

더덕추출물이 멜라닌생성에 미치는 영향

이승연, 김진만, 오현철, 임숙정, 황충연, 문연자, 우원홍
원광대학교 한의학전문대학원

Abstract

The effect of *Codonopsis lanceolata* on the melanogenesis

Seung-Yon Lee, Jin-Man Kim, Hyun-Chul Oh, Sook-Jung Im,
Chung-Yeon Hwang, Yeun-Ja Mun, Won-Hong Woo

Professional Graduate School of Oriental Medicine, Won Kwang University, Iksan, 570-749, Korea

Acquired pigmentary skin diseases such as abnormal melanogenesis, vitiligo, chloasma and inflammatory pigmentation are related to regulate the melanin production. The aim of this study was to investigate the effect of *Codonopsis lanceolata* on the melanogenesis of HM3KO human melanoma cells biologically. The cells were treated for 5 days with *Codonopsis lanceolata* at several concentrations. Treatment with *Codonopsis lanceolata* suppressed melanin contents as a dose dependent manner without cytotoxicity and morphological change. And the extract of *Codonopsis lanceolata* also inhibited tyrosinase, a key enzyme forming melanin, in a dose-dependent manner. And it did not affect the DOPAchrome tautomerase(TRP-2) activity. These results suggest that *Codonopsis lanceolata* is a candidate for an efficient whitening agent which suppresses melanogenesis by a Raper-Mason pathway.

Keywords : *Codonopsis lanceolata*, HM3KO human melanoma cells, melanogenesis, tyrosinase activity, melanin content

교신저자: 우 원 홍

익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의학전문대학원

TEL : 063)850-6845

E-mail : whwoo@wonkwang.ac.kr

접수일자 : 2002. 11. 16 채택일자 : 2002. 12. 21

* 본 연구는 보건 의료 기술 연구 개발 사업 02-PJ1-PG4-PT05-0003의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

I. 서 론

피부는 표피, 진피, 피하지방층으로 구성되어 있으며 맨 바깥층에 존재하는 표피층은 각질세포, 멜라닌세포, 랑게한스세포, 메르켈세포들로 이루어져 있다. 이중 멜라닌세포(melanocyte)는 인간의 머리카락과 피부색을 이루는 색소인 멜라닌을 합성, 분비하는 세포로, 주로 표피의 기저층(basal layer) 사이나 기저층의 아래 그리고 털주머니에서 관찰된다(1).

멜라닌의 생합성은 주로 tyrosinase의 작용에 의해 이루어지는 것으로, 그 과정은 L-tyrosine으로부터 DOPA로의 hydroxylation, DOPA에서 DOPAquinone으로의 산화, DOPAquinone에서 DOPAchome의 생성, DOPAchome에서 DHI(5,6-dihydroxyindole)로의 전환, DHI의 산화적 중합 및 단백질과의 결합을 통해 최종적으로 멜라닌을 합성하는 Raper-Mason Pathway를 통하여 생합성되는 것(2, 3)으로 알려져 왔으나, 생체 내에서 DOPAchome이 DHI로 전환되는 경로 외에도 DOPAchome tautomerase (TRP-2) 작용에 의해 DHICA로 전환되는 새로운 경로가 존재한다 하였다(4-7).

멜라닌세포의 멜라닌소체(melanosome)에서 생성된 멜라닌은 세포질 돌기를 통하여 표피의 기저층과 가시층의 각질화세포(keratinocyte)로 운반된다. 이때 한 개의 멜라닌세포와 이에 관계하는 여러 개의 각질화세포 사이에 기능적인 연관성이 있으며, 이를 표피-멜라닌 단위(epidermal-melanin unit)라고 한다(1, 8). 각질화세포로 이동한 멜라닌은 자외선 등에 의한 피부의 광노화나 일광각화증을 억제하고 보호하는 긍정적인 기능(9, 10)과, 미용적인

측면에서 볼 때 색소침착 뿐만 아니라 멜라닌 전구물질들에 의한 독성으로 세포의 사멸을 촉진하는 부정적인 기능도 가지고 있다(11). 그러므로 이러한 멜라닌 생합성의 부정적인 기능을 제어하려는 연구가 많이 시도되고 있는데 현재까지는 아직 임상적인 효능이 증명되지 않은 kojic acid나 arbutin과 같은 몇가지 물질들이 알려져 있고, hydroquinone은 매우 효과적이지만 멜라닌세포에 독성이 심하여 잠재적인 돌연변이원(mutagen)이 될 것으로 알려져 있다(3).

최근 미에 대한 사회적인 관심이 증가하면서 세포에 독성이 적으면서 멜라닌 합성을 감소시키고, 동시에 non-mutagenic한 미백제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 특히 이러한 물질을 찾기 위한 천연 물질에 대한 관심은 점차 증가되고 있는 실정이다.

