

삼백초 약침액이 B16F10 흑색종세포의 멜라닌 합성에 미치는 영향

김수경¹ · 김대성¹ · 우원홍^{1,3} · 문연자²

¹원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, ²원광대학교 한의과대학 해부학교실, ³한국전통의학연구소

Effect of *Saururus chinensis* BAILL Extract for Pharmacopuncture on the melanogenesis in B16F10 cells

Soo-Kyung Kim¹, Dae-Sung Kim¹, Won-Hong Woo^{1,3}, Yeun-Ja Mun²

¹Dept. of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine

²Dept. of Anatomy, College of Oriental medicine, Wonkwang University

³Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

Abstract

Objectives : The purpose of this study was to investigate the melanogenesis inhibition effect of *Saururus chinensis* BAILL (SC) on in B16F10 melanoma cells.

Methods : SC was fractionated ethanol extract by the hexane, ethyl acetate, butanol and water. We confirmed the inhibitory effect of tyrosinase activity and melanogenesis of all fraction samples.

Results : Hexane fraction of *Saururus chinensis* BAILL (HSC), ethyl acetate of SC (ESC), and butanol of SC (BSC) were discovered to inhibit tyrosinase activity and melanogenesis in the absence or presence of α -MSH. However, water fraction of SC (WSC) did not affect tyrosinase activity and melanogenesis. In addition, all fractions did not inhibit the catalytic activity of cell-free tyrosinase from B16F10 melanoma cell lines.

Conclusions : These results suggest that HSC, ESC and BSC reduce pigmentation by indirectly regulating tyrosinase.

Key words : *Saururus chinensis* BAILL, tyrosinase activity, melanin, whitening

1. 서 론

태양에 노출된 멜라닌세포는 멜라닌 합성이 증가되고 합성된 멜라닌은 자외선을 차단하여 피부를 보호하는 이로운 작용을 하기도 하지만 과도한 멜라닌 생성이나 분포의 이상으로 인해 기미, 주근깨 및 피부반점이 형성되고 피부노화 및 피부암을

유발하는 것으로 알려져 있다¹⁻³. 멜라닌은 멜라닌 색세포(melanoblasts)가 분화된 이후 멜라닌세포에서 일어나는 복잡한 과정을 통해 생성된다⁴. 멜라닌이 생성되는 생화학적 경로는 tyrosine hydroxylase 활성과 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA) oxidase 활성을 갖고 있는 tyrosinase에 의해 아미노산의 일종인 tyrosine이 dopaquinone으로 전환되는 반응에 의해 시작된다^{5,6}. Tyrosinase 활성을 자극하는 것으로 알려진 경로는 protein kinase C(PKC), cAMP, p38 등이 알려져 있으며, 이 중 cAMP 경로가 멜라닌 합성에 있어 중요한 역할을 하고 있는 것으로

· 교신저자: 문연자, 전북 익산시 신용동 344-2번지
원광대학교 한의과대학 해부학교실
Tel. 063-850-6942, Fax. 063-850-5195
E-mail: yjmun@wku.ac.kr

· 이 논문은 2010년도 원광대학교 교비 지원에 의하여 수행되었음
· 투고 : 2012/02/29 심사 : 2012/03/06 채택 : 2012/03/14

알려져 있다. cAMP를 증가시키는 것으로 알려진 것에는 α -MSH, forskolin, 3-isobutyl-1-methylxanthine 등이 있고, cAMP의 증가는 tyrosinase의 활성 증가와 tyrosinase mRNA의 수준을 증가시킨다^{7,8)}. 이렇듯 tyrosinase 활성 증가는 멜라닌 합성과 밀접한 관계가 있기 때문에 피부 색소침착 방지에 관한 연구는 주로 멜라닌 합성의 주효소인 tyrosinase 활성을 조절하기 위한 tyrosinase 합성 저해물질이나 길항물질을 개발하는 방향으로 연구되어왔다. 최근에는 천연물로부터 tyrosinase 활성저해를 나타내는 제제에 대한 연구와 이를 이용한 제품이 상용화되고 있다.

본 실험에 사용된 삼백초(*Saururus chinensis* BAILL)는 삼백초과(saururuaceae)에 속하는 다년생 초본으로 고산 근처의 습지에서 자생하고, 성질(性)은 차고(寒) 독성이 없으며(無毒) 맛(味)은 쓰고 맵다(苦辛). 귀경(歸經)은 폐(肺) 방광(膀胱)으로 가고, 효능은 청열이수(淸熱利水), 해독소종(解毒消腫)하며 거담(祛痰)한다⁹⁻¹¹⁾. 삼백초의 주요 정유성분은 methyl-n-nonyl-ketone이며, 앞에는 quercetin, quercetrin, isoquercetrin, avicularin, rutin 등이 함유되어 있고, 뿌리에는 아미노산, 유기산, 당류 및 hydrolyzable tannin이 함유되어 있다. 삼백초의 약리작용으로는 해열, 해독, 소염, 소종, 이뇨(利尿) 작용이 있어 소변불리, 수종(水腫), 임질(淋疾), 각기, 간염(肝炎), 황달(黃疸), 폐렴(肺炎), 변독(便毒), 고혈압(高血壓) 및 암종, 대하, 부종, 화농, 말라리아, 열독 등의 치료에 사용된다¹²⁾. 최근 삼백초에 대한 연구로는 항산화효능¹³⁾, 항균¹⁴⁾, 진통¹⁵⁾, 항암¹⁶⁾ 효능이 있는 것으로 보고되었다. 특히 삼백초 에탄올추출물의 미백효능에 대한 보고가 되어져 있었지만¹⁷⁾, 강한 세포 독성으로 인해 기능성 원료로 사용하는데 한계가 있을 것으로 생각되었다. 이에 저자는 삼백초 에탄올추출물의 세포 독성을 줄이고 미백효능을 증진시키기 위하여 용매별 분획을 실시하였고, 각 분획물들의 tyrosinase 활성 억제와 멜라닌 합성 억제 효과를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용된 삼백초(*Saururus chinensis* BAILL)는 경북 영천에서 채배된 것을 한약재시장으로부터 구입한 것을 엄선하여 한의학전문대학원 한약자원개발학과에 보관한 것을 사용하였다.

