대한안이비인후피부과학회지 제17권 제1호(2004년 4월)
The Journal of Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology 2004;17(1):82-93

사삼 물 추출액의 멜라닌 형성 억제 효과

강현성 · 임홍진 · 박민철 · 임규상 · 김남권
원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

Inhibitory Effect of Water Extract of Adenophorae Radix on the Melanogenesis

Hyun-sung Kang · Hong-jin Lim · Min-chul Park · Kyu-sang Lim · Nam-kwen Kim

Recently many efforts were focused to understanding the mechanical insights of melanogenesis to develop the agents for hyper-pigmentation and hypo-pigmentation. In the melanin biosynthetic pathway, tyrosinase is the rate limiting enzyme, and α-melanocyte stimulating hormone(MSH) or cAMP-elevating agents stimulate melanogenesis and enhance the melanin synthesis and the tyrosinase activity. The author has analyzed the effects of *Radix Trichosanthis* on the basal Melanogenic activities of B16/F10 mouse melanoma cells, and on the α-MSH or forskolin-induced melanogenesis.

Radix Trichosanthis alone markedly suppressed melanin content and tyrosinase activity in a dose-dependent manner. Pretreatment of the cells with *Radix Trichosanthis* also suppressed the increase of α-MSH(10 nM) or forskolin(20 μM)-induced melanin content and tyrosinase activity. The decrease in the tyrosinase activity was paralled by a decrease in the abundance of tyrosinase protein and tyrosinase promoter activity. Pretreatment of the cells with *Radix Trichosanthis* also inhibited the increase of forskolin(20 μM) induced the amount of tyrosinase protein and tyrosinase promoter activity. The results of DOPA staining revealed that pretreatment of the cells with *Radix Trichosanthis* showed less intensity than B16 melanoma cells stimulated with α-MSH or forskolin.

These results suggest that *Radix Trichosanthis* inhibits melanogenesis and abrogates α-MSH and cAMP-induced melanogenesis in B16 melanoma cells.

Key words : melanogenesis, *Adenophorae Radix*, inhibitory effect

서론

멜라닌은 表皮의 基底層 사이나 基底層의 아래, 털주머니 등에서 주로 관찰되는 멜라닌 細胞로부터 合成되며, 세포질 돌기를 통해 角質形成細胞로 운반되어 표피-멜라닌 단위를 形成한다[1]. 멜라닌의 合成은 細胞의 遺傳的 要因과, 代謝, 內分泌, 炎症, 感染, 腫瘍 等과 같은 物理的 및 化學的 要因들에 의해 크게 좌우되는데[2], 이런 原因들로 인한 멜라닌 합성 이상이 기미, 주근깨 등의 過色素 沈着症을 發生시킨다[3-7].

교신저자: 김남권, 경기도 군포시 산본동 1126-1
원광대학교 군포한방병원 안이비인후피부과 과장
(Tel: 031-390-2672)

韓醫學 文獻에는 皮膚의 過色素 沈着症에 대해 《黃帝內經·素問》 〈至眞要大論〉[8]에 "歲陽明在天, 燥淫所勝... 面鼽, 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 黯黲, 面黑, 雀斑 등으로 다양하게 언급하였으며[9-31], 治療方法으로는 虛證과 實證으로 각각 辨證하여 內服藥과 外用藥들을 使用하였다[9-44].

沙蔘은 도라지과(Campanulaceae)에 속한 다년생 초본인 잔대(Adeno- phora triphylla var. japonica HARA)와 그 동속식물의 根을 건조한 것으로[45-46], 《神農本草經》에 "微苦微寒 主血脈驚氣 除寒熱 補中 益肺氣 久服利人 一名 知母 生 川谷"이라 記錄된 이래 養陰淸肺, 益胃生津, 祛痰止咳, 排膿消腫, 祛風止痒 등의 效能으로 肺熱咳嗽, 口渴, 胃痛, 皮膚瘙痒 등의 治療에 使用되었으며, 《太平聖惠方》에서는 面黯黲을 治療하고 滅瘢去黑痣하는 處方에 沙蔘을 活用하였다[47].

沙參의 種類에 대한 記錄은 《本經逢源》에 처음 記錄되어 있는데 "沙蔘 南北二種 南者質堅性寒 北者體虛力微"라고 南 北沙參을 나누어 놓았으며, 申 등은 沙參은 잔대의 根, 薺苨는 모시대의 根, 羊乳는 더덕의 根으로 文獻 考察 후 각각 分類하였다[48].

最近 美容에 대한 관심이 증가하면서, 멜라닌 생합성의 부정적인 측면인 過色素 沈着을 제어하는 美白 化粧品에 대한 硏究가 활발히 이루어지고 있다. 지금까지 많이 활용되고 있는 美白劑로는 Kojic acid나 arbutin과 같은 몇 가지 물질들이 알려져 있으나 이들은 臨床的 效能이 아직 증명되지 않았으며, Hydroquinone의 경우 매우 效果的인 美白作用을 가지지만 멜라닌세포에 毒性이 심하여 잠재적인 mutagen이 될 것으로 알려져 있다[49,50].

그러므로 細胞에 毒性이 적으면서 멜라닌 合成을 減少시키고 동시에 non-mutagenic한 美白劑를 찾기 위한 硏究가 진행되고 있으며, 특히 天然物質에 대한 관심이 점차 증가되고 있다.

