

側柏葉 메탄올 추출물이 멜라닌 형성에 미치는 영향

이수형 · 홍석훈 · 황충연 · 김남권*

원광대학교 한의과대학 안이비인후과학교실

Effect of Methanolic Extract from *Biota Orientalis Folium* on Melanin Synthesis

Soo Hyeong Lee, Seok Hoon Hong, Chung Yeon Hwang, Nam Kwen Kim*

Department of Ophthalmology Otolaryngology and Dermatology, Wonkwang University

Recently many efforts were focused to understand the mechanical insights of melanogenesis to develop the agents for hyper-pigmentation and hypo-pigmentation. In the melanin bio-synthetic pathway, tyrosinase is the rate limiting enzyme, and α -melanocyte stimulating hormone(MSH) stimulates melanogenesis and enhances the melanin synthesis and the tyrosinase activity. The author has analyzed the effects of *Biota Orientalis Folium* on the basal melanogenic activities of B16 mouse melanoma cells, and on the α -MSH or tyrosinase-induced melanogenesis. *Biota Orientalis Folium* alone markedly suppressed melanin content and tyrosinase activity in a dose-dependent manner. The decrease of cell propagation was observed in B16 cells treated with 200 $\mu\text{g/ml}$ dose of *Biota Orientalis Folium*, indicating that *Biota Orientalis Folium*-induced depigmenting effect was caused by inhibition of melanin synthesis, not due to destruction of B16 cells. Pretreatment of the cells with *Biota Orientalis Folium* also suppressed the increase of α -MSH (10 nM) induced melanin content and tyrosinase activity. *Biota Orientalis Folium* inhibited the revelation of α -MSH induced tyrosinase protein and tyrosinase related protein and mRNA of tyrosinase in B16 melanoma cell. These results suggest that *Biota Orientalis Folium* inhibits melanogenesis and abrogates α -MSH and tyrosinase-induced melanogenesis in B16 melanoma cells.

Key words : melanogenesis, *Biota Orientalis Folium*, depigmenting effect

서 론

피부색은 멜라닌 세포에서 만들어지는 멜라닌의 양에 의해서 주로 결정되며, 혈색소, 카로틴같은 색소 성분과 혈관분포, 각질층의 두께 등에 의해서도 영향을 받는다. 멜라닌 세포는 표피 주구성 세포중의 하나로서, 멜라닌 세포로부터 합성된 멜라닌은 세포질 돌기를 통해 각질형성세포로 운반되어 표피-멜라닌 단위를 형성한다¹⁾. 멜라닌의 합성은 세포의 유전적 요인과, 대사, 내분비, 염증, 감염, 종양 등과 같은 물리적 및 화학적 요인들에 의해 좌우되고, 이런 원인들로 인해서 멜라닌 합성에 이상이 생기면, 기미나 주근깨 같은 과색소 침착증이나 백반증 같은 저색소 침착증이 나타난다²⁾.

韓醫學 文獻에는 皮膚의 과색소 침착증에 대해 《黃帝內經·素問》³⁾ <至真要大論>에 “歲陽明在天,燥淫所勝...面靨,身無膏澤,足外反熱”이라 하여 처음 收錄되었고, 이후 여러 醫家들은 發疹의 形態와 原因에 따라 黧黧, 面黑, 雀斑 등으로 다양하게 언급하였다^{4,5)}. 저색소 침착증은 隨代 巢元方의 《諸病源候論》⁶⁾ <白癩候>에 “白癩者 面及頸項身體皮肉色變白 與肉色不同 亦不痒痛 謂之白癩 此亦是風邪搏於皮膚血氣不和所生也.”라 하여 처음 언급된 이래로 여러 文獻에서 白駁風, 白癩風, 白癩, 駁白, 斑白, 斑駁 등으로 기록되었다⁷⁾.

側柏葉은 涼血止血, 止咳化痰, 生肌, 殺蟲, 烏鬚髮 등의 效能이 있어 風冷歷節, 吐血, 衄血, 咯血, 便血, 肺熱咳嗽, 湯火傷, 凍瘡, 鬚髮早白 등을 치료하는데 사용된다고 하였다⁸⁾.

최근 관심이 증가되고 있는 피부의 미백에 대해서는, tyrosinase 저해제로 잘알려진, 4-hydroxyanisole, 5-hydroxyindole 및 hydroquinone 등의 강력한 멜라닌 생합성 저해활성 물질들을 받

* 교신저자 : 김남권, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대학교 산본한방병원
· E-mail : drkim@wonkwang.ac.kr, · Tel : 031-390-2671
· 접수 : 2005/03/31 · 수정 : 2005/05/09 · 채택 : 2005/06/02

견 하였지만, 색소세포의 변성 또는 치사를 일으키고 세포본래의 기능을 손상시키는 등의 부작용이 있으며¹⁾, kojic acid, arbutin 등 이미 상품화되어 화장품, 식품 등에 사용되는 미백제도 활성 및 안전성에 문제점이 있는 것으로 보고되고 있으므로⁹⁾, 강력하면서도 안전한 멜라닌 생합성 저해물질의 개발이 요구되고 있다.

피부의 멜라닌 형성에 관한 단일 한약재의 실험 연구로, Morita 등¹⁰⁾은 태자삼의 뿌리로부터 tyrosinase와 멜라닌 생성을 억제하는 cyclic peptide인 pseudostellarin A, B, C, D, E, F, G를 분리 보고하였으며, 朴 등¹¹⁾은 白朮이 α -MSH에 의하여 활성화되는 JNK활성을 억제시키고, AP-1과 같은 전사활성인자(transcriptional activator)를 不活性化시켜 멜라닌 量의 생성을 抑制시켰다고 보고하였다. B16 melanoma 세포의 멜라닌 생성 억제 대해서는 윤 등¹²⁾의 백급 추출물, 강 등¹³⁾의 사삼 물 추출물을 이용한 실험 보고들이 있다.

側柏葉에 대한 실험 연구로는 이 등¹⁴⁾의 側柏葉 藥鍼이 止血 效果에 미치는 影響과 김 등¹⁵⁾의 側柏葉의 diterpenes 성분에 대한 보고가 있으며, 송¹⁶⁾은 백자인과 側柏葉의 성분인 myricetin의 멜라닌 생성 촉진 효과를 보고 하였고, 천 등¹⁷⁾은 고농도에서 quercetin의 멜라닌 생성 억제 효과를 보고 하였다.

저자는 역대 문헌에서 모발을 검게 하고 조직 재생 능력이 있다고 기록되어 있으나, 최근 연구에서는 주성분인 myricetin과 quercetin의 멜라닌 생성 효과가 상반되게 보고된, 側柏葉 메탄올 추출물이 피부의 멜라닌 세포와 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16 melanoma 세포의 증식과 형태학적 변화, 멜라닌 양 등을 측정하였다. 또, 멜라닌 생성 과정에 미치는 영향을 알아보기 위하여, α -MSH에 의한 과색소 생성 유발시 側柏葉의 농도별 멜라닌 생성량과, tyrosinase의 활성도, 멜라닌 생성 효소의 단백질 발현정도, tyrosinase의 유전자 발현 등을 조사하여 유의성있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 약재

본 실험에 사용한 측백엽은 원광대학교 익산 한방병원에서 구입하여 사용하였다.

