

# 茵陳 에탄올추출물이 α-MSH로 유도된 과색소 형성에 미치는 영향

신기돈 · 김대성<sup>1</sup> · 이장천<sup>2</sup> · 문연자<sup>3,4</sup> · 우원홍<sup>1,4\*</sup> · 이영철\*

상지대학교 한의과대학 본초학교실, 1: 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과,  
2: 부산대학교 한의학전문대학원 약물의학부, 3: 원광대학교 한의과대학 해부학교실,  
4: 원광대학교 한국전통의학연구소

## Effect of the Ethanol Extract of *Artemisiae Capillaris* Herba on the Hyperpigmentation Induced by α-MSH

Ki Don Shin, Dae Sung Kim<sup>1</sup>, Jang Cheon Lee<sup>2</sup>, Yeun Ja Mun<sup>3,4</sup>, Won Hong Woo<sup>1,4\*</sup>, Young Cheol Lee\*

Department of Herbolgy, College of Oriental Medicine, Sangji University,

1: Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University,

2: Division of Pharmacology, School of Oriental Medicine, Pusan National University,

3: Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, 4: Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

Melanogenesis is induced mainly by ultraviolet radiation of sunlight and α-Melanocyte stimulation hormone (α-MSH) which binds to a specific G protein coupled receptor. α-MSH and cAMP-elevating agents are known to melanin synthesis and dendrite outgrowth. The purpose of this study was to investigate the mechanism of melanogenesis inhibition in B16/F10 cells by ethanol extract of *Artemisiae Capillaris* Herba. In the present study, α-MSH led to a stimulation of melanin synthesis that appeared to result from an increased tyrosinase activity and melanin content. However, the ethanol extract of *Artemisiae Capillaris* Herba inhibited the α-MSH-induced tyrosinase activity and melanin content. In control conditions, B16/F10 cells displayed a fibroblastic appearance while α-MSH treatment promoted the emergence of small and numerous dendrites from the plasma membrane. The ethanol extract of *Artemisiae Capillaris* Herba abolished the α-MSH-induced dendricity. Regarding protein levels of the melanogenic enzymes, the amounts of tyrosinase were increased after incubation with α-MSH. The treatment of *Artemisiae Capillaris* Herba ethanol extract decreased the α-MSH expression levels of tyrosinase. Based on these findings, it is likely that the ethanol extract of *Artemisiae Capillaris* Herba exerts its depigmenting effects in B16/F10 cells through the suppression of tyrosinase expression, which are key enzymes for melanogenesis.

Key words : *Artemisiae Capillaris*, α-MSH, melanin, tyrosinase, depigmentation, TRP-1

### 서 론

현대사회는 과학과 문명의 발달에 따라 환경오염에 의한 오존층의 파괴가 심각해지면서 자외선의 有害性에 대한 관심이 높아지고 있다. 전반적인 생활수준의 향상과 더불어 피부 건강과

미용에 대한 관심이 고조 되었으며, 대기오염으로 인해 자외선에 대한 피부 노출이 증가하게 됨으로써 피부탄력 감소, 주름살 및 기미·주근깨 등의 피부노화가 촉진됨에 따라 항노화 및 미백에 대한 관심이 날로 높아지고 있다. 따라서 皮膚色素疾患의 치료와 개선을 위하여 보다 안정적이고 효과적인 미백소재에 대한 연구가 활발하게 진행되는 추세 속에서 천연물에 대한 관심도 점차 증가되고 있다<sup>1,2)</sup>.

피부는 항상 산소와 접촉하고, 자외선에 노출되어 있어 활성 산소종에 의한 피부의 광산화적 손상 위험이 항상 존재한다. 산소는 대사 과정 중 일부가 superoxide radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>·), 과산화수

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

이영철, 강원도 원주시 우산동 660 상지대학교 한의과대학

· E-mail : whwoo@wku.ac.kr, lyc072@sangji.ac.kr

· Tel : 063-850-6845, 033-730-0672

· 접수 : 2009/03/20 · 수정 : 2009/04/21 · 채택 : 2009/05/14

소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxy radical(HO·), singlet oxygen(1O<sub>2</sub>)과 같은 활성 유해산소로 변환되는데, 이들은 지질과산화, 단백질 산화, 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 멜라닌 생성 반응의 촉진, DNA의 산화와 같은 생체 구성 성분들의 손상을 야기 시킨다. 이에 따라 피부탄력 감소, 주름살 및 기미·주근깨 등으로 특징 지워지는 피부노화가 가속화 된다<sup>36)</sup>.

멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 멜라닌세포의 멜라닌소체(melanosome)에서 합성되어 수상돌기를 통하여 표피의 각질화 세포로 이동되어 피부의 색을 나타내고, 자외선이나 외부자극 물질 등으로부터 피부를 보호하는 긍정적인 기능이 있는 반면, 과도한 색소 침착은 기미와 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하는 등 미용적인 면에서 부정적인 기능을 나타내기도 한다<sup>78)</sup>.

茵陳(*Artemisia capillaries*)은 국화과(Compositae) 쑥속에 속하며, 한국을 비롯하여 중국, 일본 등 아시아 및 유럽 등에 분포하고, 번식력이 강한 다년생 초본으로 높이 30~100 cm 내외이다.茵陳은 생약명으로, 민간에서는茵陳쑥으로 불리우며, 사철쑥(*A. capillaris*), 더위지기(*A. iwayomogi*), 털산쑥(*A. sacrorum subsp. manshuric* K.), 제비쑥(*A. angustssia*) 등으로 분류되고 capillene, 6,7-dimethylaesculetin, scopoletin 및 caffeic acid 등이 함유되어 있다.

茵陳의 맛은 고신(苦辛)하며, 성은 미한(微寒)하다. 귀경은 비(脾), 위(胃), 간(肝), 담(膽)경이며 효능은 청습열(淸濕熱), 퇴황달(退黃疸) 한다<sup>9)13)</sup>.茵陳의 약리적 효과는 황달, 간염, 간경화, 간기능 항진, 타박상, 명안, 관절염, 소염 등에 뛰어난 것으로 알려져 있어 일반 쑥과 구별하고 있다<sup>9)</sup>.茵陳의 실험적 연구로는 아미노산 분석, 과산화 지질에 대한 효과, 간보호 효과, 항산화 효과, 소염진통 작용 등이 보고되었다<sup>14)17)</sup>.

이에 저자는 천연약물 중 미백작용을 가지는 물질을 탐색하기 위한 일환으로 B16/F10 멜라닌세포주를 이용하여茵陳 에탄올추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료

실험에 사용된茵陳(*Artemisia capillaries* Herba)은 동우당제약(경북, 영천)에서 구입하여 원광대학교 한의학전문대학원의 약재보관 냉동고에 보관하여 사용하였다.茵陳 200 g에 에탄올 2,300 ml를 가하고 밀봉하여 72시간 동안 실온에서 shaking하였다. 2시간 동안 초음파분쇄기로 처리하고 거즈로 여과하여 감압 농축 후 2.53 g의 試料(수득률: 1.265%)를 얻어 냉장 보관하였다. 試料는 분주하여 DMSO에 녹여 사용하였다.

### 2. 세포주 및 세포배양

한국 세포주은행에서 분양받은 B16/F10 멜라닌세포주는 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. 세포독성(cell cytotoxicity) 측정

B16/F10세포는 serum-free DMEM배지를 사용하여 CO<sub>2</sub> incubator(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였으며, 세포생존율 측정은 Mosmann의 방법<sup>18)</sup>에 의하여 실시하였다. 24 well plate 각 홀에 B16/F10세포 3×10<sup>4</sup>개를 분주하여 24시간동안 배양한 후茵陳 에탄올추출물을 농도별로 처리한 다음 24시간 배양하였다. 배양완료 후 0.05% MTT용액을 넣어 2시간 37°C에서 배양한 다음 상층액을 제거하고 formazan 침전물에 1 ml의 DMSO를 넣어 약 15분간 실온에서 방치한 후 540 nm의 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 계산하였다.

### 4. B16/F10 세포내 tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 등의 방법<sup>19)</sup>으로 측정하였다. B16/F10 세포를 6 well 배양용기에 5×10<sup>4</sup>/well씩 분주하여 24시간 동안 배양하여 세포를 부착시킨 후, 시료와 α-MSH(20 nM)을 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, 0.1 M 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 0.1 M 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.

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

### 5. B16/F10 세포의 멜라닌 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등의 방법<sup>20)</sup>을 변형하여 사용하였다. B16/F10 세포를 직경 10 cm 배양용기에 1×10<sup>5</sup>개씩 분주하여 부착시킨 후,茵陳 추출물과 α-MSH(20 nM)를 각각 처리하여 3일 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.

