

# 싸리꽃 추출물의 tyrosinase 활성 및 멜라닌합성 억제효과

유인식 · 박시준<sup>1</sup> · 문연자<sup>1</sup> · 고준석<sup>2</sup> · 신기돈<sup>2</sup> · 이장천<sup>2</sup> · 우원홍<sup>1\*</sup> · 임규상<sup>1\*</sup>

원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과, 1: 한약자원개발학과, 2: 상지대학교 한의과대학 본초방제학교실

## Inhibitory effects of Flowers of *Lespedeza bicolor* on Tyrosinase Activity and Melanin Synthesis

In Sik Ryu, Si Jun Park<sup>1</sup>, Yeun Ja Mun<sup>1</sup>, Joon Suk Ko<sup>2</sup>, Ki Don Shin<sup>2</sup>, Jang Cheon Lee<sup>2</sup>,  
Won Hong Woo<sup>1\*</sup>, Kyu Sang Lim<sup>1\*</sup>

The Third Medicine, 1: Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine,  
Wonkwang University, 2: Department of Herhology & Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Sangji University

In this study, we investigated the effects of the flowers of *Lespedeza bicolor* on melanogenesis in a mouse melanocyte cell line, B16/F10 cells. Our results show that the flowers of *Lespedeza bicolor* significantly inhibits melanin synthesis in concentration-dependent manner. In addition, it was also found to inhibit the activity of tyrosinase, the rate-limiting melanogenic enzyme. While the flowers of *Lespedeza bicolor* have no direct inhibitory effect on tyrosinase activity in cell free assay system using mushroom tyrosinase. Moreover, the flowers of *Lespedeza bicolor* effectively suppressed the  $\alpha$ -MSH-stimulated melanin formation, tyrosinase activity and dendrite outgrowth. These results suggest that the flowers of *Lespedeza bicolor* is a potent depigmentation agent.

Key words : *Lespedeza bicolor*, melanin, tyrosinase,  $\alpha$ -MSH

### 서 론

피부는 표피(epidermis)와 진피(dermis)로 이루어져 있고, 직접 외부와 접촉하는 부위로 대내외적인 자극에 대한 보호, 체온 조절, 감각, 배설 및 분비 작용, 비타민 D 생성, 면역 등의 작용을 하고 있다<sup>1,2)</sup>.

피부는 항상 산소와 접촉하고, 자외선에 노출되어 있어 활성 산소종에 의한 피부의 광산화적 손상 위험이 항상 존재하는데, 이들은 지질과산화, 단백질 산화, 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 멜라닌 생성 반응의 촉진, DNA의 산화와 같은 생체 구성 성분들의 손상을 일으킨다. 이에 따라 피부탄력 감소, 주름살 및 기미·주근깨 등의 피부노화가 가속화 된다<sup>3-6)</sup>.

피부에 색소침착을 일으키는 대표적인 요인은 일광으로, 각

질형성세포가 태양광선에 노출되면 alpha-melanocyte stimulating hormone( $\alpha$ -MSH), nitric oxide(NO), prostaglandin E2 등을 분비하고 이들은 멜라닌세포를 자극하여 멜라닌의 생성을 촉진 한다<sup>7-11)</sup>.

싸리(胡枝子, *Lespedeza bicolor*)는 콩과에 속하는 다년생 낙엽관목으로서<sup>12,13)</sup>, 줄기와 잎은 호지자(胡枝子)라하며 福建民間草藥에 性味는 “맛이 달고 성질은 평하며 독이 없다고” 하였으며, 藥效와 主治는 “폐를 촉촉하게 하고 열을 내리며 소변이 잘 나오게 하고 通淋한다” 하였다<sup>13,14)</sup>.

또한 “근육을 강하게 하고 腎을 보익하며 脾를 튼튼히 하고 습을 제거하며, 頭暈, 蛇傷을 치료한다” 하였다<sup>13,15)</sup>. 胡枝子の 根(根)은 풍습에 의한 痺痛, 타박상, 적백 대하, 流注腫毒에 사용하였으며, 민간에서는 피부질환치료에 이용되어 왔다. 싸리(胡枝子)의 성분으로 quercetin, kaempferol, trifolin, isoquercitrin, orientin, isoorientin 등이 함유되어 있으며<sup>2)</sup>, 실험적 연구로 이 등(2005)이 항산화효능과 아질산염(Nitrite-scavenging activity) 소거능이 있음을 보고하였다<sup>16)</sup>.