2) 시약 및 기기

추출 및 분획용 용매는 1급 시약 (E. P.)을 사용하였으며, 세포배양을 위해 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), antibiotics와 Trypsin-EDTA는 Gibco (USA)에서 구입하였고, 그 외 각종 시약은 특급 시약을 사용하였다. α -Melanocyte stimulating hormone (α -MSH), Leupeptin, Aprotinin, Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), Bovine serum albumin (BSA)은, Sigma (Sigma Chem Co.)제품을 사용하였고, Anti-Rabbit tyrosinase와 TRP-1은 Santa Cruz사 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)제품을, Anti-Rabbit HRP antibody와 ECL kit는 Amersham (Amersham Biosciences Co.)제품을 사용하였다. cDNA는 oligo dT primer (Promega, U.S.A.)와 M-MLV

reverse transcriptase (Gibco, U.S.A)를 이용하여 합성하였고, Mastercycler gradient (Eppendorf)에서 유전자 증폭을 시행하였다.

2. 실험방법

1) 側柏葉의 메탄올 추출

側柏葉 100g을 상온에서 MeOH 1L을 이용하여 6시간 동안 추출하였다. 이 추출액을 filter paper를 이용하여 여과한 후 여액을 3000rpm으로 원심분리한 후 농축기(rotary evaporator)로 감압 농축하였다. 농축액을 freezer dryer로 동결 건조시킨 후 건조분말 12.35g (수득률 약 12.35%)의 시료를 얻었다.

2) B16 melanoma 세포주 배양

B16 melanoma 세포주는 한국 세포주 은행에서 분양 받아 CO₂ 배양기(37°C, 5%)에서 10% fetal bovine serum(HyClones)이 포함된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 배지를 이용하여 배양하였으며 약 48시간 주기로 배양액을 교체하여 주었다.

3) 세포 증식 측정

세포를 배양판(6 cm dish)에 well당 1x10⁵ 씩 분주한 후 24시간 배양하여 배양용기에 세포를 부착하였다. 側柏葉 메탄올 추출물을 각 농도별로 처리하고 5일간 배양하였고, 배양 완료 후 각 well에 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액을 가하여 세포를 분리수거하고, PBS로 2회 세척 한 후 혈구 계산판을 이용하여 각 well당 세포수를 측정하였다.

4) Tyrosinase 활성도 측정

Tyrosinase 활성도는 Martinez-Esparza 등¹⁸⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 멜라닌세포를 수확하여 세포 침전물을 만들고, 100 μ l 세포용해액(lysis buffer; 1% Triton X-100, 10mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1mM PMSF)을 넣고 4°C 얼음에서 30분간 때때로 흔들어주면서 세포를 파괴시킨 후 원심분리 하여 상층액을 취하여 tyrosinase 활성측정용액으로 사용하였다. 50 μ l의 상층액에 100mM sodium phosphate(pH 7.0) 100 μ l를 넣고 30°C 물중탕기에서 5분간 보온한 후 100mM catechol 50 μ l를 넣고 온도조절장치가 있는 분광광도계로 37°C, 405nm에서 흡광도의 변화를 1시간 관찰하였다.

5) 멜라닌 정량(Melanin content) 측정

멜라닌 정량은 Hosoi 등¹⁹⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양세포는 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척, 원심분리하여 수확하였다. 세포침전물에 1ml의 증류수를 넣어 현탁 후 초음파로 분쇄한 후, 원심분리하여 침전물을 수확하였다. Acid-insoluble material을 얻기 위해 10%의 DMSO가 첨가된 1N NaOH 200 μ l를 넣어 80°C에서 1시간 동안 처리하여 용해시켰다. 475nm에서 흡광도를 측정하였으며 멜라닌 정량은 합성멜라닌 (Sigma chemical Co.)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

6) 멜라닌의 형태적 관찰

B16 mouse melanoma 세포를 10cm Petri dish에 2x10⁵개를 분주하여 부착시켰다. 24시간 후 배양액을 교체하고 側柏葉 메탄올 추출물을 처리한 후, 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 0.25% trypsin-EDTA 용액을 처리하여 세포를 수확하고, 원심 분

리하여 cell pellet을 얻었다. 이를 다시 1×10^6 세포씩 수확하여 cell pellet를 만들고 사진촬영을 하였다.

7) Western blotting

B16 mouse melanoma 세포(2×10^5)를 PBS로 세척하고 4℃에서 30분 동안 lysis buffer(phosphate buffer, pH 6.8, 100IU aprotinin, 1% AEBFS)에 용해하고 20,000×g로 30분 동안 원심분리 시켰다. 원심분리 하여 얻은 상층액은 Amicon system을 이용하여 단백질을 농축시켰다. 농축된 단백질은 Bradford assay로 정량하고, 정량하여 얻은 단백질(50-100µg)을 7.5%나 10%의 SDS-PAGE상에서 전기영동 하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 Nitrocellulose membrane에 옮긴 후 실온에서 2시간동안 blocking buffer(5% skim milk in TBST)에서 incubation시켰다. Tyrosinase antibody(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 1:500으로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 TBST에 3회 washing하고 1:1,000으로 희석시킨 secondary peroxidase-conjugated anti-mouse antibody(Sigma)에 반응된 단백질을 Amersham ECL system으로 확인하였다.

8) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)분석

(1) RNA 추출

B16 melanoma 세포를 6 well plate에 5×10^4 세포로 분주하고 24시간 안정화 시킨 후 側柏葉 에탄올 추출물을 처리하여 3일간 배양하였다. 배양이 완료된 후 상층액을 제거하고 PBS로 씻은 다음 Trizol(Life Technology) 500µl를 넣고 lysis시켰다. 이 세포 용해액에 chloroform 100µl를 첨가하고 3분간 혼합하고 13,000rpm에서 원심분리하고 약 200µl의 상층액을 회수하여 isopropanol 200µl와 동량 혼합후 천천히 흔들고 다시 13,000 rpm에서 원심분리한 후 70% EtOH로 수세하고 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 15µl의 증류수에 녹여 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

(2) cDNA 합성

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3µg와 oligo dT primer 혼합하여 65℃에서 10분간 처리한 후 5 µl 2.5 mM dNTPs mix, 5µl 100mM DTT, 10µl 5 × RT buffer, RNA inhibitor로 1µl RNase inhibitor (40U/µl), 1µl M-MLV reverse transcriptase를 가하고 DEPC 처리된 증류수로 최종 부피가 50µl가 되도록 하였다. 위 반응액을 37℃에서 overnight 하여 cDNA를 합성하였고 이 cDNA를 polymerase chain reaction에 사용하였다.

(3) Polymerase chain reaction (PCR)

합성된 cDNA를 template로 사용하여 tyrosinase 유전자를 증폭하였다. tyrosinase의 sense primer(10pmole/µl)와 antisense primer (10pmole), 2µl 2.5mM dNTPs mix, 2 µl 10× PCR buffer, 1 µl Taq polymerase (2.5U/µl), cDNA 2µl의 반응액에 20µl가 되도록 멸균증류수를 첨가하였다. 유전자 증폭은 initial denaturation; 95℃, 5분, denaturation; 95℃, 20초, annealing; 55℃, 10초, extension; 65℃, 40초를 25cycle, final extension; 72℃, 5분의 조건으로 Mastercycler gradient (Eppendorf)에서 PCR을 수행하였다. 각 PCR products는 2% agarose gel에 10µl씩 loading하여 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)로

염색한 후 UV하에서 확인하였다. Oligonucleotide의 염기배열은 아래와 같다.

