

원 저

補骨脂 추출물이 B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 미치는 영향

정재호, 서형식

상지대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

The Effects of *Psoraleae fructus* Extract on Melanin Synthesis of B16 Melanoma Cells

Jae-Ho Chung, Hyung-Sik Seo

Dept. of Ophthalmology, Otolaryngology & Dermatology, College of Oriental Medicine, Sangji University

Objectives : This study was carried out for the development of medicine for vitiligo treatment and focused on the effect of *Psoraleae fructus* extract on melanin synthesis of B16 melanoma cells.

Methods : Activity of tyrosinase playing a vital role in the synthesis and quantity of melanin, which is the final product in cultured B16 melanoma cells, the effects of *Psoraleae fructus* extract were measured.

Results : The results indicated that *Psoraleae fructus* extract increased both the amount of melanin and the activity of tyrosinase according to concentration, also supported by western blot analysis.

Conclusions : The results suggest that *Psoraleae fructus* extract has an advantageous effect on the promotion of melanin synthesis and will contribute to the development of vitiligo treatment through further related studies.

Key Words: *Psoraleae fructus*, melanogenesis, tyrosinase, vitiligo.

緒 論

백반증(vitiligo)은 멜라닌세포의 소실에 의해 다양한 크기 및 형태의 백색반들이 피부에 나타나는 후천성 탈색소 질환 중 가장 대표적 질환을 말하며, 인

구 중 1~3%의 유병율을 나타내는 피부에 발생하는 난치병 또는 불치병으로 알려져 있는 만성 피부질환이다^{1,2)}.

L-Tyrosine은 멜라닌 합성 초기단계의 필수 아미노산으로서 tyrosinase에 의해 L-Tyrosine이 산화반응을 거쳐 dihydroxyl-L-phenylalanine(L-DOPA)로 전환되고, 다시 L-DOPA는 dopaquinone으로 산화되며, 그런 후 dopachrome, indole-5,6-quinone 등의 여러 중간체를 거쳐 멜라닌이 합성된다³⁾. 따라서 tyrosinase는 멜라닌 생합성 과정에서 반응을 촉매하는 속도조절 효소로서 중요한 역할을 한다⁴⁾.

백반증은 한의학에서는 白癜風, 白駢風, 斑駢,

· 접수 : 2005년 3월 2일 · 논문심사 : 2005년 5월 3일
· 채택 : 2005년 6월 4일
· 교신저자 : 서형식, 상지대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실
(Tel : 019-470-2985, E-mail : aran99@sangji.ac.kr)

* 이 논문은 2003년도 상지대학교 교내 연구비 지원에 의한 것임.

白癜, 白蠟 등으로 불리워지고 있으며⁷⁹⁾ 內服, 外用을 통한 한의학적 치료가 이루어지고 있으나 아직 확실한 치료법이 개발되지 않은 상태이다.

백반증 또는 멜라닌 세포의 합성에 대한 최근의 연구경향으로는 지 등⁸⁰⁾, 이⁸¹⁾, 강 등⁸²⁾이 백반증에 대한 문헌적 고찰을 하였고, 멜라닌 합성과 관련된 연구로는 박 등¹¹⁾, 임 등¹²⁾, 박 등¹³⁾의 실험적 고찰이 있었다. 그러나 이상과 같은 연구들은 백반증에 대한 문헌적 고찰에 국한되거나 멜라닌 세포의 억제, 즉 미백효과에 관한 연구가 대부분으로, 백반증의 치료에 관한 한의학적 연구는 미진한 실정이다.

補骨脂를 외용하는 치료법은 기존의 본초서적¹⁴⁻¹⁹⁾이나 임상서적²⁰⁾에서 사용되었던 경우가 많았고, 임상적으로도 백반증 치료에 효과를 보였다.

이에 저자는 補骨脂 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 알아보기 위해 B16 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 형성과정에서 가장 중요한 효소인 tyrosinase 활성도와 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였으며 western blot을 통해 유의한 결과를 얻어기에 이에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材料

1) 시료조제

본 실험에 사용한 補骨脂는 상지대학교부속한방병원 약제과에서 구입하여 정선하여 사용하였다. 鹽水炒한 補骨脂 100g을 高粱酒(50% 酒精) 500 ml에 일주일 동안 침포한 후 여과하여 -70℃에서 건조시킨 후 다양한 농도로 PBS(phosphate buffered saline; Sigma Co. U.S.A.)에 희석시켜 실험에 사용하였다.