2) 시약

Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS)은 Gibco(NY, USA)사 제품을, dimethylsulfoxide(DMSO), α -melanocyte stimulating hormone(α -MSH), thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT), L-3,4-dihydroxyphenyl alanine(L-DOPA)은 Sigma사 제품을, 단백질 정량 시약은 Bio-Rad(CA, USA)사 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

진조된 삼백초 200 g에 100% 에탄올 2 l를 가하여 7일 동안 실온에서 추출한 것을 거즈로 여과하고 감압 농축 하여 11.31 g(수율 5.66%)의 시료를 얻었다. 추출물 중 7.24 g을 물 700 ml에 현탁한 다음 동량의 헥산을 넣어 분획하고, 이를 3회 반복하여 얻은 헥산분획을 감압농축 및 동결건조하여 헥산분획물 1.63 g을 얻었다. 동일한 방법으로 에틸아세테이트분획물(2.72 g) 및 부탄올분획물(0.63 g)을 얻었고, 물분획물은 2.16 g을 얻었다.

2) 세포 생존율 측정

세포생존율 측정은 Mosmann의 방법¹⁸⁾에 의하여

실시하였다. 24-well 배양 용기에 B16F10 세포를 5×10^3 개씩 분주하고 24시간 배양 후 삼백초 분획물을 여러 농도로 처리한 다음 37°C, 5% CO₂ 하에서 3일간 배양하였다. 배양 후 0.25 mg/ml MTT 용액을 넣어 3시간 배양한 다음 상층액을 제거하고, 형성된 formazan을 DMSO 1 ml로 녹여서 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) Tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 등의 방법¹⁹⁾으로 측정하였다. 6-well 배양용기에 B16F10 세포를 8.5×10^4 개씩 분주하여 24시간 배양한 후, 삼백초 분획물을 처리하고 1시간 후 α -MSH(10 nM)를 처리하였다. 3일간 배양 후 PBS로 2회 세척하고, 5 mM EDTA가 포함된 0.1 M sodium phosphate buffer(SPB, pH 6.8) 1 ml에 1%(V/V) triton X-100과 0.1%(V/V) 0.1 M PMSF를 혼합한 lysis buffer를 200 μ l씩 분주하고 세포를 수거하여 얼음에서 30분간 용해시킨 다음 4°C, 15,000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford 시약으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 동량의 단백질 양을 계산하였으며, 계산된 단백질과 0.1 M SPB(pH 6.8)의 총량이 150 μ l가 되도록 분주 하고 0.1%(W/V) L-DOPA를 50 μ l씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시켰으며, 30분 간격으로 475 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

4) 멜라닌 합성량의 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등의 방법²⁰⁾을 변형하여 사용하였다. 직경 6 cm 배양용기에 1.5×10^5 개씩 분주하여 24시간 배양한 후, 삼백초 분획물을 처리하고 1시간 후 α -MSH(10 nM)를 처리한 다음 3일간 배양 하였으며, 각 군당 2×10^6 개씩 수거하여 lysis buffer(5 mM EDTA, 0.1 M SPB(pH 6.8), 0.1%

triton X-100)로 세포를 용해하였다. 원심분리 하여 얻은 세포 침전물은 알코올로 세척한 후 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액으로 90°C에서 1 시간 용해하여 475 nm로 흡광도를 측정하였다.

5) DOPA 염색

B16F10 세포를 chamber slide에 5×10^3 개씩 분주한 후 24시간 배양하고, 삼백초 분획물을 처리한 다음 1시간 뒤 α -MSH(10 nM)를 처리하였다. 3일 동안 배양 후 4% formalin 용액으로 30분간 고정하고 PBS로 3회 세척한 다음 0.1% L-DOPA와 실온에서 4시간 반응 시켰다. PBS로 2회 세척하고 10% formalin 용액으로 30분간 고정한 후 PBS로 2회 세척 하고 에탄올로 탈수시킨 다음 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

6) Cell-free tyrosinase 활성 측정

B16F10 세포를 10 cm 배양용기에 3×10^5 개씩 분주하여 4일간 배양하여 세포를 수거하고, 5 mM EDTA가 포함된 0.1 M sodium phosphate buffer(SPB, pH 6.8) 1 ml에 1%(V/V) triton X-100과 0.1%(V/V)의 0.1 M PMSF를 혼합한 lysis buffer로 용해하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성 측정에 사용하였다. 이 상층액에 삼백초 분획물을 농도별로 처리한 후 L-DOPA를 넣고 37°C에서 30분 간격으로 1시간동안 475 nm로 흡광도의 변화를 측정하였다.

7) 통계처리

실험 결과는 student's t-test를 이용하여 p-value를 구하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 *(#)로 표기하였고 $p < 0.01$ 인 경우 **(##)로 표기하여 유의성을 나타내었다.

III. 실험결과

1. 삼백초 분획물이 세포증식에 미치는 영향

각각의 삼백초 분획물이 세포증식에 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 하였다. 삼백초 헥산분획물(Hexane fraction of *Saururus chinensis* BAILL; HSC)과 에틸아세테이트분획물(Ethyl acetate fraction of *Saururus chinensis* BAILL; ESC)은 0.0625에서 1 $\mu\text{g/ml}$ 까지, 부탄올분획물(Butanol fraction of *Saururus*

chinensis BAILL; BSC)과 물분획물(water fraction of *Saururus chinensis* BAILL; WSC)은 1에서 20 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리하고 3일간 배양하였다. 세포 생존율은 MTT를 처리하여 570 nm로 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율로 나타내었다. 삼백초 헥산분획물은 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $82\pm 1.5\%$ 의 생존율을 보인 반면, 에틸아세테이트, 부탄올, 물분획물은 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

