

川芎 메탄올 추출액의 멜라닌 형성 억제 효과

박종훈 · 김양진 · 문연자¹ · 이영철 · 우원홍^{1*}

상지대학교 한의과대학, 1:원광대학교 한의학전문대학원

Inhibitory Effect of Methanolic Extract of *Cnidii Rhizoma* on the Melanogenesis

Jong Hun Park, Yang Jin Kim, Yeun Ja Mun¹, Young Cheol Lee, Won Hong Woo^{1*}

College of Oriental Medicine, Sangji University, 1:Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

Down-regulation of melanin synthesis is required for recovery of pigmentary disorders and it is known that direct inhibitors of tyrosinase suppress melanin synthesis. We screened several oriental medicinal plants using B16/F10 cells and found that the methanolic extract of *Cnidii Rhizoma* down-regulated melanin synthesis effectively. Although the proliferation of B16/F10 cells was decreased by the methanolic extract of *Cnidii Rhizoma*, it did not appear necrosis. B16/F10 cells incubated with the methanolic extract of *Cnidii Rhizoma* showed reduced pigmentation and tyrosinase activity. Western blotting revealed that the amount of tyrosinase was decreased by the methanolic extract of *Cnidii Rhizoma*. These results suggest that the inhibitory effect of the methanolic extract of *Cnidii Rhizoma* on melanogenesis is due to the suppression of tyrosinase in B16/F10 cells and *Cnidii Rhizoma* is a candidate for an efficient whitening agent.

Key words : *Cnidii Rhizoma*, melanogenesis, tyrosinase activity, melanin

서 론

川芎은 미나리과(繖形科 : Umbelliferae)에 속한 多年生 草本인 천궁 *Cnidium officinale* Makino의 根莖을 건조한 것으로¹⁾ 歸經은 肝·膽·心包經이다. 性味が 辛溫香竅하여 走하되 守하지 않아 위로는 頭巔에 行하고 아래로는 血海에 도달하며, 外로는 皮毛를 貫通하고, 옆으로는 四肢에 通行하므로 血中의 氣藥이 되어 活血行氣하고 祛風止痛한다¹⁾.

멜라닌은 表皮의 基底層 사이나 基底層의 아래, 털주머니 등에 존재하는 멜라닌 細胞(melanocyte)로부터 合成되며, 세포질 돌기를 통해 角質形成細胞로²⁾ 멜라닌의 合成은 細胞의 遺傳的 要因과, 代謝, 內分泌, 炎症, 感染, 腫瘍 등과 같은 物理的 및 化學的 要因들에 의해 크게 좌우되고³⁾, 이런 原因들로 인한 멜라닌 合成 이상이 기미, 주근깨 등의 過色素 沈着症을 發生시킨다^{4,7)}.

最近 美容에 대한 관심이 증가하면서, 멜라닌 合成의 부정적인 측면인 過色素 沈着을 제어하는 研究가 활발히 이루어

지고 있으며 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^{8,9)}. 이에 細胞 毒性이 적으면서 멜라닌 合成을 減少시키고 동시에 non-mutagenic한 美白劑를 찾기 위한 研究가 진행되고 있으며, 특히 天然物質에 대한 관심이 점차 증가되고 있다.

韓藥材의 멜라닌 生成조절에 대한 研究로는 沙蔘 메탄올 추출물의 멜라닌 生成 억제효과¹⁰⁾에 관한 연구와 甘草水抽出物이 HM3KO 細胞의 멜라닌 生成에 미치는 영향¹¹⁾ 등이 있었다. 이 등¹²⁾은 天花粉 抽出物이 α-MSH와 c-AMP에 의한 과색소생성 유도시 멜라닌 生成을 감소시켰다고 報告하였고, 윤 등¹³⁾은 白芨이 tyrosinase 활성과 tyrosinase protein 발현을 억제하여 멜라닌 合成을 억제시켰다고 報告하였으나, 活血行氣하고 祛風止痛시키는 川芎의 美白 效果에 대한 實驗報告는 없었다.

韓醫學에서는 人體를 소우주라 하는데, 皮膚 細胞 역시 이러한 소우주의 관점에서 파악한다. 즉, 皮膚를 구성하는 細胞 하나 하나가 각각 독립된 기관을 갖고 있으면서 옆의 細胞 및 內部 臟

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

E-mail : whwoo@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-6845

접수 : 2005/05/20 · 수정 : 2005/06/21 · 채택 : 2005/07/25

器의 相互有機的 체계를 갖고 있다. 皮毛는 즉, 皮膚와 汗腺·豪毛 등의 組織을 包括하며 體表에 해당한다. 《黃帝內經·素問》〈五臟生成篇〉¹⁴⁾에서 “肺之合 皮也 其榮 毛也 其主 心也” 하였으니, 肺는 皮膚에 上합하고 이는 心이 主관하게 된다. 또한 《黃帝內經·靈樞》〈本臟篇〉¹⁵⁾에서는 “衛氣者 所以溫分肉 充皮膚 肥腠理 可開闔者也”라 하여 皮膚는 衛氣의 作用에 의해 이루어지고 衛氣는 肺의 宣發作用에 의해 이루어진다. 하지만, 肺의 宣發作用은 肝의 疎泄作用을 통해 正常的으로 維持되어 氣機가 通暢되므로, 氣血이 調和롭게 되고 經絡도 通利하여 皮膚를 運轉하게 할 수 있는 것이다. 이 외에도 皮膚는 體內 여러 臟器와 연관되어 있기 때문에, 이러한 관점에서 皮膚의 氣血 循環을 고려해야 한다.