더덕(*Codonopsis lanceolata*)은 우리나라 각지의 산야에 자생 또는 재배하는 다년생의 덩굴성 초본으로, 전체에 털이 있고 연질이며 자르면 백색의 유액이 나온다. 생약으로는 뿌리를 사용하고 뿌리에 oleanolic acid, albigenic acid, phytosterol 등이 함유되어 있으며 거담, 강장, 기관지염, 해소, 천식에 주로 사용된다(12). 한방 미용학적인 측면에서는 더덕뿌리가 알려져 있는데, 더덕가루와 냉이우린 물, 꿀, 밀가루를 혼합하여 사용하면 피부에 진정, 소염작용 및 잔주름 예방, 보습작용이 있다 하여 널리 사용되었다(13). 약리작용으로는 더덕 첨가식이에 의한 혈청지질의 감소(14), 더덕 에탄올추출물의 항산화효과(15), 더덕 물추출물이 세포성 면역반응에 미치는 영향(16) 및 면역세포에 미치는 영향(17) 등이 보고되었다. 그러나 피부세포에

대한 더덕의 약리작용에 관한 연구는 아직 보고된 바 없다.

이에 본 연구에서는 한방 피부미용학에서 널리 활용되어진 더덕이 피부의 멜라닌 합성과정에서 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 HM3KO human melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 생성과정에서 가장 중요한 효소인 tyrosinase 활성도와 최종산물인 멜라닌량을 측정하였고, 광학현미경을 이용하여 세포구조를 관찰하였다. 또한 두 가지 멜라닌 합성경로 중 한가지의 경로에서 중요한 역할을 하는 DOPAchrome tautomerase(TRP-2)에 미치는 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1) 더덕추출물

본 실험에 사용한 더덕 물추출물은 원광대학교 부속 한방병원에서 구입하였으며, 더덕물추출물 100g에 물 1ℓ를 가하여 3시간 동안 끓인 후 거르로 여과하고 3,200rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. Rotary evaporator로 감압 농축시킨 후 -70℃에서 freeze dryer로 동결건조하여 9.4g의 시료(수득률: 9.4%)를 얻었다. 試料는 세포에 투여하기 전 0.22 μ m pore의 여과지로 멸균하여 사용하였다.

2) HM3KO 세포주 배양

Human melanoma 세포주인 HM3KO 세포의 배양은 CO₂ 배양기(37℃, 5%)에서 10% fetal bovine serum(Hyclones)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle medium

(DMEM, Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지를 이용하였으며 약 48시간 주기로 배양액을 교체해주었다.

3) 세포 증식 측정

세포를 배양판(6 cm dish)에 well당 1x10⁵ 씩 분주한 후 24시간 배양하여 배양 용기에 세포를 부착하였다. 더덕 물추출물을 각 농도별로 처리하고 5일간 배양하였고, 배양 완료후 각 well에 0.05% trypsin-0.02% EDTA 용액을 가하여 세포를 분리 수거하고, PBS로 2회 세척 한 후 혈구계산판을 이용하여 각 well 당 세포수를 측정하였다.

4) 시험관 내 Tyrosinase 활성도 실험

시험관내 tyrosinase 억제효과는 DOPAchrome 방법(18, 20)을 이용하여 조사하였다. 더덕추출물을 농도별로 첨가한 sodium phosphate buffer(pH 7.0)와 150 unit의 mushroom tyrosinase(Sigma Chemical Co.), 2.5mM L-tyrosine을 넣고 온도조절 장치가 있는 분광광도계로 37℃, 405nm에서 흡광도의 변화를 30분동안 관찰하였다.

5) 세포내 Tyrosinase 활성도 측정

Tyrosinase 활성도는 Martinez-Esparza M 등(23)의 방법에 의하여 측정하였다. 멜라닌세포를 수확하여 세포침천물을 만들고, 100 μ l 세포용해액(lysis buffer; 1% Triton X-100, 10mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM PMSF)을 넣고 4℃ 얼음에서 30분간 때때로 흔들어주면서 세포를 파괴시킨 후 원심분리하여 상층액을 취하여 tyrosinase 활성측정용액으로 사용하였다. 50 μ l의 상층액에 100mM sodium

phosphate(pH 7.0) 100 μ l를 넣고 30 $^{\circ}$ C 물 중탕기에서 5분간 보온한 후 100mM catechol 50 μ l를 넣고 온도조절장치가 있는 분광광도계로 37 $^{\circ}$ C, 405nm에서 흡광도의 변화를 1시간 관찰하였다.