Table 1. Oligonucleotide의 염기배열

Gene	Primer	Sequence
tyrosinase	sence	CATTTTtGATTgAgTgTCT
	antisence	TgTggTAgTCgTCTTTgTCC
β-actin	sence	TCAgAAgACTCCTATgTgg
	antisence	TCTCTTTgATgTCACgCACg

9) 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 이들을 평균과 표준편차로 表示하였고, 각 군 간의 차이는 one-way ANOVA 후 Scheffe's test하여 P<0.05를 통계학적으로 의미 있다고 판정하였다.

실험결과

1. 側柏葉이 B16 melanoma 세포 증식에 미치는 영향

농도 의존적으로 側柏葉이 B16 melanoma 세포의 생장에 어떠한 영향을 미치는 조사하였다. 5×10^4 cell/well에서 24시간 배양한 B16 melanoma 세포에 側柏葉을 50 µg/ml에서 200 µg/ml 농도까지 처리하고 24시간, 48시간, 72시간 후 세포 증식을 측정하였다. 각각의 농도에서 세 sample을 관찰하여 본 결과, 대조군에서는 24시간, 48시간, 72시간에 $5.0 \pm 0.81 \times 10^4$ cell, $19.25 \pm 1.71 \times 10^4$ cell, $53.2 \pm 1.2 \times 10^4$ cell로 각각 나타났으며, 50 µg/ml 농도에서는 $5.0 \pm 0.81 \times 10^4$ cell, $18.5 \pm 1.73 \times 10^4$ cell, $50.4 \pm 2.1 \times 10^4$ cell로 대조군과 비교해 큰 변화 없이 나타났다. 100µg/ml 농도에서는 $4.25 \pm 0.5 \times 10^4$ cell, $18.5 \pm 1.0 \times 10^4$ cell, $49.0 \pm 1.3 \times 10^4$ cell로 나타났으며, 150µg/ml 농도에서는 $4.25 \pm 0.5 \times 10^4$ cell, $16.0 \pm 2.16 \times 10^4$ cell, $40.6 \pm 0.9 \times 10^4$ cell로 각각 나타나 세포 증식의 약간 감소하였으나 큰 변화는 없었다. 200µg/ml 농도에서는 $4.0 \pm 0.81 \times 10^4$ cell, $8.0 \pm 1.41 \times 10^4$ cell, $20.1 \pm 1.1 \times 10^4$ cell로 세포의 증식을 억제한 것으로 관찰되었다(Fig. 1). 이상의 결과, 側柏葉은 저 농도(50µg/ml-150µg/ml)에서는 세포의 증식에 큰 영향을 미치지 않았으나, 높은 농도(200µg/ml) 및 시간 경과에 따라서는 세포의 증식을 억제함을 알 수 있었다.

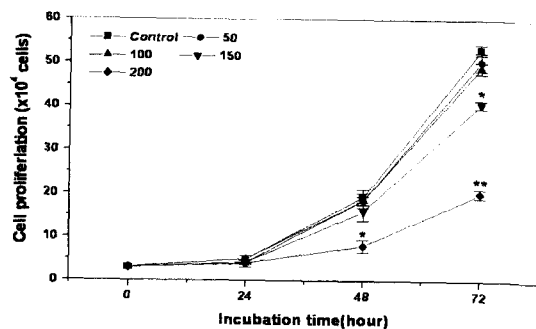


Fig. 1. Effect of *Biota Orientalis Folium* on cell proliferation in B16 cells. Dose-dependent inhibition of cell growth was observed in B16 cells treated with *Biota Orientalis Folium*. B16 cells were cultured at 5×10^4 cells/well. After 24 hr, the cells were treated with various concentrations of *Biota Orientalis Folium* (50, 100, 150, 200 µg/ml) for 72 hr. Three samples were analyzed in each group and the results were presented as means \pm SD. * P<0.05, ** P<0.01

2. 側柏葉이 B16 melanoma 세포의 형태학적 변화에 미치는 영향

Fig. 1의 실험에 나타난 일정한 농도(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이상의 세포 증식 억제 효과가 세포독성에 의한 것인지를 알아보기 위하여, 5×10^4 cell/well에서 24시간 배양한 B16 melanoma 세포에 側柏葉을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 각각 처리하고 72시간 후 세포를 수확하여 광학현미경으로 형태 관찰하였다. 관찰 결과, 농도의존적으로 대조군에 비하여 실험군에서 세포 밀도는 점차 감소하였으며 세포의 크기는 약간 커지고 또한 수치상 돌기의 길이가 약간 길어짐을 알 수 있었으나, 세포 사멸의 특징인 세포막 외부 융기의 돌출현상과 배양배지 속의 세포 사멸이 유도된 부유세포도 관찰할 수 없었다(Fig. 2). 이러한 결과는 높은 농도의 側柏葉이 B16 melanoma 세포의 성장을 억제함으로써 세포 증식을 억제시키고 세포의 분화를 촉진한 것으로 사료된다.

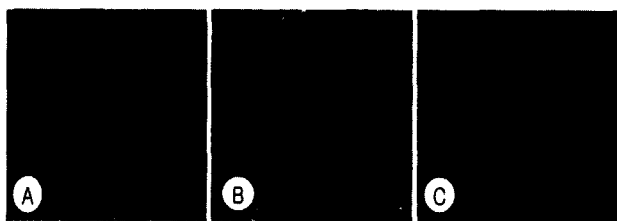


Fig. 2. Light micrographs of B16 cells observed for 3 days. A : Control, B : *Biota Orientalis Foliom*(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), C : *Biota Orientalis Foliom*(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

3. 側柏葉이 B16 melanoma 세포의 멜라닌 생성 억제에 미치는 영향

側柏葉이 직접적으로 멜라닌 생합성의 최종산물인 멜라닌양에 미치는 영향을 조사하였다. 세포배양액에 側柏葉을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서부터 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도까지 처리하고 72시간 후 세포를 수확하여 총 멜라닌양을 측정하였다. 대조군은 2.45 ± 0.12 pg/cell로 나타났으며, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리농도에서는 2.18 ± 0.23 pg/cell로 큰 변화가 없었으며, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 1.81 ± 0.23 pg/cell로 억제하였고, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 1.25 ± 0.3 pg/cell로, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 0.93 ± 0.28 pg/cell로 최종 멜라닌 생성량을 효과적으로 억제하였다(Fig. 3). 이상의 결과 側柏葉은 농도 의존적으로 멜라닌 생성량을 억제하였으며, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 효과적으로 최종 멜라닌 생성을 억제하였다.