이에 著者는 川芎이 活血行氣하므로 皮膚에 효과를 나타낼 것이라 판단하여, 皮膚의 멜라닌 形成에 미치는 影響을 알아보고자 하였다. 우선 川芎 메탄을 추출액을 제조하여, B16/F10 細胞에서 tyrosinase 활성, tyrosinase 단백질 발현, 최종산물인 멜라닌 量 및 細胞증식에 미치는 影響을 측정하였다. 그리고 실험 결과의 細胞 독성 여부를 알아보기 위해 B16/F10 細胞의 증식과 형태 변화에 대해 조사하여 有意性있는 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 시료의 제조

本 實驗에 사용한 川芎은 國產 천공 규격품을 구입하여 사용하였다. 川芎 100g에 MeOH 1ℓ를 가하여 밀봉하여 6시간 동안 실온에서 냉침 시킨 후 거저로 여과하여 감압 농축 후 14.86g의 試料(수득률: 14.86%)를 얻어 냉장 보관하였으며, 試料는 분주하여 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma Chemical Co., USA)에 녹여 사용하였다.

2. B16/F10 細胞柱 배양

B16/F10 melanoma 細胞의 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 3일 주기로 배양액을 교체하여 주었다.

3. 細胞 증식 측정

細胞를 배양관(10 cm dish)에 well당 1x10⁵ cell씩 분주한 후 24시간 배양하여 배양용기에 부착하였다. 川芎 추출액을 각 농도 별로 처리하고 5일간 배양하였고, 배양 완료 후 각 well에 0.05% trypsin-0.02% ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA, Sigma Chemical Co., USA) 용액을 가하여 細胞를 분리수거하고, phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척 한 후 혈구 계산관(Fuchs-Rosenthal cytometer, Germany)을 이용하여 각 well당 細胞數를 측정하였다.

4. 광학현미경적 관찰

細胞의 형태학적 관찰은 배양 완료 후 위상차 도립현미경

(Phase contrast inverted microscope, Leica, Germany)을 이용하여 관찰하였다(×100).

5. 멜라닌 색소 침착의 육안적 관찰

細胞를 배양관(10 cm dish)에 well당 1x10⁵ cell씩 분주하고 24시간 배양하여 부착시킨 후 川芎 추출액 100μg/ml와 150μg/ml를 처리하여 3일 및 5일 동안 배양하였다. 배양이 완료된 세포는 trypsin/EDTA로 분리하여 세척하고, 각 군당 동일한 細胞數를 산정하여 수집한 후에 육안으로 세포 침전물의 색 변화를 관찰하였다.

6. 細胞內 멜라닌 정량

멜라닌 정량은 Hosei 등¹⁷⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양 細胞는 PBS로 2회 세척, 원심분리(13,000rpm, 20min)하여 수확하였다. 細胞 침전물에 1ml의 증류수를 넣어 현탁 후 초음파로 분쇄한 후, 원심분리하여 침전물을 수확하였다. Acid-insoluble material을 얻기 위해 10%의 DMSO가 첨가된 1N NaOH 100μl를 넣어 80℃에서 1시간 동안 처리하여 용해시켰다. 475nm에서 흡광도를 측정하였으며 멜라닌 정량은 합성멜라닌(Sigma Chemical Co., USA)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선으로부터 구하였다.

7. 細胞內 tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza M 등¹⁸⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 멜라닌 細胞를 수확하여 細胞 침전물을 만들고, 여기에 100μl 세포용해액(lysis buffer; 1% Triton X-100, 10mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride)을 넣고 4℃를 유지하면서 30분간 때때로 교반하면서 細胞를 파괴시킨 후 원심분리 하여 상층액을 취하여 tyrosinase 활성 측정용액으로 사용하였다. 50μl의 상층액에 100mM sodium phosphate(pH 7.0) 100μl를 넣고 30℃ 물중탕기에서 5분간 가온한 후 100mM catechol 50μl를 넣고 온도조절장치가 있는 분광광도계로 37℃, 405nm에서 흡광도의 변화를 1시간 관찰하였다.