이에 본 저자 등은 B16/F10 멜라닌세포주에서 싸리꽃 에탄올 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향과  $\alpha$ -MSH 유도 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

\* 교신저자 : 임규상, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원  
우원홍, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원

E-mail : kslim@wku.ac.kr, whwoo@wku.ac.kr

Tel : 063-850-6916, 063-850-6845

접수 : 2007/07/13      채택 : 2007/07/26

## 재료 및 방법

### 1. 시료

실험에 사용된 싸리꽃은 전주근교에서 2005년 7-8월에 채취하여 음건하고 원광대학교 한의학전문대학원의 약재보관 냉동고에 보관하여 사용하였다. 음건한 싸리꽃 100 g에 ethanol 3 l를 가하고 밀봉하여 6시간 동안 실온에서 냉침 시켰다. 거즈로 여과하여 감압 농축 후 14.43 g의 試料(수득률: 14.43%)를 얻어 냉장 보관하였으며, 試料는 분주하여 DMSO에 녹여 사용하였다.

### 2. 세포주 및 세포배양

B16/F10 멜라닌세포주는 한국 세포주은행에서 분양받아 10% fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM)을 사용하여 CO<sub>2</sub> incubator(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

### 3. B16/F10 세포내 Tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Matinez-Esparza 등의 방법으로 측정하였다<sup>17)</sup>. B16/F10 세포를 6 well 배양용기에 5×10<sup>4</sup>/well씩 분주하여 24시간 동안 배양하여 세포를 부착시킨 후, 시료와 α-MSH(20 nM)를 각각 처리하고 3일간 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 PBS로 세척하고 lysis buffer[5 mM EDTA, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0), Triton X-100, 0.1M PMSF]로 세포를 용해하였다. 4°C, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리를 하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성측정 용액으로 사용하였고, protein assay 용액(Bio Red, USA)으로 595 nm에서 흡광도를 측정, 동량의 단백질 양을 계산하였다. 시료 50 μl와 0.1M sodium phosphate buffer 150 μl, 0.1 M catechol 50 μl를 분주하여 혼합한 후 ELISA reader기로 37°C에서 405 nm의 파장으로 1시간동안 10분 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다. 활성율은 대조군의 흡광도를 기준으로 한 백분율로 환산하여 결과로 나타내었다.

$$\text{Tyrosinase 활성율 (\%)} = \frac{\text{대조물질의 흡광도}}{\text{시료가 첨가된 용액의 흡광도}} \times 100$$

### 4. Mushroom tyrosinase 활성 측정

Mushroom tyrosinase(EC 1.14.18.1)는 2500 units/ml가 되도록 50 mM phosphate buffer(PH 6.8)에 녹여 냉동고에 동결 보관 후 효소원으로 사용하였다. 시료와 효소를 첨가하고 25°C에서 5분간 pre-incubation 시킨 후 기질로 L-DOPA를 첨가하였다. 10분간 반응 시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다<sup>18)</sup>. 각 군은 모두 triplicate로 실행하였고, 아래의 수식으로부터 효소 저해율(%)을 산출하였다.

$$\text{Inhibition (저해율 \%)} = \frac{(A-B) - (C-D)}{A-B} \times 100$$

### 5. B16/F10 세포의 멜라닌 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등의 방법을 변형하여 사용하였다<sup>19)</sup>.

B16/F10 세포를 직경 10 cm 배양용기에 1×10<sup>5</sup>/dish개씩 분주하여 부착시킨 후, 싸리꽃 추출물과 α-MSH(20 nM)를 각각 처리하여 5일 동안 배양하였다. 각 군당 2×10<sup>6</sup>개의 세포를 수거하여 멜라닌을 측정하였다. Lysis buffer[5 mM EDTA, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0), Triton X-100]로 세포를 용해하고 원심 분리하여 얻은 세포침전물에 알코올을 가하여 세척한 후 건조시켰다. 1% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액에 85°C에서 1시간 동안 멜라닌을 용해시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 멜라닌 색소의 관찰은 각 군당 1×10<sup>6</sup>개의 세포를 수거하여 육안적으로 멜라닌세포의 색깔을 관찰하였다.

