

柏子仁과 側柏葉의 성분인 myricetin이 멜라닌 생성에 미치는 영향

송화영 · 김정근 · 홍석훈 · 황충연 · 김남권*

원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

Increasing Effect of Myricetin of *Biotae Semen* & *Biotae Orientalis Folium* on the Melanogenesis

Hwa Young Song, Jeong Keun Kim, Seok Hoon Hong, Chung Yeon Hwang, Nam Kwen Kim*

Department of Ophthalmology Otolaryngology and Dermatology, Wonkwang University

The unique biochemical pathways in melanocytes responsible for melanogenesis provide us with a rational mechanism-based means for developing both pharmacological regulators of pigmentation and cytotoxic chemotherapeutic drugs for melanoma. Myricetin is a polyphenolic antioxidant and a component from *Biotae Semen*, *Biotae orientalis Folium*. Therefore, the present study was conducted to evaluate the effects of myricetin on the melanogenesis in human melanoma (HM₃KO) cells. The cells were treated for 5 days with myricetin at several concentrations (10 - 100 µg/ml). Treatment with myricetin dose-dependently suppressed cell growth in HM₃KO cells. But melanin formation was markedly increased by myricetin as a dose dependent manner. Myricetin did not affect tyrosinase activity, which is a key enzyme for melanogenesis, but significantly increased the level of tyrosinase protein expression. These results suggest that myricetin stimulate melanin synthesis of human melanoma cells through the modification of tyrosinase protein expression.

Key words : melanogenesis, myricetin, *Biotae Semen*, *Biotae orientalis Folium*, melanin synthesis

서 론

피부의 색깔은 여러 인자에 의하여 결정되는 것으로, 그 중요한 것은 멜라닌과 카로틴의 양, 진피에 있는 혈관의 수와 흐르는 혈액의 색깔이 관여하게 된다. 특히 피부색을 이루는 주요 인자인 멜라닌색소는 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌세포(melanocyte)에서 일련의 효소반응에 의하여 형성되며, 생성된 멜라닌은 표피의 각질층으로 운반되어진다¹⁾. 멜라닌은 멜라닌세포의 멜라닌소체(melanosome) 내에서 합성되는데 주로 tyrosinase 효소의 작용에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있으며, 角質化細胞(keratinocyte)로 이동된 멜라닌소체는 자외선(UV)에 의한 광노화나 일광각화증으로부터 피부를 보호하는 기

능을 하고 있다^{2,3)} 최근 피부에 대한 관심이 증가하면서 피부의 미백이나 피부에 탄력을 주어 주름을 완화 또는 개선하고자 하는 많은 연구가 진행되고 있다^{4,5)}. 특히 피부의 색소침착과 관련하여 tyrosinase의 작용을 억제하는 물질로 알부틴, 코직산, 상백피추출물, 감초추출물 등이 있으며, 멜라닌색소를 제거하는 물질로는 AHA, 멜라닌세포자체를 사멸시키는 물질로는 hydroquinone이 있다⁶⁻¹⁰⁾. 이와 반대로 멜라닌세포는 피부의 백반증(vitiligo)과도 밀접한 관련이 있는데, 백반증은 다양한 크기의 백색 반점들을 특징으로 하는 피부의 색소 이상증으로 인체의 피부 및 모발에 존재하는 멜라닌세포가 파괴되어 유발된다^{11,12)}.

白癩症은 생명을 위협하지는 않지만 치료방법이 정립되어 있지 않아 치료에 많은 시간과 경제적 부담을 요하며 특히 유색인에서 미용상 결함을 초래하여 환자에게 정신적 부담을 주고 사회활동의 제약, 일반인들의 무지(전염가능성) 등으로 일상생활을 하는데 많은 어려움을 겪고 있다¹³⁾. Flavonoid는 polyphenolic compound로서 抗病毒, 抗酸化, 抗炎 등 여러 활

* 교신저자 : 김남권, 경기도 군포시 산본동 1126-1 원광대학교 군포한방병원

· E-mail : drkim@wonkwang.ac.kr, · Tel : 031-390-2672

· 접수 : 2004/03/11 · 수정 : 2004/04/20 · 채택 : 2004/05/20

성이 알려져 있는 생리활성 물질¹⁴⁾로써, 일반적으로 flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, anthocyanins 등을 포함하며 대표적인 flavonol 물질로는 quercetin, kaempferol, myricetin 등이 있는데, 한약재와 생약 및 과일 등에 많이 함유되어 있는 성분 중의 하나로 자연에서 색을 내는데도 관여한다. 현재까지 flavonoid 중 quercetin에 대한 연구는 비교적 활발하게 이루어지고 있으나 myricetin에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 한약재에 존재하는 flavonoid 중의 하나인 myricetin의 생리활성에 관한 연구를 수행하였다. Myricetin은 柏子仁, 側柏(Biota orientalis), 側柏葉 등의 함유 성분 중 하나로서 항산화효과와 anti-HIV activity를 가지고 있는 것으로 보고되었다¹⁵⁾. 側柏(Biota orientalis)은 側柏科에 속한 상록침엽교목으로 種子와 葉을 本草로 사용하는데, 한의학에서 種子를 柏子仁, 葉을 側柏葉이라 한다. 柏子仁은 益智, 寧神, 補心脾, 滋肝腎, 潤顏色, 聰明耳目, 潤腸通便의 효능이 있어 風濕痺痛, 驚悸, 恍惚, 虛煩失眠, 陰虛盜汗, 腸燥便秘 등을 치료하는데, 성분으로 지방 및 각종 精油성분, saponin이 함유되어 있으며¹⁶⁻²²⁾, 연구로는 김 등²³⁾의 柏子仁으로부터 抗 Herpes 바이러스 1형 (HSV-1) 物質의 分離에 관한 보고가 있다.