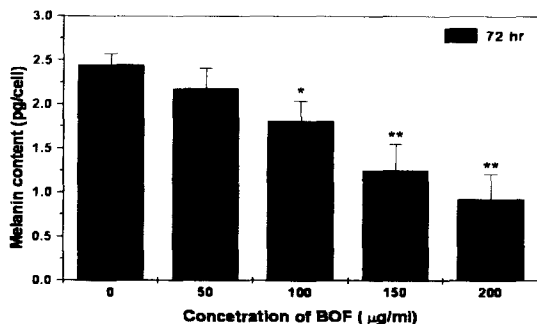


Fig. 3. Inhibitory effect of *Biota Orientalis Foliom* on the melanin synthesis in B16 cells. B16 cells were cultured at 1×10^4 cells/well. After 24 hr, the cells were treated with *Biota Orientalis Foliom* (50 to 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and melanin content was determined 72 hr later as described in Materials and Methods. Data are expressed as % of control and each column represents the mean \pm SD of four determinations. Asterisks indicate a significant difference compared with control group. * P<0.05, ** P<0.01. B O F : *Biota Orientalis Foliom*

4. 側柏葉이 α -MSH로 자극한 B16 melanoma 세포의 멜라닌 생성 억제에 미치는 영향

α -MSH는 뇌하수체 전엽에서 분비되는 물질로 멜라닌 과립이 멜라닌 세포 전체로 이동하는데 영향을 미친다. α -MSH에 의한 색소세포의 과색소형성에 미치는 側柏葉의 억제효과를 알아보기 위하여, 側柏葉을 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 처리하고 30분 후에 10nM MSH를 처리한 다음 72시간 경과 후에 B16 melanoma 세포의 tyrosinase 활성도를 측정하여 대조군과 비교하였다. 실험 결과, 대조군은 2.45 ± 0.12 pg/cell로 나타났으며, α -MSH 처리군은 6.21 ± 0.50 pg/cell로 나타나 대조군에 비하여 2배 이상 melanin양이 증가하였다. α -MSH에 側柏葉 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군은 5.08 ± 0.45 pg/cell로 나타나 α -MSH 단독 처리군에 비해 약간 감소하였으며, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 2.66 ± 0.50 pg/cell, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 1.80 ± 0.25 pg/cell, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 1.37 ± 0.33 pg/cell로 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4). 이상의 결과, 側柏葉은 α -MSH에 의한 과색소 생성을 용량 의존적으로 억제하는 것을 알 수 있었다.

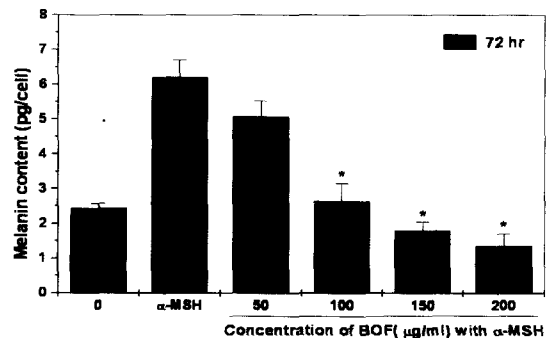


Fig. 4. Inhibitory effect of *Biota Orientalis Foliom* on the melanin contents in B16 cells stimulated by α -MSH. B16 cells were treated with *Biota Orientalis Foliom* (50 to 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). After 30 min, the cell incubated with 10nM α -MSH. The melanin content in B16 cells was determined 72hr later as described in Materials and Methods. Data are expressed as pg/cell of control and each column represents the mean \pm SD of four determinations. Asterisks indicate a significant difference compared with α -MSH treated group. * P<0.01. B O F : *Biota Orientalis Foliom*

5. 側柏葉으로 처리한 B16 melanoma 세포의 육안적 관찰

이상의 결과에서 側柏葉이 B16 melanoma 세포의 멜라닌 생성을 농도 의존적으로 억제 하였으며, α -MSH로 자극한 멜라닌 생성 또한 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인 하였으므로, 이에 대한 육안적 차이를 관찰하고자 側柏葉을 72시간 처리하고 세포를 수집한 후, 1×10^6 개의 세포를 micro centrifuge에 수확한 후 사진 촬영하였다. Fig 5에서 보는 바와 같이, 側柏葉을 처리하지 않은 것을 대조군(A)으로 하여 側柏葉 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (B)에서는 육안으로 큰 차이를 보이지 않았으나, 側柏葉 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (C)에서는 변화를 확인할 수 있었다. 멜라닌 생성을 촉진시키는 물질로 잘 알려진 α -MSH를 100nM 처리한 군을 양성 대조군(D)으로 하여, α -MSH와 側柏葉 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 것을 E군, α -MSH와 側柏葉 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 것을 F군으로 하였을 때 E군은 대조군(A)과 비교하여 차이가 없었으나, F군은 멜라닌을 현저히 억제함을 알 수 있었다(Fig. 5). 이상의 결과 側柏葉 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군에서 세포 배양시 나타나는 멜라닌 생성과, α -MSH의 자극에 의한 멜라닌 생성이 억제되었음을 육안으로 확인 할 수 있었다.

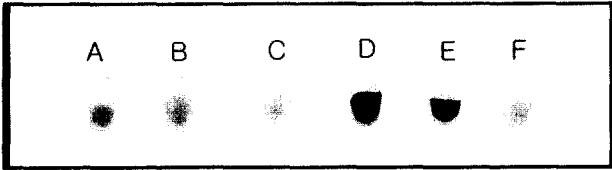


Fig. 5. Appearance of pellets of B16 cells following treatment with *Biota Orientalis Foliom*. A : Control, B : *Biota Orientalis Foliom* (100µg/ml), C : *Biota Orientalis Foliom* (200µg/ml) D : α-MSH (100nM), E : α-MSH+*Biota Orientalis Foliom* (100µg/ml), F : α-MSH+ *Biota Orientalis Foliom* (200µg/ml)

6. 側柏葉이 B16 melanoma 세포의 tyrosinase activity 억제에 미치는 영향

자외선과 같은 외부환경에 의한 색소세포의 과색소형성시 미치는 側柏葉의 억제효과를 조사하기 위하여, tyrosinase로 과색소생성이 유발된 경우 側柏葉의 효과를 관찰하였다. 側柏葉을 50 µg/ml에서 200 µg/ml까지 처리한 다음 72시간 경과 후에 B16 melanoma 세포의 tyrosinase 활성도를 측정하였다. 側柏葉 50µg/ml 처리군은 대조군에 비해 75.11 ± 2.38%로 나타났으며, 100µg/ml 처리군은 56.49 ± 3.25%, 150µg/ml군은 50.87 ± 4.11%, 200µg/ml 군은 22.48 ± 2.16%로 모두 감소를 나타냈다(Fig. 6). 이상의 결과 側柏葉은 tyrosinase 활성도를 용량 의존적으로 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

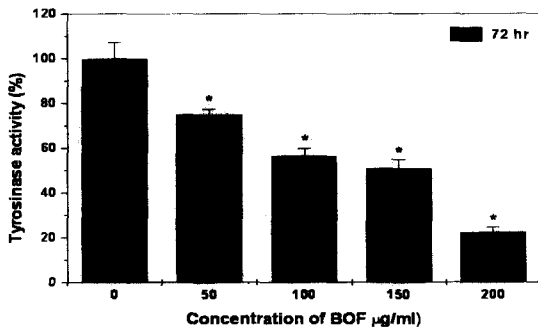


Fig. 6. Inhibitory effect of *Biota Orientalis Foliom* on the tyrosinase activity in B16 cells. B16 cells were cultured at 1×10^5 cells/well. After 24 hr, the cells were treated with *Biota Orientalis Foliom* (50 to 200 µg/ml). Tyrosinase activity in B16 cells was determined 72 hr later as described in Materials and Methods. Data are expressed as % of control and each column represents the mean ± SD of four determinations. Asterisks indicate a significant difference compared with control group. * P<0.05. B O F : *Biota Orientalis Foliom*