### 6. 세포의 형태학적 관찰

B16/F10 또는 SZ95 세포를 6 cm 배양용기에 5×10<sup>4</sup>/dish개씩 분주하여 부착시키고 tyrosinase 활성 측정 방법과 동일한 방법으로 시료와 α-MSH (100 nM)를 각각 처리하여 배양한 후 B16/F10 세포의 수지상 돌기의 변화를 위상차도립현미경(inverted phasecontrast microscope)를 이용하여 관찰하였다.

### 7. DOPA 염색

B16/F10 세포를 chamber slide(8 chamber, Nunc)에 배양하고 일정시간 시료를 처리한 후 5% formalin 용액으로 고정하였다. 0.1% DOPA 용액으로 염색하고 탈수하여 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다<sup>20)</sup>.

### 8. 통계처리

실험 결과는 One way ANOVA test를 이용하여 p-value를 구하여 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### 1. 싸리꽃 추출물의 멜라닌 합성 억제효과

싸리꽃 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 B16F10세포에 50 μg/ml와 100 μg/ml 농도로 처리하여 5일간 배양하고, 각 군당 1×10<sup>6</sup> cells를 수집하여 멜라닌 양을 측정하였다. 싸리꽃 추출물 50 μg/ml 처리군은 대조군의 70.4%, 싸리꽃 100 μg/ml 처리군은 37.3%로 대조군에 비하여 멜라닌색소가 현저히 감소되었다(Fig. 1A). 멜라닌 합성의 처음 두 단계 반응을 촉매하는 속도조절 효소인 tyrosinase의 효소활성에 미치는 영향을 조사한 결과, 싸리꽃 추출물 25 μg/ml 처리군은 대조군의 84.8%, 50 μg/ml 처리군은 70.5%, 100 μg/ml 처리군은 63.8%로 tyrosinase 효소활성이 감소되었다(Fig. 1B).

또한 DOPA 염색을 이용하여 tyrosinase의 활성을 관찰한 결과, 양성대조군인 α-MSH 처리군에서 tyrosinase의 활성이 현저히 증가하였으며, 싸리꽃 추출물 처리군은 tyrosinase의 활성이 감소하였음을 알 수 있었다(Fig. 2).

한편 싸리꽃 추출물이 직접적으로 tyrosinase 효소의 활성을 억제하는지 Mushroom tyrosinase를 이용하여 cell free system에서 조사한 결과, 싸리꽃 추출물은 tyrosinase 효소의 활성을 억제

하지 않았다(Fig. 3). 이는 싸리꽃 추출물이 직접적으로 tyrosinase 효소의 활성을 억제하지 않고 B16F10세포의 신호전달경로를 통해 간접적으로 tyrosinase 활성이 감소되었음을 의미한다.

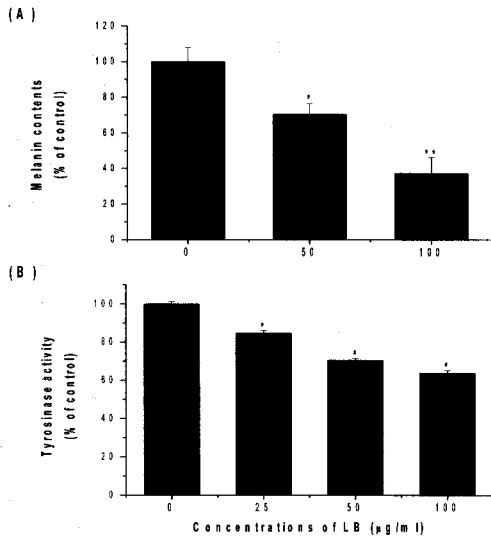


Fig. 1. Effects of LB on melanin synthesis in B16 cells. Cells were cultured with 25-100 μg/ml LB for 3 or 5 days. Melanin contents (A) and tyrosinase activity (B) were measured as described in Materials and Methods. Results are the averages of triplicate experiments±S.D. \* p<0.05; compared to control, \*\* p<0.01; compared to control.