### 6. 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.

### 7. Western blot 분석

B16/F10 세포를 10 cm 배양용기에  $2 \times 10^5$ 개의 세포를 부착시키고 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 시료를 처리한 후 72시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 모두 수거하여 세포침전물을 세포용해액 (Nonidet P-40, Sodium dodecyl sulfate, 0.1 M/l, Tris-HCl(pH 7.2), 100 mM/l PMSF, 10  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin, 10  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin)에 용해시킨 후 13,000 rpm에서 원심분리 하여 상등액을 취하였다. Protein은 bradford 시약(Bio-rad)을 이용하여 정량하였고, 50  $\mu\text{g}$  단백질과 2X sample buffer(1 ml of glycerol, 0.5 ml of  $\beta$ -mercaptoethanol, 3 ml of 10% SDS, 1.25 ml of 1 M Tris-HCl, 1~2  $\mu\text{g}$  of bromophenol blue)를 동량으로 혼합한 후 7.5% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. Nitrocellulose membrane에 전이시키고 5% non-fat skim milk로 blocking 시킨 후, tyrosinase과 actin의 antibody를 1:500으로 희석하여 각각 실온에서 3시간 동안 반응시켰다. TBST로 3회 세척한 후 tyrosinase는 anti-rabbit HRP로, actin은 goat polyclonal IgG로 2차 antibody를 1:1000으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. TBST로 세척한 후 western detection 용액으로 발색 후 반응시킨 후 image analysis 기기를 이용하여 band의 사진을 촬영하였다.

8. 통계처리

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

결 과

1. 세포생존율

茵陳 추출물이 B16/F10세포의 細胞毒性에 미치는 영향을 알아보기 위하여 12.5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하고 24시간 후 MTT assay 방법으로 세포생존율을 조사하였다. 그 결과茵陳 추출물 12.5, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 B16/F10세포의 세포생존율은 대조군 100%와 비교하여 99.1%, 99.4%, 91.0%로 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 1).

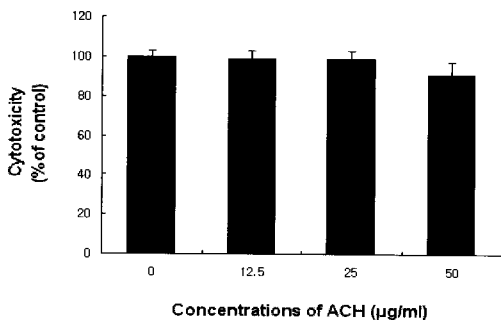


Fig. 1. Effect of ACH on B16F10 cell viability. Cells were serum-starved for 24 h and ACH was added to serum-free medium at 12.5 ~ 50  $\mu\text{g/ml}$  for 24 h. Cell viabilities were measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are means  $\pm$  S.D. of three experiments performed in triplicate. \*  $p < 0.05$ : compared with control.

2. Tyrosinase 활성도

$\alpha$ -MSH는 생체 내에서 다양한 생리적 기능에 관여하는데, 자외선이나 염증 시 피부에서 국소적으로 분비되는 호르몬으로 특히 흑색종 세포와 동물의 멜라닌세포를 자극하여 멜라닌 합성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서  $\alpha$ -MSH에 의한 과색소침착시茵陳 에탄올추출물의 효능을 조사한 결과,  $\alpha$ -MSH 처리군은 tyrosinase 활성이  $316 \pm 25\%$ 로 대조군의 약 3.2배 증가한 반면,茵陳 에탄올추출물과  $\alpha$ -MSH 병용 처리군은 25  $\mu\text{g/ml}$ 과 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각  $246 \pm 20\%$ ,  $146 \pm 24\%$ 로 감소시켰다(Fig. 2). 이러한 결과로 볼 때茵陳 에탄올추출물은  $\alpha$ -MSH에 의하여 증가된 tyrosinase의 활성을 농도 의존적으로 현저히 감소시킬 수 있었다.