8. Western blotting

B16/F10 세포에서 tyrosinase의 발현을 관찰하고자 川芎 메탄을 추출물과 대조물질인 DMSO를 5일 동안 처리하였다. PBS로 세척하고 4℃에서 30분동안 lysis buffer(phosphate buffer, pH 6.8, 100IU Aprotinin, 1% AEBSF)로 세포를 용해시킨 후 4℃, 13,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. Protein 양은 protein assay kit를 사용하여 정량하였고, bovine serum albumin (BSA)으로 표준곡선을 만들어 단백질 양을 계산하여 일정량의 단백질에 sample buffer(1.0 ml glycerol, 0.5 ml β-mercaptoethanol, 3.0 ml 10% SDS, 1.25 ml 1.0 M Tris-HCL, 1 to 2mg bromophenol blue)를 가하고 7.5% SDS polyacrylamide gel에서 P3, 100V, 400mA(Electrophoresis Power Supply)로 전기영동한 후에 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. Nitrocellulose membrane을 실온에서 2시간동안 blocking buffer(5% skim milk in TBST)에서 incubation시킨 후 anti-rabbit tyrosinase와

anti-rabbit HRP antibody를 사용하였으며 각각 실온에서 1시간 반응시킨 후 TBST에 3회 washing하고 Amersham ECL system 으로 확인하였다. Protein level 확인은 Chemi-doc image analyzer(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 대조군에 대한 ratio로 나타내었다.

9. 통계학적 분석

실험 결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 ANOVA test를 이용하여 검정하였으며, P값이 P < 0.05인 것만 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

실험성적

1. 川芎 추출액이 細胞 증식에 미치는 영향

川芎 추출액이 세포증식에 미치는 영향을 조사하였다. 세포 배양판에 B16/F10 細胞를 1×10^5 cells씩 분주하고 24시간 후 천궁 추출액을 100 μ g/ml와 150 μ g/ml의 농도로 처리하여 1일, 3일 그리고 5일에 細胞數를 측정하였다. 계측결과, 대조군은 시간이 지남에 따라 $2.0 \times 10^5 \pm 0.6$ cells, $23.1 \times 10^5 \pm 0.4$ cells, $176.3 \times 10^5 \pm 1.1$ cells로 증가하였다. 천궁 100 μ g/ml 처리군은 각각 $1.6 \times 10^5 \pm 0.3$ cells, $11.1 \times 10^5 \pm 0.2$ cells, $80.8 \times 10^5 \pm 0.7$ cells, 천궁 150 μ g/ml 처리군은 각각 $1.4 \times 10^5 \pm 0.4$ cells, $5.4 \times 10^5 \pm 0.2$ cells, $30.1 \times 10^5 \pm 0.4$ cells로 증가하였다(Fig. 1). 즉 이러한 결과는 100 μ g/ml 처리군에서는 대조군에 비하여 76.6, 48.2 그리고 45.8%의 감소를 보였으며, 150 μ g/ml 처리군에서는 68.9, 23.5 그리고 17.1%의 감소를 보인 것이다 川芎 추출액 처리에 의한 B16/F10 細胞의 형태학적 변화를 관찰한 결과, 100 μ g/ml 처리군의 경우 대조군과 거의 유사하였다. 천궁 150 μ g/ml 처리군에서 細胞 밀도는 대조군에 비해 감소하였으나 세포사멸과 같은 세포독성은 나타나지 않았다(Fig. 2). 이상의 결과 천궁 추출액은 B16/F10 細胞의 증식을 억제하였으나, 전체적으로 시간이 지남에 따라 지속적인 세포의 성장이 일어나고 있었으며, 세포사멸과 같은 독성은 나타나지 않았다.

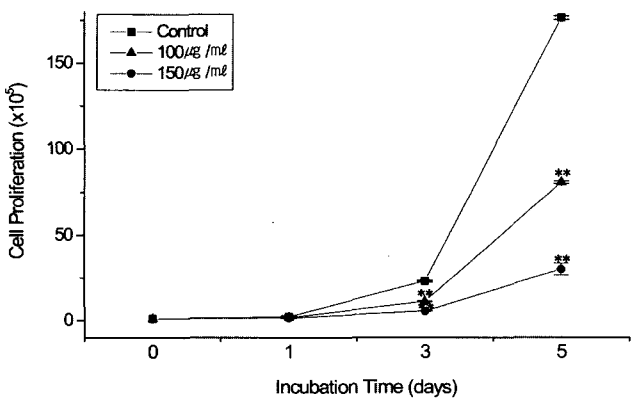


Fig. 1. The effect of the methanolic extract of *Cnidii Rhizoma* on the proliferation of B16/F10 cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well and were incubated in media contained 0, 100 and 150 μ g/ml of the methanolic extract of *Cnidii Rhizoma* for 5 days. The cell number was counted with a Fuchs-Rosenthal cytometer after 1 day, 3 days and 5 days respectively. Data are means \pm S.D. of three experiments performed in triplicate. Asterisks indicate a significant difference, being compared with control group, **P < 0.01.