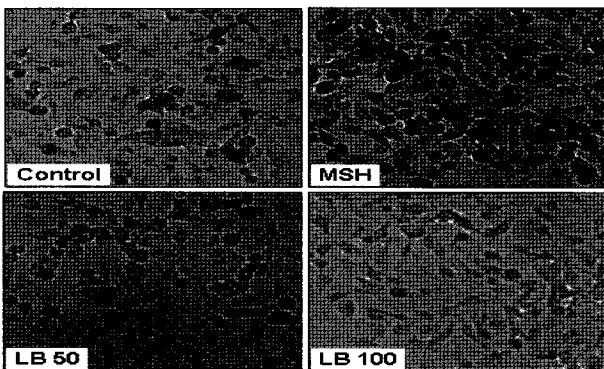


Fig. 2. Observation of tyrosinase activity by DOPA stain after treatment with LB. Cells were incubated with LB or α-MSH. After 5 days, cells were stained with DOPA as described in Materials & Methods. Control, α-MSH: α-MSH 20 nM, LB 50: 50 μg/ml, LB 100: 100 μg/ml (×200).

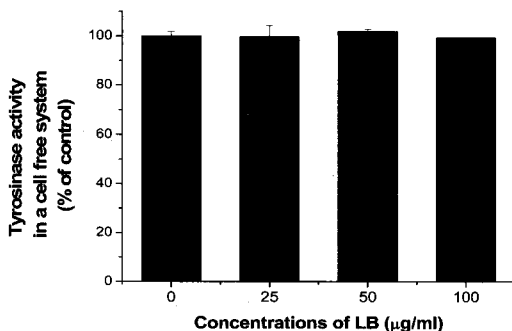


Fig. 3. Effects of LB on the tyrosinase activity in a cell free system. To test their direct effects on tyrosinase, tyrosinase activity was measured in a cell free system, as described in Materials and Methods. Various doses of LB was added to each well. Results are the averages of triplicate experiments±S.D.

## 2. α-MSH 유도 과색소침착시 싸리꽃 추출물의 미백효과

### 1) 멜라닌 합성 억제효과

α-MSH에 의한 과색소침착시 멜라닌 합성에 미치는 싸리꽃 추출물의 효과를 조사한 결과, α-MSH는 대조군의 342.1%로 약 3.5배 정도 멜라닌 색소가 증가하였고, α-MSH와 싸리꽃 추출물 100 μg/ml 병용 투여 시에 225.6%로 유의하게 감소하였다(Fig. 4A). 또한 α-MSH 처리군은 369.5%로 대조군에 비하여 tyrosinase 활성이 약 3.7배 증가하였다. 그러나 싸리꽃 추출물 100 μg/ml과 병용 처리한 경우 130.5%로 거의 대조군과 비슷한 수준으로 tyrosinase 활성이 현저히 감소하였다(Fig. 4B).

DOPA 염색을 이용하여 tyrosinase의 활성을 관찰한 결과, α-MSH 처리군은 대조군에 비하여 tyrosinase의 활성이 현저히 증가하였고 수지상 가지돌기의 수도 증가하였다(Fig. 5). 그러나 α-MSH와 싸리꽃 추출물 100 μg/ml 병용처리군은 α-MSH 단일 처리군에 비해 tyrosinase의 활성이 크게 감소하였다(Fig. 5).

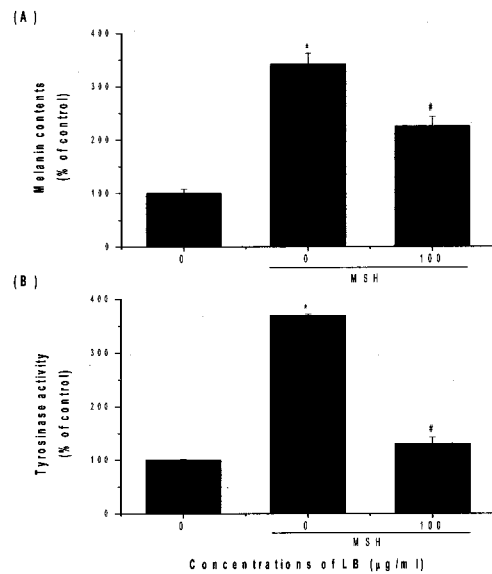


Fig. 4. Effects of LB on α-MSH-induced melanin synthesis in B16 cells. Cells were cultured with 100 μg/ml LB and α-MSH for 3 or 5 days. Melanin contents (A) and tyrosinase activity (B) were measured as described in Materials and Methods. Results are the averages of triplicate experiments±S.D. \* p<0.01; compared to control, # p<0.01; compared to the α-MSH treated group.