側柏葉은 涼血止血, 止咳化痰, 生肌, 殺蟲, 烏鬚髮 등의 효능이 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, 성분으로 精油로서 α -pinene, thujone, caryophyllene, fenchone 등이, flavonoid로서 quercetin, myricetin, hinokiflavone 등이, 이 밖에 tannin, 수지, vitamin C 등이 함유되어 있으며¹⁶⁻²¹⁾, 연구로는 이 등²⁴⁾의 側柏葉 藥鍼이 止血效果에 미치는 영향과 김 등²⁵⁾의 側柏葉의 Diterpenes 성분에 대한 보고가 있다. 한의학에서의 피부는 신체내부의 장기와 밀접한 관련이 있는데 특히 생리적인 면이나 병리적인 측면에서 보면 肺와 밀접한 연관을 가지고 있음²⁶⁾을 알 수 있으며, 백반증과 같은 피부색소 결핍의 경우나, 피부의 미백효과를 나타낼 수 있는 약재들이 소개²⁷⁾되어져 있으나 실험적인 결과는 많이 밝혀져 있지 않은 실정이다.

이에 저자는 한약재와 생약을 이용한 피부질환 치료제 및 미백제 개발을 목적으로 柏子仁和 側柏葉 등의 성분 중의 하나인 Myricetin이 피부의 멜라닌 세포에 미치는 영향을 조사하고자 인체 멜라닌 세포주 (HM₃KO)를 이용하여 멜라닌 색소 형성과 조절기전을 분석하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. HM₃KO 세포주 배양

HM₃KO 세포는 인체 멜라닌세포주로서 CO₂ 배양기 (37°C, 5%)에서 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclones Co.)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM; Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD)배지에서 배양하였으며 3일 주기로 배양액을 교체하였다.

2. 세포생존률 측정

HM₃KO 세포의 세포생존률은 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma Co. Ltd.) assay로 측정하였으며 MTT 정량은 Mosmann의 방법을 변형하여 실시하였다²⁸⁾. HM₃KO 세포를 각 dish에 분주하고 24시간 동안 세포를 안정화시킨 후 Myricetin (Sigma Co. Ltd.)을 농도별로 첨가하여 5일 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 상층액을 버리고 당일 제조한 0.05% MTT 용액을 배양용기에 분주하여 3시간 동안 배양하였다. 살아 있는 세포들은 MTT와 반응하여 보라색 불용성 formazan 침전물이 형성되는데, 상층액을 버리고 formazan 침전물을 dimethyl sulfoxide(DMSO; Sigma Chemical Co.)에 실온에서 15분간 용해한 후 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

3. 광학현미경적 관찰

HM₃KO 세포를 각 dish에 분주하고 24시간동안 세포를 안정화시킨 후 Myricetin을 농도별로 첨가하여 5일 동안 배양한 다음 inverted microscope(phase contrast, Leica Germany)을 이용하여 대조군과 실험군의 형태학적 변화를 관찰하였다.

4. 멜라닌의 정량 측정

세포내에 형성된 멜라닌은 Hosoi등의 방법을 변형하여 측정하였다²⁹⁾. 세포를 배양하여 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척한 후, 수집한 다음 Fuchs-Rosenthal cytometer로 세포수를 계산하고 원심분리하여 수확하였다. 수확된 세포에서 Acid-insoluble material을 얻기 위해 10% DMSO가 첨가된 1N NaOH를 300 μ l 첨가하여 100°C에서 10분 동안 용해시켰다. ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 멜라닌량은 합성 멜라닌(Sigma Chemical Co.)을 사용하여 작성된 표준직선에서 구하였다.

5. 멜라닌색소 침착의 육안적 관찰

Myricetin을 HM₃KO 세포에 처리하여 5일 동안 배양한 다음 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 분리하고, 원심분리하여 수확하였다. 수확된 세포들을 육안적으로 관찰하여 Myricetin에 의한 HM₃KO 세포의 색소 침착도를 관찰하였다.

6. 세포 내 tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza M 등의 방법에 의해서 측정하였다³⁰⁾. 각 well의 세포를 수확하여 원심분리하여 세포침전물을 만들고, 100 μ l lysis buffer (1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM PMSF)를 넣고 4°C 얼음에서 30분간 방치하여 세포를 파괴시키고 원심분리한 후 상층액을 tyrosinase의 enzyme solution으로 사용하였다. 이 enzyme solution은 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 100 μ l에 시료 50 μ l를 넣어 30°C water bath에서 5분간 보온한 후 100 mM catechol 50 μ l를 넣어서 온도조절장치가 되어 있는 분광광도계로 37°C, 405 nm에서 흡광도의 변화를 1 시간 관찰하였다.

7. Western blotting

HM₃KO 세포(5×10⁶)를 PBS로 세척하고 4℃에서 30분동안 lysis buffer(phosphate buffer, pH 6.8, 100IU Aprotinin, 1% AEBSF)에 용해하고 20,000×g로 30분 동안 원심분리하였다. Amicon system을 이용하여 상층액의 단백질을 농축하였다. 농축한 단백질을 Bradford assay로 정량하고, 50-100µg의 단백질을 7.5%나 10%의 SDS-PAGE상에서 전기영동하여 분리하였다. 분리된 단백질은 Nitrocellulose membrane에 옮긴 후 실온에서 2시간 동안 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 washing 하고 1:1,000으로 희석시킨 secondary peroxidase-conjugated anti-mouse antibody(Sigma)에 반응된 단백질을 Amersham ECL system으로 확인하였다.