6) 세포내 멜라닌 정량 (Melanin content) 측정

멜라닌 정량은 Hosei 등(24)의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양세포는 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 후 혈구계산판을 이용하여 각 well당 세포수를 계산하고, 원심분리하여 수확하였다. 세포침전물에 1ml의 증류수를 넣어 현탁 후 초음파로 분쇄한 후, 원심분리하여 침전물을 수확하였다. Acid-insoluble material을 얻기 위해 2배의 dimethyl sulfoxide (DMSO)가 첨가된 1N NaOH 300 μ l를 넣어 80 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 처리하여 용해시켰다. 405nm에서 흡광도를 측정하였으며 멜라닌 정량은 합성멜라닌(Sigma chemical Co.)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준 곡선에서 구하였다.

7) 세포내 DOPachrome tautomerase (TRP-2) 활성도 측정

Dopachrome tautomerase(TRP-2) 활성도는 Funasaka 등(4)의 방법에 의하여 측정하였다. 멜라닌세포를 수확하여 세포침전물을 만들고, 100 μ l 세포용해액(lysis buffer; 1% Triton X-100, 10mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM PMSF)을 넣고 4 $^{\circ}$ C 얼음에서 30분간 때때로 흔들어주면서 세포를 파괴시킨 후 원심분리하여 상층액을 취하여 Dopachrome tautomerase 활성측정용액으로 사용하였다. Dopachrome

을 기질로 사용하고, Ag₂O와 L-dopa를 반응시켜 온도 조절장치가 있는 분광광도계로 37 $^{\circ}$ C, 475nm에서 흡광도의 변화를 1시간 관찰하였다.

8) 광학현미경적 관찰

세포의 형태적은 배양완료후 Inverted Microscope(phase contrast, Leica, Germany)를 이용하여 관찰하였다.

III. 결 과

1. 더덕의 시험관내 tyrosinase 활성 억제 효과

Tyrosinase는 melanin 합성의 key enzyme으로 작용하기 때문에 버섯 tyrosinase를 이용한 시험관 내 tyrosinase 활성억제실험은 피부 미백제의 개발에 있어서 유용한 일차평가법으로 인정되고 있다(18-20).

더덕이 tyrosinase 효소에 미치는 영향을 조사하기 위하여 버섯 tyrosinase를 이용하여 시험관 내 tyrosinase 활성도를 측정한 결과, 0.01 mg/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 92%, 0.1 mg/ml 농도에서 86%, 0.5 mg/ml 농도에서 68%, 1 mg/ml 농도에서는 67%로 버섯 tyrosinase 활성도가 농도에 의존적으로 감소하였다(Fig. 1). 이상의 결과 더덕 물추출물은 시험관내 tyrosinase 활성도를 효과적으로 억제하였다.

2. 더덕이 HM3KO human melanoma

세포의 증식에 미치는 영향

HM3KO human melanoma 세포에서

더덕추출물의 멜라닌 생성 억제효과를 조사하기 위하여, 더덕추출물의 농도에 따라 human melanoma 세포에 미치는 영향을 조사하였다. 더덕추출물을 농도별로 5일간 human melanoma 세포에 투여한 후

세포수를 측정, 관찰한 결과, 대조군에 대한 백분율이 117.5%, 124.2%, 127.1%로 나타나 더덕추출물에 의하여 세포증식이 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 2).

따라서, 더덕 물추출물은 HM3KO 세포

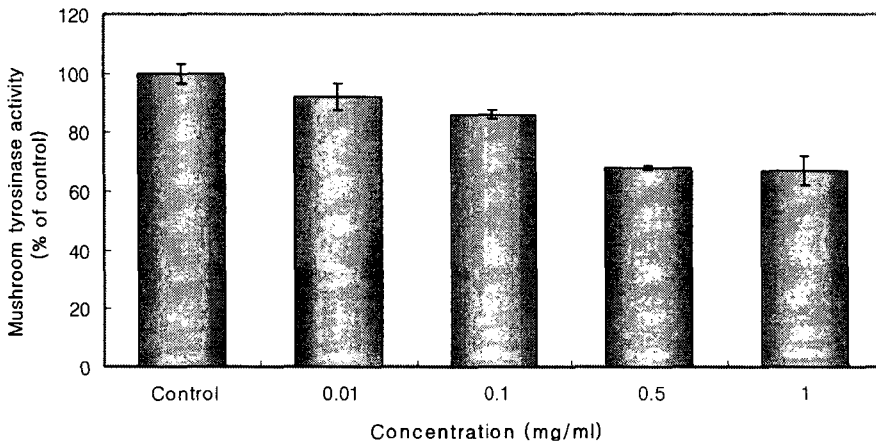


Fig. 1. Inhibitory effect of the mushroom tyrosinase by *Codonopsis lanceolata* extract. Tyrosinase activity was measured using L-tyrosine as a substrate. Values are means±S.E. of experiments performed in triplicate.