2) B16 melanoma 세포주 배양

B16 melanoma 세포주를 한국 세포주 은행에서 구입하여 RPMI-1640(Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD)에 5% FBS(fetal bovine serum; Hyclones Co.)와 Fungizone를 첨가하여 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다.

2. 方法

1) 세포독성 측정

補骨脂 高粱酒 추출물의 세포독성은 crystal violet을 이용하여 측정하였다. 세포생존율을 측정하기 위하여 24-well culture plate에 각 well 당 2×10⁵ cells를 넣어 배양한 후 補骨脂를 농도별로 처리하여 24시간 더 배양하였다. 24시간이 지난 후 세포배양액을 제거하고 PBS로 두 번 세척한 후 0.5% crystal violet(in 20% methanol)을 300 μl/well로 첨가하여 상온에서 5분간 방치한 다음 tap water로 재빨리 세척한 후 건조시켰다. 다음 lysis buffer(10 mM Tris · HCl, pH7.6, 150 mM NaCl, 1% SDS) 100 μl 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 570 nm(reference 450 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

2) Tyrosinase 활성도 측정

Tyrosinase 활성도 측정은 Martinez-Esparza 등²¹⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 두 번 세척한 후 원심분리하여 세포를 수확한 다음 100 μl의 Buffer(1% Triton X-100, 10 mM Sodium phosphate, 0.1mM PMSF)를 넣어 얼음에 방치하였다. 원심분리 후 상층액을 취하여 효소용액으로 사용하였다. 반응은 100mM Sodium phosphate(pH 7.0) 용액 100 μl에 효소용액 50 μl를 가하여 37℃에서 5분간 방치하였다. 여기에 100mM catechol 50 μl를 넣은 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

3) 멜라닌의 定量 측정

세포내 멜라닌 양 측정은 Hosoi 등²²⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 세척한 후 원심분리하여 세포를 수확한 다음 10% DMSO(dimethyl sulfoxide)가 첨가된 1N NaOH를 200 μl를 첨가하고 80℃에서 1시간 용해하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양 변화는 대조군을 100으로 하고 처리군의 상대적인 양을 백분율로 계산하였다.

4) Western bolt 분석

(1) 단백질 추출

단백질을 세포내에서 추출하기 위하여 1×10⁷의 세포 당 1% SDS 100 μl로 현탁시켜 얼음 위에서 한

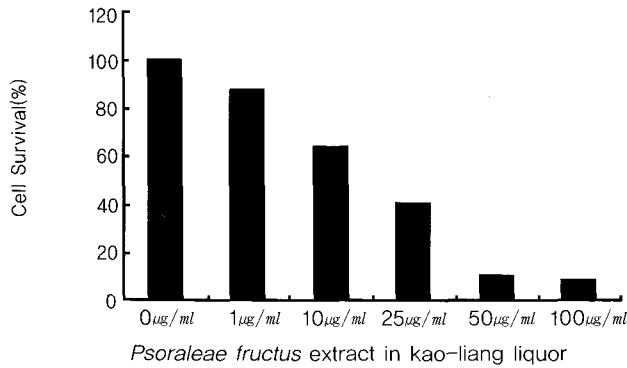


Fig. 1. The survival of B16 melanoma Cells treated with *Psoraleae fructus* extract in kao-liang liquor.

