한방안이비인후피부과학회지 제22권 제2호(2009년 8월)
The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 2009;22(2) : 104-117

α -MSH 유도성 멜라닌 합성에 있어서 황금 추출물의 역할과 작용기전 연구

홍성진 · 김경준
경원대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

Scutellaria baicalensis Georgi(SBG) inhibits Melanin Synthesis in Mouse B16 Melanoma Cells

Sung-Jin Hong · Kyung-Jun Kim

Objective : Melanin is one of the most important facor in skin color. Melanin protects human skin from ultraviolet radiation otherwise it causes melanin pigmentation. So this experiment is carried out for test whether *Scutellaria baicalensis Georgi*(SBG) inhibits melanin synthesis and tyrosinase activity in mouse B16 melanoma cells.

Method : The melanin synthesis inhibition effects of SBG were examined by in vitro melanin production assay. We assessed inhibitory effects of SBG on melanin contents from B16F1 melanoma cell, on tyrosinase activity(cell and cell free system), effect of SBG on the expression tyrosinase, Microphthalmia-associated Transcription Factor(MITF), Extracellular signal-regulated Kinase(ERK).

Result : SBG inhibited melanin synthesis induced α-MSH(α-Melanin Stimulating Hormone) in B16F1. SBG inhibited tyrosinase activity and expression. And SBG down-regulates MITF and stimulated ERK activation in B16F1.

Conclusion : According to above results, SBG was improved its suppression effect to the inhibition of melanin synthesis, tyrosinase activation, and tyrosinase promotor activation. So SBG is considered to be used for an strong source of skin whitening effect.

Key words : *Scutellaria baicalensis Georgi*(SBG), melanin, tyrosinase, Microphthalmia-associated Transcription Factor(MITF), Extracellular signal-regulated Kinase(ERK)

교신저자 : 김경준, 인천광역시 중구 용동 117번지
경원대학교 부속길한방병원 안이비인후피부과
(Tel :032-770-1215, E-mail : kkjo215@hanmail.net)
• 접수 2009/06/29 • 수정 2009/07/30 • 채택 2009/08/03
* 이 논문은 2009년도 경원대학교 교내연구비 지원에 의하여 수행되었음.

서 론

현대사회에 이르러 급격한 산업 발달과 환경오염으로 인해 피부의 자외선 노출이 증가하면서 피부노화에 의한 피부색의 침착이 늘어나고 있는 추세이다. 이와 더불어 피부 착색에 대한 관심이 높아지고 있으며 보다 안정적이고 효과적인 미백 소재를 발견하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다[1,2].

멜라닌은 피부 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌세포(melanocyte)에서 효소 및 비효소적 산화반응에 의해 생성되는데, 외부자극 물질, 특히 자외선으로부터 피부를 보호하는 긍정적인 기능을 가지고 있으나 한편으로 과색소 침착과 같은 부정적 기능도 가지고 있다[3].

이러한 이유로 멜라닌 생성을 억제시키는 물질을 찾기 위해 다양한 연구가 이루어지고 있으며 특히 화학적 물질이 아닌 천연물에서 부작용을 줄이면서 안정성 있는 물질을 찾는 연구가 활발히 이루어지고 있다[4].

지금까지 albutin 및 ascorbic acid와 이들 유도체가 의약부외품과 기능성 화장품의 미백 원료로 사용되고 있으나[5], 피부 투과, 세포독성 및 체형내에서의 안전성 등과 같은 문제점들이 있어 약효가 뛰어나고 안전성이 확보된 천연 한방 성분에 대한 개발의 필요성이 높아지고 있다[6].

황금(*Scutellaria baicalensis Georgi*, 이하 SBG)은 片芩, 枯芩, 子芩, 條芩이라고도 하며, 脣形科에 속하는 여러해살이 풀인 속썩은풀의 근경을 말린 것이다[7]. SBG의 성분으로는 baicalen, neobaicalen, 안식향산, β-sitosterol 등이 있으며 약리효과는 해열작용, 염증억제, 이뇨작용, 위액분비억제 및 항균작용이 있는 것으로 보고되고 있다[8]. 또한 항산화, 항염증, 항암 효과 등의 작용이 있는 것으로 보고되었다[9,10]. 특히 항염증 작용을 이용한 피부질환 치료에 사용되었다[11].

SBG는 지금까지 上焦의 熱을 寫하는 淸熱燥濕 작용만이 부각되어 왔으나 上焦는 面部와도 연관이 있으며 따라서 SBG가 멜라닌 생성 억제와 피부 노화 억제 및 피부 미백 효능이 있을 것으로 사료된다.

이에 본 실험에서는 mouse 유래의 B16F1 melanoma 세포를 이용하여 SBG의 멜라닌 생성 억제에 대한 연구를 수행하였으며, tyrosinase 활성 및 tyrosinase 관련 단백질의 발현을 측정하여 멜라닌 생성 작용 억제 기전에 대해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 SBG는 Omniherb(Korea)에서 구입하여 100 g을 정량 후 80% 에탄올을 가하여 30분 동안 2회에 걸쳐 초음파진동을 이용하여 추출액을 획득하였다. 지름 185 ㎜ 종이여과지(Whatman, Maidstone, England)를 이용하여 감압 여과하였다. 그 후 감압 농축기(Eyela, Japan)를 사용하여 농축한 다음, 동결 건조기(Freezedryer, Matsushita, Japan)로 동결 건조하여 분말을 얻어 DMSO에 녹여 사용하였다.

2) 기기 및 시약

세포 독성 측정 실험에 사용된 MTT 시약은 Sigma aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Tyrosinase 활성 억제 효과 측정 실험에 사용된 mushroom tyrosinase, tyrosine, arbutin, ascorbic acid는 Sigma aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Alpha MSH(α-melanin-stimulating hormone)는

Calbiochem으로부터 구입하여 사용하였다.