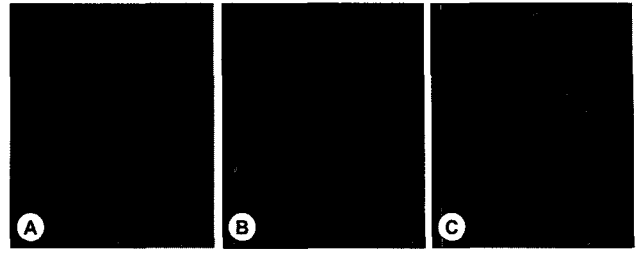


Fig. 2. The Light micrographs of B16/F10 cells observed for 5 days. A) Control, B) Methanolic extract of *Cnidii Rhizoma* 100 μ g/ml, C) Methanolic extract of *Cnidii Rhizoma* 150 μ g/ml ($\times 100$).

2. 川芎 추출액의 멜라닌 생성 억제 효과

1) 멜라닌 색소의 육안적 관찰

川芎 추출액의 멜라닌 생성 억제 효과를 육안적으로 관찰하였다. 川芎 추출액을 B16/F10 細胞에 처리하여 배양한 다음, 3일 배양군은 3×10^5 cells, 5일 배양군은 2×10^6 cells 씩 각 군당 동일하게 세포를 수집하고 수집된 세포 pellet의 멜라닌 색소를 대조군과 비교하였다. 멜라닌 색소는 川芎 추출액의 처리 시간과 농도에 비례하여 감소하였으며, 특히 5일째의 150 μ g/ml 처리군에서 대조군에 비하여 멜라닌 색소가 현저하게 억제되었다(Fig. 3).

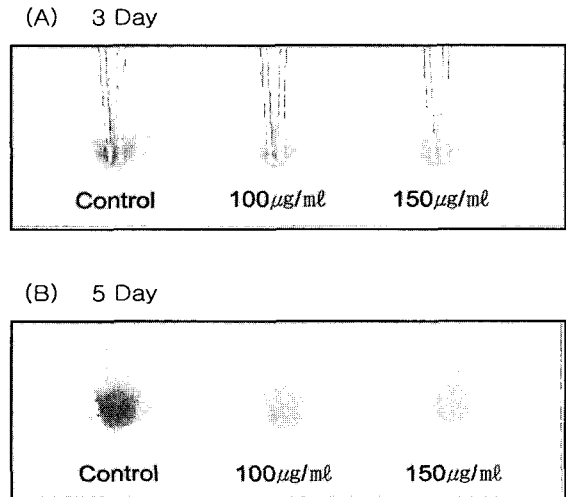


Fig. 3. The effect of the methanolic extract of *Cnidii Rhizoma* on the appearance of pellets. B16/F10 cells were seeded at 1×10^5 cells/well. The cells were treated with 0, 100 and 150 μ g/ml of the methanolic extract of *Cnidii Rhizoma* for 3 days (A) or 5 days (B). Cells were trypsinized, counted and pelleted by centrifugation. (A: 3×10^5 cell, B: 2×10^6 cell)

2) 멜라닌 색소 정량

川芎 추출액을 100 μ g/ml 및 150 μ g/ml의 농도로 처리하고 1일, 3일 그리고 5일 후 B16/F10 세포의 멜라닌을 측정하였다. 천궁 추출액 1일 처리군은 1×10^5 cells, 3일 처리군은 3×10^5 cells 그리고 5일 처리군은 2×10^6 cells를 수집하여 멜라닌 양을 측정하여 각 농도별로 비교하였다. 처리후 5일에는 100 μ g/ml 처리군에서 O.D. 값이 0.132 ± 0.03 으로 대조군의 0.306 ± 0.1 에 비하여 약 43%, 150 μ g/ml 처리군에서는 0.118 ± 0.01 로 약 39% 정도로 감소하였다. 이상의 결과 川芎 추출액은 멜라닌 생성을 억제하였고, 처리 시간과 농도가 증가함에 따라 멜라닌 생성 감소 효과도 증가하였다(Fig. 4).

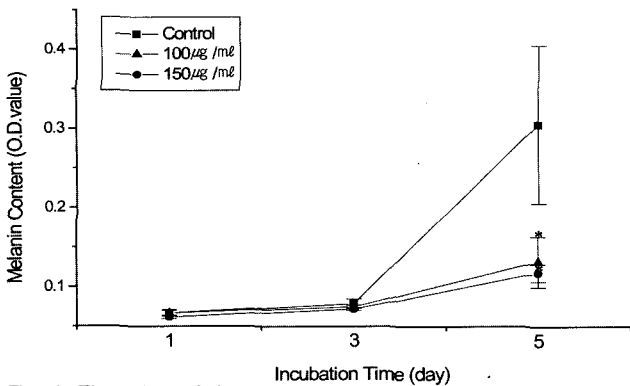


Fig. 4. The effect of the methanolic extract of *Cnidii Rhizoma* on melanin contents in B16/F10 cells. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of the methanolic extract of *Cnidii Rhizoma* and cultured for 1 day, 3 days and 5 days. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means \pm S.D. of three experiments performed in triplicate. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, * $P < 0.05$.