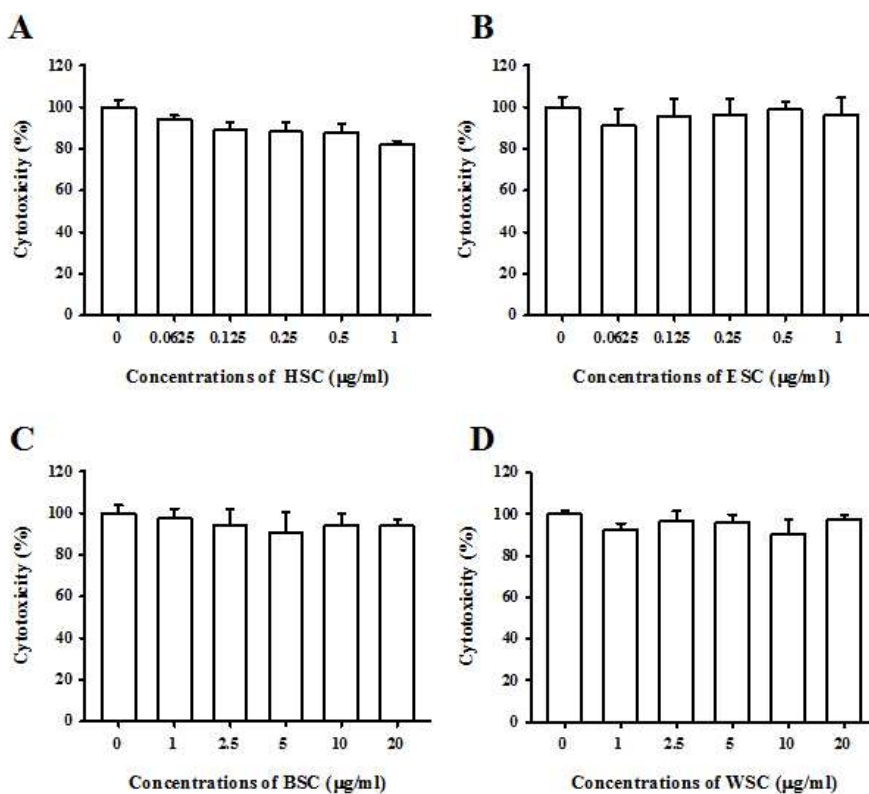


Fig. 1. Effects of hexane fraction of *Saururus chinensis* BAILL (HSC) (A), ethyl acetate fraction of SC (ESC) (B), butanol fraction of SC (BSC) (C), and water fraction of SC (WSC) (D) on the cell viability.

Cells were plated at 5×10^3 cells/well and incubated with HSC, ESC, BSC, and WSC for 72 hours. Cell viabilities were measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.D. of three experiments performed in triplicate.

2. 삼백초 분획물이 세포내 tyrosinase 활성에 미치는 영향

삼백초 분획물의 멜라닌 합성 억제 효과

삼백초 분획물들이 세포내 tyrosinase 활성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위하여 삼백초 핵산분획물과 에틸아세테이트분획물은 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하고, 부탄올분획물과 물분획물은 1, 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 다음 3일간 배양하여 세포내 tyrosinase 활성을 측정하였다. 핵산분획물은 농도 의존적으로 tyrosinase 활성이 현저하게 감소되었으며 각각의 농도별로 93 \pm 4.4%,

79 \pm 3.4%, 54 \pm 4.1%, 39 \pm 2.2%, 35 \pm 3.3%로 측정되었고 (Fig. 2A), 에틸아세테이트분획물은 47 \pm 4.2%, 36 \pm 3.1%, 32 \pm 2.1%, 33 \pm 5.1%, 31 \pm 4.1%로 tyrosinase 활성을 억제하였다(Fig. 2B). 부탄올분획물은 각각 105 \pm 4.4%, 93 \pm 4.7%, 82 \pm 3.4%, 70 \pm 2.7%, 47 \pm 3.1%로 농도 의존적인 tyrosinase 활성 억제 효과를 나타냈다(Fig. 2C). 그러나 물분획물은 세포내 tyrosinase 활성 억제 효과가 나타나지 않았다(Fig. 2D).

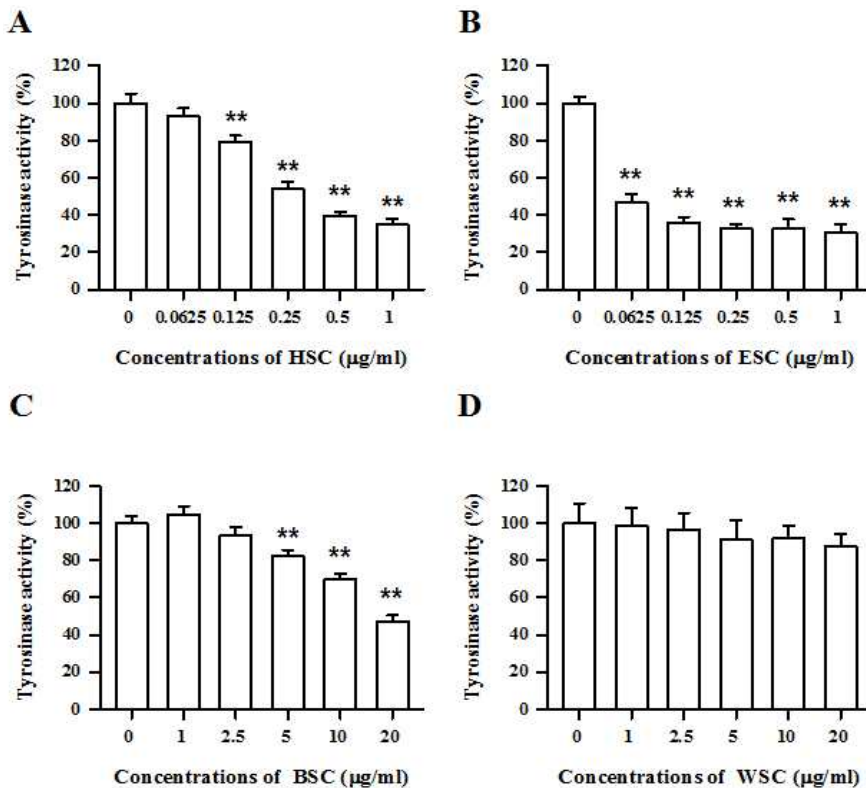


Fig. 2. Effects of HSC (A), ESC (B), BSC (C), and WSC (D) on tyrosinase activity in B16F10 cells.

The effect on tyrosinase activity was tested with several concentrations of HSC, ESC, BSC, and WSC for 3 days. Results are expressed as percent of control. Each column represents the means \pm S.D. of triplicate determinations. **P<0.01 compared with the control.

3. 삼백초 분획물이 α -MSH로 자극된 tyrosinase 활성에 미치는 영향

Tyrosinase 활성은 cAMP 생성을 자극하는 α -MSH에 의해 활성이 증가한다. 본 실험에서는 B16F10

세포주에 α -MSH를 처리한 후 증가된 tyrosinase 활성에 삼백초 분획물들이 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 삼백초 핵산분획물은 α -MSH 단독 처리군이 $197 \pm 10.0\%$, α -MSH와 핵산분획물 0.125, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 병용처리 군에서 각각 $131 \pm 3.8\%$ 와 $119 \pm 4.1\%$ 로 유의성 있게 tyrosinase 활성을 억제시켰다(Fig. 3A). 삼백초 에틸아세테이트분획물은 α -MSH 단독 처리군이 $197 \pm 10.0\%$, α -MSH와 에틸아세테이트분획물 0.0625, 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 병용처리 군에서 각각 $132 \pm 3.1\%$

와 $113 \pm 2.7\%$ 로 tyrosinase 활성을 현저하게 억제시켰다(Fig. 3B). 삼백초 부탄올분획물은 α -MSH 단독 처리군이 $202 \pm 2.2\%$, α -MSH와 부탄올분획물 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 병용처리 군에서 각각 $169 \pm 3.6\%$ 와 $147 \pm 1.2\%$ 로 유의성 있게 tyrosinase 활성을 억제시켰다(Fig. 3C). 그러나 삼백초 물분획물은 α -MSH로 증가된 tyrosinase 활성을 억제하지 못하였다(Fig. 3D).