Western blot 분석 실험에 사용된 tyrosinase Ab-1(Clone T311, MS-800-P0), Microphthalmia (MiTF) Ab-1 (C5, MS-771-P0) phospho-ERK1/2 (Thr202/ Tyr204, #9101S)는 NeoMarkers (Fremont, CA, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였고 α-tubulin은 Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA)에서 구입하여 사용하였다.

본 실험에 사용된 시약중 LPS, NaCl, KCl, NaH_2PO_4, KH_2PO_4는 Sigma(USA)제품을 사용하였고, Tween 20은 BIO-RAD(USA) 제품을 사용하였다. WBC Count에는 Trypan Blue Solution 0.4%(Sigma Co. USA)을 사용하였고, Haemacytometer는 Superior(Germany)를 사용하였다.

약물추출액은 Rotary Evaporator (Eyela Co., Japan)를 사용해서 건조하였고, 혈액 채취시 사용된 tube는 heparinized capillary tubes(Chase Inc., USA)를 사용하였다. Cytolergy를 측정하기 위해서 DuoSet ELISA Development System(R&D, USA)kit 시약과 ELISA Reader(Merck Co., Germany)를 사용하였다.

3) 세포주

B16F1 melanoma 세포는 한국 세포주 은행에서 분양받아 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS와 Antibiotic-antimycotic이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)배지를 사용하였으며 1일 1회 배지를 교환하였다. FBS는 잔존하는 보체 성분을 불활성화시키기 위해 실온에서 녹인 후 heat inactivation(56℃ water bath에 30분간 가열)하여 사용하였다.

세포를 회수할 때에는 trypsin-EDTA 1ml를 가하여 37℃에서 1분간 반응시켜 세포를 분리하고 배지 4 ㎖를 넣고 원심분리(1,200 rpm, 2분)를 하여 세척한 후 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) MTT assay 를 이용한 세포독성 측정

96well plate에 well당 3x103의 B16F1 melanoma cell을 접종하고 24시간동안 37℃, 5% CO_2 세포 배양기에서 배양한 후 SBG를 각각의 well에 100 ㎍/㎖부터 0.0001 ㎍/㎖까지 10배씩 낮추어 7개의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 여기에 2 ㎍/㎖의 농도로 제조한 MTT 용액을 첨가하고 2시간 후에 ELISA reader로 570 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

2) 멜라닌 생성 측정

멜라닌 함량 측정의 실험방법은 Park[12]의 방법을 기초로 수행하였다. 24well plate에 1x104의 세포를 접종하여 배양하였다. 24시간 후 phenol red 가 들어있지 않은 DMEM (10% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic) 배지에 시료를 0.8 ㎍/㎖, 0.16 ㎍/㎖ 의 농도로 처리해주고 48~72시간 동안 배지의 색깔을 관찰하였다.

α-MSH의 처리에 따른 멜라닌 생성 억제 실험에서는 세포를 위의 기술한 방법과 동일하게 배양한 후 α-MSH를 0.1uM로 처리한 군과 SBG를 0.8 ㎍/㎖에서 100 ㎍/㎖의 농도로 첨가하고 한 시간 후에 α-MSH를 0.1 uM로 처리한 군으로 나누었다. 그 후 48~72시간 동안 배지의 색깔을 관찰하였다.

관찰한 배지는 96well로 옮겨 담아 ELISA reader로 400 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

3) Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성은 Busca R. 등[13]의 방법을 변형하여 측정하였다. 60mm dish에 자란 B16F1 melanoma cell에 α-MSH를 0.1 uM로 처리한 군과 0.8 ㎍/㎖에서 100 ㎍/㎖의 농도의 SBG를 가하고 한 시간 후에 0.1 uM α-MSH를 처리한 군으

로 나누었다.

24시간 배양 후 PBS로 세척하고 1% Triton X-100이 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer(pH6.8)로 lysis하여 10,000×g로 5분간 원심분리 한 후 Bradford assay에 따라 단백질을 정량하였다.

96well plate의 각 well에 90 ㎕의 lysate를 넣고 10mM L-DOPA 10 ul를 넣어준 다음 37℃에서 20분 incubation 한 후 ELISA reader로 475 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

4) Zymography를 이용한 tyrosinase 활성 측정

B16F1 melanoma cell 에 α-MSH를 0.1uM로 처리한 군과, 0.8 ㎍/㎖에서 100 ㎍/㎖의 농도의 SBG를 가한 뒤 한 시간 후에 0.1 uM α-MSH를 처리한 군으로 나누었다.

24시간 배양 후 PBS로 세척하고 1% Triton X-100와 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)가 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer(pH6.8)로 용해하여 10,000×g로 5분간 원심분리 한 후 Bradford assay에 따라 단백질을 정량하였다.

동일량의 lysate와 β-mercaptoethanol이 들어있지 않은 protein sample buffer를 섞어준 후 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 gel에 함유된 tyrosinase의 활성을 측정하기 위해 gel을 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 가볍게 shaking하면서 헹구어 준 다음 30분 후에 fresh buffer로 다시 헹구어 주었다.

Gel을 5 mM L-DOPA가 함유된 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8) 200 ㎖에 넣어 37℃에서 3시간 동안 어둡게 보관 하였다. Tyrosinase 활성은 어둡게 나타나는 melanin-containing band 로 확인하였다.

5) Mushroom tyrosinase 활성 측정

96well micro plate에 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 110 ㎕씩 분주한 후 SBG를 10 ㎕씩 넣는다. 그 후 mushroom tyrosinase(fluka, 93898)를 10 ㎕씩 넣은 다음 7.5 mM tyrosine (sigma, T3754)을 20 ㎕씩 분주 후 잘 섞어 주고 37℃에서 20분간 반응을 시켰다. 신속하게 얼음에서 5분간 방치하여 반응을 중단 시키고, 490 ㎚에서 흡광도를 측정하고 tyrosinase효소 활성 억제율을 구하였다.

$$\text{Inhibition of tyrosinase activity (\%)} = [1-(S-B)/C] \times 100$$

S : 효소액 및 시료용액 첨가 시 흡광도 변화 값
B : 효소액 대신 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 첨가 시 흡광도 변화 값
C : 시료 용액 대신 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 첨가 시 흡광도 변화 값

6) Western blotting

B16F1 melanoma cell에 α-MSH를 0.1 mM로 처리한 군과 0.8 ㎍/㎖ 에서 20 ㎍/㎖ 농도의 SBG를 가한 뒤 한 시간 후에 0.1 uM α-MSH를 처리한 군으로 나누었다.