韓藥複合製劑에 대한 美白 硏究로는 麻黃 및 麻黃膏의 미백효과[51]에 관한 연구와 瀉白散의 미백효과 검정에 관한 연구[52], 加減西施玉容散의 미백효과에 관한 연구[53-55] 등이 있으나 구성 本草 각각의 미백효과보다는 미약하게 나타났다. 皮膚의 멜라닌 形成에 미치는 單一 韓藥材에 대한 實驗的 硏究로 이 등[56]은 天花粉 抽出物이 B16 melanoma 세포의 멜라닌 생성을 억제하였으며, α-MSH와 c-AMP에 의한 과색소생성 유도시에도 멜라닌생성을 감소시켰다고 報告하였고, 윤 등[57]은 白芨이 멜라닌 생성억제 효과를 가지고 있으며, 이러한 과정은 B16 흑색종 세포의 tyrosinase 활성과 tyrosinase protein 발현을 억제하여 멜라닌 형성을 억제시켰다고 報告하였으나, 面黯黲을 치료하고 滅瘢去黑痣한다고 알려진 沙蔘의 美白 效果에 대한 實驗報告는 없었다.

이에 著者는 沙蔘이 皮膚의 멜라닌 形成에 미치는 影響을 알아보고자, 沙蔘 물 추출물을 제조하여, B16 흑색종세포에서 멜라닌 생성과정에서 가장 중요한 효소인 tyrosinase 활성도와, 최종산물인 멜라닌量과 세포증식에 미치는 영향을 측정하였으며, 멜라닌 생성을 촉진시키는 물질로 알려진 α-MSH (melanocyte stimulating hormone)를 처리하여 과색소 형성을 유도한 뒤 沙蔘의 멜라닌 생성 억제효과를 관찰하였고, 실험 결과의 세포 독성 여부를 알아보기 위해 B16 흑색종세포의 증식과 형태 변화에 대해 조사하여 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 시료 제조

本 實驗에 사용한 沙蔘은 전라북도 진안 숙근 약초 시험장에서 재배되는 3년근잔대를 제공(2002년 9월30일) 받아 충분히 음건한 후 본 실험에 사용하였다. 잔대 100g에 물 1ℓ를 가하여 3시간 동안 끓인 후 거즈로 여과하고 3,200rpm으로 30분간 원심분리

하여 상징액을 취하였다. 감압 농축 후 -70℃에서 freeze dryer로 동결건조 시킨 후 30.13g의 試料(수득률: 30.13%)를 얻었다. 試料는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM, Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD)에 녹인 뒤 세포에 투여하기 전 0.22㎛ pore의 여과지로 멸균하여 사용하였다.

2. B16 흑색종세포주 배양

B16 흑색종세포의 배양은 CO_2 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 교체하여주었다.

3. 세포 증식 측정

세포를 배양판(6 cm dish)에 well당 $1x10^5$ 씩 분주한 후 24시간 배양하여 배양용기에 세포를 부착하였다. 沙蔘 물 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 well 당 세포수를 측정하였다.

4. 세포내 tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성도는 Martinez-Esparza M 등[58]의 방법에 의하여 측정하였다. 멜라닌세포를 수확하여 세포 침천물을 만들고, 100㎕ 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 원심분리 하여 상층액을 취하여 tyrosinase 활성측정용액으로 사용하였다. 50㎕의 상층액에 100mM sodium phosphate(pH 7.0) 100㎕를 넣고 30℃ 물중탕기에서 5분간 보온한 후 100mM catechol 50㎕를 넣고 온도조절장치가 있는 분광광도계로 37℃, 405nM에서 흡광도의 변화를 1시간 관찰하였다.

5. 세포내 멜라닌 정량

멜라닌 정량은 Hosei 등[59]의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양세포는 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척, 원심분리 하여 수확하였다. 세포침전물에 1㎖의 증류수를 넣어 현탁 후 초음파로 분쇄한 후, 원심분리 하여 침전물을 수확하였다. Acid-insoluble material을 얻기 위해 10%의 dimethyl sulfoxide(DMSO)가 첨가된 1N NaOH 300㎕를 넣어 80℃에서 1시간 동안 처리하여 용해시켰다. 475nM에서 흡광도를 측정하였으며 멜라닌 정량은 합성멜라닌(Sigma chemical Co.)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

6. 광학현미경적 관찰

세포의 형태적 관찰은 배양 완료 후 Inverted Microscope(phase contrast, Leica, Germany)를 이용하여 관찰하였다.

7. 통계학적 분석

자료는 Origin 50을 이용해 분석하였고 평균과 표준편차로 요약하였다. 통계적 유의성에 대한 차이는 일원분산분석(ANOVA)을 이용하였다.

실험성적

1. 沙蔘이 세포내 tyrosinase 활성에 미치는 영향

멜라닌은 멜라닌세포에서 amino acid인 tyrosine으로부터 일련의 효소 반응, 즉 tyrosinase, tyrosinase related protein 1(TRP-1), DOPA chrome tautomerase (TRP-2)에 의해 합성되는데 이 중 tyrosinase는 멜라

닌색소 형성과정의 속도 조절 효소로 작용한다[60-66].

沙蔘추출물이 B-16흑색종세포의 tyrosinase의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 沙蔘추출물을 0.5 mg/ml에서 부터 2 mg/ml농도까지 5일 동안처리하고 tyrosinase 활성을 측정한 결과, 沙蔘 0.5 mg/ml 처리군에서의 tyrosinase 활성은 대조군에 비하여 89%로 감소되었으며, 1 mg/ml 농도 처리군에서는 80%, 2 mg/ml 농도 처리군에서는 tyrosinase의 활성이 대조군에 비하여 70%로 감소하였다(Fig. 1).

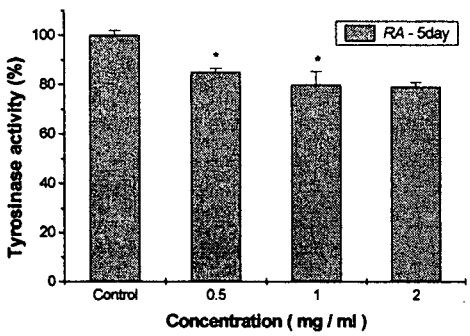

Fig. 1. The effect of Radix Adenophorae extract on tyrosinase activity of B-16 mouse melanoma cells. Cells were seeded at 1×105 cells/well. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of RA (Radix Adenophorae) extract and cultured for 5 d. Then, tyrosinase assay was performed as described 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.