7. 側柏葉이 α-MSH로 자극한 B16 melanoma 세포의 tyrosinase 활성화 억제에 미치는 영향

α-MSH는 세포내 cAMP의 농도를 증가시키고 신호전달에 관련되는 기작을 변화시켜 tyrosinase를 활성화시키고 멜라닌 합성을 증가시킨다. 이상의 실험에서 관찰된 α-MSH가 자극한 B16 melanoma 세포의 멜라닌 생성에서의 側柏葉이 tyrosinase 활성화 경로에 영향을 미친 것이지를 알아보기 위하여 tyrosinase 활성화 정도를 농도별로 관찰하였다. 側柏葉을 50 µg/ml에서 200 µg/ml까지 처리하고 30분 후에 10nM MSH를 처리한 다음 72시간 경과 후에 B16 melanoma 세포의 tyrosinase 활성도를 측정하였다. α-MSH 처리군은 대조군에 비하여 2배 이상 tyrosinase 활성도가 증가하였다. α-MSH에 側柏葉 50µg/ml 처리군은 α-MSH 단독 처리군에 비하여 10.6%(89.4%), 100µg/ml에서

는 35.9%(64.1%), 150µg/ml에서는 63.2% (36.8%), 200µg/ml에서는 73.1%(26.9%)로 감소하였다(Fig. 7). 이상의 결과 α-MSH에 의한 과색소생성시 側柏葉은 tyrosinase 활성도를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

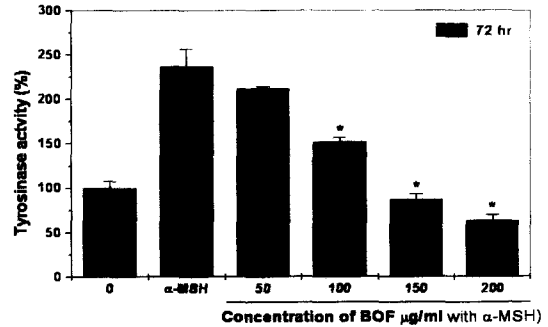


Fig. 7. Inhibitory effect of *Biota Orientalis Foliom* on the tyrosinase activity in B16 cells stimulated by α-MSH. B16 cells were treated with *Biota Orientalis Foliom* (50 to 200 µg/ml). After 30 min, the cell incubated with 10 nM α-MSH. The tyrosinase activity in B16 cells was determined 72 hr later as described in Materials and Methods. Data are expressed as % of control and each column represents the mean ± SD of our determinations. Asterisks indicate a significant difference compared with α-MSH treated group. * P<0.01. B O F : *Biota Orientalis Foliom*

8. 側柏葉이 멜라닌 생성 효소의 단백질 발현에 미치는 영향

최근에는 tyrosinase 뿐만 아니라 TRP-1과 TRP-2효소도 멜라닌 색소 형성에 관여한다고 밝혀져 많은 연구가 이루어지고 있다. 이에, 側柏葉에 의한 멜라닌 생성 억제에 TRP-1과 tyrosinase가 관여하는지를 확인하고자, 側柏葉으로 처리하지 않은 것을 대조군(1-Lane)으로 하고, 100µg/ml 농도 처리군(2-Lane)과, 200µg/ml농도의 처리군(3-Lane), α-MSH (100nM) 처리군 (4-Lane), α-MSH와 100µg/ml 농도 처리군(5-Lane), α-MSH와 200µg/ml 농도 처리군(6-Lane)으로 하여 B16 melanoma 세포에서 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 Western blot으로 관찰하였다. 실험 결과, 대조군(1-Lane)에 비하여 100µg/ml 농도 처리군 (2-Lane)과, 200µg/ml농도의 처리군(3-Lane)의 tyrosinase와 TRP-1의 발현이 약간 억제되어 나타났다. α-MSH (100nM) 처리군(4-Lane)에서는 tyrosinase와 TRP-1의 발현이 현저히 증가되었으며, α-MSH와 100µg/ml 농도 처리군(5-Lane)에서는 4-Lane에 비해 tyrosinase의 억제는 거의 관찰되지 않았으나 TRP-1의 억제는 나타났으며, α-MSH와 200µg/ml 농도 처리군(6-Lane)에서는 tyrosinase와 TRP-1의 현저한 억제가 관찰되었다(Fig. 8).

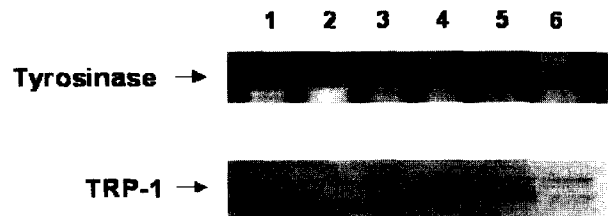


Fig. 8. Western blot analysis of tyrosinase, Trp-1 protein in cultured B16 cells after treatment with *Biota Orientalis Foliom*. Lane 1 : Control, Lane 2 : *Biota Orientalis Foliom* (100µg/ml), Lane 3 : *Biota Orientalis Foliom* (200µg/ml) Lane 4 : α-MSH (100nM), Lane 5 : α-MSH+*Biota Orientalis Foliom*(100µg/ml), Lane 6 : α-MSH+*Biota Orientalis Foliom*(200µg/ml)

9. 側柏葉이 B16 melanoma 세포에서 발현되는 tyrosinase의 mRNA에 미치는 영향 (RT-PCR)

側柏葉이 B16 melanoma 세포에서 발현되는 tyrosinase의 유전자 발현에 영향을 미치는 지를 평가하기 위해, 側柏葉으로 처리하지 않은 것을 대조군(1-Lane)으로 하고, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군(2-Lane)과, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 처리군(3-Lane), α -MSH (100nM) 처리군(4-Lane), α -MSH와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군 (5-Lane), α -MSH와 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군(6-Lane)으로 하여 B16 melanoma 세포에서 tyrosinase의 mRNA의 발현을 RT-PCR로 관찰하였다. 실험 결과, 대조군(1-Lane)에 비하여 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군(2-Lane)과, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 처리군(3-Lane)의 tyrosinase의 mRNA의 발현이 약간 억제되어 나타났다. α -MSH (100nM) 처리군(4-Lane)에서는 tyrosinase의 mRNA 발현이 증가되었으며, α -MSH와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군(5-Lane)과 α -MSH와 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도 처리군(6-Lane)에서는, 4-Lane에 비해 tyrosinase의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 억제된 것으로 나타났다. 따라서 側柏葉은 α -MSH에 의한 멜라닌합성 경로를 효과적으로 억제함을 알 수 있었다(Fig. 9).