3. 川芎 추출액이 細胞內 tyrosinase 활성에 미치는 영향

Tyrosinase는 멜라닌 합성 과정 중 tyrosinase를 산화시켜 dopa로 전환시키는 tyrosinase hydrolase와 dopa를 산화시켜 dopachrome으로 전환시키는 dopa oxidase로 작용함으로써 멜라닌 합성하는데 중요한 역할을 하는 효소이다. 川芎 추출액이 B16/F10 細胞의 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 川芎 추출액을 10 µg/ml 에서부터 150 µg/ml 농도까지 3일 동안 처리하고 tyrosinase 활성을 측정 한 결과, 川芎 10 µg/ml 처리군에서의 tyrosinase 활성은 대조군에 비하여 $93 \pm 6.3\%$ 로 감소되었으며, 50 µg/ml 농도 처리군에서는 $85 \pm 4.0\%$, 100 µg/ml 농도 처리군에서는 $83 \pm 7.7\%$ 그리고 150 µg/ml 농도 처리군에서는 $72 \pm 2.3\%$ 로 감소하였다(Fig. 6).

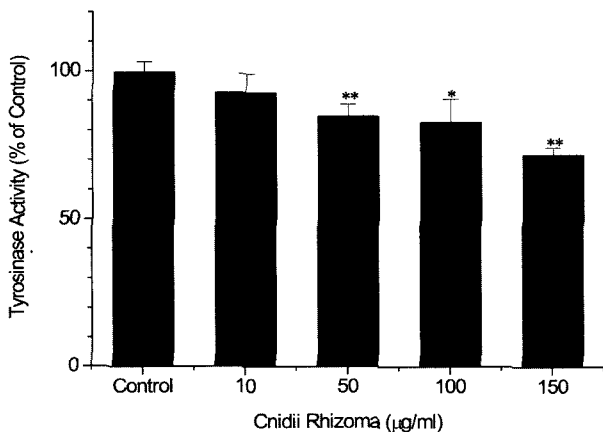


Fig. 5. The effect of the methanolic extract of *Cnidii Rhizoma* on tyrosinase activity. The effect on tyrosinase activity in B16/F10 cells was tested with the variety of doses of the methanolic extract of *Cnidii Rhizoma* for 3 days. Data are expressed as % of control and each column represents the mean \pm S.D. of at least three experiments performed in triplicate. Asterisks indicate a significant difference compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

4. 川芎 추출액이 tyrosinase 단백질 발현에 미치는 영향

川芎 추출액이 B16/F10 세포의 tyrosinase 효소 활성을 감소시켰으므로 tyrosinase protein 발현 또한 조절 할 가능성이 있다.

따라서 본 실험에서는 川芎 추출액이 B16/F10 세포의 tyrosinase protein 발현양상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 tyrosinase antibody를 이용한 western blotting 방법으로 tyrosinase protein level을 조사하였다. 川芎 추출액 100 µg/ml와 150 µg/ml를 처리하여 5일 동안 배양한 후 tyrosinase protein level을 조사한 결과 대조군에 비하여 현저히 감소하였다 (Fig. 6).

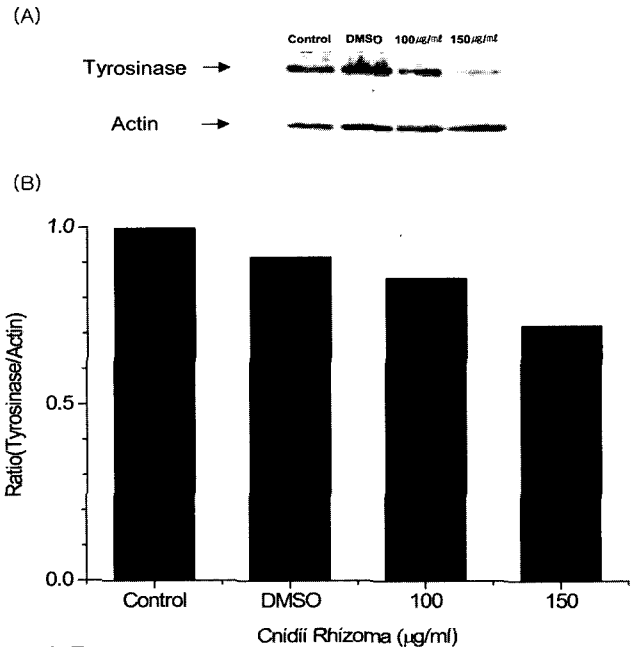


Fig. 6. Tyrosinase expression on B16/F10 cells after treatment with the methanolic extract of *Cnidii Rhizoma*. A: B16/F10 cells were treated with DMSO, 100 and 150 µg/ml for 5 days, and analyzed using Western blotting as described in materials and methods. Arrows indicate the representative bands and similar results were obtained in repeated experiments. B: Fold induction of tyrosinase protein expression quantified by densitometer.

고찰

皮膚의 색깔은 크게 세가지 要因에 의하여 決定되는 것으로, 멜라닌, 카로틴의 量 그리고 眞皮에 있는 血管의 數와 흐르는 血液의 색깔이 關係하게 된다. 특히 멜라닌은 表皮에서 특수하게 분화된 멜라닌 細胞에서 合成되고 멜라닌 細胞는 주로 基底層細胞 사이나 基底層細胞의 아래, 그리고 털주머니에서 관찰되는 細胞이다. 基底層 아래의 진피유두에는 神經終末과 毛細血管이 풍부하게 분포한다.