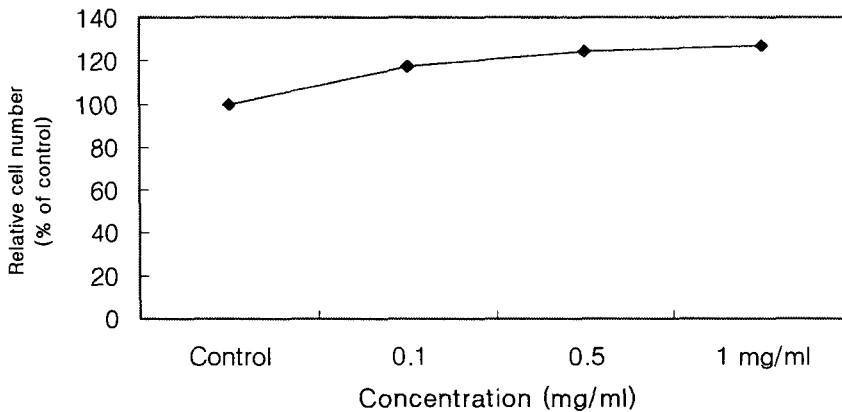


Fig. 2. Effect of the *Codonopsis lanceolata* extract on the cell proliferation of the human melanoma cells. Cells were treated with several concentrations of *Codonopsis lanceolata* extracts for a period of 5 days. Data are means ±S.E. of experiments performed in four times.

에 1 mg/ml의 농도까지 세포독성을 나타내지 않았다.

3. 더덕이 멜라닌 생성에 미치는 영향

더덕이 직접적으로 멜라닌 생합성의 최종산물인 멜라닌량에 미치는 영향을 조사하였다.

더덕추출물을 0.1 mg/ml에서 1 mg/ml 농도까지 처리하고 5일 후 10^3 cell당 멜라닌량을 측정된 결과, 더덕 0.1 mg/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 백분율이 94.6%, 0.5 mg/ml에서 86.3%, 1 mg/ml에서 70.1%로 농도에 의존적으로 감소하는 경향이 나타났다. 이상의 결과 더덕은 멜라닌 생성을 억제하였고, 더덕의 처리농가 높아짐에 따라 억제효과도 증가하였다(Fig. 3).

4. 더덕이 세포내 Tyrosinase 활성에 미치는 영향

멜라닌세포에서 멜라닌은 tyrosine으로부터 세가지 단계, 즉 tyrosinase, tyrosinase related protein 1(TPR-1), DOPA chrome tautomerase (TRP-2)에 의해서 합성되는데 이중 tyrosinase는 rate-limiting step으로 멜라닌색소 형성과정 중 가장 중요한 효소이다(4-6).

따라서, 본 연구에서는 더덕이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 멜라닌 합성과정중 rate-limiting 효소인 tyrosinase의 활성도를 측정하였다. 더덕을 0.1 mg/ml에서 1 mg/ml 농도까지 처리하고 5일 후 tyrosinase 활성도를 측정된 결과, 더덕 0.1 mg/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 97.5%, 0.5 mg/ml 농도에서 86.2%, 1 mg/ml 농도에서 75.6%로 감소하였다(Fig. 4). 따라서 더덕은 세포내 tyrosinase 활성도를 억제하였고, 더덕의 농도가 증가함에 따라 억제효과도 증가하였다.

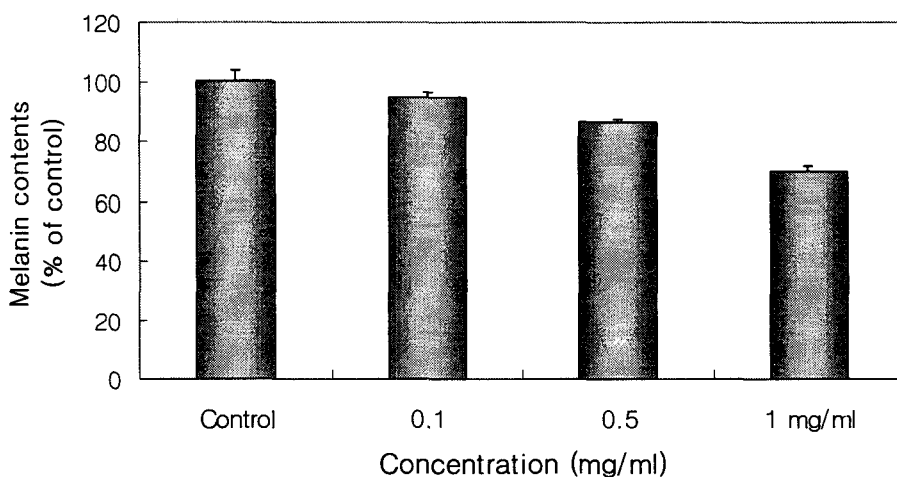


Fig. 3. The effect of *Codonopsis lanceolata* extract on melanin contents in HM3KO human melanoma cells. Cells were treated with several concentrations of *Codonopsis lanceolata* extract for a period of 5 days. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.E. of three experiments performed in triplicate.