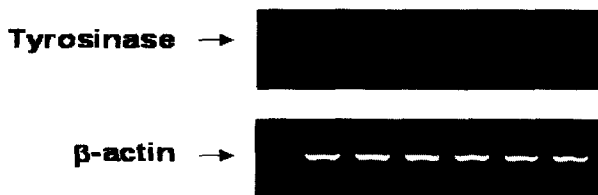


Fig. 9. Effect of *Biota Orientalis Folium* on tyrosinase mRNA expression in cultured B16 cells. The cells were incubated with various concentrations of *Biota Orientalis Folium*. Total RNA was prepared, and tyrosinase mRNA was analysed by RT-PCR. β -actin was used as control gene. Lane 1 : Control, Lane 2 : *Biota Orientalis Folium*(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Lane 3 : *Biota Orientalis Folium*(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Lane 4 : α -MSH(100nM), Lane 5 : α -MSH+*Biota Orientalis Folium*(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Lane 6 : α -MSH+*Biota Orientalis Folium*(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

고찰

인간의 피부색은 멜라닌의 양에 의해서 주로 결정되며, 혈색소, 카로틴 같은 색소 성분과 혈관분포, 각질층의 두께 등에 의해서도 영향을 받는다. 특히 표피에 분포하는 멜라닌 세포는 멜라닌을 합성하여 피부의 색소 침착에 중요한 역할을 할 뿐 아니라 생성된 멜라닌이 각질형성세포로 이동하여 과도한 자외선을 흡수하고 차단하는 광보호 작용을 한다고 알려져 있다^{1,2)}.

피부에 존재하는 멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 멜라닌 세포(melanocyte)라고 불리는 색소세포 내의 melanosome에서 생합성되고, 세포질 돌기를 통하여 표피의 기저층과 기시층의 세포로 운반된다^{1,2)}. 피부에 가해지는 여러 가지 자극에 의해 멜라닌세포의 유사분열이 일어나고 이어서 멜라닌세포가 활성화 된다. 활성화된 멜라닌세포에서는 tyrosinase 합성이 촉진되고 멜라닌의 생성이 항진되어 이를 표피 밖으로 운반 배출하게 된다. 피부 멜라닌 생성에 있어서 tyrosinase는 매우 중요한 역할을 하고 있으며, melanosome 내에서 tyrosine을 산화시켜 dopa를 만드는 tyrosine hydroxylase로, dopa를 산화시켜 dopachrome을 만드는 dopa oxidase로 작용하여 최종적으로 멜

라닌 중합체를 합성하는 데 중요한 효소로 작용한다. 그러므로 tyrosinase 활성억제제는 피부 내에서의 멜라닌 중합체 합성을 효과적으로 저해할 수 있으며, tyrosinase 활성 억제 실험은 유용한 일차 평가법으로 인정되고 있다¹⁸⁻¹⁹⁾. Tyrosinase에 의해 생성이 촉매되는 멜라닌은 노란색-적갈색의 pheomelanin과 갈색-검은색의 eumelanin으로 구분되는데, 1980년대까지 멜라닌은 L-tyrosine으로부터 dopa(L-3,4-dihydroxy-phenylalanine)를 거치는 Raper-Mason pathway를 통해 합성되는 것으로 생각되었다²⁾. 이 경로에 의하면 L-tyrosine으로부터 dopa로 hydroxylation, dopa에서 dopaquinone으로의 산화, dopaquinone에서 leucochrome으로의 산화, leucochrome의 산화에 의한 dopachrome의 생성, dopachrome에서 DHI(5,6-dihydroxyindole)로의 전환, dihydroxyindole의 산화적 중합 및 단백질과 결합을 통해 최종적으로 멜라닌을 합성한다고 하였다. 1980년대 이후의 멜라닌 생합성 경로에 대한 연구는 피부암 관련 연구그룹에 의해 집중적으로 연구되었으며, 그 결과 생체내에서 dopachrome이 DHI로 전환되는 경로 외에 dopachrome tautomerase (EC5.3.2.3) 작용에 의해 DHICA(5,6-dihydroxyindole carboxylic acid)로 전환되는 새로운 경로가 존재한다는 사실이 밝혀졌다. Dopachrome에서 DHICA를 거쳐 멜라닌을 합성하는 경로는 세포가 멜라닌 생성 중간대사 물질의 독성으로부터 자신을 보호하기 위한 파생경로로 추정되고 있다²⁰⁾. 사람에게 있어서 멜라닌 색소는 인종에 따라 차이가 있지만 특정 피부색의 사람이라도 신체의 건강상태에 따라 얼굴의 눈 밑 또는 뺨에 특이적으로 짙은 반점을 형성하기도 하고, 노화의 과정에서 얼굴, 팔, 다리에 검버섯을 형성하기도 하며, 과색소 침착이 되면 기미나 주근깨 같은 피부질환을 일으키기도 한다²⁾.

韓醫學에서는 기미 주근깨 등의 과색소 침착증에 해당하는 질환이 《黃帝內經·素問》〈至真要大論〉³⁾에 “歲陽明在天, 燥淫所勝... 面黑, 身無膏澤, 足外反熱”이라하여 처음 기록된 이래, 以後 많은 醫家들⁵⁻⁶⁾에 의해 面黑, 黧黯, 雀斑, 黛黑斑 등의 異名으로 記錄되었다.

과색소 침착증의 原因을 樓 등²¹⁾은 內經의 面塵에 대한 文獻을 引用하여 陽明病으로 보았으며, 顧 등²²⁾은 憂思過多와 飲食失節로 인한 脾胃損傷을 原因으로 보았다. 또, 祁 등²³⁾은 巢⁶⁾의 文獻을 引用하여 風邪와 痰飲이 症狀를 誘發한다고 보았고, 顧 등²²⁾은 發病機轉 중에서 女性에게 주로 나타난다는 言及과 함께 陰虛火動을 原因으로 보았다. 近來 文獻들²⁴⁾은 肝鬱氣滯, 瘀血內停, 腎陰不足, 陰虛火旺, 脾虛不運, 濕熱內蘊, 日曬熱毒, 火鬱孫絡, 風邪外搏 등의 原因으로 자세히 분류하였는데, 이상의 문헌을 종합하면 內因으로는 肝鬱氣滯, 瘀血內停, 腎陰不足, 陰虛火旺, 脾虛不運 등이, 外因으로는 風邪, 火邪, 濕熱邪, 熱毒 등이 각각 과색소 침착증을 유발하는 것으로 나타났다. 治療方法으로는 辨證施治에 의한 疏肝解鬱, 通經活絡, 滋補肝腎, 健脾益氣, 滋陰降火, 祛風濕, 清熱解毒 등의 內治법과, 膏劑나 粉未 洗劑 등을 사용하는 外治法, 體鍼, 耳鍼 등을 이용하는 針治療法 등이 기록되어 있다²⁵⁾.

側柏葉(Biota Orientalis Folium)은 측백나무과에 속한 상록

침엽고목인 측백나무 및 동속 근연식물의 어린 가지와 잎을 건조시킨 약재로서, 涼血止血, 止咳化痰, 生肌, 殺蟲, 烏鬚髮 等の效能이 있어 風冷歷節, 吐血, 衄血, 咯血, 便血, 肺熱咳嗽, 湯火傷, 凍瘡, 鬚髮早白 等を 치료하는데, 성분으로 精油로서 α -pinene, thujone, caryophyllene, fenchone 등이, flavonoid로서 quercetin, myricetin, hinokiflavone 등이, 이 밖에 tannin, 수지, vitamin C 등이 함유되어 있으며⁸⁾, 연구로는 이 등¹⁴⁾의 側柏葉 藥鍼이 지혈효과에 미치는 영향과 김 등¹⁵⁾의 側柏葉의 Diterpenes 성분에 대한 보고가 있다. 또 側柏葉의 flavonoid 성분으로서 quercetin과 myricetin에 대한 연구도 보고 된 바 있는데, quercetin은 고농도에서 멜라닌 생성을 억제한다고 하였으며¹⁷⁾, myricetin은 tyrosinase protein의 발현을 촉진시켜 멜라닌 생성을 증가시킨다고 하였다¹⁶⁾.