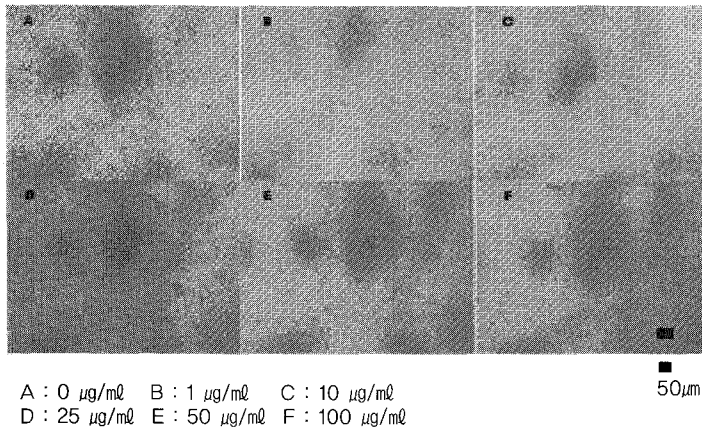


Fig. 2. The microscopic images of B16 melanoma cells.

시간 동안 방치하여 완전히 lysis시켜 단백질을 추출하였다. 그런 다음 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겨 다음 실험을 수행하였다.

(2) 단백질 농도 측정

단백질 정량은 BCA(bicinchoninic acid, Sigma, U.S.A.) 용액을 이용하여 BSA(bovine serum albumin, Sigma, U.S.A.)를 표준곡선으로 산출하여 측정하였다. 96-well plate에 BSA(1 µg/µl)를 농도별로 0, 1, 2, 4, 8, 16 µg/µl에 BCA 용액 100 µl를 첨가하여 20분간 37℃에서 방치한 다음 흡광도 540nm에서 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2 µl

와 BCA 용액 100 µl을 섞은 뒤 20분간 37℃에서 방치한 후 540nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

(3) 전기영동 및 Western blot

추출한 단백질 100 µg를 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 상온에서 5% milk를 함유한 PBS-Tween(0.01%)에서 1시간동안 hybridization 하였다. 이 membrane을 tyrosinase(Santa Cruz, U.S.A.) 항체를 사용하여 1시간동안 상온에서 shaking하면서 hybridization 시키고 난 후 PBS-Tween 20으로 세척하고, membrane을 horseradish peroxidase으로

conjugated된 antimouse IgG 또는 antirabbit IgG로 다시 1시간동안 상온에서 hybridization하였다. Membrane을 PBS-Tween으로 네번 세척한 후 chemiluminescence 시약(DuPont, NEM)으로 반응시킨 후 Fuji X-ray film으로 감광시켜 단백질을 가시화하였다.

5) 통계분석을 통한 유의성 검증

본 연구의 통계학적 분석은 SigmaStat(ver 2.1)을 이용하여 one way ANOVA test로 검증하였고, 각각의 수치는 평균±평균편차로 표시하였으며, 유의성은 $p<0.05$ 수준일 때를 기준으로 하였다.

結 果

1. 세포생존률에 미치는 영향

補骨脂 추출물이 B16 melanoma 세포의 생존률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 crystal violet을 이용하여 측정하였다.

補骨脂 추출물을 0에서 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리한 결과, 세포 생존률이 농도별로 점차 감소하여 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군에 비해 약 64.3%의 세포 생존률을 나타내었고($p<0.05$)(Fig.1), 이는 현미경 소견에서도 세포수가 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수가 있었다(Fig.2). 따라서 본 연구에서는 세포 생존률을 감안하여 10 $\mu\text{g/ml}$ 이하인 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 3

$\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 본 실험을 진행하였다.

2. 멜라닌 합성에 미치는 영향

생체에서의 멜라닌 합성과정은 tyrosine을 기질로 하여 dopa를 생성시키고, 다시 L-dopaquinone으로 산화시키는 연속적인 효소적 산화가 진행된 후 각 생성물의 중합반응에 의해 이루어진다. 補骨脂 추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였다.

補骨脂 高粱酒 추출물을 각각 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 다양한 농도로 처리한 결과 멜라닌 생성은 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$ 까지 점차 증가하여 3 $\mu\text{g/ml}$ 에서 118 \pm 14% 증가 양상을 보였고, 4 $\mu\text{g/ml}$ 에서 110 \pm 8% 그리고 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 105 \pm 16%로 4 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서는 감소하였으나 대조군보다는 유의성 있게 증가되었다($p<0.05$)(Fig. 3).