8. 통계처리

실험결과는 평균 표준편차로 표시하였다. 각 실험군은 대조군과 비교하여 나타내었다. 각 군 간의 통계적 유의성에 대한 검증은 t-test를 이용하였다.

실험결과

1. Myricetin이 인체 멜라닌세포주의 증식에 미치는 영향

Myricetin이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 인체 멜라닌세포주의 세포 생존율에 대한 영향을 조사하였다. 인체 멜라닌세포주인 HM₃KO 세포에 Myricetin을 여러 농도 (10 - 100 µg/ml)로 5일 동안 처리 한 후 MTT 방법으로 세포 생존율을 측정하였다. Myricetin 처리군은 HM₃KO 세포의 증식을 억제하여 Myricetin 10 µg/ml 농도에서 대조군 (100±4.6%)의 76±7.2%, 50 µg/ml 농도에서 47±7.4%, 100 µg/ml 농도에서 19±5.9%로 나타났다 (Fig. 1). 또한 세포의 광학현미경적 관찰결과에서도 Myricetin은 HM₃KO 세포의 증식을 억제한 것으로 관찰되었다 (Fig. 2). 이상의 결과 Myricetin은 농도 의존적으로 HM₃KO 세포의 증식을 억제함을 알 수 있었다.

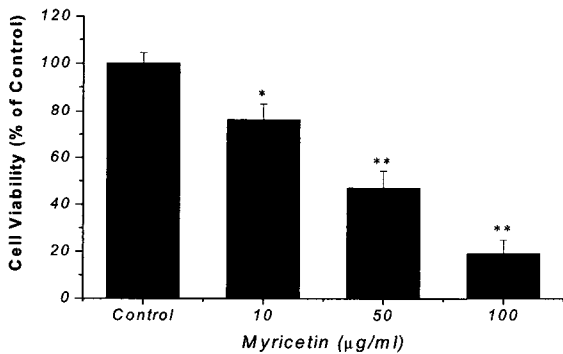


Fig. 1. Effect of Myricetin on the cell viability in human melanoma cells. HM₃KO cells were seeded at 5×10³ cells/well. After 24 hr, the cells were treated with various concentrations of Myricetin (10 - 100 µg/ml) for 5 day. The cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are expressed as % of control and each column represents the mean ± S.D. of six determinations. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, * p<0.05, **p<0.01.

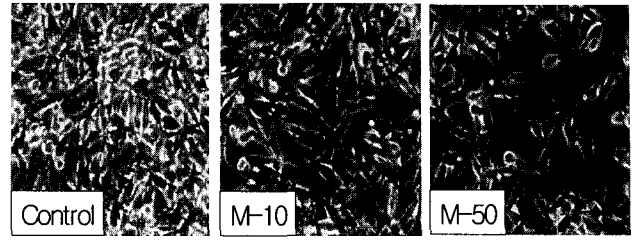


Fig. 2. Light micrographs of HM₃KO human melanoma cells observed for 5 days. HM₃KO cells were treated with Myricetin (10 µg/ml or 50 µg/ml) for 5 day. 1: Control, 2: Myricetin (10 µg/ml), 3: Myricetin (50 µg/ml).

2. Myricetin이 멜라닌 생성에 미치는 영향

멜라닌은 멜라닌세포의 세포소기관인 멜라닌소체(melanosome)에서 일련의 효소 반응에 의해 생성된다. 본 연구에서는 Myricetin이 피부의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 인체 멜라닌세포주인 HM₃KO 세포에 Myricetin을 일정시간 처리한 후 멜라닌양을 측정하였다. Myricetin을 인체 멜라닌세포주에 10, 50, 100 µg/ml 농도로 5일간 처리한 후, 세포를 수집하여 멜라닌 세포수에 따른 멜라닌양을 측정하였다. Myricetin 10, 50, 100 µg/ml 처리군에서 1×10³개의 세포당 멜라닌 양이 4.6±1.6 ng, 7.4±0.6 ng, 11.3±3 ng이었으며 대조군에서는 3.0±0.4 ng이었다 (Fig. 3). 따라서 Myricetin은 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 촉진하였으며, Myricetin 50 µg/ml 처리군은 대조군의 2배, Myricetin 100 µg/ml 처리군은 대조군의 3배 정도 멜라닌 생성이 증가되었음을 알 수 있었다.

이상의 연구결과 Myricetin은 HM₃KO 세포의 증식을 억제 하였으나, 반면에 HM₃KO 세포의 멜라닌 생성을 촉진시키고 있음을 알 수 있었다.

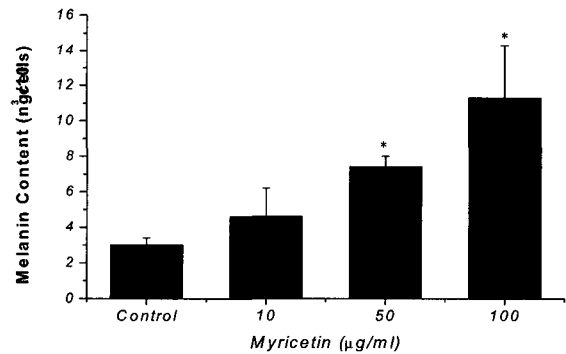


Fig. 3. Effect of Myricetin on melanin synthesis in human melanoma cells. HM₃KO cells were treated with various concentrations of Myricetin (10 - 100 µg/ml) for 5 day. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means ± S.D. of three experiments performed in triplicate. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, * p<0.05.