이에 저자는 역대 문헌에서 모발을 검게 하고 조직 재생 능력이 있다고 기록되어 있으나, 최근 연구에서는 주성분인 myricetin과 quercetin의 멜라닌 생성 효과가 상반되게 보고된, 側柏葉 메탄올 추출물의 피부의 멜라닌 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 본 실험을 계획하였다.

側柏葉 메탄올 추출물이 각 농도별로 B16 melanoma 세포의 증식과 형태에 어떠한 영향을 미치는 지를 관찰하였고, 멜라닌의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각 농도별 멜라닌 생성량을 측정하였다. 멜라닌의 생성 기전에 어떤 과정에 작용하는지 알아보기 위하여, α -MSH에 의한 과색소 생성 유발시 側柏葉의 농도별 멜라닌 량과, tyrosinase의 활성도, 멜라닌 생성 효소의 단백질 발현정도, tyrosinase의 유전자 발현을 각각 실험하였다.

실험결과, 側柏葉이 B16 melanoma 세포의 성장에 미치는 영향은 저 농도($50\mu\text{g}/\text{ml}$ - $150\mu\text{g}/\text{ml}$)에서는 세포의 증식에 큰 영향을 미치지 않았으나, 높은 농도($200\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 시간 경과에 따라서는 세포의 증식을 억제함을 알 수 있었으며(Fig. 1), 이런 결과가 세포 독성에 의한 것인지를 알아보기 위하여 각 농도별 B16 melanoma 세포의 형태 변화를 관찰 하였다. 관찰 결과, 농도 의존적으로 대조군에 비하여 실험군에서 세포 밀도는 점차 감소하였고 세포의 크기는 약간 커지면서 수직상 돌기의 길이가 약간 길어짐을 알 수 있었으나, 세포 사멸의 특징인 세포막 외부 융기의 돌출현상과 배양배지 속의 세포 사멸이 유도된 부유세포도 관찰할 수 없었다(Fig. 2). 이러한 결과는 높은 농도의 側柏葉이 B16 melanoma 세포의 성장을 억제함으로써 세포 증식을 억제시키고 세포의 분화를 촉진한 것으로서, 세포 독성에 의하지 않은 것으로 사료된다. 또, 側柏葉이 직접적으로 멜라닌 생합성의 최종산물인 멜라닌양에 미치는 영향을 조사하였으며, 농도 의존적으로 멜라닌 생성량을 억제하는 것을 확인하였고, $150\mu\text{g}/\text{ml}$, $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 효과적으로 최종 멜라닌 생성을 억제하였다(Fig. 3). 이런 결과는 側柏葉의 미백제 개발 가능성을 높여 주는 것으로서, 이에 따라 멜라닌 형성과정에 관여하는 작용 기전을 분석하였다. 멜라닌의 생성 억제는 크게 두 가지로 세포독성에 의한 세포사멸과 멜라닌 생성단계에서 효소활성억제로 나눌 수 있는데, B16 mouse melanoma 세포의 광학현미경 검사에서 세포독성이 없는 것으로 보아 멜라닌 생성억제는 세포독성에 의한 세포사멸

의 기전보다는, 멜라닌 생성 단계중 側柏葉에 의한 효소활성 억제와 관계가 있는 것으로 생각할 수 있으며, 이를 알아보기 위하여 뇌하수체 전엽에서 분비되는 물질로서 멜라닌 과립이 멜라닌 세포 전체로 이동하는데 영향을 미친다고 알려진 α -MSH에 의한 B16 melanoma 세포의 자극 후 melanin 생성량을 측정하고 육안 관찰하였다. 실험 결과 α -MSH 단독 처리군에 비해 側柏葉 처리군 등에서 melanin양이 유의성 있게 감소하였으며(Fig. 4), 육안적 관찰에서도 색의 변화를 확인하였다(Fig. 5). 이는 α -MSH에 의한 과색소 생성을 側柏葉이 용량 의존적으로 억제한 것으로 사료된다. 또, 자외선과 같은 외부환경에 의한 색소세포의 과색소형성시 미치는 側柏葉의 억제효과를 조사하기 위하여, 側柏葉을 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 처리한 다음 72시간 경과 후에 B16 melanoma 세포의 tyrosinase 활성도를 측정한 결과 모두 유의성 있는 감소를 나타냈다(Fig. 6). 이러한 결과는 側柏葉이 tyrosinase 활성도를 용량 의존적으로 억제한 결과로 사료된다. α -MSH로 자극한 B16 melanoma 세포의 멜라닌 생성 억제 효과가 tyrosinase 활성화 경로에 영향을 미친 것이지를 알아보기 위하여, 側柏葉을 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 처리하고 30분 후에 10nM MSH를 처리한 다음 72시간 경과 후에 B16 melanoma 세포의 tyrosinase 활성도를 측정하였다. α -MSH 처리군은 대조군에 비하여 2배 이상 tyrosinase 활성도가 증가하였고, α -MSH에 側柏葉 처리군은 α -MSH 단독 처리군에 비하여 모두 감소하였다(Fig. 7). 이 같은 결과는 α -MSH와 tyrosinase의 signal pathway에 의한 멜라닌 합성 경로에 側柏葉이 작용한 것으로 생각된다. 최근에는 tyrosinase 뿐만 아니라 TRP-1과 TRP-2효소도 멜라닌 색소 형성에 관여한다고 밝혀져 많은 연구가 이루어지고 있다. 이에, 側柏葉에 의한 멜라닌 생성 억제에 TRP-1과 tyrosinase가 관여하는지를 확인하고자, B16 melanoma 세포에서 tyrosinase와 TRP-1의 발현을 Western blot으로 관찰하였다. 실험 결과, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도(2-Lane)에서는 α -MSH 처리군과 비처리군에서 모두 미약하게 tyrosinase 발현을 억제하였으며, $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 α -MSH 처리군에서 tyrosinase 발현을 현저하게 억제하는 것이 관찰되었다(Fig. 8). 側柏葉이 B16 melanoma 세포에서 발현되는 tyrosinase의 유전자 발현에 영향을 미치는 지를 평가하기 위해, B16 melanoma 세포에서 tyrosinase의 mRNA의 발현을 RT-PCR로 관찰한 결과, 농도 의존적으로 발현이 억제된 것으로 나타났다. α -MSH는 생물학적으로 melanogenesis를 유도하는 물질로 가장 잘 알려져 있으며, 여러 가지 melanoma 세포에서 tyrosinase protein과 mRNA의 증가에 의한 tyrosinase 활성의 증가를 통하여 일어난다고 보고 되었으며, 한편 tyrosinase mRNA의 분해를 감소와 translation 효과의 증가와 같은 posttranscription 과정의 변화에 의한 것이라는 보고가 있다. 또한 α -MSH는 G-protein-linked signal transducing pathway를 통하여 전달되며 세포내 cAMP 농도를 증가시키는 theophyllin, db-cAMP, IBMX와 같은 agents들도 melanogenesis에서 α -MSH와 같은 효과를 나타내며, 이러한 화합물들은 inhibitor로부터 tyrosinase를 releasing하거나 tyrosinase gene expression을 촉진시키므로서 tyrosinase 활성을 증가시킨다고 하였다. 그러므로,

側柏葉 200 μ g/ml 농도에서 tyrosinase mRNA가 약간 감소하고, α -MSH와 동시 처리군에서는 더욱 효과적으로 감소한 것은(Fig. 9), 측백이 tyrosinase mRNA expression을 억제함으로써 결과적으로 tyrosinase 활성이 감소하였으며, α -MSH 경로를 억제하는 것으로 생각된다.