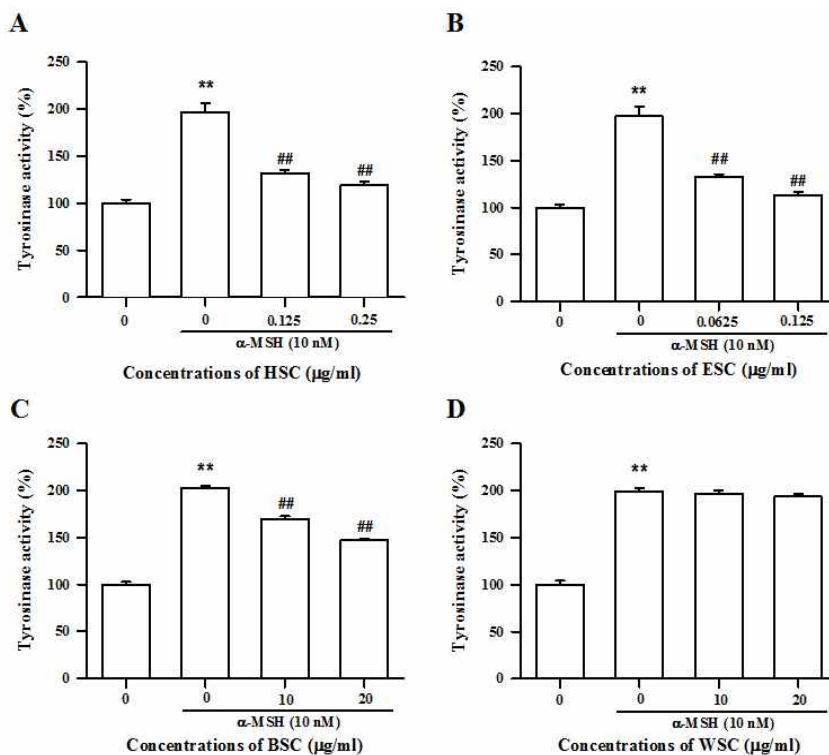


Fig. 3. Effects of HSC (A), ESC (B), BSC (C), and WSC (D) on tyrosinase activity in B16F10 cells stimulated with α -MSH.

Cells were treated with several concentrations of HSC, ESC, BSC, WSC and α -MSH (10 nM) for 3 days. Tyrosinase activity was measured as described in materials and method. Results are expressed as percent of control. Each column represents the means \pm S.D. of triplicate determinations. **P<0.01 compared with the control, and #P<0.01 compared with the α -MSH.

4. 삼백초 분획물이 멜라닌 생성에 미치는 영향

삼백초 분획물의 멜라닌 합성 억제 효과

멜라닌 합성 초기단계에서 중요한 역할을 하는 tyrosinase 활성은 삼백초 헥산분획물과 에틸아세테이트분획물에서 효과적으로 억제되었고, 부탄올분획물에서는 앞선 두 분획물 보다 높은 농도인 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서 비슷한 수준의 억제효과를 나타냈다. 이러한 결과를 바탕으로 tyrosinase에 의해 촉매 되는 반응의 최종 산물인 멜라닌의 합성 양에 삼백초 분획물들이 어떠한 영향을 미치는지 측정하고자 하였다. B16F10 세포에 각각의 분획물들을 농도별로 처리한 후 세포내에서 합성된 멜라닌 합성량을 측정한 결과 대조군 $100\pm 5.2\%$ 와 비교하여 삼

백초 헥산분획물은 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $82\pm 12.3\%$ 로, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $70\pm 8.1\%$ 로 유의성 있게 멜라닌 합성을 억제하였다(Fig. 4A). 삼백초 에틸아세테이트분획물은 0.0625 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $68\pm 6.5\%$ 로, 0.125 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $57\pm 5.1\%$ 로 현저하게 멜라닌 합성을 억제하였다(Fig. 4B). 삼백초 부탄올분획물은 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $86\pm 3.3\%$ 로, 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서 $69\pm 3.0\%$ 로 유의성 있는 결과를 나타냈다(Fig. 4C). 그러나 삼백초 물분획물은 tyrosinase 활성 조사 결과와 마찬가지로 멜라닌 합성을 억제하지 못하였다(Fig. 4D).

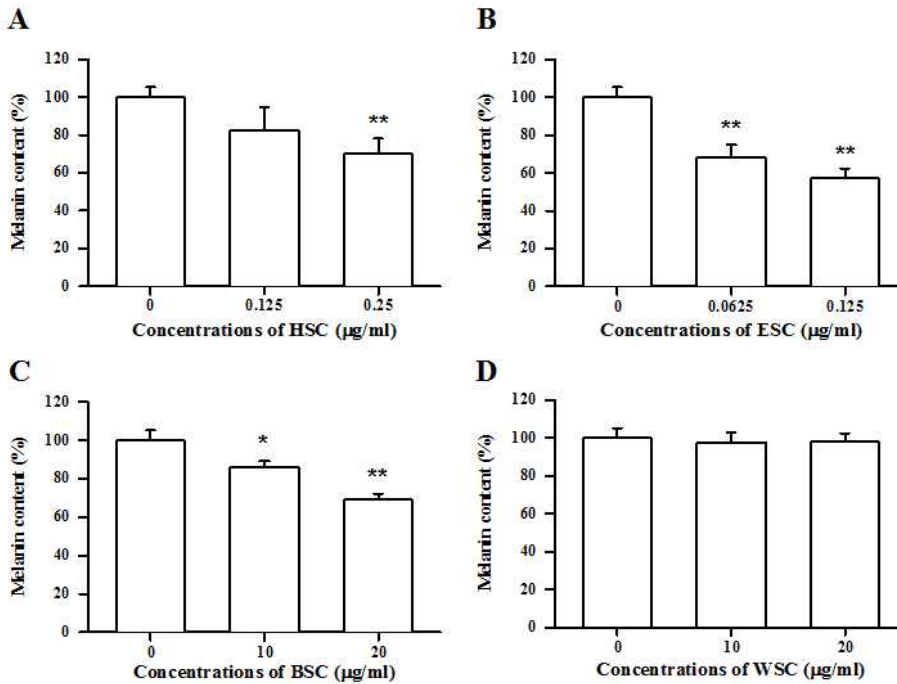


Fig. 4. HSC (A), ESC (B), BSC (C), WSC (D) decreased the melanin synthesis in B16F10 cells. The cells were cultured with 0.125 and 0.25 $\mu\text{g/ml}$ HSC for 3 days. The melanin contents were measured in B16F10 cells. The results are averages of triplicate experiments, and the data are expressed as means \pm SD. ** $p < 0.01$ compared with the control.