3. Myricetin에 의한 멜라닌색소 침착의 형태적 관찰

위의 연구 결과 Myricetin은 HM₃KO 세포의 생존율을 억제 하면서 동시에 멜라닌 생성을 촉진시키는 것으로 나타나, 멜라닌 생성 촉진 효과를 육안적으로 관찰하였다. HM₃KO 세포에 Myricetin을 50 µg/ml 농도로 처리하고 5일 동안 배양한 후 세포를 수확하여, HM₃KO cell pellet을 관찰한 결과, Myricetin 처리군은 대조군에 비하여 멜라닌 생성이 현저히 증가되었음이 육안적으로 확인되었다 (Fig. 4). 한편 멜라닌 생성을 촉진시키는

호르몬으로 잘 알려진 α -MSH를 처리하여 양성 대조군으로 하였다. 그러나 α -MSH는 생쥐의 멜라닌 생성에는 효과적이지만, 인체 멜라닌세포에서는 생쥐에 비하여 촉진효과가 약하다. 본 연구 결과에서 Myricetin은 인체 멜라닌 세포주의 멜라닌 생성을 촉진하였으며, 멜라닌 생성 촉진효과는 α -MSH 보다도 효과적이었음을 알 수 있었다.

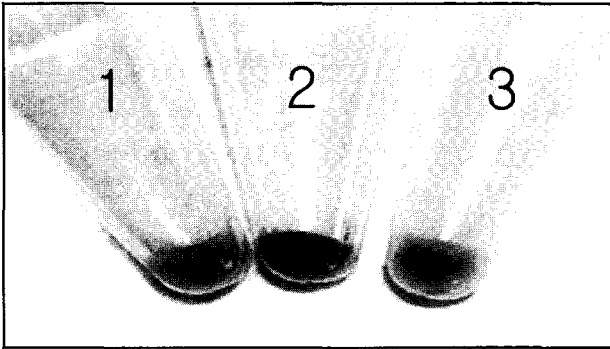


Fig. 4. Photographs of cell pellets of human melanoma cells after 5 day treatment with Myricetin or α -MSH. HM_3KO cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. 1: Control, 2: Myricetin (50 μ g/ml), 3: α -MSH (20 nM).

4. Myricetin이 인체 멜라닌세포주의 tyrosinase 활성에 미치는 영향

멜라닌 생성 과정은 복잡적이고 다원적이지만 아직까지 주된 생성과정은 tyrosine을 기질로 하여 tyrosinase 효소에 의하여 DOPA, DOPAquinone으로 전환되고 이는 다시 DOPochrome, DH1나 DHICA를 형성하고 최종적으로 중합반응에 의하여 멜라닌 polymer를 형성하는 것으로 알려져 있다. 이 과정 중 초기의 두 단계의 반응이 tyrosinase의 촉매작용을 통하여 일어나며, 일단 반응이 개시되면 매우 빠르게 진행되므로 tyrosinase는 멜라닌 생성과정에서 중요한 역할을 한다. 위의 실험결과 Myricetin 처리 후 멜라닌 생성이 현저히 증가되었으므로 이는 멜라닌 합성에 관여하는 효소들의 활성과 관련이 있음을 의미하며, 따라서 본 실험에서는 HM_3KO 세포의 tyrosinase 활성에 미치는 Myricetin의 영향을 조사하였다. Myricetin을 HM_3KO 세포에 각 농도별로 처리하고 5일 동안 배양한 후 세포내 tyrosinase 효소 활성을 조사한 결과, Myricetin 10, 50, 100 μ g/ml 농도에서 tyrosinase 활성은 각각 대조군(100 \pm 2%)에 비교하여 104 \pm 6%, 113 \pm 6.3%, 108 \pm 4.6%로 나타났다. 따라서 Myricetin은 HM_3KO 세포의 tyrosinase 활성에는 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다 (Fig. 5).

5. Myricetin이 tyrosinase 단백질 발현에 미치는 영향

Myricetin이 HM_3KO 세포의 tyrosinase 효소 활성에는 영향을 주지 않았으나 tyrosinase protein 발현을 조절 할 가능성이 있다. 따라서 본 실험에서는 Myricetin이 HM_3KO 세포의 tyrosinase protein 발현양상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 tyrosinase antibody를 이용한 western blotting 방법으로 인체 멜라닌세포주에서 tyrosinase protein level을 조사하였다. Myricetin 10 μ g/ml와 50 μ g/ml 처리하여 5일 동안 배양한 후

tyrosinase protein level을 조사한 결과 대조군에 비하여 현저히 증가하였다 (Fig. 6). 또한 양성 대조군으로서 멜라닌 생성을 촉진하는 호르몬으로 알려진 α -MSH에 의한 과색소 생성 유도시에도 대조군보다 tyrosinase protein level이 증가하였다 (Fig. 6).

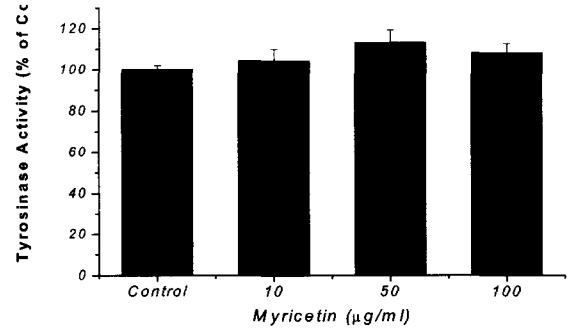


Fig. 5. Effect of Myricetin on tyrosinase activity in human melanoma cells. HM_3KO cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hr, cells were treated with various concentrations for 72 hr. Then, tyrosinase activity was measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.D. of three experiments performed in triplicate.