3. Tyrosinase 활성도에 미치는 영향

Tyrosinase는 멜라닌 합성과정에서 속도제한 효소이며 멜라닌합성의 주요한 조절적 단계를 나타내는 효소이다. 補骨脂 추출물이 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16 melanoma 세포에 補骨脂 추출물을 농도별로 처리한 후 tyrosinase 활성도를

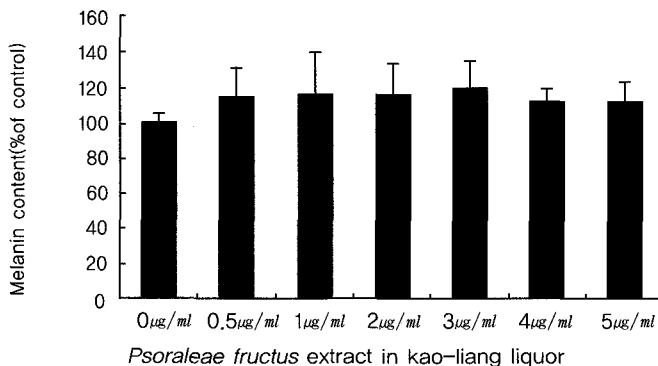


Fig. 3. The melanin content of B16 melanoma cells treated with *Psoraleae fructus* extract in kao-liang liquor.

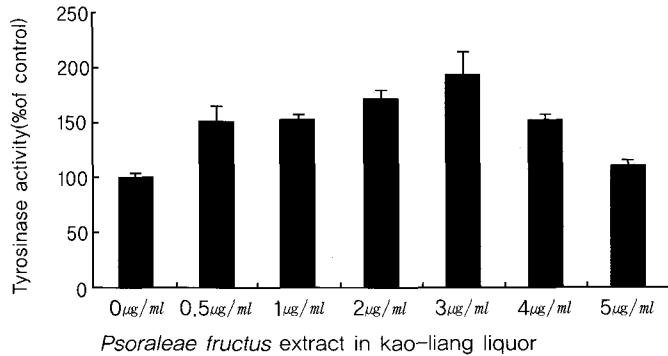


Fig. 4. The tyrosinase activity of B16 melanoma cells treated with *Psoraleae fructus* extract in kao-liang liquor.

측정하였다.

Tyrosinase 활성도도 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml까지 점차 증가하여 3 µg/ml에서 193 ± 22.2% 증가 양상을 보였고, 4 µg/ml에서 152 ± 6.5% 그리고 5 µg/ml에서 112 ± 4.9%로 4 µg/ml 이상에서는 감소하였으나 대조군보다는 유의성 있게 증가되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 4).

4. Western blot

여러 단백질의 혼합물로부터 어떤 특정 단백질을 찾아내기 위해 찾고자 하는 단백질에 대한 항체를 사용하여 항원-항체 반응을 일으킴으로써 특정 단백질의 존재여부를 밝혀내는 western blot을 실시한 결과 補骨脂 高粱酒 추출액을 0 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml로 처리하였을 때, 일반적으로 단백질의 양이 일정하지 확인하는 actin의 양은 변화가 없었으나 tyrosinase의 양은 증가하였다 (Fig. 5). 이는 補骨脂 高

粱酒 추출물이 B16 melanoma 세포의 tyrosinase의 활성도 결과와 일치한다.

考 察

멜라닌 세포의 이상으로 인한 질환으로는 전 세계적으로 발생빈도가 0.14~3.0%가 되는 백반증을 비롯하여 부분 백반증, 그리고 화상이나 상처 후의 탈색소반 등이 있다²³⁾. 백반증은 멜라닌세포가 파괴되어 피부색의 소실을 가져오는 탈색소성 질환으로 그 기전은 아직 정확하게 밝혀지지 않고 있다⁴⁾. 백반증은 비전염성 후천성 질환으로 생명단축과 신체의 기능에 악영향을 주지는 않으나 사회생활의 어려움과 정신적 스트레스, 특히 봄·여름 등 노출계절에는 일상생활에 많은 곤란을 겪어야 하는 피부 손상 및 환자가 겪는 정서적 갈등이 심한 병이다⁷⁾. 그동안 백반증의 발병기전에 관한 많은 연구가 있었