24시간 배양 후 PBS로 세척하고 RIPA buffer(150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 50 mM Tris (pH8.0), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na_3PO_4, 1 ㎍/㎖ aprotinin, leupeptin, pepstatin)를 사용하여 용해한 후 13,000×g로 20분간 원심분리 하였다.

동량의 단백질(50 ㎍)을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 다음, Trans-blot unit를 사용하여 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane(NC)에 전이(transfer)하였다. 이 NC를 5% non-fat dry milk(0.1% Tween-20을 함유한 Tris buffered saline: TBS-T)로 실온에서 1시간

blocking하고, 1차 항체를 1:1000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시킨 후, NC를 TBS-T로 10분간 3회 세척하였다.

이후, 2차 항체를 1:4,000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 세척 후 ECL detection kit (Amersham)를 이용하여 반응성이 있는 특정 단백질 띠를 찾았다.

3. 통계 처리

실험결과에 대한 모든 분석은 Win PC-SPSS (VER. 8.5) 프로그램으로 실시하였고, 기술통계학적 분석은 각 group의 측정값을 Mean(평균) ± S.E(표준오차)로 요약하였으며, student *t*- test method로 분석하여 α=0.05 level에서 유의성을 인정하였다.

결 과

1. 세포 생존율

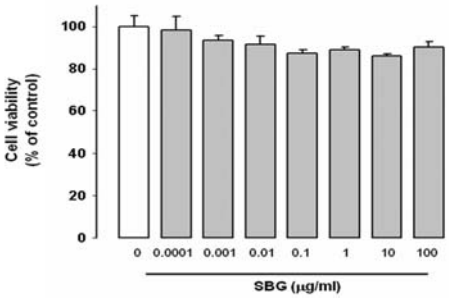

Fig. 1. Effect of SBG on B16F1 cell viability.

Cytotoxicity of *Scutellaria baicalensis Georgi* (SBG) on cultures of B16F1 mouse melanoma cells. Cells treated with SBG at 0.0001-100 ㎍/㎖ for 24 hr. Cell viability was determined using the MTT assays. Results are expressed as a percent viability relative to vehicle-treated controls. Data are shown as the mean of three independent experiments (error bars were shown in mean ± standard error (SE)).

SBG가 melanoma 세포인 B16F1 세포주에 미치는 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay 방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다. Fig. 1 에서 보는 바와 같이, SBG 최고농도인 100 ㎍/㎖에서 90% 이상의 생존율을 보여주었고 통계적인 유의성은 없었다.

2. 멜라닌 생성 억제 효과

B16F1 세포주에서 SBG에 의한 멜라닌 생성 억제 효과를 살펴보기 위하여 분비되는 멜라닌 양을 배양액에서 측정하였다. 우선 배양액만 첨가한 군과 SBG를 농도 별로 첨가한 군으로 나누어 실험하였다. 그 결과, SBG를 첨가하지 않은 군에 비해 SBG를 첨가한 실험군 중 각각 0.8, 0.16 ㎍/㎖의 농도에서 80, 75% 이상의 멜라닌 생성 억제 효과를 보여주었으며 모두 통계적으로 유의하였다.

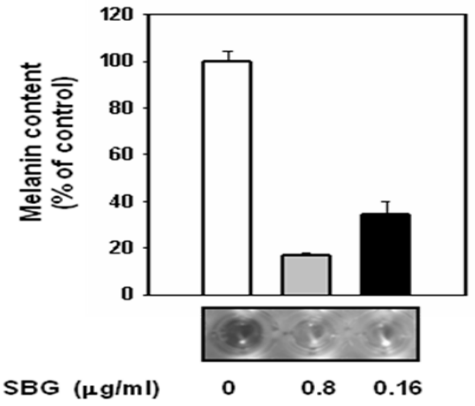

Fig. 2. Effect of SBG on Melanogenesis in B16F1 cells.

The extracellular melanin content of B16F1 cells after treatment with SBG at 0.8 and 0.16 ㎍/㎖ for 72 hr. Data are shown as the mean of three independent experiments (error bars were shown in mean ± standard error (SE)).

3. α-MSH 유도 후 멜라닌 생성 억제 효과

α-MSH 자극에 의한 멜라닌 합성 억제 효과를 검증하기 위하여 배양액만 첨가한 군, α-MSH(0.1mM)를 첨가한 군, α-MSH(0.1 mM)와 SBG를 100, 20, 4, 0.8 ㎍/㎖의 농도 별로 첨가한 군으로 나누어 멜라닌 함량을 측정하였다. 그 결과, α-MSH를 단독으로 첨가한 군에서 멜라닌 함량이 50% 이상 증가하였다. SBG 첨가군에서 멜라닌 생성이 농도 의존적으로 감소하였고 100 ㎍/㎖에서 50%이상의 멜라닌 생성 억제 효과를 보여주었으며 통계적으로 유의하였다.

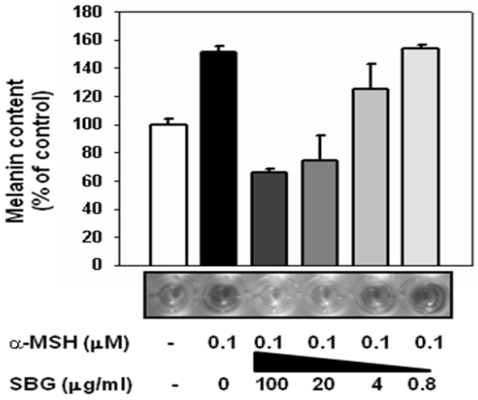

Fig. 3. Effect of SBG on Melanogenesis in B16F1 cells.