2. 沙蔘이 멜라닌 생성에 미치는 영향

沙蔘추출물이 멜라닌 생합성 과정 중 최종 단계의 산물로 나타나는 멜라닌량에 미치는 영향을 조사하였다.

沙蔘추출물을 0.5, 1, 2 mg/ml 의 각각의 농도로 처리하고 배양 5일 후 10^3 cell당의 멜라닌 양을 측정한 결과, 沙蔘 0.5 mg/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 89%, 1 mg/ml 처리군에서는 80%, 2 mg/ml 처리군에서는 최종 멜라닌 생성량이 70%로 감소하였다. 이상의 결과 沙蔘추출물은 멜라닌 생성을 억제하였고, 沙蔘의 농도가 높아짐에 따라 멜라닌 생성도 감소하였다(Fig. 2).

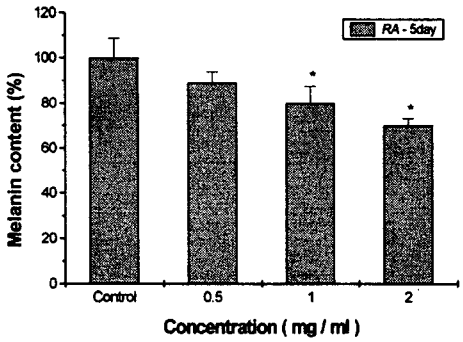

Fig. 2. The effect of *Radix Adenophorae* extract on melanin contents in B-16 mouse melanoma cells. Cells were seeded at 1×105 cells/well. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of RA (*Radix Adenophorae*) extract and cultured for 5 d. Then, melanin contents were measured as described 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. α-MSH 에 의한 과색소 유발시 沙蔘의 tyrosinase 억제효과

멜라닌 생성을 촉진시키는 호르몬인 α-MSH (melanocyte stimulating hormone)은 뇌하수체에서 ACTH(adrenocorticotropic hormone), Lipotropic 호르몬과 Endolpine의 전구체인 POMC(proopiomelanocortin)의 형태로 분리되며, 흑색종세포와 실험동물의 멜라닌세포의 멜라닌화를 자극하는 것으로 알려져 왔다[67].

α-MSH에 대한 沙蔘추출물의 과색소 형성 억제효

과를 알아보기 위하여 α-MSH와 沙蔘추출물에 대한 tyrosinase 활성을 측정한 결과, 10nM의 α-MSH처리군의 경우 tyrosinase 활성은 대조군에 비하여 206%로 현저히 증가 되었다. α-MSH와 沙蔘추출물 동시에 처리한 沙蔘추출물 2 mg/ml처리군에서는 tyrosinase 활성이 대조군에 비하여 146%로 나타나 α-MSH에 의한 tyrosinase 활성 증가를 억제시켰다(fig. 3).

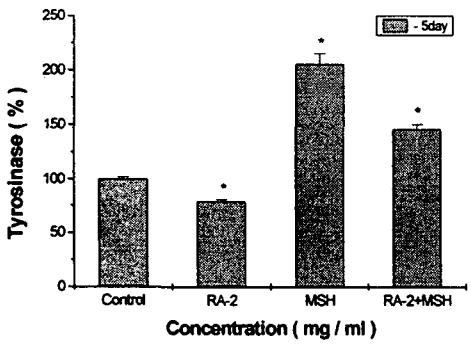

Fig. 3. The effect of *Radix Adenophorae* extract on tyrosinase activity of B-16 mouse melanoma cells. Cells were seeded at 1×105 cells/well. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of RA(*Radix Adenophorae*) extract only or RA with α-MSH and cultured for 5 d. Then, tyrosinase assay was performed as described in Materials and Methods. Data are means±S.E. of three experiments performed in triplicate. Asterisks indicate a significant difference compared with control group. *P < 0.05.

4. α-MSH 에 의한 과색소 유발시 沙蔘의 멜라닌 형성억제효과

α-MSH에 대한 과색소 형성시 沙蔘추출물의 억제 효과를 알아보기 위하여 α-MSH와 沙蔘추출물에 대한 최종산물인 멜라닌 양을 측정한 결과, 10nM의 α-MSH처리군의 경우 멜라닌 양은 대조군에 비하여 1500%로 현저히 증가 하였다. 아울러 α-MSH와 沙蔘추출물 동시에 처리한 沙蔘추출물 2 mg/ml처리군에서는 최종산물인 멜라닌 양이 대조군에 비하여 약 1000%로 α-MSH 단일 처리군에 비하여 현저히 감소하였다(fig. 4).

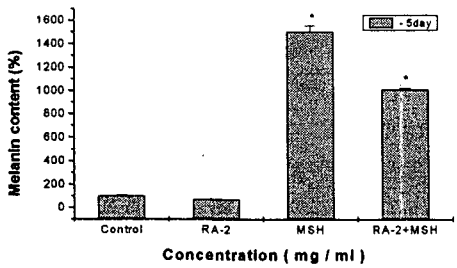

Fig. 4. The effect of *Radix Adenophorae* extract on melanin contents in B-16 mouse melanoma cells. Cells were seeded at 1×105 cells/well. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of RA(*Radix Adenophorae*) extract only or RA with α-MSH and cultured for 5 d. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means±S.E. of three experiments performed in triplicate. Asterisks indicate a significant difference compared with control group. *P < 0.05.

5. 沙蔘이 B16흑색종세포의 증식에 미치는 영향

沙蔘추출물의 멜라닌 생성 억제 효과가 沙蔘추출물 자체의 세포 독성에 의한 것인지 알아보기 위하여 沙蔘추출물의 B16 흑색종세포에 대한 증식에 미치는 영향을 관찰하였다.