5. 삼백초 분획물이 α -MSH로 증가된 멜라닌 생성에 미치는 영향

삼백초 분획물이 α -MSH로 증가된 멜라닌 합성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다. 실험 결과 α -MSH 단일 처리군은 대조군에 비해 $302 \pm 16.6\%$ 로 약 3배로 멜라닌 합성이 증가한 반면 삼백초 핵산분획물 $0.125 \mu\text{g/ml}$ 에서 $190 \pm 44.8\%$, $0.25 \mu\text{g/ml}$ 에서 $155 \pm 22.6\%$ 로 멜라닌 합성을 현저하게 감소시켰다(Fig. 5A). 삼백초 에틸아세테이트분획물은 $0.0625 \mu\text{g/ml}$ 에서 $184 \pm 28.1\%$, $0.125 \mu\text{g/ml}$ 에서 $139 \pm 24.8\%$ 로 가장 좋은 멜라닌 합성 억제효과

를 나타냈다(Fig. 5B). 삼백초 부탄올분획물은 $10 \mu\text{g/ml}$ 에서 $251 \pm 5.9\%$, $20 \mu\text{g/ml}$ 에서 $220 \pm 16.8\%$ 로 유의성 있는 멜라닌 합성 억제효과가 관찰되었다(Fig. 5C). 삼백초 물분획물은 $10, 20 \mu\text{g/ml}$ 에서 멜라닌 합성에 영향을 미치지 않았다(Fig. 5D). 이상의 결과 네 가지 분획물중 세 가지 분획물에서 멜라닌 합성 억제효과가 관찰되었으며 에틸아세테이트>핵산>부탄올 분획물 순으로 멜라닌 합성 억제효과를 보였다.

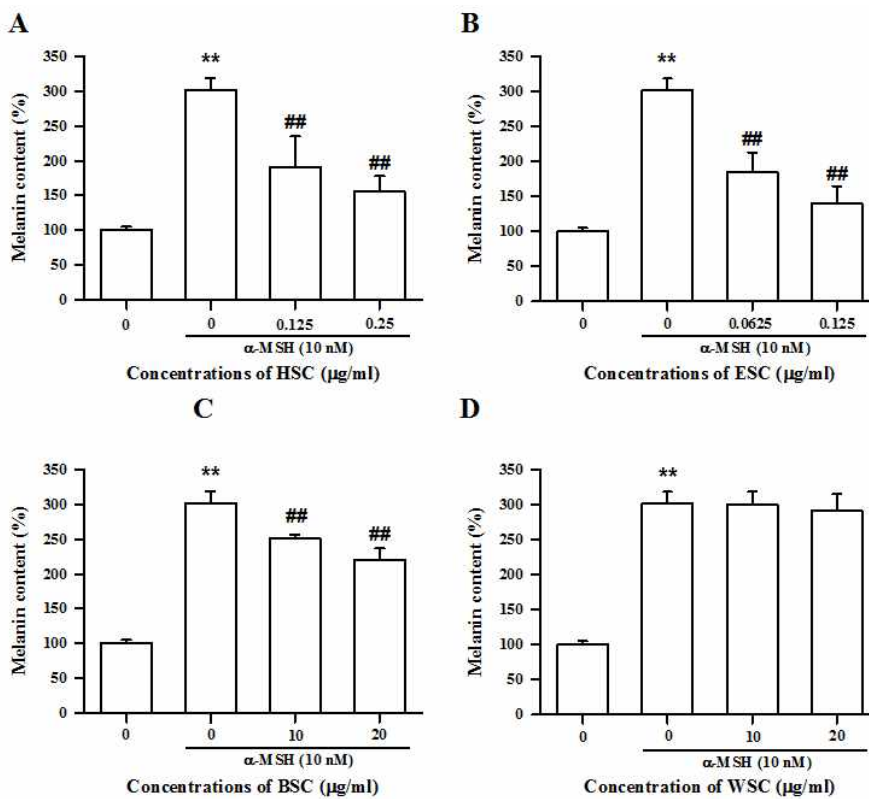


Fig. 5. Effects of HSC (A), ESC (B), BSC (C), and WSC (D) on melanin content in B16F10 cells stimulated with α -MSH.

Cells were seeded 3×10^5 cells/dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of HSC, ESC, BSC, WSC and α -MSH (10 nM) for 3 days. Melanin contents were measured as described in materials and method. Data are expressed as percent of control. Each determination was made in triplicate; the data shown represent means \pm S.D. #P<0.01 compared with the control, and **P<0.01 compared with the α -MSH.

6. DOPA 염색에 의한 삼백초 추출물의

tyrosinase 활성 억제 효과 관찰

삼백초 분획물의 멜라닌 합성 억제 효과

삼백초 분획물의 tyrosinase 억제 활성을 세포 수준에서 관찰하기 위하여 DOPA 염색을 시행하였다. 삼백초 핵산분획물은 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군 보다 멜라닌 합성이 감소된 것을 관찰할 수 있으며, α -MSH 단독 처리군에서 증가된 수지상 돌기와 멜라닌 합성이 α -MSH와 삼백초 핵산분획물 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 감소된 것을 관찰할 수 있었다. 삼백초 에틸아세테이트분획물이 처리된 세포는 대조군 보다 멜라닌 합성이 현저하게 감소하였을 뿐만 아니라 α -MSH 처리로 증가된 멜라닌

합성과 발달된 수지상 돌기를 현저하게 감소시켰다. 삼백초 부탄올분획물 또한 멜라닌 합성과 수지상 돌기를 감소시켰다. 그러나 삼백초 물분획물은 B16F10 세포에 영향을 미치지 않고 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 삼백초 분획물 중 핵산, 에틸아세테이트, 부탄올 분획물이 B16F10 세포의 멜라닌 합성과 수지상 돌기 감소 효과를 관찰할 수 있었으며, 이 중 삼백초 에틸아세테이트분획물이 가장 좋은 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다.