Cells were stimulated with α-MSH (0.1 μM) and SBG at 0.8-100 ㎍/㎖ for 72 hr. Data are shown as the mean of three independent experiments (error bars were shown in mean ± standard error (SE)).

4. 세포 내 tyrosinase 활성 억제 효과

SBG의 멜라닌 억제 기전을 규명하기 위하여 tyrosinase activity를 측정하였다. B16F1 세포주의 세포 배양액에 멜라닌 생성 자극 호르몬인 α-MSH 0.1 mM과 SBG를 100, 20, 4, 0.8 ㎍/㎖의 농도로 24시간 처리한 후 tyrosinase 활성을 측정한 결과, Fig. 4와 같이 α-MSH만 처리한 군에서 tyrosinase activity가 2배 증가하였으나 SBG를 처리한 군에서 농도 의존적으로 tyrosinase activity를 억제하였다. 통계적으로 모든 처리군에서 유의하였다.

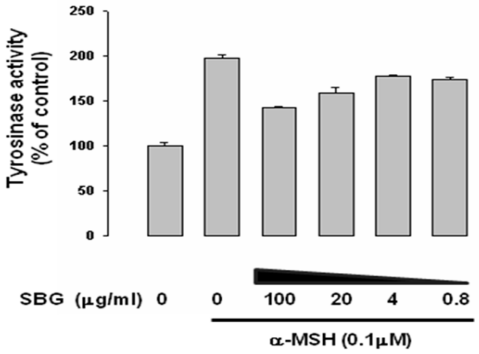

Fig. 4. Effect of SBG on tyrosinase activity and expression

Influence of SBG on the tyrosinase activity and expression of B16F1 mouse melanoma cells after treatment for 72 hr. B16F1 mouse melanoma cells were treated with SBG (0.8-100 ㎍/㎖) and stimulated with α-MSH (0.1 μM). Data are shown as the mean of three independent experiments (error bars were shown in mean ± standard error (SE)).

5. Zymography를 이용한 tyrosinase 활성 억제 효과

SBG가 B16 melanoma 세포 수준에서 tyrosinase 활성 정도를 시각적으로 확인할 수 있는 tyrosinase zymography를 수행하였다[14]. Fig. 5와 같이 100 ㎍/㎖에서 Fig. 4처럼 눈에 띄는 tyrosinase activity의 저해 효과를 확인할 수 있었다.

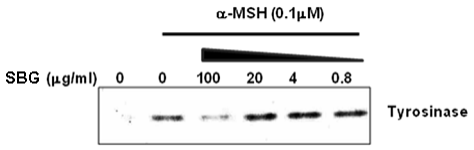

Fig. 5. Effect of SBG on tyrosinase activity and expression

Influence of SBG on the tyrosinase activity and expression of B16F1 mouse melanoma cells after treatment for 72 hr. B16F1 melanoma cells were treated with SBG (0.8-100 ㎍/㎖) and stimulated with α-MSH (0.1 μM).

6. Mushroom tyrosinase 활성 억제 효과

In vitro assay는 L-DOPA와 mushroom tyrosinase를 이용하여 tyrosinase activity 억제효과를 측정하였다. 기질과 효소를 이용한 추출물의 tyrosinase activity 측정 결과 대조군인 kojic acid 만큼 유의한 효과는 나타나지 않았다.

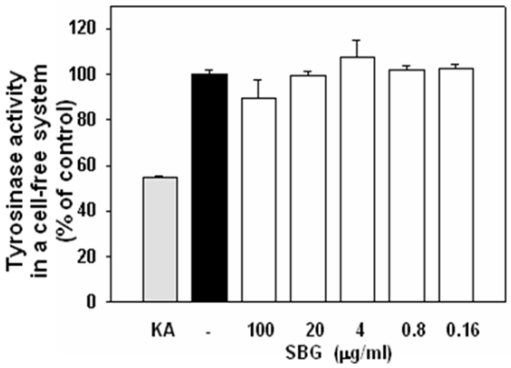

Fig. 6. Effect of SBG on mushroom tyrosinase activity and expression

Influence of SBG on the tyrosinase activity and expression of B16F1 melanoma cells after treatment for 72 hr. B16F1 melanoma cells were treated with SBG(0.16-100㎍/㎖).

KA : kojic acid

7. Tyrosinase 발현 억제 효과

앞의 결과에서 α-MSH 가 멜라닌 생성과 세포 내 tyrosinase activity를 모두 억제하지만 tyrosinase activity를 직접 억제하지 않는 것으로 관찰되었다. 이에 SBG의 tyrosinase 발현 조절을 확인하기 위하여 Western blotting assay를 수행하였다. B16 melanoma 세포에 α-MSH 0. 1mM과 SBG를 20, 4, 0.8 ㎍/㎖의 농도로 24시간 처리한 후 tyrosinase 발현 양을 측정한 결과는 Fig. 7과 같다.

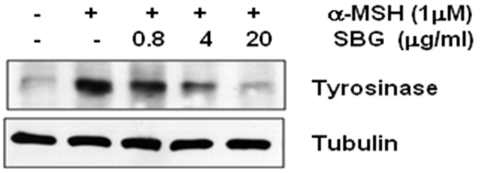

Fig. 7. Effect of SBG on tyrosinase activity and expression in Western blotting assay

Influence of SBG on the tyrosinase activity and expression of B16F1 melanoma cells after treatment for 72 hr. B16F1 melanoma cells were treated with SBG (0.8-20 ㎍/㎖) and stimulated with α-MSH (0.1 μM).

8. MITF 발현 억제 효과

MITF(Microphthalmia-associated Transcription Factor)는 tyrosinase 의 promoter에 결합하여 tyrosinase 발현을 조절하는 transcription factor로 알려져 있다[15]. 따라서 MITF는 tyrosinase 단백질 level을 조절할 수 있으므로 SBG 처치 후 MITF 단백질 level을 확인하였다.

Fig. 8처럼 α-MSH에 의하여 유도된 MITF 발현이 SBG에 의하여 억제되는 것을 확인하였다.