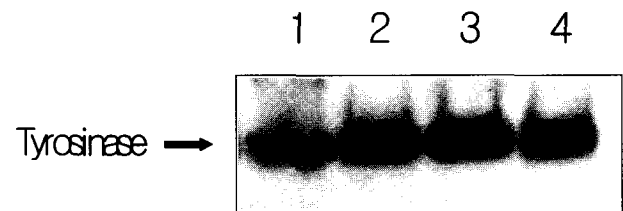


Fig. 6. Myricetin induces expression of tyrosinase protein in human melanoma cells. HM_3KO cells were treated for 5 day with 10 μ g/ml and 50 μ g/ml Myricetin. Total protein were electrophoresed in 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membrane. Specific detection of tyrosinase was performed with the antibody tyrosinase. 1: Control, 2: Myricetin (10 μ g/ml), 3: Myricetin (50 μ g/ml), 4: α -MSH (20 nM).

고 찰

피부의 색깔은 여러 인자에 의하여 결정되는 것으로, 그 중 중요한 것은 멜라닌과 카로틴의 양, 진피에 있는 혈관의 수와 흐르는 혈액의 색깔이 관여하게 되며, 특히 멜라닌은 표피에서 특수하게 분화된 멜라닌 세포에서 합성이 되는데, 멜라닌 세포는 주로 기저층세포 사이나 기저세포의 아래, 그리고 털주머니에서 관찰되는 세포로 멜라닌을 생성하여 세포질 돌기를 통하여 표피의 기저층과 가시층의 세포로 운반된다. 멜라닌색소의 형성은 멜라닌세포 내의 멜라닌소체(melanosome)에서 이루어지며, 멜라닌 소체는 수상돌기를 통하여 부근에 인접되어 있는 각질화세포(keratinocyte)로 이동하게 되고, 각질화세포가 외피로 부상하면서 피부색을 나타내게 된다¹⁾. 이렇게 각질화세포(keratinocyte)로 이동된 멜라닌소체는 자외선(UV)에 의한 광노화나 일광각화 증으로부터 피부를 보호하는 기능을 하고 있다^{2,3)}.

Melanocyte에서 melanogenesis를 조절하는 것으로 알려진 효소들로는 tyrosinase, tyrosinase related protein 1(TRP-1)과 DOPochrome tautomerase (TRP-2) 등이 있다¹⁾. 이러한 melanogenesis에 관여하는 유전자는 현재 160여 종류의 유전자가 알려져 있으며, melanin 색소의 감소나 증가 및 이상 분포 등

은 白皮症(albinism)이나 白斑症(vitiligo) 등의 피부질환을 유발하고, 에디슨병(Addison's disease)은 반대로 부신피질에서 코티솔의 생성이 결핍되어 부신피질자극호르몬이 과잉 생산되므로써 색소침착을 증가시키기도 한다³¹⁾.

최근 피부에 대한 관심이 증가하면서 피부의 미백이나 피부에 탄력을 주어 주름을 완화 또는 개선하고자 하는 많은 연구가 진행되고 있다^{4,5)}. 특히 기미, 주근깨 등 피부에 생기는 색소침착과 관련하여 tyrosinase의 작용을 억제하는 물질로 알부틴, 코직산, 삼백피추출물, 감초추출물 등이 있으며, 멜라닌색소를 제거하는 물질로는 AHA, 멜라닌세포자체를 사멸시키는 물질로는 hydroquinone이 있다⁶⁻¹⁰⁾.

이와 반대로 멜라닌 색소의 감소로 인한 白斑症(vitiligo)은 다양한 크기의 白色 斑點들을 特徵으로 하는 皮膚의 色素 異常症으로 人體의 皮膚 및 毛髮에 存在하는 멜라닌세포가 파괴되어 誘發된다^{11,12)}. 이외에도 貧血斑點, 無色素性 斑點, 白色症(albinism), 斑狀 白化病, 老年性 白斑, 特發性 점모양 色素減少症, 紫白癜風, 單純糠疹, 脂溢性 皮膚炎, 局限性 硬皮症, 癩性 白斑, 梅毒性 白斑 등에서 멜라닌 색소 감소를 볼 수 있다²⁶⁾. 이들 중 白斑症은 대부분 생명을 위협하지는 않지만 치료방법이 정립되어 있지 않아 치료에 많은 시간과 경제적 부담을 요하며 특히 유색인에서 미용상 결함을 초래하여 환자에게 정신적 부담을 주고 사회활동의 제약, 일반인들의 무지(전염가능성) 등으로 일상생활을 하는데 많은 어려움을 겪고 있다¹³⁾. 白斑症은 韓醫學에서 白駁風, 白癩風, 白癩, 駁白, 斑白, 斑駁 등에 該當³²⁾되는데, 隨代 巢元方의 『諸病源候論 白癩候』³³⁾에 “白癩者 面及頸項身體皮膚肉色變白 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 문헌에서 언급되어 왔는데, 病因으로는 風邪搏於皮膚하거나 諸原因으로 인하여 氣血失和하여³³⁻³⁸⁾, 또는 肝腎不足³⁹⁾, 氣滯血瘀⁴⁰⁻⁴²⁾ 등으로 보았고, 治療⁴³⁾에 있어서는 內服藥으로 蒼耳膏, 浮萍丸, 白駁丸, 通竅活血湯 등을, 外用藥으로는 補骨脂酊, 密陀僧散, 玉粉膏 등이 많이 언급되었으며, 外用, 塗布로는 硫黃, 蛇蛻皮, 補骨脂 등이 자주 쓰인 약제였다.