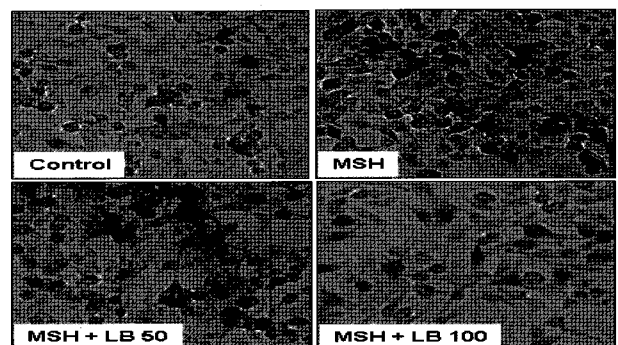


Fig. 5. Observation of tyrosinase activity in α-MSH-induced condition by DOPA stain. Cells were incubated with LB and α-MSH. After 5 days, cells were stained with DOPA as described in Materials & Methods. Control, α-MSH: α-MSH 20 nM, α-MSH+LB 50: α-MSH+LB 50 μg/ml, α-MSH+LB 100: α-MSH+LB 100 μg/ml. Arrows: dendritic process (×200).

2) 수지상 세포돌기의 형태적 관찰

멜라닌세포는 수지상의 가지돌기를 통하여 인접한 각질형성 세포에 멜라노솜을 수송하고 있는데, 자외선과 α-MSH 등의 자극에 의하여 멜라닌 합성이 촉진됨과 동시에 수지상 가지돌기의 수도 증가된다<sup>21-23)</sup>. 따라서 본 연구에서 싸리꽃 추출물 50, 100 μg/ml과 α-MSH를 병용처리하고 싸리꽃 추출물이 B16/F10 세포의 수지상 가지돌기 형성에 미치는 영향을 조사하였다.

α-MSH 단일 처리군은 대조군에 비하여 수지상 가지돌기가 현저히 증가하였다(Fig. 6). 그러나 싸리꽃 병용처리군에서는 수지상 가지돌기 형성이 α-MSH 처리군에 비하여 약간 감소되어, 싸리꽃 추출물은 α-MSH에 의한 가지돌기의 형성을 억제하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 6).

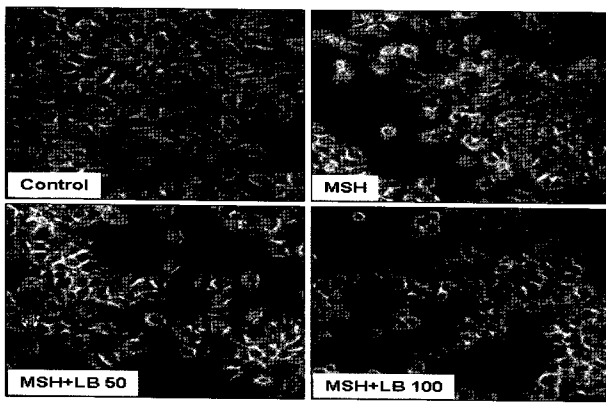


Fig. 6. Effects of LB on α-MSH-induced dendritic process in B16 cells. Cells were incubated with LB and α-MSH. After 5 days, cells were photographed with phase contrast inverted microscope. Control, α-MSH: α-MSH 20 nM, α-MSH+LB 50: α-MSH+LB 50 μg/ml, α-MSH+LB 100: α-MSH+LB 100 μg/ml. Arrows: dendritic process (×200).

고찰

멜라닌은 표피의 기저층 사이나 기저층의 아래, 털주머니 등에 존재하는 멜라닌 세포(melanocyte)로부터 합성되고, 세포질 돌기를 통해 각질형성세포(keratinocyte)로<sup>21)</sup> 전달되는데, 멜라닌의 합성은 세포의 유전적 요인과, 대사, 내분비, 염증, 감염, 종양 등과 같은 물리적 및 화학적 요인들에 의해 크게 좌우되고<sup>22)</sup>, 이런 원인들로 인한 멜라닌 합성 이상이 기미, 주근깨 등의 과색소 침착증을 발생시킨다<sup>7,8)</sup>. 또한 멜라닌은 생물 종 사이의 성적유인과 자외선(UV)에 의해 생성되는 자유라디칼(free radical)을 제거하는 scavenger로서의 역할을 함으로써 세포의 파괴를 방지하기도 하며, 신경전달체로서의 가능성 등이 알려져 있다<sup>24,25)</sup>.