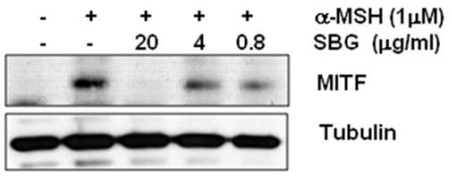

Fig. 8. SBG inhibits MITF in α-MSH stimulated B16F1 cells.

SBG down-regulates MITF activation. Cells were stimulated with α-MSH (0.1 μM) with/without SBG (0.8 and 20 ㎍/㎖) for 72 hr.

9. ERK 활성 효과

SBG가 ERK(Extracellular signal-regulated Kinase)의 활성을 유도하는 것을 확인하기 위하여 ERK 활성을 측정하였다. SBG를 B16F1 세포주에 처리 하였을 때 30분에서 ERK가 발현되는 것으로 보아 SBG가 MITF의 분해 작용을 억제하여 멜라닌 생합성에 직접적으로 관여하는 tyrosinase의 발현을 저해하는 것으로 사료된다.

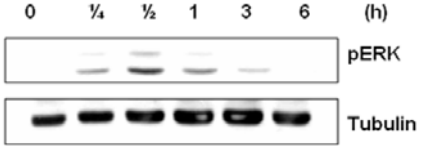

Fig. 9. SBG inhibits the melanogenic proteins expression through the ERK pathway.

SBG down-regulates MITF and ERK activation. After 12 hr of serum starvation, B16F1 cells were treated with 100 ㎍/㎖ of SBG for each experimental time point.

고 찰

피부는 크게 나누어 표피층과 진피층 그리고 피하지방으로 구성되어 있다. 이중 최 상부의 표피층은 세부적으로 각질층, 과립층, 기저층으로 구분되어지는데 각각 다른 기능을 하는 각질형성세포, 멜라닌세포, 랑게르한스세포 등으로 구성되어 있다. 피부의 가장 중요한 기능은 외부 환경으로부터 인체를 보호하고 항상성을 유지하며 내부 장기를 보호하는 등 생명유지를 위한 주요 기능을 수행하는 것이다[16,17].

특히 멜라닌 세포(melanocyte)에서는 피부에 자외선 조사를 감소하기 위해 멜라닌을 생성하게 하여 인체를 보호하는 긍정적 기능을 수행하지만, 반대로 피부암과 같은 피부질환과 과색소 침착증과 같은 미관상의 부정적 작용을 유발시키기도 한다[18].

사람의 피부색은 carotene과 같은 외부적 인자와 각질층의 두께, hemoglobin 및 melanin 등의 내부적 인자에 의해서 결정되며 이중에서 멜라닌이 피부색을 결정하는데 가장 중요한 역할을 한다[19].

멜라닌은 표피의 기저층 사이나 기저층의 아래 모낭 등에서 주로 관찰되는 멜라닌 세포로부터 합성되며, 세포질 돌기를 통해 각질형성세포로 운반되어 표피-멜라닌 단위를 형성한다. 멜라닌 세포 내의 멜라닌 소체(melanosome)에서 생성된 멜라닌 색소는 멜라닌 소체의 수상돌기를 통하여 부근에 인접되어 있는 각질화세포(keratinocyte)로 이동하게 되고, 각질화세포가 외피로 부상하면서 피부색을 나타내게 된다[20]. 각질화세포로 이동된 멜라닌 소체는 자외선에 의한 광노화나 일광각화증으로부터 피부를 보호하는 기능을 하고 있다[21].

멜라닌 소체 내에서의 멜라닌 생성은 주로 tyrosinase의 합성과 이의 전달에 관여하는 세포내 조절인자가 관여하고 있으며, tyrosinase외에 dopachrome tautomarase, peroxidase, catalase, glutatione reductase 등의 효소와 구리, 아연, 철 등의 금속 이온과 interferon(IFN), prostaglandin (PG), histamine 등이 관여하는 것으로 알려져 있다.

피부의 색소 침착은 멜라닌 세포에서 멜라닌 색소의 과잉 생산에 따른 멜라닌 색소의 피부 침착

에 기인한다. 멜라닌 색소는 피부 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌 세포에서 효소 및 비효소적 산화 반응에 의해 tyrosinase로부터 생성되며 표피를 구성하고 있는 각질 세포로 전이된다. 멜라닌 세포는 표피세포, 각질세포 등과 서로 밀접한 세포 간 정보망을 구성하고 있다[22].

멜라닌은 자외선으로부터 피부가 손상되는 것을 방지[23,24]하는데 큰 역할을 하는 반면 멜라닌의 過剩生産은 인체에 기미, 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하며 나아가 피부암의 유발에 관여한다. 멜라닌 생합성은 주로 tyrosinase의 작용에 의해 이루어지는 것으로 보고되어 있다[25].

Tyrosinase는 phenolase, monophenolase, monophenol oxidase, cresolase, monophenol monooxygenase 등으로 불리며, catechol oxidase와는 기능이 유사하여 혼용되기도 한다. Tyrosinase는 한 쌍의 구리이온을 함유하고 있는 금속 단백질 군에 속하며, monophenol의 ortho hydroxylation과 catechols의 D-quinon으로의 산화의 두 가지 반응을 촉매한다[26].

Tyrosinase는 생체내 아미노산인 tyrosine이 L-DOPA가 DOPAquinone으로 산화되는 과정에 관여한다. DOPAquinone은 두 가지 다른 경로를 통해 Pheomelanin과 eumelanin을 생합성하게 되는 중요한 전구물질로 작용하게 된다.

갈색 또는 흑색을 나타내는 멜라닌인 eumelanin을 생성하는 eumelanogenesis를 살펴보면 DOPAquinone이 DOPAchrome으로 변환되고, DOpAchrome이 TRP-2(DOPAchrome tautomerase)에 의해 DHICA (5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid)를 생성하게 된다. DHICA는 TRP-1(DHICAoxidase)에 의해 Indole-5,6-quinone-carboxylic acid(DHICA)가 생성되며 이것이 갈색을 나타낸다. 한편 DOPAchrome이 환원 및 탈탄산 반응에 의해 DHI(5,6-dihydroxyindole)이 생성되고 이것이 DHIoxidase에 의해 Indole-5,6-quinone이 생성되는데 이는 흑색을 나타낸다.