Flavonoid는 polyphenolic compound로서 항virus, 항산화, 항염 등 여러 활성이 알려져 있는 생리활성 물질¹⁴⁾로써, 일반적으로 flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, anthocyanins 등을 포함하며 대표적인 flavonol 물질로는 quercetin, kaempferol, myricetin 등이 있는데, 한약재와 생약 및 과일 등에 많이 함유되어 있는 성분 중의 하나로 자연에서 색을 내는데도 관여한다. 현재까지 flavonoid 중 quercetin에 대한 연구는 비교적 활발하게 이루어지고 있으나 myricetin에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 한약재에 존재하는 flavonoid 중의 하나인 myricetin의 생리활성에 관한 연구를 수행하였다. Myricetin은 柏子仁, 側柏(Biota orientalis), 側柏葉 등의 함유 성분 중 하나로서 항산화효과와 anti-HIV activity를 가지고 있는 것으로 보고되었다¹⁵⁾. 側柏(Biota orientalis)은 側柏科에 속한 상록 침엽교목으로 種子와 葉을 本草로 사용하는데, 韓醫學에서 種子를 柏子仁, 葉을 側柏葉이라 한다. 柏子仁은 益智, 寧神, 補心脾,

滋肝腎, 潤顏色, 聰明耳目, 潤腸通便의 효능이 있어 風濕痺痛, 驚悸, 恍惚, 虛煩失眠, 陰虛盜汗, 腸燥便秘 등을 치료하는데, 성분으로 지방 및 각종 精油성분, saponin이 함유되어 있으며¹⁶⁻²²⁾, 연구로는 김 등²³⁾의 柏子仁으로부터 항 Herpes 바이러스 1형(HSV-1)物質의 分離에 관한 報告가 있다. 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, 성분으로 精油로서 α-pinene, thujone, caryophyllene, fenchone 등이, flavonoid로서 quercetin, myricetin, hinokiflavone 등이, 이 밖에 tannin, 수지, vitamin C 등이 함유되어 있으며¹⁶⁻²¹⁾, 연구로는 이 등²⁴⁾의 側柏葉 藥鍼이 지혈효과에 미치는 영향과 김 등²⁵⁾의 側柏葉의 Diterpenes 성분에 대한 보고가 있다.

멜라닌의 생합성은 주로 tyrosinase의 작용에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있는데, 1980년대까지 L-tyrosine으로부터 DOPA로 hydroxylation, DOPA에서 DOPAquinone으로의 酸化, DOPAquinone에서 DOPochrome의 生成, DOPochrome에서 DHI(5,6-dihydroxyindole)로의 전환, DHI의 산화적 중합 및 단백질과의 결합을 통해 최종적으로 멜라닌을 합성하는 Raper-Mason Pathway를 통해 생합성 되는 것으로 알려졌다⁴⁴⁾. 그러므로 전통적으로 멜라닌 생성(melanogenesis) 조절 물질에 대한 연구는 멜라닌 생합성 경로의 속도 조절 단계를 촉매하는 효소인 tyrosinase에 영향을 주는 인자에 초점을 두었으나, 1980년대 이후 멜라닌 생합성에 대한 연구는 피부암 관련 연구그룹에서 집중적으로 연구되어, 생체내에서 DOPA -chrome이 DHI로 전환되는 경로 외에 DOPochrome tautomerase 작용에 의해 DHICA로 전환되는 새로운 경로가 존재한다는 사실이 밝혀졌다^{45,46)}. Kojic acid, arbutin 등의 물질은 tyrosinase 저해작용과 항산화작용에 의해 멜라닌 생성을 감소시킨다고 보고된 바 있으며, 피부의 색소생성을 조절하는 많은 연구의 대부분이 tyrosinase의 효소적 조절에 초점이 맞추어져 왔다^{8,47)}. 본 실험에서도 Myricetin이 HM₃KO 세포의 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 분석한 결과 Myricetin은 흥미롭게도 tyrosinase 활성에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.

Mishima 등⁴⁸⁾은 멜라닌 생성 억제 물질을 크게 두가지 형태로 분류하였는데, 그 하나는 멜라닌 생성의 속도조절 효소인 tyrosinase 효소 자체를 직접 억제하는 것이고, 또 하나는 세포로부터 분리한 tyrosinase에 대해서는 직접적인 억제를 나타내지 않지만 멜라닌세포 내에서 멜라닌을 억제하는 것이다. 후자는 tyrosinase 합성 억제, 유산, esculin, tyrosinase 당쇄수식에 의한 성숙과정의 저해, 세포독성 등의 작용으로 대별된다. 본 실험에서 Myricetin이 HM₃KO 세포의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과 Myricetin은 HM₃KO 세포의 증식을 유의하게 억제하였다. 따라서 본 연구결과에서 Myricetin은 인체 멜라닌세포주의 증식을 억제하였으나 세포당 멜라닌 생성을 현저하게 촉진시킨 것으로 나타났다. 부 등⁴⁹⁾은 in vitro에서는 솔잎 추출성분 4-hydroxy-5-methyl-3-[2H]-furanone (HMF)가 Kojic acid 보다 tyrosinase 활성 억제 작용이 약하지만, 배양 murine melanoma 세포에서 Kojic acid 보다도 훨씬 강력하게 멜라닌의 생성을 억제

