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 증가한 TRP-1 유전자 발현을 대조군에 비해 현저히( $p < 0.01$ ) 억제하였다(Fig. 6). TRP-2는  $\alpha$ -MSH(10  $\mu\text{M}$ )처리시 발현이 증가하였으며, PM은 200, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 증가한 유전자 발현을 현저히( $p < 0.01$ ) 억제하였다(Fig. 7).

Melanocyte가 활성화되어 melanogenesis가 진행될 때, adenylate cyclase의 활성이 증가하며 cAMP 농도가 증가한다. PKA는 cAMP 의존적 protein kinase로서 각종 효소의 활성을 조절하고, 세포 증식에 관여하는 것으로 알려져 있다. PKA의 활성 증가는 tyrosinase의 인산화와 활성 증가를 유발한다<sup>34</sup>. 따라서 PKA 발현을 억제하는 경우 tyrosinase의 활성화를 방지를 통하여 melanin 생성을 억제하게 된다. 실험결과 PM은 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 증가한 유전자 발현을 현저히( $p < 0.01$ ) 억제하였으며, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 유의한( $p < 0.05$ ) 억제 효과를 나타냈다(Fig. 8).

또한 PKC $\beta$ 는 여러 효소를 인산화하여 활성을 증가시키며, 세포의 증식을

자극하는 효소이다<sup>34</sup>. 따라서 PKC $\beta$ 의 활성이 증가하면 melanocyte의 기능이 증가한다. 실험 결과 PKC $\beta$ 는  $\alpha$ -MSH(10  $\mu\text{M}$ )처리시 발현이 증가하였으며, PM은 200, 100, 50, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 모두 증가한 유전자 발현을 현저히( $p < 0.01$ ) 억제하였다(Fig. 9).

MMP(matrix Metalloproteinase)는 단백질 분해 효소로 세포외부의 matrix를 분해하는 역할을 한다. MMP-2는 gelatinase의 활성을 가지는 효소로 melanocyte가 활성화될 때 발현될 수 있다<sup>35</sup>. 실험 결과 MMP-2는  $\alpha$ -MSH(10  $\mu\text{M}$ )처리시 발현이 증가하였으며, PM은 200, 100, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 증가한 유전자 발현을 현저히( $p < 0.01$ ) 억제하였으나, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 영향을 주지 못했다(Fig. 10).

ERK는 extracellular regulated kinase로 알려져 있는 세포내 신호전달단백질로 유전자 발현을 조절하는 인자로 알려져 있으며, ERK의 발현이 억제되면 melanin 색소 생성이 증가하는 것으로 알려져 있다<sup>36</sup>. 따라서 ERK-1, ERK-2의 발현이 증가하면 색소 생성이 억제될 수 있다. 실험 결과 ERK-1은  $\alpha$ -MSH(10  $\mu\text{M}$ ) 처리에 의해 발현이 억제되었으며, PM을 처리한 경우에는 200, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 감소한 유전자 발현을 현저히( $p < 0.01$ ) 증가시켰으며, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 유의하게( $p < 0.05$ ) 증가시켰다. 그러나 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 영향을 주지 못했다(Fig. 11). 마찬가지로 ERK-2는  $\alpha$ -MSH(10  $\mu\text{M}$ ) 처리에 의해 발현이 억제되었으며, PM을 처리한 경우에는 200, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 감소한 유전자 발현을 현저히( $p < 0.01$ ) 증가시켰다. 그러나 100, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 영향을 주

지 못했다(Fig. 12).

AKT는 ERK, CREB, RSK-1등과 함께 세포 기능을 조절하는 신호전달 단백질로 유전자 발현을 조절하는 인자로 알려져 있다. AKT의 발현이 증가하면 MITF (microphthalmia transcription factor)의 발현이 억제되어 tyrosinase 발현을 억제한다<sup>35,36</sup>. 따라서 AKT-1의 발현이 증가하면 색소 생성이 억제될 수 있다. 실험결과 AKT-1은  $\alpha$ -MSH(10  $\mu$ M) 처리에 의해 발현이 억제되었으며, PM을 처리한 경우에는 200, 100, 50, 25  $\mu$ g/ml 농도에서 모두 감소한 유전자 발현을 현저히 ( $p < 0.01$ ) 증가시켰다(Fig. 13).