그리고 적색 또는 황색의 색소를 만드는 pheomelanogenesis는 cysterine, glutathine과 같은 황 함유 아미노산이 관여하는 경로이다. 일반적으로 멜라닌이라고 하면 eumelanogenesis에 의해 생성된 eumelanin을 가리킨다[27,28].

최근 피부 미용과 미백에 대한 관심이 늘어나면서 멜라닌 합성과 이에 따른 과색소 침착을 억제하는 미백 소재에 대한 연구가 늘어나고 있다. 미백 효과에 대한 연구는 tyrosinase 활성 억제, DOPA 산화 억제, 각질층 제거 및 자외선 차단에 대한 연구, 세포 독성 억제 연구, 활성 산소 제거에 대한 연구 등으로 이루어지고 있다[29].

이를 크게 세 가지 관점에서 살펴보면 첫째 멜라닌 합성의 주효소인 tyrosinase 활성을 조절하기 위하여 tyrosinase 합성 저해 물질이나 tyrosinase의 기질에 대한 길항 물질을 개발한다. 둘째, 멜라닌 생산성 장소인 melanocyte의 기능을 저하시키기 위해 melanocyte에 독성을 나타내는 물질을 개발한다. 셋째, tyrosinase와 DOPAchrome에서 DHICA로의 변환을 촉매하는 제2효소인 DOPAchrome tautomerase와 DHICA(dihydroxyindole carboxylic acid)에서 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 변환을 촉매하는 제3효소의 활성을 동시에 감소시킨다[30].

현재까지 많은 연구들은 멜라닌 합성과정의 메카니즘을 규명하는데 초점이 맞춰졌으며 이러한 이유로 tyrosinase 저해제 개발에 집중되어 왔다. 현재 tyrosinase 저해제로 잘 알려진 arbutin, kojic acid, vitamin C와 같은 물질들은 tyrosinase 활성도뿐만 아니라 멜라닌 생성과정의 최종 산물인 멜라닌 양까지 억제한다.

그러나 vitamin C는 수용액에서 빨리 산화되고 분해되기 때문에 임상적 사용에는 한계가 있다. Hyroxyanisole, 5-hydroxyindole, hydroquinone 등은 강력한 멜라닌 생합성 저해를 보이지만 멜라

닌 세포의 변성과 치사를 유도하며 세포 본래의 기능을 손상시키는 등 부작용을 나타낸다. 또한 arbutin, kojic acid 등은 의약품이나 미백제로 사용되고 있지만 활성 및 안전성에 문제점이 보고되고 있다[31].

이러한 이유로 멜라닌 생성을 억제하는 새로운 치료제 물질을 찾는 시도가 변하고 있으며 화학적 물질이 아닌 천연물에서 부작용을 줄이면서 안정성 있는 물질을 찾는 연구를 수행하고 있다.

한의학에서는 피부의 과색소 침착증에 대하여 《黃帝內經 · 素問》 〈至眞要大論〉에 "歲陽明在泉, 燥淫所勝, … 面塵, 身無膏澤, 足外反熱"이라고 처음 수록되어 있다[32]. 이후 여러 의가들에 의하여 형태와 색조에 따라 黔黯[33,34], 斑黔黯[34], 黔點[35], 面黔黯[35,36], 雀卵[34,37], 黶子[34,37], 雀斑[34,38], 黑斑[39] 등 다양하게 표현되어 왔고, 최근 중국문헌에서는 색소이상성 피부병의 범주에서 雀斑, 黃褐斑, 黧黑斑 등으로 구분하여 辨證施治하였으며, 치료방법으로는 虛症과 實證으로 각각 辨證하여 內服藥과 外用藥들을 사용하였다[40,41].

과색소 침착질환에 대한 한의학적 원인으로 樓 등[42,43]은 《內徑》의 面塵에 대한 문헌을 인용하여 顔面이 陽明經에 속하므로 陽明之氣의 부족을 그 원인으로 보았으며, 趙 등[35,36]은 巢[44]의 說을 따라 風邪와 痰飮으로 氣血이 不和됨을 원인으로 보았다. 또 李 등[45,46]은 思慮過多와 飮食失節로 인한 脾胃 損傷, 陳[38]은 腎水不足으로 인한 虛火의 발생, 朱[46]는 熱을 주된 원인으로 보았다. 이를 종합하면 內因으로 肝鬱氣滯, 瘀血內停, 腎水不足, 陰虛火旺, 脾胃不和 등을 들 수 있고, 外因으로는 風邪, 濕熱邪, 熱毒 등을 들 수 있다.

황금은 脣形科(Labiatae)에 속한 다년생 본초인 황금(속 썩은 풀, *Scutellaria baicalensis Georgi*)의 根을 건조한 것으로[47,48] 神農本草經 中品에 "主諸熱黃疸, 腸癖洩利, 逐水, 下血閉, 惡瘡疽蝕, 火瘍"이라고 수록된 이래 實火를 寫하고 濕熱을 제거하는 작용이 있어 임상에서 빈용되는 약물 중의 하나이다[48,49].

황금은 생육연도에 따라 형태가 달라지기 때문에 본초의 藥理說이 발달하기 시작한 金元時代부터 내부가 堅實한 新根을 子芩 또는 條芩이라 하였고, 내부가 腐朽한 老根을 枯芩 또는 宿芩이라고 하였으며, 新根은 그性이 下降하여 下焦 大腸火를 寫하고 老根은 그 性이 上昇하여 上焦 肺火를 寫하는 작용이 있는 것으로 구별하여 사용하였다[50,51].