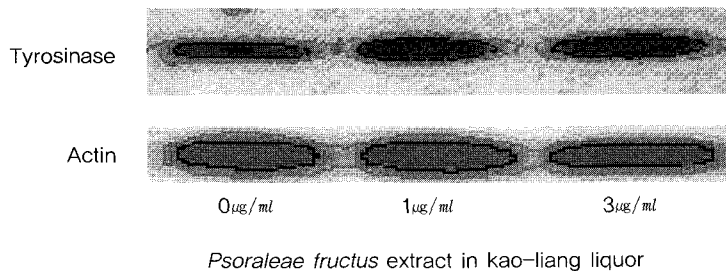


Fig. 5. Western blot analysis.

으며 치료에 대해서도 많은 연구가 있었지만 아직 정확한 발생기전이나 확실한 치료방법이 없는 실정이다.

멜라닌의 생성은 전구물질인 tyrosine에서 dopa로 산화되고 다시 dopaquinone으로 변화된 후, 전자 재배열을 통하여 indole이 되며 indole은 적어도 2개 이상의 효소에 의해서 산화되고 중합되어 멜라닌을 형성한다²⁴. 이 과정에서 tyrosinase는 각 단계에서 촉매작용을 한다고 알려져 있다. 이러한 과정이 정상적이지 못할 경우 멜라닌세포를 죽이고 백반증을 유발한다고 한다.

그 원인에 있어서 서양의학적으로는 신경체액설, 멜라닌세포 자가파괴설, 면역설, 유전 등의 4가지 설이 가장 유력하다^{12,7)}.

첫째, 신경체액설은 멜라닌 세포가 신경릉에서 기원하였고 신경절에 따른 분포를 보이며 신경손상이나 스트레스 후에 발병하는 경우가 있어 이를 뒷받침해 준다²⁾.

두 번째 자가파괴설은 티올, 페놀복합체, 카테콜 유도체, 메르카프타민과 여러 퀴논들이 tyrosinase의 작용을 억제하여 탈색소를 일으키게 된다. 백반증이 주로 생기는 부위가 정상적으로 색소침착이 심한 곳이며 멜라닌 형성과정 중에 생기는 페놀 복합체가 탈색반을 일으키므로 멜라닌 형성과정에서 생기는 중간물질이나 대사물질에 대한 자체 방어력이 떨어져서 백반증이 생긴다는 설명이다¹⁾.

세 번째로 면역설은 백반증 환자들이 부신세포질, 갑상선세포질, 갑상선 글로블린, 위벽세포, 췌장 소도세포 등에 대한 자가항체가 증가되어 있는 것으로 추정 가능하다¹⁾. 자가면역질환 환자들에게서 백반증이 나타나는 빈도는 10~15%로 보고 있어 일반인구의 백반증 발생빈도 약 1%보다 현저히 높다. 즉, 멜라닌 세포에 대한 자가항체가 존재하기 때문에 자가면역에 의해 유발된다는 설명이 있다⁹⁾.

네 번째로 유전설은 일반인 중에서의 백반증 발병율은 1~3%뿐인데 비해 연구된 자료에 의하면 백반증을 갖고 있는 가족 중에서 발병율은 20~30%인 것으로 설명된다^{4,25)}. 그러나 이 네 학설이 독립적으

로 작용하기 보다는 복합적으로 작용하여 백반증을 일으키는 것으로 설명되고 있다.

서양의학적 치료로는 아직 완전한 치료법이 개발되지 않은 상태로서 posralen을 이용한 자외선 요법과 스테로이드 치료, 외과적 치료, 기타 치료법 등이 있다¹⁴⁾.