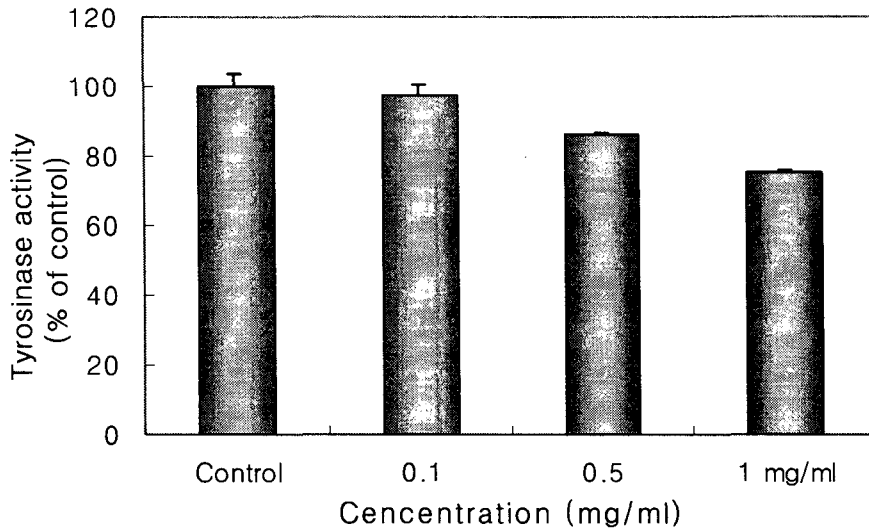


Fig. 4. The effect of *Codonopsis lanceolata* extract on tyrosinase activity of HM3KO human melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of *Codonopsis lanceolata* extract for a period of 5 days. Then, tyrosinase activity was measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.E. of three experiments performed in triplicate.

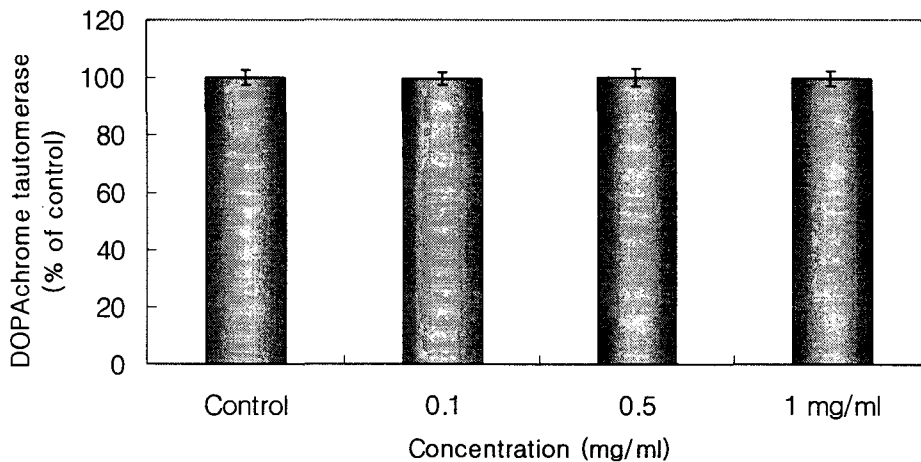


Fig. 5. The effect of *Codonopsis lanceolata* extract on DOPAchrome tautomerase activity of HM3KO human melanoma cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of *Codonopsis lanceolata* extract for a period of 5 days. Then, DOPA tautomerase activity was measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.E. of three experiments performed in four times.

5. 세포내 Tyrosinase-related protein (TRP-2) 효소활성 억제 효과

DOPAchrome은 L-tyrosine으로부터 tyrosinase에 의해 생성된 후 DOPA chrome tautomerase(TRP-2)에 의해 DHICA(5, 6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)로 전환되며 이는 다시 DHICA-oxidase (TRP-1)에 의해 eumelanin을 형성하는 것으로 알려져 있다(4-6).

본 실험에서 더덕 물추출물이 HM3KO 세포에서 DOPA tautomerase (TRP-2)의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, HM3KO 세포에 더덕 물추출물을 각 농도 별로 5일간 처리한 후 세포내 DOPA chrome tautomerase 활성을 조사한 결과, 각각 100%, 100%, 99.56%로 변화가 없었다(Fig. 5).

이상의 결과 더덕 물추출물은 HM3KO 세포의 DOPA tautomerase (TRP-2)의 활성에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

6. 세포의 형태적 관찰

더덕추출물이 HM3KO 세포의 형태에 미치는 영향을 관찰하였다. 더덕추출물을 5일동안 처리하고 광학현미경으로 관찰한 결과, 1 mg/ml의 처리군에서 처리하지 않은 대조군과 비교하여 세포증식이 약간 늘어났을 뿐, 형태적인 차이점을 발견할 수 없었다. 따라서, 더덕추출물은 1 mg/ml 농도까지 HM3KO human melanoma 세포의 형태에 영향을 미치지 않았음이 관찰되었다.