沙蔘추출물을 0.05, 0.5, 1, 2 mg/ml 의 각각의 농도를 처리하고, 5일간 세포를 배양한 다음 각각의 세포수를 계측한 결과, 沙蔘추출물만을 처리한 군의 경우 대조군에 비하여 각각 95%, 94%, 93%, 91%로 나타났다. 또한 α-MSH 와 沙蔘추출물 0.05, 0.5, 1, 2 mg/ml 농도로 동시에 처리한 실험군의 경우 각각 대조군에 비하여 103%, 105%, 110%, 113%로 나타나 沙蔘추출물의 세포독성 효과는 관찰되지 않았다 (Fig. 5)

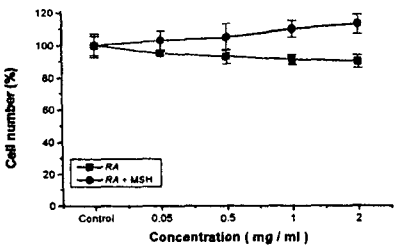

Fig. 5. Effect of the *Radix Adenophorae* extract on the cell proliferation of the B16 mouse melanoma cells. Cells were seeded at 1×105 cells/well. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of RA (*Radix Adenophorae*) extract only or RA with α-MSH and cultured for 5 d. ■; RA ●; RA and α-MSH. Data are means±S.D. of experiments performed in triplicate. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, *P < 0.05.

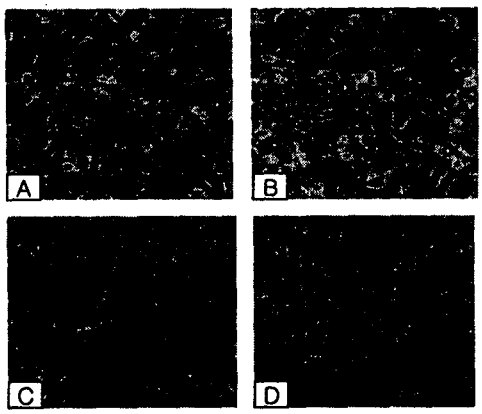

Fig. 6. Light micrographs of B-16 mouse melanoma cells observed for 5 days. A) Nontreated, B)RA 2mg, C) MSH 10nM treated, D) 2mg of RA and 10nM of MSH treatment.

6. 세포의 형태학적 관찰

沙蔘추출물 처리에 의한 B16 흑색종세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과, 沙蔘 2 mg/ml의 처리군의 경우 대조군과 거의 유사한 정상세포 소견을 나타냈으며, 10 nM의 α-MSH를 처리한 군에서는 대조군에 비하여 세포체가 커지고 수지상의 세포돌기 수가 증가하였음이 관찰되어 α-MSH에 의한 멜라닌세포의 분화가 촉진되었음을 알 수 있었다. 아울러 α-MSH와 沙蔘추출물 2 mg/ml를 동시에 처리한 군의 세포의 모양은 α-MSH만을 단독처리한 군의 형태와 유사하게 관찰되어 沙蔘추출물의 처리는 B16 흑색종세포에 독성을 나타내지 않았으며 세포의 형태학적인 변화에도 영향을 미치지 않았다(Fig. 6).

고찰

皮膚의 색깔은 여러 因子에 의하여 決定되는 것으로, 그 중 중요한 것은 멜라닌과 카로틴의 量, 眞皮에 있는 血管의 數와 흐르는 血液의 색깔이 관여하게 되며, 특히 멜라닌은 表皮에서 특수하게 분화된 멜라닌 細胞에서 合成이 되는데, 멜라닌 細胞는 주로 基底層細胞 사이나 基底細胞의 아래, 그리고 털주머니에서 관찰되는 細胞로 멜라닌을 생성하여 세포질 돌기를 통하여 表皮의 基底層과 가시층의 細胞로 운반된다. 멜라닌 색소의 形成은 멜라닌 細胞內의 멜라닌 소체(melanosome)에서 이루어지며, 멜라닌 소체는 수상돌기를 통하여 부근에 인접되어 있는 角質化細胞(keratinocyte)로 이동하게 되고, 角質化細胞가 外皮로 부상하면서 皮膚色을 나타내게 된다[1]. 이렇게 角質化細胞 (keratinocyte)로 이동된 멜라닌 소체는 자외선 (UV)에 의한 光老化나 日光角化症으로부터 皮膚를 保護하는 機能을 하고 있다[68,69].

이러한 melanin 色素의 減少나 增加 및 異常 分布 等은 白皮症(albinism)이나 白斑症(vitiligo) 等의 皮膚疾患을 誘發하고, 에디슨병(Addison's disease)은

반대로 副腎皮質에서 코티솔의 生成이 缺乏되어 副腎皮質刺戟호르몬이 과잉 生産됨으로써 色素沈着을 증가시키기도 한다[70,71].

환자들은 자신의 皮膚色에 異常이 있을 때 美容的 문제를 이유로 1차적인 조언을 구하게 되며 皮膚色이 너무 짙거나 옅은 경우에 정신적 부담을 느낀다. 비록 皮膚色의 變化가 症狀이나 後遺症이 없을지라도 이는 身體에 疾病이 있는 것을 意味하기도 한다[72]. 最近에는 皮膚 美容을 해치는 기미나 주근깨 등과 같은 過色素 沈着으로 인한 皮膚疾患에 대한 認識이 높아지고 있다[73-76].

韓醫學에서는 기미, 주근깨 등의 過色素 沈着症에 해당하는 疾患이 《黃帝內經·素問》<至眞要大論>[8]에 "歲陽明在天, 燥淫所勝...面塵, 身無膏澤, 足外反熱"이라 하여 처음 기록된 이래, 巢[9]는 《諸病源候論·面皯黑證候》에서 風邪가 皮膚에 侵入하고 痰飮이 臟腑에 쌓이면 '烏黧'나 '雀卵上之色'이 얼굴에 나타난다 하여 原因과 症狀을 비교적 자세히 言及하였고, 이후 많은 醫家들[9-31]에 의해 面黑, 黔黯, 雀斑, 黧黑斑 等의 異名으로 記錄되었다.