싸리(Lespedeza bicolor)는 콩과에 속하는 다년생 낙엽관목으로서<sup>12,13)</sup>, 줄기와 잎은 호지자(胡枝子)라하며 胡枝子の 根(根)은 풍습에 의한 痺痛, 타박상, 적백 대하, 流注腫毒에 사용하였고, 민간에서는 피부질환치료에 이용되어 왔다. 이에 본 저자 등은 B16/F10 멜라닌세포주에서 싸리꽃 에탄올 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향과 α-MSH 유도 과색소침착에 미치는 영향을 조사하였다.

본 실험 결과 싸리꽃 추출물은 B16세포의 멜라닌 생성을 현

저히 감소시켰으며(Fig. 1A), 멜라닌 합성 속도조절 효소인 tyrosinase의 활성도 억제하였다(Fig. 1B). Tyrosinase 효소는 멜라닌 합성의 처음 두 단계 반응을 촉매하는데, 각각 tyrosine hydroxylase와 DOPA oxidase의 활성을 지닌다. 따라서 DOPA 염색을 이용하여 tyrosinase 활성을 관찰한 결과, 싸리꽃 추출물은 DOPA oxidase의 활성을 유의하게 억제하였다(Fig. 2).

따라서 싸리꽃 추출물이 tyrosinase 효소 활성을 직접적으로 억제하는지 알아보기 위하여 mushroom tyrosinase assay를 이용하여 cell free system에서 조사하였다. 그러나 싸리꽃 추출물은 시험관 내 tyrosinase 효소의 활성을 억제하지 않았다(Fig. 3). 이는 싸리꽃 추출물은 직접적으로 tyrosinase 효소의 활성을 억제하지 않고 B16F10세포의 신호전달경로를 통해 간접적으로 tyrosinase 활성을 조절함을 의미한다.

피부는 태양광선으로부터 인체를 보호하기 위하여 멜라닌세포의 멜라노솜에서 멜라닌을 합성하는데, 생성된 멜라닌은 각질형성세포로 이동되며, 일정 시간이 지나면 각질층의 탈락과 함께 밖으로 배출된다. 피부에 색소침착을 일으키는 대표적인 요인은 일광으로, 피부를 구성하고 있는 각질형성세포, 멜라닌세포, 섬유아세포는 물론 염증세포의 출현, prostaglandin, 여러 가지 cytokine, α-MSH의 변화 등이 서로 연관되어 종합적으로 일어나는 현상이다<sup>7-11)</sup>.

α-MSH는 뇌하수체 및 피부를 포함한 여러 가지 말초조직에서 분비되는 pleiotropic molecule로 표피세포의 성장과 증식, 국소조직의 면역 조절 등 다양한 생리적 기능에 관여하고 있으며, 멜라닌 합성을 자극하는 호르몬으로 잘 알려져 있다. 이는 세포막 수용체(melanocortin receptor 1, MC1R)와 결합하여 adenylate cyclase, protein kinase A(PKA), tyrosinase 활성 등을 통하여 멜라닌 생성을 촉진시키고, microphthalmia transcription factor (MITF) 단백질의 발현을 증가시켜 tyrosinase 유전자의 발현도 촉진한다<sup>11,26,27)</sup>.

본 실험에서 α-MSH에 의한 과도한 멜라닌 합성에 미치는 싸리꽃 추출물의 영향을 조사하였다. 싸리꽃 추출물은 α-MSH에 의한 멜라닌색소의 합성을 억제하였으며(Fig.4A), tyrosinase 활성도 대조군과 거의 비슷한 수준으로 억제하였다(Fig. 4B & 5). 또한 DOPA 염색 결과에서도 싸리꽃 추출물 병용 처리군은 tyrosinase의 활성이 감소하였음을 알 수 있었다(Fig. 5).