IV. 고 찰

더덕(*Codonopsis lanceolata*)은 한국, 중국 및 일본의 산간지방에서 야생하는 다년생 초본으로서 일반식용으로 널리 이용되고 있는 산채식품이다. 생약으로는 뿌리를 사용하여 양유(*Codonopsis Radix*) 또는 사삼

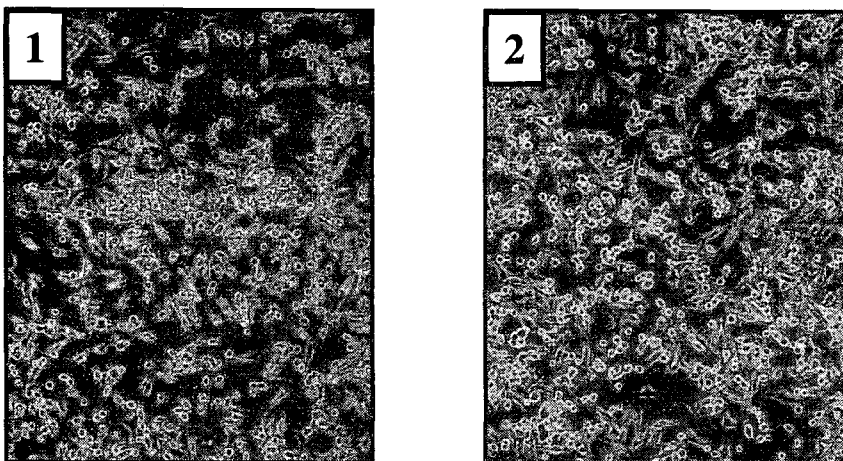


Fig. 6. Light micrographs of HM3KO human melanoma cells. observed for 5 days. 1: HM3KO nontreated 2: HM3KO treated with 1 mg/ml of *Codonopsis lanceolata* extract.

이라 하여 주로 거담, 강장, 기관지염, 해소, 천식에 사용되며, 인삼의 대용약으로 사용되어 왔다(12). 약리작용으로는 더덕 첨가식이에 의한 혈청지질의 감소(14), 더덕 에탄올추출물의 항산화효과(15), 더덕 수추출물이 세포성 면역반응에 미치는 영향(16) 및 면역세포에 미치는 영향(17) 등이 보고되었다. 성분으로는 oleanolic acid, albigenic acid, phytosterol이 알려져 있으며, 최 등(21)은 더덕 뿌리에서 10여종의 saponin 성분을 분리하였는데, 이 중 sapogenin 등 4가지 물질이 인삼과 유사하다고 보고하였다.

한편, 인삼에 대해서는 각종 생화학적, 약리학적 작용 뿐 아니라 그 물질에 관하여 보고되었는데, 특히 윤 등(22)은 인삼의 수용성 추출물과 사포닌이 배양된 인체 각질형성세포 및 멜라닌세포의 성장에 미치는 영향을 보고한 바 있다.

멜라닌의 과잉생산은 인체에 기미, 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하며, 더 나아가 피부암의 유발에 관여하는데, 멜라닌 생합성은 주로 tyrosinase의 작용에 의해 이루어지는 것으로 보고되어 있다(4). Tyrosinase는 phenolase, monophenolase, monophenol oxidase, cresolase, monophenol monooxygenase등으로 불리며, catechol oxidase와는 기능이 유사하여 혼용되기도 한다. Tyrosinase는 한 쌍의 구리이온을 함유하고 있는 금속단백질 군에 속하며, monophenol의 ortho hydroxylation (cresolase activity)과 catechols의 o-quinone으로의 산화(catecholase activity)의 두 가지 반응을 촉매한다(7, 19). 버섯 tyrosinase의 저해제는 tyrosinase 활성부위 구리이온의 상태변화에 관여함으로써

tyrosinase의 산화, 환원과정을 조절할 수 있기 때문에, 버섯 tyrosinase를 이용한 시험관 내 tyrosinase 활성억제실험은 피부 미백제의 개발에 있어서 유용한 일차평가 방법으로 인정되고 있다. 이에 더덕이 tyrosinase 효소에 미치는 영향을 조사하기 위하여 버섯 tyrosinase를 이용하여 시험관 내 tyrosinase 활성도를 측정된 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 더덕 물추출물은 시험관 내 tyrosinase 활성도를 효과적으로 억제하였다.