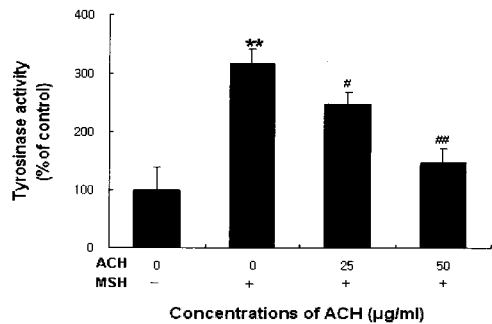


Fig. 2. Effect of ACH and  $\alpha$ -MSH on tyrosinase activity. The effect on tyrosinase activity was tested with various doses of ACH and  $\alpha$ -MSH in B16/F10 cells for 3 days. Data are expressed as percent (%) of control and each column represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments performed in triplicate. \*\*  $p < 0.01$ : compared to control group, #  $p < 0.05$ : compared to the  $\alpha$ -MSH treated group, ##  $p < 0.01$ : compared to the  $\alpha$ -MSH treated group.

3. 멜라닌 합성

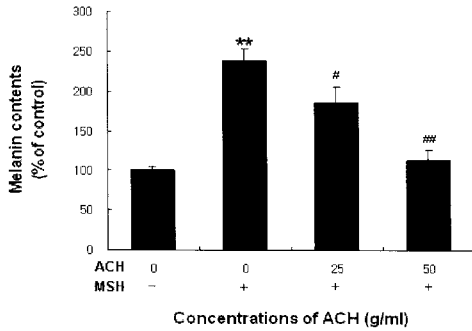
본 연구에서茵陳 에탄올추출물이 B16/F10 세포에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여  $\alpha$ -MSH와茵陳 에탄올추출물을 25  $\mu\text{g/ml}$ 와 50  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하여 3일간 배양한 후 총 멜라닌양을 측정하였다. 실험 결과  $\alpha$ -MSH 처리군은 총 멜라닌양이  $238 \pm 15\%$ 로 대조군의 약 2.4배 증가하였으며,茵陳 에탄올추출물과  $\alpha$ -MSH 병용 처리군의 경우 25  $\mu\text{g/ml}$ 과 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각  $186 \pm 20\%$ ,  $113 \pm 13\%$ 로 감소하였다(Fig. 3). 따라서茵陳 에탄올추출물은 특히 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서  $\alpha$ -MSH에 의해 증가된 B16/F10 세포의 멜라닌 합성을 매우 효과적으로 억제하였으며 이는 tyrosinase 활성도와 유사하게 나타났다.

4. DOPA 염색

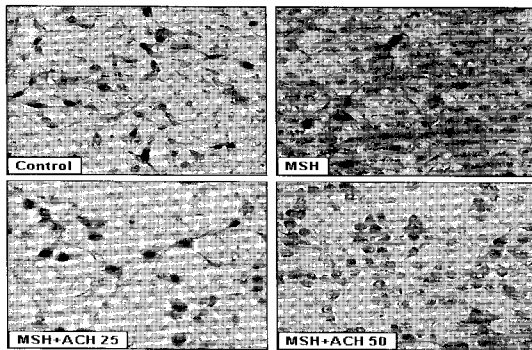
茵陳 에탄올추출물의 멜라닌합성 억제 효과를 형태적으로 관찰하기 위하여茵陳 에탄올추출물과  $\alpha$ -MSH를 병용처리하고 3일간 배양한 후 DOPA 염색을 실시하여 대조군과 비교하였다. Tyrosinase의 DOPA oxidase 활성을 관찰한 결과  $\alpha$ -MSH 처리군은 대조군에 비하여 활성이 현저히 증가하였으나,  $\alpha$ -MSH와茵陳 에탄올추출물의 병용처리군은  $\alpha$ -MSH군에 비해 tyrosinase의 활성이 크게 감소하였다. 또한  $\alpha$ -MSH군은 수지상 가지돌기가 현저히 발달하였고,  $\alpha$ -MSH와茵陳 에탄올추출물 병용처리군의 경우  $\alpha$ -MSH군에 비하여 수지상 돌기가 감소하였음을 알 수 있

었다(Fig. 4).

## 고찰



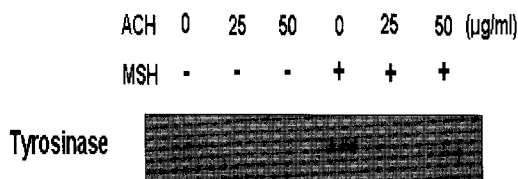
**Fig. 3. Effect of ACH and α-MSH on melanin contents.** Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of ACH and α-MSH for 5 days. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means  $\pm$  S.D. of three experiments performed in triplicate. \*\*  $p < 0.01$ : compared to control group, #  $p < 0.05$ : compared to the α-MSH treated group, ###  $p < 0.001$ : compared to the α-MSH treated group.