멜라닌세포는 신경능선(neural crest)에서 유래한 세포로서 가지돌기(dendritic process)를 갖고 있으며 약 30-40개의 각질형성세포와 연결되어 표피-멜라닌 단위(epidermal-melanin unit)를 형성하는데, 이 돌기를 통하여 멜라노솜이 각질형성세포로 이동된다<sup>21)</sup>. 멜라닌세포의 돌기형성(dendricity)과 인접한 각질형성세포 사이의 연결은 멜라노솜의 수송에 중요한 역할을 하고 있으며, 자외선과 α-MSH에 의해 이러한 epidermal-melanin network이 확장된다<sup>23)</sup>. 그러나 현재까지 멜라노솜의 수송기전과 조절에 대하여 거의 알려진 바 없으나, 멜라노솜은 kinesin, dynein, myosin V와 같은 운동단백질(motor protein)과 microtubule, actin filament에 의하여 가지돌기를 따라 각질형성세포로 이동되는 것으로 생각된다<sup>29,30)</sup>.

따라서 본 연구에서 싸리꽃 추출물이 수지상 가지돌기에 미치는 영향을 조사하였다. 실험결과  $\alpha$ -MSH 단일 처리군에서 대조군과 비교 시 수지상 가지돌기가 현저히 발달하였고, 싸리꽃 추출물과  $\alpha$ -MSH 병용처리 시 수지상 가지돌기의 수가  $\alpha$ -MSH 단일 처리군에 비하여 감소하였음을 알 수 있었다(Fig. 6).

Hunt 등<sup>26)</sup>은 MSH에 의해 tyrosinase 활성, 멜라닌, tyrosinase와 TRP-1 mRNA의 발현이 증가되었으며 가지돌기의 발달 등 형태적으로도 멜라닌화가 촉진되었다고 보고하였고, Busca 등(1998)<sup>27)</sup>은 cAMP 증가는 Rac과 Rho를 통하여 actin의 재배열(disorganization) 일으키고, 결과적으로 멜라닌세포의 가지돌기가 증가한다고 하였다. 이는 본 실험에서 Rac과 Rho에 미치는 영향은 조사하지 않았으나 싸리꽃 추출물은  $\alpha$ -MSH의 tyrosinase 활성 억제에 의해 멜라닌 합성을 억제하였으나 Rac과 Rho 경로를 경유한 수지상 가지돌기의 형성에 영향을 주었음을 가능성이 있다.

이상의 결과 싸리꽃 추출물은 멜라닌세포의 tyrosinase 효소 활성과 수지상 가지돌기의 형성 억제를 통하여 멜라닌의 생성을 감소시켰으며,  $\alpha$ -MSH 유도에 의한 과색소침착시 더욱 효과적으로 미백효과를 나타냈다. 따라서 싸리꽃 추출물은 미백 생리활성 효능 소재로서 더욱 심도 있는 연구를 지속할 필요가 있는 것으로 사료된다.

## 결 론

싸리꽃 추출물이 멜라닌 생성, tyrosinase 효소 및 수지상 가지돌기 형성에 미치는 영향을 조사하였다.

싸리꽃 추출물은 B16F10세포의 멜라닌 생성을 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 70.4%, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 37.3%로 억제하였다. 싸리꽃 추출물은 B16F10세포의 tyrosinase 활성을 억제하였으며, cell-free system에서는 tyrosinase 활성을 억제하지 않았다. 싸리꽃 추출물은  $\alpha$ -MSH에 의한 과색소침착시 더욱 효과적으로 멜라닌 생성과 tyrosinase 활성 및 수지상 가지돌기의 형성을 억제하였다.

이상의 결과 싸리꽃 추출물은 tyrosinase 효소 활성과 수지상 가지돌기의 형성 및 멜라닌 생성을 감소시켰으며,  $\alpha$ -MSH 유도 과색소침착시 더욱 효과적으로 미백효과를 나타냈다.

## 감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

## 참고문헌

1. 박경아 외. 조직학. 서울, 고려의학, pp 405-411, 1999.
2. McLaughlin, K.A., Townes, D.A., Wedmore, I.S., Billingsley, R.T., Listrom, C.D., Iverson, L.D. Pattern of injury and illness during expedition-length adventure races. Wilderness Environ Med 17(3):158-161, 2006.