멜라닌 색소 形成에 대해 좀더 자세히 관찰해보면, 멜라닌은 멜라닌 細胞內的 멜라닌 소체(melanosome)에서 이루어진다. 그리고 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 된다²⁾. 과거에는 기미, 주근깨 등을 질환으로 생각하지 않았으나 最近, 생활 수준의 향상에 따라 美容에 대한 관심이 증가하면서 過色素 沈着으로 인한 皮膚疾患에 대한 認識이 높아지고 있다. 지금까지 天然物을 이용한 미백효과에 대한 연구 중에서, 단일 韓藥製劑에 대한 연구로는 麻黃¹⁹⁾, 辛夷²⁰⁾, 天花分^{12,21)}, 牡丹皮²²⁾, 大戟²³⁾, 續隨子²⁴⁾, 白芨¹³⁾, 蘇木^{25,26)}, 前胡²⁷⁾, 人蔘²¹⁾, 白朮²⁸⁾, 甘草¹¹⁾, 沙參¹⁰⁾ 그리고 山茱萸²⁹⁾ 등이 있다.

韓醫學에서는 기미, 주근깨 등의 過色素 沈着症에 해당하는 疾患이 《黃帝內經·素問》 <至真要大論>¹⁴⁾에 "歲陽明在泉, 燥淫所勝...面塵, 身無膏澤, 足外反熱"이라 하여 처음 기록된 이래, 巢³⁰⁾는 《諸病源候論·面皴黑證候》에서 風邪가 皮膚에 侵入하고 痰飲이 臟腑에 쌓이면 '烏麻' 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들에 의해 面黑, 黧黯, 雀斑, 黧黑斑 等の 異名으로 記錄되었다. 이러한 過色素 沈着症의 原因에 대해, 近來 文獻들은 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 等の 原因으로 자세히 分類하였다. 過色素 沈着症에 대하여 현재까지 연구된 단일 韓藥材를 韓醫學의 原因으로 분류해보면, 瘀血內停에는 蘇木이 속하고, 腎陰不足, 陰虛火旺 및 脾虛不運 등에는 人蔘, 白朮, 甘草, 沙參 및 山茱萸 등이 속한다. 그리고 濕熱內蘊, 日曬熱毒 및 火鬱孫絡 등에는 大戟, 續隨子, 天花粉, 牡丹皮 및 白芨 등이 속한다고 할 수 있으며, 風邪外搏에는 麻黃, 辛夷 및 前胡 등이 속한다고 볼 수 있으나, 肝鬱氣滯가 原因인 경우에 대한 韓藥材의 연구는 부족했던 것으로 파악된다. 肝은 血을 藏하므로 肝鬱氣滯에 작용하기 위해서는 歸經이 肝이거나 血을 運行시키는 효능이 있어야 한다. 현재까지 연구된 단일 韓藥製劑 중에서 歸經이 肝인 韓藥은 牡丹皮, 續隨子, 白芨, 蘇木, 前胡 그리고 山茱萸 등이다. 이 중에서 血을 運行시키는 효능을 가진 韓藥은 牡丹皮와 蘇木이다. 그러나 牡丹皮는 그 性이 微寒하여 清熱을 위주로 한다. 반면, 蘇木은 活血祛瘀하므로 肝鬱氣滯도 다스릴 수 있겠지만, 瘀血內停을 다스리는 것이 主가 되리라 思料된다.

현재 국내에서 유통되고 있는 川芎으로는 土川芎, 日川芎, 中國川芎 등의 山茱萸가 있다. 이 가운데 日川芎의 基原식물이 *Cnidium officinale* Makino이며, 中國川芎의 基原식물은 *Ligusticum chuanxiong* Hort.이고, 土川芎은 *Ligusticum chuanxiong* Hort.의 한 품종으로 알려져 있다²⁾. 이 중 국내에서는 土川芎을 上品으로 취급한다. 川芎의 歸經은 肝·膽·心包經이며, 效能은 性味가 辛溫香穢하여 走하되 守하지 않아 위로는 頭顛에 行하고 아래로는 血海에 도달한다. 또한, 外로는 皮毛를 貫通하고, 옆으로는 四肢에 通行하므로 血中の 氣藥이 되어 活血行氣하고 祛風止痛한다¹⁾. 《神農本草經》³¹⁾에 "味辛溫 主中風入腦, 頭痛, 寒痹 筋脈緩急 金創 婦人血閉無子 生川谷"이라 記載된 以來 肝鬱氣滯로 인한 胸脇脹痛과 氣血瘀阻로 인한 瘡瘍腫毒 및 風濕痺痛 등 證에 常用하여 疼痛을 치료하는 主藥이 된다. 疼痛의 발생은 대개가 氣滯와 血瘀 및 風寒濕邪의 凝滯로 인한이므로 不通則痛하게 되므로 川芎을 사용하여 活血, 行氣, 祛風케 함으로써 氣血이 凝滯한 病證에 良好한 치료효과가 있다¹⁾. 최근의 研究論文 중에는 백 등³²⁾이 虛血性 腦損傷의 환위에 川芎 메탄올 추출액을 복강주사하여 경색면적이 감소하였고 신경독성이 抑制되었으며 라디칼 및 산화물이 유의하게 소거되었다고 하였다. 이는 川芎의 活血行氣하는 效能으로 정제되어 있는 혈류의 개선효과를 발현한 것으로 思料된다. 皮膚의 過色素 沈着症은 멜라닌 細胞數 및 멜라닌색소 형성 효소의 활성화와 밀접한 관계를 가지고 있다³³⁾. 따라서 멜라닌 細胞數를 감소시키면서 멜라닌 색소