**Fig. 4. Observation of tyrosinase activity by DOPA stain after treatment with ACH and α-MSH.** Cells were incubated with ACH and α-MSH. After 5 days, cells were stained with DOPA as described in Materials & Methods. Control: untreated group, α-MSH: α-MSH 20 nM, α-MSH+ACH 25: α-MSH+ACH 25 μg/ml, α-MSH+ACH 50: α-MSH+ACH 50 μg/ml ( $\times 200$ ).

### 5. Tyrosinase 단백질 발현

본 연구에서 western blot을 이용하여茵陳 에탄올추출물이 α-MSH에 의한 과색소침착시 세포 내 tyrosinase 효소의 단백질 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 결과, α-MSH 처리군은 tyrosinase 발현이 대조군에 비하여 현저히 증가하였으며, α-MSH와茵陳 에탄올추출물 병용처리군의 경우 유의하게 감소하였다(Fig. 5).



**Fig. 5. Effect of ACH and α-MSH on tyrosinase protein expression.** Cells were incubated with ACH and α-MSH. After 3 days, whole cell lysates were then subjected to Western blot analysis using antibodies against tyrosinase as described in Materials & Methods. Lane 1: untreated group, Lane 2: ACH 25 μg/ml, Lane 3: ACH 50 μg/ml, Lane 4: α-MSH 20 nM, Lane 5: α-MSH and ACH 25 μg/ml, Lane 6: α-MSH and ACH 50 μg/ml.

멜라닌은 태양광선으로부터 인체를 보호하기 위하여 멜라닌 세포 내에서 합성되는데, 합성된 멜라닌은 각질형성세포로 이동되며, 일정 시간이 지나면 각질층의 탈락과 함께 밖으로 배출된다. 피부의 색소침착을 일으키는 요인은 UV, 피부를 구성하고 있는 각질형성세포, 멜라닌세포, 섬유아세포는 물론 염증세포의 출현, prostaglandin, cytokine, α-MSH의 변화 등이 서로 연관되어 종합적으로 색소침착이 조절하며, 이 중 대표적인 요인은 일광이다<sup>21-23</sup>).

최근 기미, 주근깨 등의 색소 침착을 예방하거나 제거하려는 목적으로 tyrosinase 활성 억제 효과가 있는 미백제를 찾기 위해 활발히 연구하고 있으며, 그 중에서도 환경 친화적이고 피부 안정성이 우수한 한방 소재 개발이 활발해지고 있다. 현재까지 tyrosinase 활성 억제제로 알려진 물질로는 4-hydroxyanisole, 5-hydroxyindole 및 hydroquinone와 kojic acid, arbutin, oxyresveratrol 등이 있으며, 그 외에도 stilbene계 화합물인 α-viniferin, isoflavonoid류인 ferulic acid가 알려져 있다<sup>24,25</sup>. 이밖에도 감초<sup>26,27</sup>, 더덕<sup>28</sup>, 천화분<sup>29</sup>, 백출<sup>30</sup>, 사삼<sup>31</sup> 등의 식물추출물이 멜라닌 합성 억제 효능이 있다고 보고되었다. 또한 천 등<sup>32</sup>은茵陳속 물추출물의 조다당체가 100 μg/ml 농도에서 B16/F10세포의 멜라닌생성을 14% 억제하였음을 보고하였다.

본 실험에서茵陳 추출물의 멜라닌 합성 억제 효과를 밝히기 위하여茵陳 에탄올추출물을 사용하였으며, B16/F10 세포에서 멜라닌 합성을 조절하는지 알아보았다. 실험결과茵陳 에탄올추출물은 B16/F10 세포에 대한 독성을 보이지 않았다(Fig. 1).

자외선(UV)은 인체에서 과도한 피부색소 침착을 일으키는 주요 원인으로, 각질형성세포와 멜라닌세포는 자외선에 대하여 α-MSH와 부신피질자극호르몬(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)과 같은 melanocortin peptide를 분비하는데, 이때 α-MSH는 멜라닌세포의 주변분비(paracrine)와 자가분비(auto-crine) 인자로서 피부의 색소침착에 관여하고 있다<sup>33</sup>.