3. Adelman, D., Saul, R.L., Ames, B.N. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. proc Natl Acad Sci USA 85: 2706-2708, 1988.
4. Bissett, D.L., Chatterjee, R., Hannon, D.P. Chronic ultraviolet radiation-induced increase in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators. photochem Photobio 54: 215-223, 1991.
5. Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freedman, B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation; The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch Biochem Biophys 288: 481, 1991.
6. Janssen, Y.M., Van Houten, B., Borm, P.J., Mossman, B.T. Cell and tissue responses to oxidative damage. Lab Invest 69: 261, 1993.
7. Ranson, M., Psen, S., Mason, R.S. Human melanocytes as a target tissue for hormones : in vitro studies with 1  $\alpha$ -25 dihydroxyvitamine D3,  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone, and beta estradiol. J Invest Dermatol 91: 593-598, 1988.
8. Prota, G. Recent advance in the chemistry of melanogenesis in mammals. J Invest Dermatol 75: 122, 1990.
9. Hearing, V.J., Tsukamoto, K., Urabe, K. et al. Functional properties of cloned melanogenic proteins. Pigment Cel Res 5: 264-270, 1992.
10. Walter, E., Roger, R., Monique, D.C., Dominique, L., Jean-paul, O., Robert, B. Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. J Bio Chem 270: 24315-24320, 1995.
11. Friedman, P.S., Wren, F., Buffey, J.  $\alpha$ -MSH causes a small rise in cAMP but has no effect on basal or ultraviolet-stimulated melanogenesis in human melanocytes. Br J Dermatol 123: 145-151, 1990.
12. 김창민, 신민교, 안영균, 이경호 외. 중약대사전. 10: 4871-4872, 1997.
13. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編. 本草學. 서울, 永林社, pp 450-451, 2004.
14. 田裕敏 編. 再編整理 黃帝內經 素問. 서울, 圖書出版 東源文化社, p 101, 619, 2002.
15. 田裕敏 編. 再編整理 黃帝內經 靈樞. 서울, 圖書出版 東源文化社, p 264, 2002.
16. 이양숙, 주은영, 김남우. 싸리(Lespedeza bicolor)추출물의 항산화성에 관한 연구. Korean J. Food Preserv. 12(1):75-79, 2005.
17. 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.
18. Sandra, M., De Leeuw, Nico, P.M., Smit Monique Van

- Veldhoven Ed, M. Pennings, Stan Pavel, Johannes, W.I.M. Simons, Albert, A. Schothorst. Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytoxicity. *J Photochem Photobio* 61: 106-113, 2001.
19. Hosoi, J.E., Suda, T., Kuroki, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1  $\alpha$ ,25-dehydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res* 45: 1474-1478, 1985.
  20. 전국임상병리교수협의회. 조직검사학. 고려의학, 서울, 제3판, pp 343-344, 1998.
  21. Provance, D.W., Jr, Wei, M., Ipe, V., Mercer, J.A. Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14554-14558, 1996.
  22. Chakraborty, A.K., Funasaka, Y., Slominski, A., Ermak, G., Hwang, J., Pawelek, J.M., Ichihashi, M. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim Biophys Acta* 1313: 130-138, 1996.
  23. Provance, D.W., Jr, Wei, M., Ipe, V., Mercer, J.A. Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14554-14558, 1996.
  24. 박수남. 피부노화와 항산화제. *대한화장품학회지* 23: 75-132, 1997.
  25. Mikkola, M.L., Millar, S.E. The Mammary Bud as a Skin Appendage: Unique and Shared Aspects of Development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* [Epub ahead of print], 2006.
  26. Hunt, G., Todd, C., Cresswell, J.E.  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7  $\alpha$ -MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J Cell Sci* 107: 205-211, 1994.
  27. Busca, R., Bertolotto, C., Abbe, P., Englaro, W., Ishizaki, T., Narumiya, S., Boquet, P., Ortonne, J.P., Ballotti, R. Inhibition of Rho is required for cAMP-induced melanoma cell differentiation. *Mol Biol Cell* 9: 1367-1378, 1998.
  29. Hara, M., Yaar, M., Byers, H.R., Goukassian, D., Fine, R.E., Gonsalves, J., Gilchrest, B.A. Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. *J Invest Dermatol* 114: 438-443, 2000.
  30. Wu, X., Bowers, B., Rao, K., Wei, Q., Hammer, J.A. Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo. *J Cell Biol* 143: 1899-1918, 1998.