하였고, 이는 멜라닌 생성을 억제할 수 있는 또 다른 인자가 있음을 시사하는 것으로 보고하였다. 또한 이 등⁵⁰⁾은 전통 한약재인 半夏(Pinelliae ternate B.)의 물추출물이 비록 tyrosinase에 대한 저해 작용은 없으나 배양된 마우스 흑색종 세포의 멜라닌 생성을 억제하였고, 용량 의존적으로 tyrosinase mRNA의 양을 감소시켜 tyrosinase m-RNA의 전사 조절을 통하여 미백효과를 나타낸다고 보고하였고, Ando 등⁵¹⁾은 Lactic acid가 tyrosinase 효소의 전사과정을 억제함으로써 효소활성을 억제한다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 側柏葉과 枳子仁 등의 성분 중의 하나인 Myricetin이 피부의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 인체 멜라닌세포주의 세포 생존율에 대한 영향을 조사하였다. Myricetin을 인체 멜라닌세포주인 HM₃KO 세포에 다양한 농도(10 - 100 µg/ml)로 5일 동안 처리한 후 MTT 방법으로 세포 생존율을 측정하였는데, Fig. 1에서 보는 바와 같이 Myricetin 처리군은 HM₃KO 세포의 증식을 억제하여 10 µg/ml 농도에서 대조군(100±4.6%)의 76±7.2%, 50 µg/ml 농도에서 47±7.4%, 100 µg/ml 농도에서 19±5.9%로 나타났다. 또한 세포의 광학현미경적 관찰결과에서도 Myricetin은 HM₃KO 세포의 증식을 억제한 것으로 관찰되어 Myricetin은 농도 의존적으로 HM₃KO 세포의 증식을 억제함을 알 수 있었다. 다음으로 인체 멜라닌세포주인 HM₃KO 세포에 Myricetin을 일정시간 처리한 후 세포내에 생성된 총 멜라닌 양을 측정하였는데, Fig. 3에서 보는 바와 같이 Myricetin 10, 50, 100 µg/ml 처리군에서 1×10³개의 세포당 멜라닌 양이 4.6±1.6 ng, 7.4±0.6 ng, 11.3±3 ng이었으며, 대조군에서는 3.0±0.4 ng으로 Myricetin은 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 촉진하였으며, Myricetin 50 µg/ml 처리군은 대조군의 2배, Myricetin 100 µg/ml 처리군은 대조군의 3배 정도 멜라닌 생성이 증가되었음을 알 수 있었다. 한편 멜라닌 생성을 촉진시키는 호르몬으로 잘 알려진 α-MSH를 처리하여 양성 대조군으로 하였는데, 멜라닌 생성 촉진효과는 α-MSH 보다도 효과적이었음을 알 수 있었다. 또한 Myricetin이 HM₃KO 세포의 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 Myricetin은 HM₃KO 세포의 tyrosinase 활성에는 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다. 그러나 Myricetin이 HM₃KO 세포의 tyrosinase 효소 활성에는 영향을 주지 않았으나 tyrosinase protein 발현을 조절할 가능성이 있으므로 Myricetin이 HM₃KO 세포의 tyrosinase protein 발현양상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 tyrosinase antibody를 이용한 western blotting 방법으로 인체 멜라닌세포주에서 tyrosinase protein level을 조사하였는데, Fig. 6에서 보는 바와 같이 대조군에 비하여 현저히 증가하였다.

이상의 실험결과, Myricetin은 인체 멜라닌세포주에서 세포의 증식을 억제하였으며, tyrosinase 효소 활성에는 영향을 미치지 않았으나 tyrosinase protein 발현을 증가시키므로서 멜라닌 생성을 촉진시킨 것으로 생각된다. 이와 더불어 멜라닌 생성 촉진 효과가 α-MSH 보다 효과적인 것으로 나타나 Myricetin의 보다 정확한 작용 기전을 밝힘으로써 멜라닌 생성 조절제로서, 또한 白皮症이나 白斑症 등의 색소 결핍질환에 응용될 치료제로서

개발 가능성이 매우 높은 물질로 생각된다.

결론

본 연구는 한약재와 생약을 이용한 피부질환 치료제 및 미백제개발을 목적으로 枳子仁和 側柏葉 등의 성분 중의 하나인 myricetin이 피부의 멜라닌 세포에 미치는 영향을 조사하고자 인체 멜라닌세포주 (HM₃KO)를 이용하여 멜라닌 색소 형성과 조절 기전을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Myricetin은 HM₃KO 세포의 증식을 농도 의존적으로 억제하였다. Myricetin은 HM₃KO 세포에서 멜라닌 생성을 유의하게 촉진하였다. Myricetin은 HM₃KO 세포의 tyrosinase 활성에는 영향을 주지 않았다. Myricetin은 HM₃KO 세포의 tyrosinase protein 발현을 촉진시켰다. 이상의 결과 myricetin은 인체 멜라닌세포의 증식을 억제하였으며, tyrosinase protein 발현을 촉진시키므로서 멜라닌 생성을 증가시킨 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 2004년도 원광대학교 교비 지원에 의하여 연구됨

참고문헌

1. 박경아 등 : 조직학, 서울, 고려의학, pp. 405-411, 1999.
2. Bloom W, Fawcett DW: A textbook of histology, 11th ed, W.B. Saunders Company, USA, pp. 543-558, 1986.
3. Korner A, Pawelek J: Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. Science. 217(4565):1163-1165, 1982.
4. Pawelek J M: After dopachrome? Pigment Cell Res. 4: 53-62, 1991.
5. Aroca P, Solano F, Salinas C, Garcia-Borrón JC, Lozano JA: Regulation of final phase of melanogenesis. Eur. J Biochem 208: 155-163, 1992.
6. 백종현 외 : 알부틴의 항멜라닌 효과, 大韓皮膚科學會誌, 38: 1303-1308, 2000.
7. 최영옥 : 멜라닌생성 억제제인 코직산 및 그제품의 이용제제화 연구, 한국약제학회, 27: 5-58, 1997.
8. Chakraborty A K, Funasaka Y, Komoto M and Ichihashi M. Effect of Arbutin on melangenic Proteins in Human Melanocytes. Pigment Cell Res. 11:206-212, 1998.
9. Curto E V, Kwong C, Hermersdorfer H, Glatt H, Santis C, Virador V, Hearing V J and Dooley P : Inhibitors of mammalian melanocytes tyrosinase: In vitro Comparisons of alkyl Esters of Gentisic acid with other putative inhibitors. Biochemical Pharmacology, 57: 663-672, 1999.
10. 이승호 외 : 고등식물로부터 피부멜라닌 생성에 관여하는 티로시나제 활성 억제물질의 탐색, 藥學會誌, Vol. 41, No. 4,