황금의 뿌리에는 baicalein, bacalin, wogonin, wogonoside, neobaicalein이 함유되어 있으며, 안식향산, sitosterol 등도 포함되어 있다. 경엽 속에는 scutellarein이 함유되어 있고, 진황금의 뿌리에는 wogonin, baicalein, wogonoside, hispidulin 등이 주성분으로 함유되어 있다[52].

본 연구에서는 황금 추출물을 B16 흑색종 세포에 처리하여 멜라닌 생성, tyrosinase 활성 및 멜라닌 생합성에 관여하는 여러 효소에 미치는 영향을 관찰하였다.

먼저 SBG가 B16 흑색종 세포의 멜라닌 생성 억제 효과를 알아보기 위해 멜라닌 배양액에 SBG를 농도별로 첨가하여 멜라닌 생성을 측정한 결과 SBG 0.8, 0.16 ㎍/㎖의 농도에서 80%, 75% 이상의 멜라닌 생성을 억제하였다.

또한 α-MSH를 첨가한 B16 세포주에서는 멜라닌 함량이 50% 이상 증가하였으나, SBG 첨가군에서는 멜라닌 생성이 농도 의존적으로 감소하였다(fig. 3).

SBG가 B16 흑색종 세포의 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 SBG 100, 20, 4, 0.8 ㎍/㎖와 α-MSH를 세포배양액에 24시간 처리한 결과 SBG군에서 tyrosinase의 활성이 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 4).

그러나 tyrosinase 활성에 있어 세포 외에서 Mushroom tyrosinase에 대한 억제 효과는 없었다(Fig. 6). 이러한 결과는 SBG가 멜라닌 생성을 억

제하는데 있어서 직접 tyrosinase의 활성을 억제하는 것이 아니라 tyrosinase의 단백질 level을 조절하는 것으로 사료된다.

이에 tyrosinase의 발현을 조절하는 transcription factor인 MITF에 SBG를 처리한 후 단백질 level을 확인한 결과 α-MSH에 의해 유도된 MITF의 발현이 SBG에 의하여 억제됨을 관찰하였다(Fig. 8). 이와 같은 사실에서 α-MSH에 의하여 유도된 tyrosinase의 발현 억제는 SBG에 의한 MITF 발현 감소가 그 원인이라고 사료된다.

마지막으로 실험을 통해 SBG가 B16 세포주에서 ERK를 발현시키는 것을 확인하였다. 최근 논문에 의하면 ERK는 MITF의 분해를 유도한다고 알려져 있다[15]. 따라서 SBG의 처리 후 ERK가 발현되는 것으로 보아 SBG가 MITF의 분해 작용을 유도하여 멜라닌 생합성에 관여하는 tyrosinase의 발현을 억제하는 것으로 사료된다(Fig. 9).

이로써 SBG가 세포내 멜라닌 합성을 억제하였으며, 멜라닌 합성의 주 효소인 tyrosinase의 활성을 감소시키는 것으로 나타났다. 특히 tyrosinase의 생성에 있어서 중요한 역할을 하는 MITF와 그에 관여하는 ERK의 발현을 확인함으로써 멜라닌 생성 억제에 이 두 인자가 가장 큰 역할을 하며 이의 조절을 통해 멜라닌 합성을 조절할 수 있을 것으로 사료된다.

이상으로 SBG가 멜라닌 합성을 억제하는데 가장 중요한 역할을 하는 tyrosinase를 억제하는 효과가 확인되었으므로 피부에 활용할 경우 미백효과를 기대할 수 있고, 기미나 주근깨 등의 과색소 침착증을 치료하는 약물로 활용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

결 론

SBG가 멜라닌 합성에 대한 억제 효과와 조절기전에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. SBG의 tyrosinase 활성과 멜라닌 생성 억제 효과를 측정하고, 멜라닌 합성에 관여하는 효소인 tyrosinase 단백질과 관련 인자인 MITF와 ERK의 발현에 대한 연구를 한 결과, SBG가 α-MSH에 의해 유도된 멜라닌 생성을 유의성 있게 감소 시켰고 tyrosinase 활성에 있어 세포 외에서 Mushroom tyrosinase에 대한 억제 효과는 없었으나 세포 내에 직접 작용하여 tyrosinase를 억제함을 확인할 수 있었다.

멜라닌 생합성에 직접적으로 관여하는 효소인 tyrosinase의 단백질 발현을 확인한 결과, SBG가 tyrosinase 발현 억제에 대한 효과를 나타내었고 이를 조절하는 전사인자인 MITF 또한 효과적으로 억제하였다. 또한 분해효소인 ERK는 MITF를 효과적으로 분해하여 tyrosinase의 작용을 억제하는 결론을 도출해 낼 수 있었다.

이상의 결과, SBG가 피부의 멜라닌 생성을 억제함으로써 미백 활성 물질로써의 가능성을 나타내었다.

Acknowledgement

이 논문은 2009년도 경원대학교 교내연구비 지원에 의한 것입니다.

참 고 문 헌

1. Maeda K, Fukuda M., In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocyte, J. Soc. Cosmet Chem, 1991:42,361-8.
2. Mishima Y., 외. Overview for development

of furture innovative skin whitening agents, Fragrance J. 1996;24:13.