過色素 沈着症의 原因을 樓 等[13,19]은 內經의 面塵에 대한 文獻을 引用하여 陽明病으로 보았으며 또 顧 等[10,12,18,26]은 憂思過多와 飮食失調로 인한 脾胃損傷을 原因으로 보았는데, 이는 最近 鞠[32]이 臨床 論文에서 밝힌 胃腸機能 障碍 患者에게서 기미가 많이 나타난다는 것과 관련이 있는 것으로 思料된다. 또, 李 等[12,17,22,23,28,31]은 巢[9]의 文獻을 引用하여 風邪와 痰飮이 症狀을 誘發한다고 보았고, 陣 等[10,12,13,29,33]은 發病機轉 중에서 女性에게 주로 나타난다는 言及과 함께 陰虛火動을 原因으로 보았는데 이는 高 等[34,35]이 臨床論文에서 밝힌 기미환자 중에서 月經不調를 호소하는 女性이 많다는 內容과 일맥상통한 것으로 思料된다. 近來 文獻들[36-44]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 等의 原因으로 자세히 分類하였다.

以上의 病因病機를 綜合하면 內因으로는 肝鬱氣滯, 瘀血內停, 腎陰不足, 陰虛火旺, 脾虛不運 等이, 外因으로는 風邪, 火邪, 濕熱邪, 熱毒 等이 각각 過色素 沈着症을 誘發하는 것으로 思料된다. 治療方法으로는 辨證施治에 의한 內治法과, 軟膏劑나 粉末洗劑 等을 使用하는 外治法, 體鍼, 耳鍼 等을 利用하는 鍼治療法으로 分類할 수 있다. 內治法은 肝鬱氣滯에 疏肝解鬱하는 逍遙散을, 瘀血內停에는 通經活絡하는 通竅活血湯을, 腎陰不足에는 滋補肝腎하는 知柏地黃丸을, 脾虛不運에는 健脾益氣하는 加味歸脾湯 等을 爲主로 加味하여 각각 使用하였다. 外治法에 使用된 外用藥은 玉容散, 紅玉散, 西氏玉容散, 玉肌散, 黃柏霜, 祛斑霜 等을 여러 가지 製法으로 얼굴에 使用하였다.

最近, 美容에 대한 관심이 증가하면서, 멜라닌 생합성의 否定的인 側面인 過色素 沈着을 제어하는 美白 化粧品에 대한 硏究가 활발히 이루어지고 있다. 지금까지 많이 활용되고 있는 美白劑로는 Kojic acid나 arbutin과 같은 몇 가지 물질들이 알려져 있으나 이들은 臨床的 效能이 아직 증명되지 않았으며, Hydroquinone의 경우 매우 效果的인 美白作用을 가지지만 멜라닌 細胞에 毒性이 심하여 잠재적인 mutagen이 될 것으로 알려져 있다[49,50].

그러므로 細胞에 毒性이 적으면서 멜라닌 合成을 減少시키고 동시에 non-mutagenic한 美白劑를 찾기 위한 硏究가 進行되고 있으며, 특히 天然物質에 대한 관심이 점차 增加되고 있다.

韓藥複合製劑에 대한 美白 硏究로는 이[51]의 麻黃 및 麻黃膏의 미백효과에 관한 연구와 김[52]의 瀉白散의 미백효과 검정에 관한 연구, 손 등[53-55]의 加減西施玉容散의 미백효과에 관한 연구 等이 있으나 構成本草 각각의 美白效果보다는 微弱하게 나타났다. 皮膚의 멜라닌 形成에 미치는 單一 韓藥材에 대한 實驗的 硏究로 이 등[56]은 天花粉 抽出物이 B16 melanoma 세포의 멜라닌 生成을 抑制하였으며, α-MSH와 c AMP에 의한 과색소생성 유도시에도 멜라닌생성을 감소시켰다고 報告하였고, 윤 등[57]은 白芨이 멜라닌 생성억제 효과를 가지고 있으며, 이러

한 과정은 B16 흑생종 세포의 tyrosinase 활성과 tyrosinase protein 발현을 억제하여 멜라닌 형성을 억제시켰다고 報告하였다.

沙蔘은 도라지과(*Campanulaceae*)에 屬한 多年生草本인 잔대(*Adenophora triphyllan var. japonica HARA*)와 그 同屬植物의 根을 乾燥한 것[45-46]으로 《神農本草經》에 "微苦微寒 主血脈驚氣 除寒熱 補中 益肺氣 久服利人 一名 知母 生川谷"이라 記載된 以來 養陰淸肺, 益胃生津, 祛痰止咳, 排膿消腫, 祛風止痒 等의 效能으로 久咳肺癆, 肺熱咳嗽, 口渴, 胃痛, 皮膚瘙痒 等의 症狀에 應用되고 있다. 또한 現代 科學的 實驗을 통해 精油, 澱粉, Saponin 等의 成分이 含有되어 祛痰 强心 抗眞菌作用 等 有效한 藥理作用이 있는 것으로 밝혀져 中國에서는 冠心病, 心肌炎, 慢性氣管支炎, 百日咳, 赤白帶下, 産後無乳, 牙痛 等에 臨床活用하고 있으며[48], 《太平聖惠方》에서는 面黑黯을 치료하고 滅瘢去黑痣하는 處方에 沙蔘을 活用하였다[47]. 이에 著者는 韓醫學的으로 皮毛는 肺의 合이므로, 肺·胃 二經으로 歸經하면서 滋陰淸肺, 祛痰止咳, 益胃生津의 作用이 있는 沙蔘이 멜라닌 形成에 어떤 영향을 미치는지에 관하여 硏究하였다.