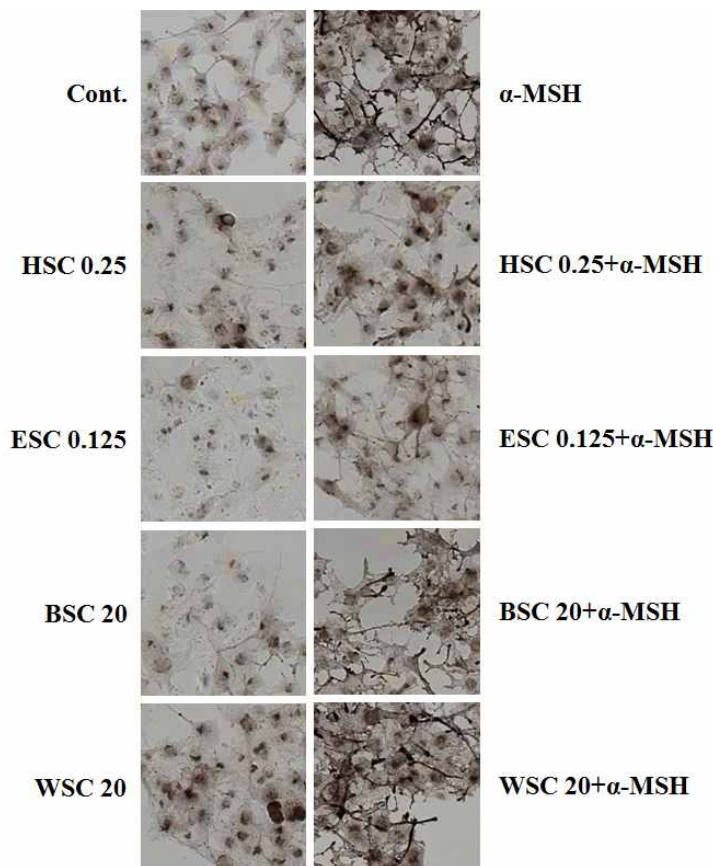


Fig. 6. Observation of tyrosinase activity by DOPA stain after treated with HSC, ESC, BSC, WSC, and α -MSH in B16F10 cells.

B16F10 cells were incubated with HSC and α -MSH. After 3 days, cells were stained with DOPA as described in materials & methods. ($\times 200$).

7. Cell free tyrosinase 활성 측정

삼백초 핵산추출물이 tyrosinase에 직접적으로 작용하여 효소의 활성을 억제시키는 것 인지 알아보기 위하여 기본 조건 하에서 배양된 B16F10 세포를 용해하여 tyrosinase 활성도 측정에 사용될 효소를 얻었다. 세포로부터 분리한 tyrosinase에 삼백초 핵산분획물 0.25 $\mu\text{g/ml}$, 에틸아세테이트분획물 0.125 $\mu\text{g/ml}$, 부탄올분획물 20 $\mu\text{g/ml}$, 물분획물 20 $\mu\text{g/ml}$, kojic acid 50 $\mu\text{g/ml}$ 를 각각 처리하고 DOPA oxidation 활성을 측정된 결과 삼백초 분획물 처리군들은 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았은 반면 kojic acid 처리군은 40 \pm 2.2 %의 tyrosinase 억제 활성을 보였다(Fig. 7). 이상의 실험 결과 삼백초 분획물은 tyrosinase에 직접적으로 작용하기 보다는 세포내 대사과정에 영향을 주어 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성을 억제하는 것이라 추측할 수 있다.

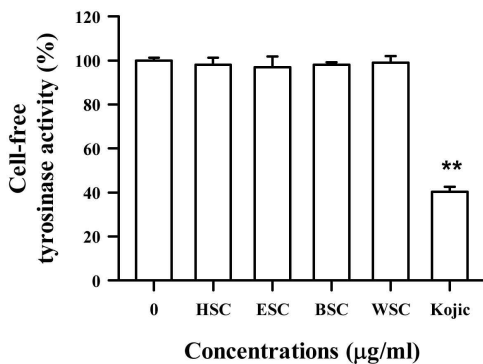


Fig. 7. Effects of HSC, ESC, BSC, and WSC on the tyrosinase activity in a cell-free system.

To test their direct effects on tyrosinase, B16F10 tyrosinase activity was measured in a cell-free system, as described in materials and methods. HSC 0.25 $\mu\text{g/ml}$, ESC 0.125 $\mu\text{g/ml}$, BSC 20 $\mu\text{g/ml}$, WSC 20 $\mu\text{g/ml}$, and kojic acid 50 $\mu\text{g/ml}$ were added to each well. Results are the averages of triplicate experiments \pm S.D. ****p<0.01** compared to the untreated control.

IV. 고 찰

멜라닌의 과잉 생산은 기미, 주근깨 등을 형성하고, 피부노화를 촉진하며 피부암 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 부정적인 작용을 예방하거나 치료하려는 목적으로 tyrosinase 활성 억제에 효과가 있는 미백제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 기존의 몇 가지 멜라닌 합성 억제제가 활성 및 안전성에 문제점을 가지고 있는 것으로 밝혀지면서 환경 친화적이고 피부 안정성이 우수한 한방화장품의 개발이 활발해지고 있다. 현재까지 천연물에서 분리된 멜라닌 생성 억제 물질로는 감초에서 분리된 formononetin, glabrene, glabridin, glabrol, 누룩곰팡이(*Aspergillus oryzae*)의 이차대사산물인 kojic acid, 우바우르시엽(Uvae Ursi Folium)의 arbutin, 상백피의 oxyresveratrol, dihydromoriin, artocarbene, 4-prenyloxyresveratrol 등이 알려져 있다²¹⁻²⁴. 그 외에도 더덕²⁵, 천화분²⁶, 백출²⁷, 사삼²⁸, 인진쑥²⁹, 교맥³⁰ 등의 식물추출물이 멜라닌 합성 억제효능이 있다고 보고되었다.

한의학에서는 피부를 구성하는 세포 하나하나가 각각 독립된 기관을 갖고 있으면서 인접한 세포 및 내부 장기와 상호 유기적 체계를 이루며, 皮毛 피부와 汗腺·豪毛 등의 조직을 포괄하며 體表에 해당한다. 『黃帝內經·素問』 「五臟生成篇」에서 “肺之合皮也 其榮毛也 其主心也” 하였으니, 肺는 皮毛에 상합하고 이는 心이 주관하게 된다. 또한 『黃帝內經·靈樞』 「本臟篇」에서는 “衛氣者 所以溫分肉 充皮膚 肥腠理 可開闔者也”라 하여 피부는 衛氣의 작용에 의해 이루어지고 위기는 肺의 宣發作用에 의해 이루어진다. 하지만, 肺의 宣發作用은 간의 疎泄作用을 통해 정상적으로 유지되어 氣機가 通暢되므로, 氣血이 조화롭게 되고 經絡도 通利하여 피부를 윤택하게 할 수 있는 것이다. 이 외에도 피부는 체내 여러 장기와 연관되어 있기 때문에, 이러한 관점에서 피부의 氣血 循環을 고려해야 한다.