멜라닌 생성에 대한 α-MSH의 연구로는 Lerner(1993)<sup>34</sup>는 인체에 α-MSH를 주입한 결과 피부의 tanning 현상을 관찰하였고, Ranson 등(1988)<sup>35</sup>은 배양 멜라닌세포에서 cAMP와 tyrosinase 활성을 증가시켰으며, 임 등<sup>36</sup>은 색소성 질환인 기미(melasma) 부위에서 α-MSH의 발현이 증가되었음을 보고 하였다. 따라서 본 실험에서 과색소생성시茵陳 에탄올추출물의 효과를 알아보기 위하여 α-MSH로 tyrosinase 활성과 멜라닌 합성을 자극시키고茵陳 에탄올추출물이 미치는 영향을 조사하였다. α-MSH는 B16/F10 세포의 tyrosinase 활성을 약 3.2배(316 $\pm$ 25%) 증가시켰고,茵陳 에탄올추출물 50 μg/ml와 α-MSH 병용처리 시 tyrosinase 활성은 146 $\pm$ 24%로 감소되었다(Fig. 2). 또한 α-MSH는 B16/F10 세포의 멜라닌 합성을 약 2.4배(238 $\pm$ 15%) 증가시켰으며,茵陳 에탄올추출물 25, 50 μg/ml와 α-MSH 병용처리군의 경우 멜라닌 합성은 각각 186 $\pm$ 20%, 113 $\pm$ 13%로 현저히 감소되었다(Fig. 3).

Hunt 등<sup>37</sup>은 MSH에 의해 tyrosinase 활성, 멜라닌, tyrosinase

와 TRP-1 mRNA의 발현이 증가되었으며 가지돌기의 발달 등 형태적으로도 멜라닌화가 촉진되었다고 보고하였다. 본 실험에서도 Western blot을 이용하여  $\alpha$ -MSH에 의한 과색소침착시 tyrosinase 단백질 발현에 미치는 영향을 조사한 결과,  $\alpha$ -MSH 처리군에서 대조군에 비하여 tyrosinase 발현이 현저히 증가하였으며,  $\alpha$ -MSH와茵陳 에탄올추출물 병용 처리군에서는 현저히 감소하였다(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 형성한다<sup>38)</sup>. 멜라닌세포의 돌기형성(dendricity)과 인접한 각질형성세포 사이의 연결은 멜라노솜의 수송에 중요한 역할을 하고 있으며, 자외선과  $\alpha$ -MSH에 의해 이러한 epidermal-melanin network이 확장된다. 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 생각되며<sup>39,40)</sup>, Busca 등<sup>41)</sup>은 cAMP와 Rac과 Rho를 통하여 actin의 재배열(disorganization) 일으키고, 결과적으로 멜라닌세포의 가지돌기가 증가한다고 하였다.

본 실험 결과  $\alpha$ -MSH에 의하여 가지돌기가 증가하였으며,茵陳 에탄올추출물은  $\alpha$ -MSH로 인한 가지돌기 형성을 억제하였다(Fig. 4). 비록 본 실험에서 Rac과 Rho에 미치는 영향은 조사하지 않았으나茵陳 에탄올추출물은 가지돌기의 형성을 효과적으로 억제하였으며, 이는茵陳 에탄올추출물의 수지상 가지돌기의 형성 억제작용이 kinesin, dynein, myosin V와 같은 운동단백질(motor protein)과 microtubule, actin filament에 영향을 미쳤을 가능성이 있다.

$\alpha$ -MSH는 뇌하수체 및 피부를 포함한 여러 가지 말초조직에서 분비되는 pleiotropic molecule로써 표피세포의 성장과 증식, 국소조직의 면역 조절, 멜라닌 색소 생성 등 다양한 생리적 기능에 관여한다. 이는 세포막 수용체(melanocortin receptor 1, MC1R)와 결합하여 Gs 단백질을 활성화시키고, 이차적으로 adenylate cyclase 활성화에 의해 cAMP가 증가되고 연속적으로 protein kinase A(PKA), CREB, microphthalmia transcription factor (MITF), tyrosinase 활성화 등을 통하여 멜라닌 생성을 촉진시킨다<sup>42-44)</sup>. 본 실험결과에서茵陳 에탄올추출물은  $\alpha$ -MSH에 의해 증가된 tyrosinase 활성화와 멜라닌 합성을 효과적으로 억제하였기 때문에茵陳 에탄올추출물이 cAMP 경로를 조절하여 tyrosinase 활성화와 멜라닌 합성을 조절하는지 알아봐야 할 것이다.