멜라닌은 멜라닌세포의 세포소기관인 멜라닌소체(melanosome)에서 일련의 효소반응에 의해 생성되므로, in vitro에서 tyrosinase 활성을 직접적으로 억제하는 실험 결과만으로 더덕추출물이 멜라닌생성을 억제한다고 말하기는 불충분하다. 따라서 본 연구에서는 HM3KO human melanoma 세포에서 더덕추출물의 멜라닌생성 억제효과를 조사하기 위하여, 더덕물추출물의 농도에 따라 HM3KO 세포에 미치는 영향을 조사하였다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 더덕물추출물은 HM3KO 세포에 1 mg/ml까지 세포증식에 영향을 미치지 않았다. 또한 광학현미경을 이용한 HM3KO 세포형태를 관찰한 결과 세포의 형태에 영향을 미치지 않았는데, 이는 위 세포증식 실험결과와 일치함을 나타낸다(Fig. 6). 이상의 결과 멜라닌생성억제는 세포독성에 의한 세포사멸에 의해서 보다는 멜라닌생성의 여러 단계를 통한 멜라닌생성억제작용에 의한 것으로 사료된다.

생체에서 피부 색소침착을 일으키는 가장 주요한 자극은 자외선으로서, UV radiation은 멜라닌세포를 직접 자극하게

된다. 멜라닌세포에서 멜라닌은 tyrosine으로부터 세가지 단계, 즉 tyrosinase, tyrosinase related protein 1(TPR-1), DOPachrome tautomerase(TRP-2)에 의해서 합성되는데, 이 중 tyrosinase는 rate-limiting step으로 멜라닌색소 형성과정 중 가장 중요한 효소이다(2, 4, 5). 따라서, 본 연구에서는 더덕이 멜라닌 세포에서 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 HM3KO human melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 생합성의 최종산물인 멜라닌 양 및 tyrosinase 효소 활성을 측정하였다. 본 실험에서 더덕 물추출물에 의하여 최종산물인 멜라닌양이 감소하였으며, tyrosinase 효소활성 또한 유의하게 억제되었다.

멜라닌 생성 조절에 관한 연구에 있어서, 1980년대까지의 연구는 멜라닌 생합성 경로의 key enzyme인 tyrosinase에 영향을 주는 인자에 초점을 두는 Raper-Mason pathway를 통해 생합성되는 것으로 생각되었다. 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 단백질과의 결합을 통해 최종적으로 멜라닌이 합성된다. 그러나, 1980년대 이후 멜라닌 생합성 경로에 관한 연구는 피부암 관련 연구그룹에 의해 집중적으로 연구되었으며, 그 결과 생체 내에서 dopachrome이 DHI로 전환되는 경로 외에 DOPachrome tautomerase(TRP-2) 작용에 의해 DHICA(5, 6-dihydroxyindole carboxylic acid)로 전환되는 새로운 경로가 존재한다

는 사실이 밝혀졌다(4-7). 따라서, 본 연구에서는 최종 멜라닌양과 tyrosinase 효소활성에서 억제효과를 나타내는 더덕 물추출물이 위 두 가지 경로 중 어떠한 경로에 의하여 멜라닌 생성을 억제하는지 조사하기 위하여 DOPachrome tautomerase (TRP-2) 활성을 측정하였다. 더덕추출물은 DOPachrome tautomerase(TRP-2) 활성에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다(Fig. 5).

이상의 결과에 의하여 더덕에 의한 멜라닌 생성 억제효과는, DOPachrome tautomerase(TRP-2)의 작용에 의해 DHICA로 전환되는 경로가 아닌, dopachrome에서 DHI로 전환되어 dihydroxyindole의 산화적 중합 및 단백질과의 결합을 통해 최종적으로 멜라닌이 합성되는 Raper-Mason의 경로에 의한 것으로 사료된다. 그러나 지금까지 연구된 바로는 위의 두 가지 경로가 존재하지만, 멜라닌 생합성 과정에는 여러 효소들이 작용하며 멜라닌 색소에는 각각의 특성을 가진 여러 종류의 단일물질 및 강한 탄소결합들이 존재하기 때문에, 어느 한 가지로 단정지을 수는 없으며, 이에 대한 심도있는 연구가 필요하다.

V. 결 론

더덕이 피부의 멜라닌 합성과정에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 HM3KO human melanoma 세포를 이용하여 tyrosinase 활성도와 최종산물인 멜라닌량을 측정하고, 세포의 형태학적인 변화를 관찰한 후 더덕의 멜라닌 생성 억제효과가 이루어지는 경로를 조사하기 위하여 DOPachrome tautomerase(TRP-2) activity

를 측정 한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 더덕 물추출물은 시험관내 버섯 tyrosinase 활성도를 효과적으로 억제하였다.
2. 더덕 물추출물은 1 mg/ml의 농도까지 세포독성을 나타내지 않았으며, 더덕 물추출물의 처리농도에 의존적으로 멜라닌 생성을 억제하였다.
3. 더덕 물추출물은 세포내 tyrosinase 활성도를 처리농도에 의존적으로 억제하였다.
4. 더덕 물추출물은 DOPachrome tautomerase(TRP-2)의 활성에는 영향을 미치지 않았다.