MITF는 microphthalmia transcription factor로서 tyrosinase 발현을 조절한다. MITF의 억제는 tyrosinase의 발현억제를 통하여 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다<sup>36</sup>. 실험결과 MITF는  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리에 의해 발현이 증가되었으며, PM을 처리한 경우에는 200, 100, 50, 25  $\mu$ g/ml 농도에서 모두 증가된 유전자 발현을 현저히( $p < 0.01$ ) 감소시켰다(Fig. 14).

이상의 결과를 종합해 보면, PM은  $\alpha$ -MSH(10  $\mu$ M)에 의해 증가되는 melanin 합성에 직접적으로 관여하는 효소인 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 발현을 억제하였고, melanocyte 수준에서의 활성을 억제하여 melanin 합성을 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 작용은  $\alpha$ -MSH에 의해 melanocyte에서 증가되는 PKA, PKC $\beta$ 의 활성 억제와,  $\alpha$ -MSH에 의해 melanocyte에서 발현이 감소하여 tyrosinase 활성을 증가시키고 melanin 생합성을 증가시키는 유전자 조절인자들인 ERK-1, ERK-2, AKT-1의 활성 증가, 그리고

tyrosinase 발현에 관여하는 MITF 발현을 억제하는 작용기전을 통하여 나타나는 것으로 판단된다.

## V. 결 론

적하수오의 미백효과를 확인하기 위한 연구의 일환으로 적하수오(Polygonum multiflorum) 추출물을 분획한 다음 얻어진  $\text{CHCl}_3$  분획층(PM)을 이용하여 melanin 생성, tyrosinase의 활성 및 melanin 생합성에 관여하는 여러 효소에 미치는 영향과, 이 과정에서 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PM은 B16F10 세포의 melanin 생성을 현저히 억제하였다.
2. PM은 tyrosinase의 활성 및 세포내 합성을 현저히 억제하였다.
3. PM은 B16F10 세포에서  $\alpha$ -MSH(10  $\mu$ M)에 의해 증가되는 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2 유전자 발현을 억제하였다.
4. PM은 B16F10 세포에서  $\alpha$ -MSH(10  $\mu$ M)에 의해 증가되는 PKA, PKC $\beta$  발현을 억제하였다.
5. PM은 B16F10 세포의  $\alpha$ -MSH(10  $\mu$ M)에 의해 감소되는 유전자조절 신호전달인자인 ERK-1, ERK-2, AKT-1의 발현을 증가시켰다.
6. PM은  $\alpha$ -MSH(10  $\mu$ M)에 의해 증가되는 B16F10 세포의 MITF의 발현을 억제하였다.

이상의 결과를 종합해 보면, 赤何首烏

는 melanin 합성을 억제하여 미백효과를 내는 것으로 판단된다. 이는 미백효과를 나타내기 위해 적하수오를 단방이나 복합방에 가미하여 활용할 수 있음을 의미하며, 향후 화장품의 재료로도 응용될 수 있으리라고 사료된다.