멜라닌의 過剩生産은 人體에 기미, 주근깨를 形成하고 皮膚老化를 促進하며, 더 나아가 皮膚癌의 誘發에 관여하는데, 멜라닌 生合成은 주로 tyrosinase의 작용에 의해 이루어지는 것으로 報告되어 있다[66]. Tyrosinase는 phenolase, monophenolase, monophenol oxidase, cresolase, monophenol monooxygenase 等으로 불리며, catechol oxidase와는 機能이 유사하여 混用되기도 한다. Tyrosinase는 한 쌍의 구리이온을 함유하고 있는 금속단백질 군에 속하며, monophenol의 ortho hydroxylation과 catechols의 o-quinone으로의 산화의 두 가지 반응을 촉매한다[61,77].

멜라닌 生成 調節에 관한 硏究에 있어서, 1980년대까지의 硏究는 멜라닌 생합성 경로의 key enzyme인 tyrosinase에 영향을 주는 因子에 초점을 두는 Raper-Mason pathway를 통해 生合成되는 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.

멜라닌 생합성 과정에는 여러 효소들이 작용하며 멜라닌 색소에는 각각의 특성을 가진 여러 종류의 단일물질 및 강한 탄소결합들이 존재하기 때문에, 어느 한가지로 단정 지을 수는 없으며, 이에 대한 심도 있는 硏究가 필요하다.

버섯 tyrosinase의 沮害劑는 tyrosinase 활성부위 구리이온의 상태변화에 관여함으로써 tyrosinase의 산화, 환원과정을 조절할 수 있기 때문에, 버섯 tyrosinase를 이용한 시험관내 tyrosinase 활성억제실험은 皮膚美白劑의 개발에 있어서 유용한 일차 평가법으로 인정되고 있다.

生體에서 皮膚 色素沈着을 일으키는 가장 주요한 刺戟은 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[61,62,65]. 따라서 本 硏究에서는 沙蔘이 멜라닌 細胞에서 멜라닌 生成에 미치는 影響을 조사하기 위하여 B-16 흑색종 細胞를 이용하여 멜라닌 生合成의 최종산물인 멜라닌 量 및 tyrosinase 효소 활성을 측정하였고, 아울러 α-MSH와 沙蔘 물 추출물을 같이 처리했을 때와 沙蔘 단독으로 처리했을 때 濃度에 따른 細胞에 미치는 영향을 조사하였다.

먼저 沙蔘추출물이 B-16흑색종세포의 tyrosinase의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 沙蔘추출물을 0.5 mg/ml에서 부터 2 mg/ml농도까지 5일 동안 처리하고 tyrosinase 활성을 측정한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 沙蔘 0.5 mg/ml 처리군에서의

tyrosinase 활성은 대조군에 비하여 89%로 감소되었으며, 1 mg/ml 농도 처리군에서는 80%, 2 mg/ml 농도 처리군에서는 tyrosinase의 활성이 대조군에 비하여 70%로 감소하였고, 沙蔘추출물이 멜라닌 생합성 과정중 최종 단계의 산물로 나타나는 멜라닌 量에 미치는 影響을 조사하기 위해 10^3 cell당의 멜라닌 量을 측정한 結果, 沙蔘 0.5 mg/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 89%, 1 mg/ml처리군에서는 80%, 2 mg/ml처리군에서는 최종 멜라닌 생성량이 70%로 감소하였다. 以上의 結果 沙蔘추출물은 멜라닌 生成을 抑制하였고, 沙蔘의 濃度가 높아짐에 따라 멜라닌 生成도 減少하였다(Fig. 2).

또한 멜라닌 生成을 促進시키는 호르몬인 α-MSH(melanocyte stimulating hormone)에 대한 沙蔘추출물의 過色素 形成 抑制效果를 알아보기 위하여 α-MSH와 沙蔘추출물에 대한 tyrosinase 활성을 측정한 結果, Fig. 3에서 보는 바와 같이 10nM의 α-MSH 처리군의 경우 tyrosinase 활성은 대조군에 비하여 206%로 현저히 증가 되었고, α-MSH와 沙蔘추출물 동시에 처리한 沙蔘추출물 2 mg/ml처리군에서는 tyrosinase 활성이 대조군에 비하여 146%로 나타나 α-MSH에 의한 tyrosinase 활성 증가를 억제시켰다. 아울러 멜라닌 量을 측정한 結果, Fig. 4와 같이 10nM의 α-MSH처리군의 경우 멜라닌 양은 대조군에 비하여 1500%로 현저히 증가하였고, α-MSH와 沙蔘추출물 동시에 처리한 沙蔘추출물 2 mg/ml처리군에서는 최종산물인 멜라닌 量이 대조군에 비하여 약 1000%로 α-MSH 단일 처리군에 비하여 현저히 감소하였다.

그리고 沙蔘추출물의 멜라닌 生成 抑制效果가 沙蔘추출물 자체의 細胞 毒性에 의한 것인지 알아보기 위하여 沙蔘추출물의 B16 흑색종 細胞의 형태학적 변화를 관찰한 結果, Fig. 6에서 보는 바와 같이 沙蔘 2 mg/ml의 처리군의 경우 대조군과 거의 유사한 정상세포 소견을 나타냈으며, 10 nM의 α-MSH를 처리한 군에서는 대조군에 비하여 세포체가 커지고 수지상의 세포돌기 수가 증가하였음이 관찰되어 α-MSH에 의한 멜라닌세포의 분화가 촉진되었음을 알 수 있었다. 아울러 α-MSH와 沙蔘추출물 2 mg/ml를 동시에 처리한 군의 세포의 모양은 α-MSH만을 단독처리한 군의 형태와 유사하게 관찰되어 沙蔘추출물의 처리는 B16흑색종 細胞에 毒性을 나타내지 않았으며 細胞의 形態學的인 變化에도 影響을 미치지 않았다.