이상의 결과 더덕은 세포증식에 영향을 미치지 않으면서 멜라닌 생성을 억제하였으며, 이는 dopachrome에서 DHI로 전환되어 dihydroxyindole의 산화적 중합 및 단백질과의 결합을 통해 최종적으로 멜라닌이 합성되는 Raper-Mason의 경로에 의한 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 박경아 등, 조직학, 서울 고려의학, pp. 405-411, 1999.
2. Kobayashi T, Urabe K, Winder AJ *et al.* Tyrosinase related protein(TRP-1) functions as a DHICA oxidase activity in melanin biosynthesis. *EMBO J.* 13: 5818-5825, 1994.
3. Curto E V. Kwong C. Hermersdorfer

H, Glatt H, Santis C, Virador V, Hearing V J and Dooley P: Inhibitors of mamalian melanocytes tyrosinase: In vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology.* 57: 663-672, 1999.

4. Y. Funasaka, A. K. Chakraborty, M. Komoto, A. Ohashi, and M. Ichihashi: The depigmenting effect of α -tocopherol ferulate on human melanoma cells. *British J. Dermatolohy.* 141: 20-29, 1999.
5. K. Wakamatsu and S. Ito: Advanced chemical methods in melanin determination. *Pigment Cell Res.* 15: 174-183, 2002.
6. Kametama, K., T. Takemura, Y. Hamada, C. Sakai, S. Kondoh, S. Nishiyama, K. Urabe, and J. Hearing: Pigment production in murine melanoma cell is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1(TRP-1), DOPachrome tautomerase (TRP-2), and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol..* 2: 126-131, 1993.
7. 이충환, 고영희, 멜라닌 생합성 저해물질의 탐색, *신물질 탐색 연구동향 (IV)*, 생물산업 9(2): 32-35, 1996.
8. Bloom W, Fawcett DW: A textbook of histology, 11th ed, W.B. Saunders Company, USA, pp. 543-558, 1986.
9. 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 cytotoxicity. *J. Photochemistry and Photobiology B. Biology* 61: 106-113, 2001.
10. Walter Englaro, Philippe Bahadoran, Corine Bertolotto, Roser Busca, Benoit Derijard, Antonia Livolsi, Jean-Francois Peyron, Jean-Paul Ortonne, and Robert Ballotti: Tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition of melanogenesis is dependent on nuclear factor kappa B activation. *Oncogene* 18: 1553-1559, 1999.
 11. Sugai, T: Clinical effects of arbutin in patients with chlosma in Japanese. *Hifu. Skin Res.* 34: 522-529, 1992.
 12. 김일혁 등 한국약용식물학 연구회 저, 종합 약용식물학, 학창사, pp. 290, 2001.
 13. 김귀정, 김금희, 김해남, 윤영숙, 이승자, 이해영, 경락과 한방피부미용학, 수문사, pp. 210.
 14. SY Kim, HS Lim, IS Su, HS Yi, HS Kim, and SY Chung: Effects of the feeding *Platycodon grandiflorum* and *Codonopsis Lanceolata* on lipid components of serum and liver in rats. *J. Korean Sci. Food. Nutr.* 22(5): 517-523, 1993.
 15. YS Maeng and HK Park: Antioxidant activity of ethanol extract from *Dodok(Codonopsis Lanceolata)*. *Korean J. Food Sci. Thchnol.* 23(3): 311-316, 1991.
 16. YJ Lee, JM Kim and YM Jung: Effect of *Codonopsis Lanceolata pilosula* on the cellular immunity. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* 19(3): 273-279, 1995.
 17. JS Suh: Effect of *Codonopsis Lanceolata* radix water extract on Immunocytes. *Korean J. Food & Nutr.* 9(4): 379-384, 1996.
 18. JK No, DY Soung, YJ Kim, KH Shim, YS Jun, SH Rhee, T Yokozawa, HY Chung: Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Science.* 65(21): 241-246, 1999.
 19. Prota G.: Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.* 75(122): 31-36, 1990.
 20. SH Lee, JS Park, SY Kim, JJ Kim, SR Chung: Isolation of inhibitory components on tyrosinase activity from the bark of *Paeonia moutan*. *Yakhak Hoeji.* 42(4): 353-358, 1998.
 21. MS Choi and PS Choi: Plant regeneration and saponin contents in *Codonopsis lanceolata* L. *Korean J. Medical Crop Sci.* 7(4): 275-281, 1999.
 22. TJ Yoon, NI Kim, JK Park, CR Hwa: Effects of *Panax ginseng* saponins and water extract on the growth of cultured human keratinocytes and melanocytes. *대한피부과학회지.* 32(3): 451-461, 1994.
 23. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, Garcia-Borron JC: Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor

necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. Eur J Biochem 255(1):139-146, 1998.

24. Hosoi J, Abe 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.