멜라닌 합성은 합성 과정 초기에 작용하는

tyrosinase에 의해 시작되기 때문에 tyrosinase 활성 억제를 주 표적으로 하는 멜라닌 합성 억제제를 찾기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는 삼백초 에탄올추출물 7.24g을 4가지 용매로 분획을 실시하였고 hexanefraction 1.63g, ethylacetatefraction 2.72g, butanolfraction 0.63g, waterfraction 2.16g의 시료를 얻었다. 각각의 분획물들이 B16F10 세포에 미치는 독성을 조사한 결과 hexanefraction은 처리 농도 중 가장 고농도인 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $82 \pm 1.5\%$ 의 생존율을 보였고 실험 농도도 잡은 0.125, 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 각각 $89 \pm 3.6\%$, $88 \pm 4.3\%$ 의 생존율을 보였다. 그러나 ethylacetatefraction, butanolfraction, waterfraction은 대조군과 비교하여 유의적인 차이는 보이지 않았다. 멜라닌 합성 초기단계에서 속도조절 효소로 작용하는 tyrosinase의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 삼백초 hexanefraction, ethylacetatefraction, butanolfraction은 농도의존적인 tyrosinase 활성 억제 효과를 나타냈지만, 삼백초 waterfraction은 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

α -MSH는 cAMP경로를 통해 전사인자인 MITF의 발현을 증가시켜 tyrosinase의 생성을 증가시키는 것으로 잘 알려져 있다. 과색소침착성 삼백초 분획물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 α -MSH로 자극하여 tyrosinase 활성을 조사한 결과 B16F10 세포에 α -MSH를 처리하였을 때 대조군 보다 tyrosinase 활성이 현저하게 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 이렇게 증가된 tyrosinase 활성은 삼백초 hexanefraction, ethylacetatefraction, butanolfraction에서 효과적으로 tyrosinase 활성을 억제하였다. 그러나 삼백초 waterfraction은 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 이러한 삼백초 분획물의 tyrosinase 활성 억제 효과가 tyrosinase에 대한 직접적인 억제 작용 때문인지 알아보기 위하여 cell-free tyrosinase 활성 측정법을 이용하였다. 배양된 세포로부터 tyrosinase를 추출하여 삼백초 분획물을 효소에 직접 처리함으로써 각각의 분획물이 tyrosinase에 대한 직접적인 억제 효과를 측정하였다. 실험 결과 세포내 tyrosinase

활성을 효과적으로 억제하였던 삼백초 hexanefraction, ethylacetatefraction, butanolfraction은 tyrosinase 활성에 대하여 직접적인 억제 활성은 없는 것으로 나타난 반면 양성 대조군으로 사용한 kojic acid는 tyrosinase 활성에 직접적인 억제 효과를 나타냈다.

멜라닌은 UV에 노출된 피부를 보호하는 작용을 하기도 하지만 과도한 생성은 기미, 주근깨, 피부 노화, 어두운 피부 톤 등의 미용상 좋지 않은 영향을 미친다. 이러한 멜라닌 생성을 삼백초 분획물이 B16F10 세포내에서 멜라닌 합성을 조절하는지 알아보았다. 삼백초 hexanefraction, ethylacetatefraction, butanolfraction은 세포내 tyrosinase 활성 억제 효과와 같은 경향으로 세포내 멜라닌 합성을 억제하였다. 또한 α -MSH 처리로 증가된 멜라닌 합성도 현저하게 억제하였다. 그러나 삼백초 waterfraction은 세포내 멜라닌 합성량을 조절하지 않았다. 이러한 결과를 세포 수준에서 관찰하기 위하여 DOPA 염색을 실시한 결과 삼백초 hexanefraction, ethylacetatefraction, butanolfraction은 대조군 보다 멜라닌 합성이 감소된 것을 관찰 할 수 있으며, α -MSH 단독 처리군에서 증가된 수치상 돌기와 멜라닌 합성이 α -MSH와 삼백초 분획물 병용 처리군에서 현저하게 감소된 것을 관찰 할 수 있었다. 그러나 삼백초 waterfraction은 B16F10 세포에 영향을 미치지 않고 있음을 세포 수준에서 관찰 할 수 있었다.

최근 삼백초 뿌리로부터 분리된 saucerneol D와 삼백초 메탄올추출물 분획물 중 ethylacetatefraction에서 분리된 Manassantin A가 cAMP로 유도된 멜라닌 합성 증가를 억제한다고 보고되었다³¹⁻³³). 본 연구에서는 삼백초 에탄올추출물 분획이 멜라닌 합성에 미치는 영향에 대하여 조사하였으며, 이전 보고와 비교했을 때 비슷한 경향을 보였으나 멜라닌 합성 억제효능을 보인 농도가 현저하게 낮아졌고 ethylacetatefraction 뿐만 아니라 hexanefraction과 butanolfraction의 미백 효능도 증가되었다. 삼백초의 성분으로 알려진 quercetin이 mushroom tyrosinase 활성을 억제하는 것으로 알려져 있지만

강한 세포독성을 갖고 있고^{34,35)}, rutin이 C57BL/6 마우스에서 melanoma의 전이를 억제하고 멜라닌 생성을 억제한다고 보고하였다³⁶⁾. 비록 분획물 중 어떠한 성분이 미백효능을 상승시킨 것인지 조사하지는 않았지만 메탄올 추출 보다 에탄올 추출 방법이 미백효능과 관련된 성분을 추출하는데 더욱 효과적인 것으로 생각된다.

이상의 결과 삼백초 분획물 중 핵산, 에틸아세테이트, 부탄올 분획물이 세포내 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성을 억제할 뿐만 아니라 세포독성이 없음을 확인할 수 있었다. 세 분획물의 미백 효능은 에틸아세테이트분획물>핵산분획물>부탄올분획물 순으로 나타났다. 그러나 삼백초 물분획물은 미백 효능이 없는 것으로 조사되었다. 따라서 삼백초에 존재하는 미백 물질은 핵산, 에틸아세테이트, 부탄올 분획물에 존재하며, 이중 에틸아세테이트 분획물에 가장 많이 함유되어 있을 것으로 생각되며, 삼백초 분획물의 멜라닌 합성 억제효과가 어떠한 기전을 통한 것인지 더욱 깊이 있는 조사가 필요할 것이다.

V. 결 론

세포 독성이 적으면서 멜라닌 합성을 감소시키고, tyrosinase 활성을 억제하는 천연물질의 탐색을 위한 연구의 일환으로 삼백초 에탄올추출물을 핵산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물로 분획을 실시하여 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다. 삼백초 분획물 중 핵산, 에틸아세테이트, 부탄올 분획물이 세포독성 없이 세포내 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성을 억제함을 알 수 있었다. 또한 세 가지 분획물의 미백 효능은 에틸아세테이트분획물>핵산분획물>부탄올분획물 순으로 나타난 것으로 미루어 에틸아세테이트분획물에 미백효능을 나타내는 물질이 가장 많이 존재할 것으로 판단된다. 또한 멜라닌 합성 억제 기전을 밝히기 위하여 추가적인 연구가 필요하다.