이상의 결과茵陳 에탄올추출물은  $\alpha$ -MSH에 의해 자극된 세포에서 tyrosinase 활성화와 단백질 발현양 그리고 수지상 가지돌기의 형성을 억제하였고, 멜라닌 합성 또한 감소시켰다. 따라서茵陳 에탄올추출물은 멜라닌 합성 기능이 항진 되었을 때 효과적인 멜라닌 합성 억제 효과가 있음을 알 수 있었다.

## 결 론

茵陳 에탄올추출물이 멜라닌 합성 조절 기전에 미치는 영향

을 조사하고자, B16/F10 세포를 이용하여  $\alpha$ -MSH 유도된 과색소 침착시 미치는 영향을 조사하였다.

茵陳 에탄올추출물은 12.5~50  $\mu$ g/ml 농도구간에서 B16/F10 세포에 독성을 나타내지 않았다.  $\alpha$ -MSH에 의해 B16/F10 세포의 tyrosinase 활성이 약 3.2배(316 $\pm$ 25%) 증가되었으며,茵陳 에탄올추출물 병용처리군의 경우 50  $\mu$ g/ml 농도에서 146 $\pm$ 24%로 대조군과 유사한 수준으로 tyrosinase 활성을 억제하였다.  $\alpha$ -MSH에 의해 B16/F10 세포의 멜라닌 합성이 약 2.4배(238 $\pm$ 15%) 증가되었으며,茵陳 에탄올추출물 병용처리군의 경우 50  $\mu$ g/ml 농도에서 113 $\pm$ 13%로 대조군과 유사한 수준으로 멜라닌 합성이 억제하였다.茵陳 에탄올추출물은  $\alpha$ -MSH에 의해 증가된 tyrosinase 단백질 발현과 수지상 가지돌기의 형성을 억제하였다.

이상의 결과茵陳 에탄올추출물은  $\alpha$ -MSH에 의해 자극된 세포에서 tyrosinase 효소의 발현과 수지상 가지돌기의 형성을 억제하였으며, 결과적으로 멜라닌의 합성이 감소된 것으로 생각된다. 따라서茵陳 에탄올추출물은 멜라닌 합성 기능 항진 시 미백 효과가 있음을 알 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 2008년도 진안군 '친환경홍삼한방산업클러스터사업단'의 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. Hara, M., Yaar, M., Byers, H.R., Goukassian, D., Fine, R.E., Gonsalves, J., Gilchrist, B.A. Kinesin participates in melanosomal movement along melanocyte dendrites. J Invest Dermatol 114: 438-443, 2000.