- pp. 456-461, 1997.
11. Bystryn JC, Naughton GK. The significance of vitiligo antibodies. *J. Dermatology* 12: 1-9, 1985.
 12. Han SK, Park YK, Lee KG. epidermal change in active vitiligo. *J Dermatology* 19: 217-222, 1992.
 13. 박윤기 외 : 전신 광화학요법에 의한 백반증의 치료, *大韓皮膚科學會誌*, Vol. 23, No. 5, p.643, 1985.
 14. 천현자 외 : Quercetin이 Melan-a 멜라닌세포의 멜라닌 합성에 미치는 영향, *生藥學會誌*, 33(3): 245-251, 2002.
 15. 장일식 외 : 동양의학과학대전, 서울대학교 천연물과학연구소 문헌정보학연구실 편, 학술편수관, 3권 p. 2052, 2003.
 16. 申佶求 : 申氏本草學, 서울, 壽文社, pp. 117, 175-176, 1988.
 17. 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.
 18. 吳儀洛 : 本草從新, 서울, 杏林書院, pp. 107-108, 1982.
 19. 唐慎微 重修政和經史證類備用本草, 서울 大星文化社 p. 295, 1983.
 20. 楊東喜 : 本草備要解析, 서울, 一中社, pp. 309-310, 1991.
 21. 汪詡庵 : 本草易讀, 北京, 人民衛生出版社, pp. 284-285, 1987.
 22. 辛民教 : 臨床本草學, 서울, 永林社, pp. 641-643, 1997.
 23. 김호경 외 : 백자인으로부터 항 Herpes 바이러스 1형(HSV-1) 물질의 분리, *生藥學會誌*, 29(4), pp. 277-282, 1998.
 24. 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*, Vol. 13, No. 2 : 074-088, 2000.
 25. 김영중 외 : 측백엽의 Diterpenes 성분, *生藥學會誌*, 29(4) : 347-352, 1998.
 26. 이선동 : 백반증의 한방치료, 서울, 정담, pp.30-54, 1996
 27. 許 浚 : 東醫寶鑑·外形篇, 서울, 大星文化社, pp. 394-395, 400-402, 1990
 28. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival application and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods*, 65: 55, 1983.
 29. Hosei 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.
 30. 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.
 31. 박지선 외 : 백출추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향, *大韓東醫病理學會誌*, 13(2):91, 1999.
 32. 陳貴廷·楊思澍 : 實用中西醫結合診斷治療學, 서울, 一中社, pp.1505- 1506, 1992.
 33. 巢元方 : 諸病源候論, 台北, 集文書局, p. 302, 1965.
 34. 李旻 : 醫學入門·雜病, 서울, 大星文化社, pp. 63-64, 1990.
 35. 王肯堂 : 證治準繩·四卷·瘍醫, 台北, 新文豐出版公司, pp.368-369, 1979.
 36. 許 浚 : 東醫寶鑑·外形篇, 서울, 大星文化社, pp. 394-395, 400-402, 1990.
 37. 吳謙 : 醫宗金鑑·外科心法要訣, 台北, 大中國圖書公司, p.111,1982.
 38. 陸青節 : 萬病醫藥顧問·冊下·皮膚科, 台北, 大中國圖書公司, p. 11, 1973.
 39. 楊思澍 외 : 中醫臨床大全, 北京, 北京科學技術出版社, pp. 896-897, 1991.
 40. 王勳臣 : 醫林改錯, 台北, 局書文集, pp. 55, 59, 1964.
 41. 陳貴廷·楊思澍 : 實用中西醫結合診斷治療學, 서울, 一中社, pp.1505- 1506, 1992.
 42. 顧伯華 : 實用中醫外科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp. 532-535, 641, 1994.
 43. 지선영 : 白斑症의 東西醫學의 考察, *濟韓東醫學術院 論文集 Vol.4, No.1*, pp. 265, 280-282, 1999.
 44. Hearing VJ : Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 4, pp. 24-28, 1999.
 45. Fitzpatrick TB, Szabo G, Seiji M, Quevedo WC : Biology of the melanin pigmentary system. In: Fitzpatrick TB, ed., *Dermatology in General Medicine*. Academic Press, New York, pp. 131-163, 1979.
 46. Jimbow K, Fitzpatrick TB, Wick M : Biochemistry and physiology of melanin pigmentation. In: Goldsmith LA, ed., *Physiology and Molecular Biology of the Skin*. Oxford Univ. Press, New York, pp. 873-909, 1991.
 47. Sakuma K, Ogawa M, Sugibayashi K, Yamada K and Yamamoto K.: Relationship between tyrosinase inhibitory action and oxidation-reduction potential of cosmetic whitening ingredients and phenol derivatives. *Arch Pharm Res.* 22(4): 335-9, 1999.
 48. Mishima Y., Hatta S., Ohyma, Y. and Inazu, M. : Induction of melanogenesis suppression: Cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res*, 1, 367, 1988.
 49. 부용출 등 : 솔잎으로부터 항산화 성분인 4-hydroxy-5-methyl-3[2H]-furanone 의 분리, *한국농화학회지*, 37(4):310-314, 1994.
 50. 이상화, 김진준, 김호정, 이종태, 강세훈: 반하 추출물이 B-16 마우스 흑색종 세포의 멜라닌 생성과 타이로시네이즈 mRNA 양에 미치는 영향, *대한화장품학회지*, 23(2):23-32, 1997.
 51. Ando, S., Ando, O., Suemoto, Y., Mishima, Y. : Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor, *J. Invest Dermatol.* 100, 150, 1993.