以上의 硏究結果를 綜合하면 沙蔘추출물은 B16 melanoma 細胞의 멜라닌 生成을 抑制하였으며, α-MSH와 cAMP에 의한 과색소생성 유도시에도 멜라닌 生成을 減少시켰고, tyrosinase 활성과 tyrosinase protein 발현을 抑制하여 멜라닌 形成을 抑制시켰음을 알 수 있었다. 따라서 沙蔘의 멜라닌 生成 抑制效果는 皮膚 副作用을 줄이는 化粧品의 美白物質로서 개발 가능성이 높으며, 더욱 정확한 作用機轉의 糾明과 應用法 等의 硏究가 필요할 것으로 思料된다.

결론

滋陰淸肺, 祛痰止咳, 益胃生津의 效能이 있는 沙蔘의 皮膚의 멜라닌 形成에 미치는 影響을 알아보기 위하여 B16 흑색종 細胞에서 멜라닌 생성과정에서 가장 중요한 효소인 tyrosinase 활성도와 최종산물인 멜라닌 量과 세포증식에 미치는 影響을 測定하였으며, 멜라닌 生成을 促進시키는 物質로 알려진 α-MSH(melanocyte stimulating hormone)를 처리하여 過色素 形成을 誘導하고 沙蔘의 抑制效果를 관찰한 結果 아래와 같은 結論을 얻었다.

1. 沙蔘추출물은 B16 흑색종세포의 tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 抑制하였다.

2. 沙蔘추출물은 B16 흑색종세포의 멜라닌 생성 또한 농도 의존적으로 抑制하였다.

3. α-MSH에 의한 過色素 生成時 沙蔘추출물은 tyrosinase 활성을 抑制하였다.

4. α-MSH에 의한 過色素 生成時 沙蔘추출물은 멜라닌 생성을 효과적으로 抑制하였다.

5. 沙蔘추출물은 2 mg/ml 농도에서도 B16 흑색종 세포에 毒性을 나타내지 않았다.

以上의 硏究結果를 綜合하면 沙蔘추출물은 B16 melanoma 細胞의 멜라닌 生成을 抑制하였으며, α-MSH와 cAMP에 의한 過色素 生成 誘導時에도 멜라닌생성을 減少시켰고, tyrosinase 활성과 tyrosinase protein 발현을 억제하여 멜라닌 形成을 抑制시켰음을 알 수 있었다. 따라서 沙蔘의 멜라닌 生成 抑制 效果는 皮膚 副作用을 줄이는 化粧品의 美白物質로서 개발 가능성이 높으며, 더욱 정확한 作用機轉의 규명과 應用法 等의 硏究가 필요할 것으로 思料된다.

참고문헌

1. 박경아 등 : 조직학, 서울, 고려의학, pp.405-411, 1999.
2. 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 cytoyoxicity. J. Photochemistry and Photobiology B. Biology 61: 106-113, 2001.
3. 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.
4. Kameyama, K.,Takamura, T., Hamada, Y., Sakai, C., Kondoh, S. and Nishiyama, S.: Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1(TRP 1), dopachrome tautomerase(TRP 2) and a melanogenic inhibitor. J. Invest. Dermatol, 100, 126
5. 강호석 외 : 조직학 제 2판, 서울, 고문사, pp.319, 327, 1994.
6. 대한피부과학회 : 피부과학, 서울, 여문각, pp.1-9, 409-412, 2001.
7. 은희철 외 : 피부면역학, 서울, 서울대학교출판부, pp.143, 1999.
8. 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.
9. 巢元方 : 巢氏諸病原候論, 서울, 大星文化社, p.200, 1992.
10. 顧世澄 : 瘍醫大全, 北京, 人民衛生出版社, pp.479, 481-482, 1987.
11. 龔廷賢 : 萬病回春, 서울, 醫聖堂, p.271, 1993.
12. 祁坤 : 外科大成, 臺北, 文光圖書有限公司, p.218, 1968.
13. 樓英 : 醫學綱目, 서울, 大星文化社, p.1081, 1989.
14. 武之望 : 濟陰綱目, 서울, 柳林文化社, p.484, 1990.
15. 薛瑜 : 編輯外科心法要訣, 臺灣, 大中國圖書公社, p.85, 1984.
16. 孫震元 譯 : 瘍科會粹, 北京, 人民衛生出版社, pp.364-365, 1987.
17. 沈金鰲 : 沈氏尊生書, 臺北, 自由出版社, p.530, 1979.
18. 吳謙 : 醫宗金鑒, 北京, 中國醫藥學出版社, pp.1680-1682, 1982.
19. 王肯堂 : 證治準繩, 北京, 人民衛生出版社, 卷1, p.824,1991.
20. 王壽 : 外臺秘要, 上海, 文光圖書有限公司, pp.870-880, 1968.
21. 李梴 : 編註醫學入門, 서울, 大星文化社, 雜病篇, p.29, 224. 1990.
22. 張璐 : 張氏醫通, 上海, 上海科學技術出版社, pp.442-443, 1995.
23. 浙江省中醫硏究所. 湖州中醫院. 校 : 醫方類聚,