3. Gordon P. R., Mansur C. P., Gilchrest B. A., Regilation of human growth, dendricity and melanization by keratinocyte derived factor, J. Invest, Dermatol, 1989:92,565-72.
4. Ilza V., Huang Ti Nei Ching Su Wen, Univ.California Press, 1966.
5. T, Ikeda and T. Tsutsumi, Fuction and skin depigmental activity of crude drugs , Fragrance J.,1990:6, 56.
6. 김지영, 이연희, 김주연, 노보경, 익모초 추출물의 항산화 작용에 관한 연구. J. soc. Cosmet. Scientists korea, 2005 Jun;31(2):189-96.
7. 신민교, 원색임상본초학. 서울:남산당. 1986:308-9.
8. 新文豊出版公社. 中藥大辭典. 臺北:新文豊出版公社. 1981:158,175-9.
9. Antioxiductive and anti-inflammatory activities of polyhydroxyflavonoids of *Scutellaria baicalensis Georgi.*, Biosci Biotechnol biochem. 2006 Oct;70(10):2371-80.
10. Anticancer activity of extracts derived from the mature roots of Scutellaria baicalensis on human malignant brain tumor cells. BMC Complement Altern Med. 2006 Aug;16(6):27.
11. Inhibition of chronic skin inflammation by topical anti-inflammatory flavonoid preparation. Ato Formula, Arch Pharm Res. 2006 Jun;29(6):503-7
12. Park, S. H., Kim, D. S., Kim, W. G., Ryoo, I. J., Lee, D. H., Huh, C. H., Youn, S. W., Yoo, I. D., and Park, K. C., A New Melanogenesis Inhibitor and its Mechanism, Cell Mol Life Sci. 2004;6:2878-85.
13. Busca R., Bertolotto C., Ortonne J. P., Ballotti R., Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/p70(S6)-kinase pathway induces B16 melanoma cell differentiation. J. Biol. Chem., 1996;271: 31824-30.
14. Sato, K., Takahashi, H., Iraha, R., and Toriyama, M., Down-regulation of tyrosinase expression by acetylsalicylic acid in murine B16 melanoma. Biol Pharm Bull. 2008;31:33-7.
15. Busca, R., and Ballotti, R., Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. Pigment Cell Res. 2008; 13:60-9.
16. Michael H. R., Edward J. R., Histology. A text and Atlas. Haper and Row, Lippincott. 1985:338-48.
17. Elias P. M., Menon G. K., Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier, In: Elias P. M., Havel R. J. and Small D. M., eds., Advances in Lipid Research, New York:Skin Lipids. Academic Press Inc., 1991:1-3.
18. Jimbow K., Fitzpatrick T. B., Wick M Biochemistry and Physiology of melanin pigmentation, In:Goldsmith, L.A., ed., Physiology and Molecular Biology of the skin, New York:Oxford Univ. press. 1991:873-909.
19. Jimbow K, Quevedo WC, Fitzpatrick TB, et al. Biology of melanocyte. In:Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, et al, eds. Dermatology in general medicine, 4th ed. New York:McGraw-Kill Book. 1993:261-84.

20. 박경아 外. 조직학. 서울:고려의학. 1999:405-11.
21. Bloom W, Fawcett DW:A textbook of histology, 11th ed. USA:W.B. Saunders Company. 1986:543-58.
22. 최종원. A study on the antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of uv-b sunscreen and preservative in cosmetic products. 건국대학교 대학원 박사학위논문. 1996.
23. Mishima, Y., Hatta, S., Ohyama, Y., Induction of melanogenesis suppression cellular pharmacology and mode of differential action, Pigment Cell Res., 1988;1:367.
24. Matubara, H., Inhibitory effect of Iichen metabolites and their synthetic analogues on malanin biosynthesis in cultured B-16 mouse melanoma cells, Natural Product Sciences., 1998;4:3.
25. Y. Funasaka, A. K. Chakraborty, M. Komoto, A. Ohashi, and M. Ichihashi. The depigmenting effect of c-tocopherol ferulate on human melanoma cells. British J. Dermatology. 1999;141:20-9.
26. Prota G., Recent advances in the chemistry og melanogenesis in mammals. J. Invest Dermatol. 1990;75(122):31-6.
27. Jackson I.J. et al. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melonogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase, EMBO J., 1992;11:519.
28. Jimbow K. et al. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in viltigo. British J. Derma. 2001;144:55.
29. 하병조. 기능성화장품. 서울:신광출판사. 2001: 66-84, 138-40, 143-7.
30. 김은철 외. 천연물에 포함된 미백성분의 추출 및 미백효과. 한국공업화학학회지. 2005;16(3): 348-53.
31. Dawley R. M., Flurkey W. H., 4-Hexylresocinol aponent inhibitor of mushroom tyrosinase. J. Food. Sci. 1993: 58,609-10.
32. 楊維傑 編. 黃帝內徑 素問. 臺北:樂群出版事業有限公司. 1994:624-79.
33. 陳昭遇 外. 太平聖惠方. 北京:人民衛生出版社. 1986:1208.
34. 許俊. 東醫寶鑑. 서울:南山堂. 1981:211-2.
35. 趙佶. 聖濟總錄. 北京:人民衛生出版社. 1987: 1763.
36. 辛民敎 外. 鄕藥集成方. 서울:영림사. 1989: 1039.
37. 周命新. 醫門寶鑑. 서울:杏林書院. 1975:186-7.
38. 陳實功. 外科正宗. 上海:上海科學技術出版社. 1989:290-8.
39. 顧世澄. 瘍醫大全. 北京:人民衛生出版社. 1987: 479,481-2.
40. 顧伯華 外. 實用中醫外科學. 上海:上海科學技術出版社. 1985:529-30.
41. 楊思樹 外. 中醫臨床大全. 中國:北京科學技術出版社. 1991:923-4.
42. 樓英. 醫學綱目. 서울:대성문화사. 1986:1081.
43. 王肯堂. 證治準繩. 北京:人民衛生出版社. 1991: 824.
44. 巢元方. 巢氏諸病原候論. 서울:대성문화사. 1992:200.
45. 李梴. 偏註醫學入門. 서울:대성문화사. 1990: 29,224.
46. 朱震亨. 丹溪醫集. 北京:人民衛生出版社. 1993: 24.

47. 이상인. 본초학. 서울:수서원. 1981:505-7.
48. 中華人民共和國 衛生部 藥典委員會. 中華人民共和國藥典. 北京:人民衛生出版社. 1977:515.
49. 上海中醫學院. 中華藥學. 香港商:務印書館. 1981:197-220.
50. 徐國龍 外. 常用中藥名辨. 安徽:安徽科學技術出版社. 1981:204-5.
51. 翁雄健. 中藥應用鑒別. 天津:天津科學技術出版社. 1984:34-5.
52. 이상인, 안덕균. 본초학. 서울:영림사. 1992:178.