형성 효소의 활성화를 동시에 억제할 수 있다면 過色素 沈着症에 대한 효과적인 물질일 것이다.

川芎 추출액에 대한 B16/F10 細胞의 증식율을 관찰하기 위하여, 100 μ g/ml과 150 μ g/ml의 농도에서 5일동안 배양하여, 1일, 3일 그리고 5일에 B16/F10 細胞의 증식을 조사하였다. 그 결과, 대조군에 비하여 세포 증식율이 감소하였는데, 150 μ g/ml의 농도에서는 100 μ g/ml의 농도보다 더 큰 감소율을 보였다(Fig. 1). 川芎 추출액에 대한 B16/F10 세포의 증식율 감소가 川芎 추출액의 독성에 의한 것이 아니라는 것을 형태학적 관찰을 통해 확인하였다(Fig. 2). 이러한 결과를 통해, 川芎 추출액이 B16/F10 세포에 독성을 나타내지 않으면서, 처리 시간과 농도의 증가에 따라 B16/F10 細胞의 증식을 억제한다는 것을 알 수 있었다. 그러나 노화과정 중에서도 皮膚 細胞의 총 멜라닌 細胞數가 감소하게 되며, 불규칙적인 착색이 발생한다³⁴⁾. 따라서 세포의 증식이 억제되면서도, 노화가 진행되는 것이 아닌 건강한 세포가 유지되고 있다는 것을 확인하기 위해서는 더 많은 연구가 진행되어야 한다고 思料된다. 본 실험에서는 川芎 추출액의 증식 억제에 노화의 유발로 인한 것이 아니라는 假定下에서, 증식율의 억제와 함께 色素沈着이 감소하는 되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3A & B).

멜라닌 細胞에서 생성되는 멜라닌은 tyrosine으로부터 세가지 단계에 의해서 합성된다. 따라서 본 研究에서는 멜라닌 生合成의 최종산물인 멜라닌의 감소의 기전을 알아보기 위하여 우선적으로 tyrosinase 효소 활성을 측정하였으며, tyrosinase 효소 활성이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 또한, tyrosinase 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 western blot를 실시한 결과에서도 川芎 메탄올 추출물은 tyrosinase 단백질 발현을 감소시켰다. 그러나 좀더 명확한 기전을 밝히기 위해서는 이 부분에 관한 더 많은 연구가 필요하리라 思料된다.

以上の 研究結果를 綜合하면 川芎 추출액은 B16/F10 細胞의 증식율을 감소시켜 멜라닌 生成을 抑制하였고, 멜라닌색소 형성 효소인 tyrosinase 활성과 tyrosinase 단백질 발현을 抑制시켰음을 알 수 있었다. 따라서 川芎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 等の 研究가 필요할 것으로 思料된다.

결론

活血行氣하고 祛風止痛하는 效能이 있는 川芎이 皮膚의 멜라닌 形成에 미치는 影響을 알아보기 위하여 B16/F10 細胞에서 멜라닌 생성과정의 속도조절 효소인 tyrosinase 활성, tyrosinase 단백질 발현, 최종산물인 멜라닌 및 細胞 증식에 미치는 영향을 측정하여 아래와 같은 結論을 얻었다. 川芎 추출액을 100 μ g/ml 와 150 μ g/ml 농도로 1일, 3일 그리고 5일 동안 처리하였을 때 B16/F10 細胞의 증식을 억제하였으나 지속적인 성장이 일어나고 있으며 세포사멸은 관찰되지 않았다. 川芎 추출액은 B16/F10 細胞의 육안적 관찰과 멜라닌의 정량적 측정 결과 멜라닌 생성을 현저히 억제하였다. 川芎 추출액은 B16/F10 細胞의

tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 억제하였다. 川芎 추출액은 B16/F10 細胞의 tyrosinase 단백질 發顯을 감소시켰다. 以上の 研究結果를 綜合하면 川芎 추출액은 B16/F10 細胞 사멸이 아닌 tyrosinase 효소 활성 억제와 tyrosinase 단백질 發顯 감소 등을 통하여 멜라닌의 생성을 감소시킨 것임을 알 수 있었다. 따라서 川芎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 等の 研究가 필요할 것으로 思料된다.