감사의 글

이 논문은 2010학년도 원광대학교 교비 지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

1. Bell AA, Weeler MH. Biosynthesis and function of fungal melanin, *Ann Rev Phthopathol.* 1986 ; 24 : 411-51.
2. Chen JS, Wei C, Marshall MR. Inhibition mechanism of Kojic acid on polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem.* 1991 ; 39 : 1897-901.
3. Urabe K, Aroca P, Tsukamoto K, Mascagna D, Paulumbo A, Prota G, Hearing VJ. The inherent cytotoxicity of melanin precursors. *Biochim Biophys Acta.* 1994 ; 1221 : 272-8.
4. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev.* 2004 ; 84(4) : 1155-228.
5. Ferguson CA, Kidson SH. The regulation of tyrosinase gene transcription. *Pigment Cell Res.* 1997 ; 10(3) : 127-38.
6. Hearing VJ, Tsukamoto K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 1991 ; 5(14) : 2902-9.
7. Wong G, Pawelek J. Melanocyte-stimulating hormone promotes activation of pre-existing tyrosinase molecules in Cloudman S91 melanoma cells. *Nature.* 1975 ; 255 : 644-6.
8. Hunt G, Todd C, Creswell JE, Thody AJ. Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle 4DPhe 7 alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J Cell Sci.* 1994 ; 107 : 205-11.

9. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울 : 영림사. 2004 : 371-2.
10. 국가중의약관리국중화본초편찬위원회. 중화본초. 상해 : 상해과학기술출판사. 1999 : 419-20.
11. 정보섭 외1인. 향약대사전. 서울 : 영림사. 1990 : 812-14.
12. Koh MS. Antimicrobial activity of *Saururus chinensis* Baill Extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2004 ; 33(7) : 1098-105.
13. Cho HY, Cho CW, Song YS. Antioxidative and Anti-Inflammatory Effects of *Saururus chinensis* Methanol Extract in RAW 264.7 Macrophages. *J Med Food.* 2005 ; 8 : 190-7.
14. Koh MS. Antimicrobial Activity of *Saururus chinensis* Baill Extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2004 ; 33 : 1098-105.
15. 박시경 외. 삼백초의 진통성분. 약학회지. 1998 ; 42 : 238-42.
16. 서훈석, 정봉환, 조용구. 쥘신나물, 삼백초의 항산화와 항암활성 효과. 한국약용작물학회지. 2008 ; 16 : 139-43.
17. 박대중, 이장천. 삼백초 에탄올추출물의 항산화능 및 피부 미백작용 연구. 대한본초학회지. 2008 ; 23 : 193-202.
18. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 ; 65(1-2) : 55-63.
19. Martínez-Esparza M, Jiménez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, García-Borrón JC. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem.* 1998 ; 255(1) : 139-46.
20. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 1985 ; 45(4) : 1474-8.
21. Nerya O, Vaya J, Musa R, Izrael S, Ben-Arie R, Tamir S. Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *J Agric Food Chem.* 2003 ; 51(5) : 1201-7.
22. Department of Food Science, Agricultural Research Organization, Bet Dagan, Israel. Effect of kojic acid on the oxidation of L-DOPA, norepinephrine, and dopamine by mushroom tyrosinase. *Pigment Cell Res.* 1995 ; 8(5) : 234-40.
23. Chakraborty AK, Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 1998 ; 11(4) : 206-12.
24. Shin NH, Ryu SY, Choi EJ, Kang SH, Chang IM, Min KR, Kim Y. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 ; 243(3) : 801-3.
25. 이승연, 김진만, 오현철, 임숙정, 황충연, 문연자, 우원홍. 더덕추출물이 멜라닌생성에 미치는 영향. 대한한의학 방제학회지. 2002 ; 10(2) : 199-211.
26. 문연자, 이성원, 임숙정, 송채석, 이관순, 임규상, 우원홍. 천화문 수추출물이 B16 흑색종 세포의 멜라닌 생성 억제 효과. 한국전통의학지. 2000 ; 10(2) : 149-59.
27. 천현자, 최은영, 윤성찬, 남항우, 백승화, 우원홍. 백출의 에탄올 추출물에 의한 melanin 생성 억제 효과. 약학회지. 2001 ; 45(3) : 269-75.
28. 임난영, 권강주, 김윤석, 백순기, 임주락, 문연자, 우원홍. 사삼메탄올 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과. 동의생리병리학회지. 2004 ; 18(3) : 747-53.
29. 신기돈, 김대성, 이장천, 문연자, 우원홍, 이영철. 인진 에탄올추출물이 α -MSH로 유도된 과색소 형성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2009 ; 23(3) : 574-80.

30. 노성택, 김대성, 이성진, 박대중, 이장천, 임규상, 우원홍, 문연자. 교맥 에탄올 추출물의 피부 미백기전 연구. 동의생리병리학회지. 2007 ; 21(5) : 1243-9.
31. Yun JY, Roh E, Son JK, Lee SH, Seo CS, Hwang BY, Han SB, Kim Y. Effect of saucerneol D on melanin production in cAMP-elevated melanocytes. Arch Pharm Res. 2011 ; 34(8) : 1339-45.
32. Seo CS, Lee WH, Chung HW, Chang EJ, Lee SH, Jahng Y, Hwang BY, Son JK, Han SB, Kim Y. Manassantin A and B from *Saururus chinensis* inhibiting cellular melanin production. Phytother Res. 2009 ; 23(11) : 1531-6.
33. Lee HD, Lee WH, Roh E, Seo CS, Son JK, Lee SH, Hwang BY, Jung SH, Han SB, Kim Y. Manassantin A inhibits cAMP-induced melanin production by down-regulating the gene expressions of MITF and tyrosinase in melanocytes. Exp Dermatol. 2011 ; 20(9) : 761-3.
34. Chen QX, Kubo I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. J Agric Food Chem. 2002 ; 50(14) : 4108-12.
35. Nitoda T, Isobe T, Kubo I. Effects of phenolic compounds isolated from *Rabdosia japonica* on B16-F10 melanoma cells. Phytother Res. 2008 ; 22(7) : 867-72.
36. Drewa G, Schachtschabel DO, Pałgan K, Grzanka A, Sujkowska R. The influence of rutin on the weight, metastasis and melanin content of B16 melanotic melanoma in C57BL/6 mice. Neoplasma. 1998 ; 45(4) : 266-71.