8. 중앙대사전편찬위원회. 중앙대사전. 서울, 정담, pp 3500-3506, 1999.
9. 전국한의과대학 본초학교수 공편. 본초학 7권. 서울, 영림사, pp 450-451, 2004.
10. 국가중약관리국중화본초편찬위원회. 중화본초 7권. 상해, 상해과학기술출판사, pp 687-693, 1999.
11. 신길구. 신씨본초학. 서울, 수문사, pp 661-663, 1988.
12. 허준. 대역동의보감. 서울, 법민문화사, p 1930, 1999.
13. 김시나, 김희석, 남경숙, 황성완, 황성연. 인진 추출물의 소염 진통작용. 생약학회지 36(4):338-343, 2005.
14. 송영은, 류지성, 정주리, 곽준수, 김대향, 김법석, 임채웅. 한 인진의 생리활성에 관한 연구. 한약잡지, 9(2):116-123, 2001.
15. 최병범, 이해정, 방선권. Studies on the Amino Acid, Sugar Analysis and Antioxidative Effect of Extracts from *Artemisia* sp. 한국식품영양학회, 17: 86-91, 2004.
16. 홍정희, 전정란, 이주현, 이인선. 약쑥(*Artemisia princeps* Pamp)의 항산화작용. 한국식품영양학회지, 36(6):657-662, 2007.
17. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199-1200, 1958.
18. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assay. J Immunol Methods 65: 55-63, 1983.
19. 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.
20. Hosoi, J.E., Suda, T., Kuroki, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and retinoic acid. Cancer Res 45: 1474-1478, 1985.
21. 은희철. 피부면역학. 서울, 서울대학교출판부, p 143, 1999.
22. Englaro, W., Bahadoran, P., Bertolotto, C., Busca, R., Derijard, B., Livolsi, A., Peyron, J.F., Ortonne, J.P., Ballotti, R. Tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition of melanogenesis is dependent on nuclear factor kappa B activation. Oncogene 18: 1553-1559, 1999.
23. Kameyama, K., Takamura, T., Hamada, Y., Sakai, C., Kondoh, S., Nishiyama, S., Urabe, K., Hearing, V.J. Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), dopachrome tautomerase (TRP2) and a melanogenic inhibitor. J Invest Dermatol 100: 126-131, 1993.
24. Dawley, R.M., Flurkey, W.H. 4-hexylresocinol, a potent inhibitor of mushroom tyrosinase. J Food Sci 58: 609-610, 1993.
25. Maeda, K., Fukuda, M. In vivo effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. J Soc Cosmet Chem 42: 361-368, 1991.
26. 이주상, 김정아, 조세훈, 손애량, 장태수, 소명숙, 정시련, 이승호. 감초의 tyrosinase 활성 억제 성분. Kor J Pharmacogn 34(1):33-39, 2003.
27. 문연자, 김진, 임난영, 이승연, 곽섭, 황충연, 우원홍. 감초 물 추출물의 멜라닌 형성 억제효과. 동의생리병리학회지 16(6): 1230-1235, 2002.
28. 이승연, 김진란, 오현철, 임숙정, 황충연, 문연자, 우원홍. 더덕추출물이 멜라닌생성에 미치는 영향. 대한한의학 방제학회지 10(2):199-211, 2002.
29. 문연자, 이성원, 임숙정, 송채석, 이관순, 임규상, 우원홍. 천화분 수추출물이 B16 흑색종 세포의 멜라닌 생성 억제 효과. 한국전통의학지, 10(2):149-159, 2000.
30. 천현자, 최은영, 윤성찬, 남항우, 백승화, 우원홍. 백출의 에탄올 추출물에 의한 melanin 생성 억제 효과. 약학회지 45(3): 269-275, 2001.
31. 임난영, 권강주, 김윤석, 백순기, 임주락, 문연자, 우원홍. 사삼메탄올 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과. 동의생리병리학회지 18(3):747-753, 2004.
32. 천현자, 안병용, 한종현, 우원홍. 인진쑥 물추출물의 조다당체에 의한 Melanin 생성억제 효과. 대한약학회, 45(6):701-707, 2001.
33. Chakraborty, A.K., Funasaka, Y., Slominski, A., Ermak, G., Hwang, J., Pawelek, J.M., Ichihashi, M. Production and release of pro-opiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: Regulation by ultraviolet B. Biochim Biophys Acta 1313: 130-138, 1996.
34. Lerner, A.B. The discovery of the melanotropins: a history of pituitary endocrinology. Ann NY Acad Sci 680: 1-12, 1993.
35. Ranson, M., Psen, S., Mason, R.S. Human melanocytes as a target tissue for hormones : in vitro studies with 1  $\alpha$ -25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>,  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone, and beta estradiol. J Invest Dermatol 91: 593-598, 1988.
36. Im, S., Kim, J., On, W.Y., Kang, W.H. Increased expression of  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone in the lesionl skin of melasma. Br J Dermatol 146: 165-167, 2002.
37. Hunt, G., donatien, P.D., Lunec, J. Cultured human melanocytes respond to MSH peptides and ACTH. Pigment Cell Res 7: 217-221, 1994.
38. 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.
39. 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.

40. 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.
41. 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.
42. De Leeuw, S.M., Smit, N.P., Van Veldhoven, M., Pennings, E.M., Pavel, S., Simons, J.W., Schothorst, A.A. Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. *J Photochem Photobiol* 61(3):106-113, 2001.
43. Englaro, W., Bahadoran, P., Bertolotto, C., Busca, R., Derijard, B., Livolsi, A., Peyron, J.F., Ortonne, J.P., Ballotti, R. Tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition of melanogenesis is dependent on nuclear factor kappa B activation. *Oncogene* 18: 1553-1559, 1999.
44. Suzuki, I., Cone, R.D., Im, S., Nordlund, J., Abdel-Malek, Z.A. Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology* 137: 1627-1633, 1996.