참고문헌

1. 全國韓醫科大學 本草學教授 共編. 本草學, 서울, 永林社, p 450-451, 2004.
2. 박경아 외. 조직학, 서울, 고려의학, p 405-411, 1999.
3. 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, pp 106-113, 2001.
4. 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, pp 1553-1559, 1999.
5. Kameyama, K., Takamura, T., Hamada, Y., Sakai, C., Kondoh, S., 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, p 126, 1993.
6. 대한피부과학회 피부과학, 서울, 여문각, p 1-9, 409-412, 2001.
7. 은희철 외. 피부면역학, 서울, 서울대학교출판부, p 143, 1999.
8. Curto, E.V., Kwong, C., Hermersdorfer, H., Glatt, H., Santis, C., Virador, V., Hearing, V.J., Dooley, P. Inhibitors of mammalian melanocytes tyrosinase : In vitro Comparisons of alkyl Esters of Gentisic acid with other putative inhibitors, Biochemical Pharmacology, 57, pp 663-672. 1999.
9. Chakraborty, A.K., Funasaka, Y., Komoto, M., Ichihashi, M. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes, Pigment Cell Res., 11(4):206-212, 1998.
10. 임난영 외. 沙蔘 메탄올 추출물의 멜라닌 생성 억제효과, 동의생리병리학회지, 18(3):747-753, 2004.
11. 임숙정. 甘草水抽出물이 HM3KO 細胞의 멜라닌 생성에 미치는 영향, 동의생리병리학회지, 17(2):368-373, 2003.
12. 이관순 외. 天花粉이 멜라닌 형성에 미치는 영향, 대한외과과학회지, 14(1):209-225, 2001.
13. 윤화정 외. 白芨이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향, 대한안ibi인후피부과학회지, 16(1):100-111, 2003.
14. 田溶敏 編. 再編整理 黃帝內經 素問, 서울, 圖書出版 東源文化社, p 101, 619, 2002.
15. 田溶敏 編. 再編整理 黃帝內經 靈樞, 서울, 圖書出版 東源文化社, p 264, 2002.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival applicaton of proliferation and cytotoxic assay, J. Immun. Methods, pp 55,65, 1983.
17. Hosoi, J.E., Suda, T., Kuroki, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid, Cancer Res., 45, pp 1474-1478, 1985.
18. 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, pp 139-146, 1998.
19. 이상희. 麻黃 및 麻黃膏의 미백효과에 관한 연구, 경희대학교 동서의학대학원, 2001.
20. 허광화 외. 신이(辛夷)로부터 멜라닌 생성 억제물질의 분리, 생약학회지, 35(2):152-156, 2004.
21. Sook-Jung Im, et al.. Effect of Radix Ginseng and Radix Trichosanthis on Melanogenesis, Biol. Pharm. Bull., 26(6):849-853, 2003.
22. 이승호 외. 목단피로부터 멜라닌 생성 억제성분의 분리, 약학회지, 42(4):353-358, 1998.
23. 김정아 외. 대극과 식물로부터 분리한 천연폴리페놀의 멜라닌 생성 억제효과, 생약학회지, 35(2):157-163, 2004.
24. 김청택 외. 속수자의 멜라닌 생성 억제 물질, 생약학회지, 31(2):168-173, 2000.
25. 천현자 외. 소목의 부탄올 추출물에 의한 Melan-a 세포의 멜라닌생성 억제효과, 생약학회지, 33(2):130-136, 2002.
26. 천현자 외. 蘇木의 에틸아세테이트 추출물이 B16/F10 흑색종 세포의 멜라닌 합성에 미치는 효과, 동의생리병리학회지, 15(6):961-966, 2001.
27. 김청택 외. 전호의 멜라닌 생성 억제 물질, 생약학회지, 33(4):395-398, 2002.
28. 朴智善 外. 白朮抽出液이 멜라닌 生成에 미치는 影響, 대한동의병리학회지, 13(2):91-98, 1999.
29. 최원형, 천현자, 이정호, 백승화. 산수유 메탄올 추출물이 B16/F10 Melanoma 세포주의 멜라닌 생성에 미치는 영향, 생약학회지, 34(1):70-74, 2003.
30. 巢元方. 巢氏諸病原候論, 서울, 大星文化社, p 200, 1992.
31. 魏·吳普 著. 孫星衍·孫馮翼 輯. 神農本草經, 서울, 圖書出版 醫聖堂, p 70, 2003.
32. 백일성, 박치상, 박창국. 川芎의 虛血性 腦損傷 抑制作用 및 神經細胞 保護效果, 大韓本草學會誌, 18(4):37-46, 2003.

33. Ortonne, J.P., Nordlund, J.J. Mechanisms that cause abnormal skin color. In : Norlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A., Ortonne, J.P. *The Pigmentary System, Physiology and Pathophysiology*, New York, Oxford University Press, pp 489-502, 1998.
34. Megumi Tobiiishi, et al. .Pigmentation in Intrinsically Aged Skin of A1 Guinea Pigs, *Pigment Cell Res.*, 17, pp 651-658, 2004.