北京, 人民衛生出版社, p.509 1979.
24. 程國彭 : 醫學心悟, 香강, 우련출판사, p.290, 1961.
25. 趙佶 : 聖濟總錄, 北京, 人民衛生出版社, p.1763, 1987.
26. 周命新 : 醫門寶鑑, 서울, 杏林書院, pp.186-187, 1975.
27. 朱震亨 : 丹溪醫集, 北京, 人民衛生出版社, p.24, 1993.
28. 陳昭遇 外 : 太平聖惠方, 北京, 人民衛生出版社, p.1208, 1986.
29. 陳實功 : 外科正宗, 上海, 上海科學技術出版社, p.290, 298, 1989.
30. 陳自明 : 婦人大全良方, 北京, 人民衛生出版社, p.12-13, 578-579, 1986.
31. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.211,212, 1981.
32. 국홍일 : 기미환자의 임상소견과 신체정신건강상태에 관한 연구, 대한피부과학회지, 17:1, 1979.
33. 楊思澍 外 : 中醫臨床大全, 中國, 北京科學技術出版社, pp.923-924, 1991.
34. 高云 外 : 中西醫結合治療女性黃竭斑 36例臨床觀察, 杏林中醫藥, 第6期, 1995.
35. 王愉 外 : 中藥祛斑倒模粉治療黃竭斑 110例 臨床觀察, 北京中醫 제3期, 1995.
36. 劉愛民 : 損容性皮膚病的診斷與治療, 中國, 中國中醫藥出版社, p.177, 1992.
37. 周洪範 : 白話中醫秘方全書, 臺灣, p.494, 1986.
38. 中醫研究院 : 中醫症狀鑑別診斷學, 中國, 人民衛生出版社, p.524, 1987.
39. 陳貴延 外 : 實用中西醫結合診斷治療學, 서울, 一中社, p.524, 1987.
40. 徐宜厚 外 : 皮膚病中醫診療學, 北京, 人民衛生出版社, pp.8-17, 1997.
41. 梁勇才 : 實用皮膚病診療全書, 北京, 學苑出版社, pp.17-24, 27-30, 1996.
42. 邊天羽 外 : 中西醫結合皮膚病學, 天津, 天津科學技術出版社, pp.46- 49, 1999.
43. 宋兆友 : 中醫皮膚科臨床手冊, 北京, 人民衛生出版社, pp.3-6, 1996.
44. 李林 : 實用中醫皮膚病學, 北京, 中醫古籍出版社, pp.1-17, 1998.
45. 신민교 : 임상본초학, 영림사, 서울, pp.270-271, 1992.
46. 최태섭 : 한국의 보약, 열린책들, 서울, pp.300- 301, 1990.
47. 이경순 외 : 中藥大辭典, 서울, 정담, pp.4927-4928, 1998.
48. 신동훈 외 : 沙蔘에 관한 문헌적 고찰, 대전대학교 한의학연구소 논문집, 8(2): 107-122, 2000.
49. 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.
50. Chakraborty AK, Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M.: Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. Pigment Cell Res. 11(4): 206-212, 1998.
51. 이상희 : 麻黃 및 麻黃膏의 미백효과에 관한 연구, 경희대학교 동서의학대학원, 2001.
52. 김성옥 : 瀉白散의 미백효과 검정에 관한 연구, 경희대학교 한의과대학, 1991.
53. 손동석 외 : 加減西施玉容散의 미백효과에 관한 연구, 대한안이비인후피부과학회지15(2):104-117, 2002.
54. 박지선외 : B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 대한 西施玉容散의 효과, 대한동의병리학회지, 14(1):160-170, 2000.
55. 전병훈 외 : 멜라닌 합성의 신호전달기전에 미치는 西施玉容散의 효과, 대한동의병리학회지, 15(1): 73-83, 2001.
56. 이관순 외 : 天花粉이 멜라닌 형성에 미치는 영향, 대한외관과학회지, 14(1): 209-225, 2001.
57. 윤화정 외 : 白芨이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향, 대한안이비인후피부과학회지, 16(1): 100-111, 2003.
58. Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J.A. and 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.

59. Hosoi, J., E., Suda, T., Kuroki, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1α,25-dehydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res, 45, 1474-1478, 1985.
60. Jk NO, DY Soung, YJ Kim, KH Shim, YS Jun, SH Rhee, T Yokizawa, HY Chung: Inhibition of tyrosinase by green tea components. Life Science. 65(21): 241-246, 1999.
61. Prota G.: Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. J. Invest. Dermatol. 75(122): 31-36, 1990.
62. SH Lee, JS Park, SY kim, JJ kim, SR Chung: Isolation of inhibitory components oa tyrosinase activity from the bark of Paeonia moutan. Yakhak Hoeji. 42(4): 353-358, 1998.
63. K. Wakamatsu and S. Ito: Advanced Chemical Methods in Melanin Determination. pigment cell Res 15, 174-183, 2002.
64. Pawelek , J.M. After dopachrome Pigment Cell Res. 4, 53-62, 1991.
65. 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.
66. 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.
67. Hadley, M. E.: Source synthesis, chemistry, secretion and metabolism in the melanotropic peptides. Vol 1,
68. Bloom W, Fawcett DW: A textbook of histology, 11th ed, W.B. Saunders Company, USA, pp. 543-558, 1986.
69. Korner A, Pawelek J: Mammalian tyrosinase catalases three reactions in the biosynthesis of melanin. Science. 217(4565): 1163-1165, 1982.
70. 박지선 외 : 백출추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향, 대한동의병리학회지, Vol. 13, No. 2, p. 91, 1999
71. J.A.A.Hunter, J.A.Satin, M.V.Dahl : Clinical Dermatology, London, Blackwell Science, pp.210-218, 1994.
72. 안성구 외 : 흔히 보는 피부질환, 서울, 고려의학, pp.131, 1993.
73. 국홍일 : 고운피부 젊은피부, 서울, 도서출판등지, pp.19-20, 130- 131, 1995.
74. 대한피부과학회 : 피부과학, 서울, 여문각, pp.2-7, 328-337, 1994.
75. 은희철 외 : 피부면역학, 서울, 서울대학교출판부, pp.143, 1999.
76. 취국주 : 피부미인, 서울, 동명사, pp.17-23, 1996.
77. 이충환, 고영희, 멜라닌 생합성 저해물질의 탐색, 신물질 탐색 연구동향(IV), 생물산업 9(2): 32-35, 1996.