- 투 고 일 : 2008년 4월 25일
- 심 사 일 : 2008년 4월 29일
- 심사완료일 : 2008년 5월 10일

## 참고문헌

1. Kligman LH. Photoaging manifestations, prevention and treatment, *Dermatol. Clin.*. 1986;4:517-528.
2. 윤재일. 자외선에 의한 피부반응. 방사선방어학회지. 1995;20(3):181-186.
3. 홍원식. 精校 黃帝內經素問. 서울: 동양의학연구원출판부. 1985;11, 295, 296.
4. 巢元方. 巢氏諸病源候論. 서울: 대성문화사. 1992;200.
5. 李 梴. 編註醫學入門(雜病篇). 서울: 대성문화사. 1990;29, 224.
6. 趙 佶. 聖濟總錄. 북경: 인민위생출판사. 1987;1763.
7. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울: 대성문화사. 1990;97, 98, 308, 309.
8. 신연상, 노석선. 기미에 관한 문헌적 고찰. 대한외관과학회지. 1998;11(1):82-98.
9. 대한피부과학회교과서편찬위원회. 피부과학. 서울: 여문각. 2001;8, 9, 409, 533-535.
10. 김중대. 피부관리학. 서울: 고문사. 1994;23-26, 111-113.
11. 김복희. 뉴피부미용학. 서울: 양생의학사. 1998;73, 74, 302-311.
12. 이상희. 麻黃 및 摩風膏의 미백효과에 관한 연구. 경희대학교 동서의학대학원 석사학위논문. 2001.
13. 김성옥. 瀉白散의 미백효과 검정에 관한 연구. 경희대학교대학원 석사학위논문. 1991.
14. 손동석 등. 加減西施玉容散의 미백효과에 관한 연구. 대한안이비인후피부과학회지. 2002;1(2):104-117.
15. 박지선 등. B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 대한 西施玉容散의 효과. 대한동의병리학회지. 2000;14(1):160-170.
16. 전병훈 등. 멜라닌 합성의 신호전달 기전에 미치는 西施玉容散의 효과. 대한동의병리학회지. 2001;15(1):73-83.
17. 이관순 등. 天花粉이 멜라닌 형성에 미치는 영향. 대한외관과학회지. 2001;14(1):209-225.
18. 윤화정 등. 白芨이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향. 대한안이비인후피부과학회지. 2003;16(1):100-111.
19. 전국한외과대학본초학교수. 본초학. 서울: 영림사. 2000;583, 584.
20. 안덕균. 한국본초도감. 서울: 교학사. 1999;675.
21. 한방약리학교재편찬위원회. 한방약리학. 서울: 신일상사. 2005;755, 756.
22. Hosoi J., et al. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by vitamin D3 and retinoic acid, *Cancer Res.*. 1985;45:1474-1478.
23. Mason HS, Paterson EW. Melanoproteins I. Reaction between enzyme-generated quinones and amino acids, *Biochim. Biophys. Acta.*. 1965;111:134-146.



24. Martinez-Esparza M.. Mechanism and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- $\alpha$  in B16F10 mouse melanoma cells,.Eur. J. Biochem.. 1998;225:139-146.
25. Tong X. et al.. Apigenin prevents UVB-induced cyclooxygenase 2 expression: coupled mRNA stabilization and translational inhibition. Mol Cell Biol.. 2007;27(1):283-296.
26. Romero G.C. et al.. J. Clin. Invest.. 1997;99(4):635-642.
27. 손애량, 이승자. 한국미용학회지. 2000; 6(1):239-254.
28. Hak Cheol Kwon et al.. Cytotoxic constituents of Polygonum multiflorum. Yakhak Hoeji. 1999;43(2):169.
29. 권학철, 방은정. 적하수오 101A의 세포독성 사이클로헥시헵타이드 성분. 약학회지. 2000;44(2):115.
30. Chan YC, Cheng FC, Wang MF. Beneficial effects of different Polygonum Multiflorum Thunb. extracts on memory and hippocampus morphology, J. Nutr. Sci. Vitaminol(Tokyo). 2002; 48:491-497.
31. 山孝一 良, Hearing V.J..メラニン産生の制御因子. Fragrance Journal. 1990;6:24-28.
32. Jackson I.J. et al.. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. EMBO J.. 1992;11:519.
33. Jimbow K. et al.. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. British J. Derma.. 2001;144:55.
34. Lee J, Kim YS, Park D.. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. Biochem Pharmacol.. 2007;74(7):960-968.
35. Huang SC et al.. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor- $\kappa$ B and c-Jun.. Biochem. Pharmacol.. 2004;69(2):221-232.
36. Jiménez-Cervantes C. et al.. Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress, transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor. J Cell Sci.. 2004;114(Pt 12):2335-2344.