이상의 연구 결과, 側柏葉은 역대 한의학 문헌에서 언급한 모발을 검게 만드는 효과 보다는 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 나타났으며, 송¹⁶⁾이 melanin 생성 촉진 효과가 있다고 보고한 myricetin의 작용보다 강력한 다른 성분을 함유하고 있는 것으로 사료된다. 側柏葉은 B16 melanoma 세포의 멜라닌 형성과 tyrosinase 활성도의 억제 효과가 있었으며, TRP-1, tyrosinase의 유전자 발현도 억제하였으며, 이는 α -MSH와 tyrosinase의 signal pathway에 의한 멜라닌 합성 경로를 억제하는 것으로 생각된다. 따라서, 側柏葉의 멜라닌 합성 억제효과에 대한 더욱 정확한 작용기전과 응용법의 개발 등 체계적인 연구가 이루어진다면, 미백작용이 우수하면서도 피부 부작용이 없는 화장품이나, 기미나 주근깨 등의 과색소 침착증을 치료하는 천연약품 등으로 응용될 수 있을 것이며, 한의학 문헌에서 밝힌 烏鬚髮 효과에 대해서는 차후 모발의 멜라닌 실험이 필요할 것으로 사료된다.

결론

側柏葉 메탄올 추출물이 B16 mouse melanoma 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 세포독성과 α -MSH에 의한 멜라닌 생성량, tyrosinase 활성, tyrosinase와 TRP-1의 단백질 발현, tyrosinase mRNA 발현 등을 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

側柏葉은 B16 melanoma 세포 증식을 50 μ g/ml-150 μ g/ml 농도 까지는 약간 억제하는 것으로 나타났으며, 200 μ g/ml 이상에서는 세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났다. 側柏葉은 B16 melanoma 세포의 성장을 억제함으로써 세포 증식을 억제시켰으나 세포의 독성은 없는 것으로 나타났다. 側柏葉은 B16 melanoma 세포의 최종산물인 멜라닌 생성량을 억제하였다. 側柏葉은 α -MSH에 의한 과색소 생성 유도시 tyrosinase 활성도와 멜라닌 생성량을 억제하였다. 側柏葉은 100 μ g/ml 농도에서는 α -MSH 처리군과 비처리군에서 모두 미약하게 tyrosinase 발현을 억제하였으며, 200 μ g/ml 농도에서는 α -MSH 처리군의 tyrosinase 발현을 현저하게 억제하였다. 側柏葉은 100 μ g/ml 농도와, 200 μ g/ml 농도에서 tyrosinase의 mRNA의 발현이 약간 억제되었으며, α -MSH 처리군에서는 100 μ g/ml 농도와 200 μ g/ml 농도에서 발현이 억제된 것으로 나타났다.

이상의 연구결과를 종합하면, 側柏葉은 B16 melanoma 세포의 증식과 멜라닌 생성을 억제하였으며, α -MSH와 tyrosinase에 의한 과색소 생성 유도시에도 멜라닌 생성을 감소시켰으며, 멜라닌 생성 효소의 단백질 발현과, tyrosinase의 mRNA 발현도 억제한 것으로 나타났다. 이는, 側柏葉이 tyrosinase mRNA expression을 억제함으로써, tyrosinase 활성의 감소로 인한 α -MSH 경로 억제의 결과로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 원광대학교 교비 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. 박경아 외. 조직학, 서울 고려의학, pp 405-411, 1999.
2. 대한피부과학회. 피부과학, 서울, 여문각, pp 2-7, 328-337, 1994.
3. 楊維傑 編. 黃帝內經 素問, 臺北, 樂羣出版事業有限公司, pp 624-679, 1994.
4. 武之望. 濟陰綱目, 서울, 柳林文化社, p 484, 1990.
5. 薛 瑜. 編輯外科心法要訣, 臺灣, 大中國圖書公社, p 85, 1984.
6. 巢元方. 巢氏諸病源候論, 서울, 大星文化社, p 200, 302, 1992.
7. 朱震亨. 丹溪醫集, 北京, 人民衛生出版社, p 24, 1993.
8. 全國韓醫科大學本草學教授共編. 本草學, 서울, 永林社, pp 395, 494-495, 1991.
9. Ishihara, Y., Oka, M., Tsunakawa, M., Tomota, K., Hatori, M.
10. Hiroshi Morita, Hideyuki Kobata, Takashi Kayashita, Akira Gonda, Koichi Takeya, Hideji Itokawa. Pseudostellarins A-C, New Tyrosine inhibitory cyclic peptides from Pseudostellaria Heterophylla. tetrahedron. 50, 6797, 1994
11. Park, J.S., Kim, J.S., Lee, J.W., Park, R.G., Jeon, B.H., Woo, W.H., Jeong, W.Y. Effect of Rhizoma Atractylodis macrocephalae on the melanogenesis, J. Oriental Medical Pathology 13(2):91-97, 1999.
12. 윤화정 외. 白芨이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향, 대한안미비인후피부과학회지 16(1):100-111, 2003.
13. 강현성 외. 사삼 물 추출물의 멜라닌 형성 억제 효과, 동의생리병리학회지 18(2):440-445, 2004.
14. 李承宰 외. 側柏葉 및 黃芩 藥鍼이 止血效果에 미치는 影響, 大韓韓方婦人科學會誌 13(2):74-88, 2000.
15. 김영중 외. 측백엽의 Diterpenes 성분, 生藥學會誌, 29(4): 347-352, 1998.
16. 송화영. 柏子仁과 側柏葉의 成分인 myricetin이 멜라닌 生成에 미치는 影響, 원광대학교 대학원, 2004.
17. 천현자 외. Quercetin이 Melan-a 멜라닌세포의 멜라닌합성에 미치는 영향, 생약학회지 33(3):245-251, 2002.
18. Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J.A., Garcia-Borron, J.C. Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. Eur. J. Biochem. 255, 139-146, 1998.
19. Hosoi, 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, 1474-1478, 1985.
20. 한대석 외. Tyrosinase 저해제가 검은북눈봉어의 멜라닌 생성에 미치는 영향, Korean J. food Sci. Technol. 28(6): 1089-1094, 1996.

21. 樓 英. 醫學綱目, 서울, 大星文化社, p 1081, 1986.
22. 顧世澄. 瘍醫大全, 北京, 人民衛生出版社, pp 479, 481-482, 1987.
23. 祁 坤. 外科大成, 臺北, 文光圖書有限公司, p 218, 1968.
24. 楊思澍 外. 中醫臨床大全, 中國, 北京科學技術出版社, pp. 896-897, 923-924, 1991.
25. 申佶求. 申氏本草學, 서울, 壽文社, pp 117, 175-176, 1988.