첫째, 광화학요법은 광감작제인 psoralen계의 8-methoxypsoralen이나 trimethylpsoralen을 내복한 후 일광이나 장파자외선(UVA)을 조사한다(PUVA). 치료는 대개 일주일에 2-3회씩 시행하는데 광선조사 후에 약간의 홍반이 나타나는 광선량으로부터 시작하여 차차 증량하여 홍반을 유지시키는 범위내에서 적정량 조사한다. psoralen 치료 시 색소침착은 대개 수 주(15~25회)후에 시작되나 좋은 효과를 얻기 위해서는 100회 이상의 장기적인 치료가 시행되어야 한다¹⁶⁾. 색소침착은 대개 병소의 모낭 주위에서 시작하여 주위로 파급되기도 하고 병소의 주변부에서 시작하여 중앙부로 파급되어 들어오기도 한다⁹⁾. 그러나 광선치료는 시간과 경비가 많이 들고 피부암, 면역학적 이상, 색소침착, 소양증, 심한 수포 형성, 피부노화현상 등의 부작용이 있기 때문에 신중을 기해야 한다²⁶⁾.

두번째 스테로이드 치료의 경우 적은 부위가 침범된 경우는 국소도포나 트리암시놀론을 이용한 국소 주사로 치료할 수 있고 광범위한 부위에 확산된 경우 스테로이드를 전신 투여할 수 있는데 장기치료가 필요하므로 부작용을 염두에 두어야 한다^{13,9)}.

세번째 분절형이나 장기간 국소에 머물러 있는 국한형에서 외과적 치료가 시도되고 있다. 병변의 박피술, 중간층 피부이식, 흡입수포술 등을 이용한 피부이식술이 좋은 효과를 보인 경우도 있으나 이식 치료 후 재발, 켈로이드 생성, 새로운 백반증 생성 등의 부작용도 많은 것이 사실이다^{12,4)}.

이 밖에도 미용상 문제가 되는 부위를 covermark나 적당한 화장품 등의 사용으로 병변부위를 감추도록 하는 커버요법, 레이저 광선을 이용하여 멜라닌 세포내 활성을 촉진시키는 레이저요법 등이 시도되고 있다¹⁷⁾.

백반증은 한의학에서는 白癜風, 白駁風, 斑駁, 白癜, 白蠟 등으로 불리워지고 있다⁷⁹⁾. 본 질환은 隨代 巢元方の <諸病源候論>²⁸⁾에서, “白癜者面及頸項身體皮肉色變白與肉色不同亦不痒痛謂之曰癩此亦是風邪搏於皮膚血氣不和所生也”라 하여 최초로 언급되었다.

한의학적인 원인으로 外因은 風, 濕, 寒 등의 邪氣가 하나 혹은 두 가지 이상이 熱體의 피부나 肌腠에 침입하여 毛竅에 凝滯하여 氣血不行이나 氣血失和를 일으키고, 內因은 七情內傷, 過度勞倦, 驚恐, 肝腎陰虛, 心脾兩虛, 脾腎陽虛, 血虛, 肝熱 등이 氣血不和 氣機壅滯, 氣滯血瘀, 氣血生化無源 등의 병리과정을 일으켜 經脈과 피부를 濡養하지 못하여 經脈이 不暢되어 肌膚가 失養되고 壓力, 摩擦, 手術 등의 기계적 자극이 不內外因으로 작용하여 血瘀 經絡阻滯 등을 유발시킨다고 하였다⁷⁾.

한의학적인 치료에 있어서는 內服藥으로 蒼耳膏, 浮萍丸, 通竅活血湯의 빈도가 높았고 外用藥으로는 補骨脂酊, 密陀僧散, 玉粉膏가 많이 언급되었다. 또한 外用, 塗布로는 硫黃, 蛇蛻皮, 鰻鱺魚, 補骨脂 등이 자주 쓰인 약제였다⁷⁾.

백반증은 만성적이고 치료가 잘 되지 않음에도 불구하고 한의학과 서양의학적으로 질병의 원인, 치료방법이 아직까지 미흡한 실정에 있어 환자 뿐만 아니라 의료인들도 치료 및 예방에 많은 어려움을 겪고 있는 것이 사실이다⁷⁾.

그러나 현재의 한의학적인 연구경향을 살펴보면 백반증에 대한 연구로서는 문헌적 고찰 이외에는 별다른 연구가 진행되지 않았고 멜라닌 합성에 관한 연구는 박 등¹¹⁾이 B16 melanoma 세포주의 西施玉容散의 멜라닌 합성 억제에 관하여, 임 등¹²⁾은 甘草 추출액이 멜라닌화에 미치는 영향에 대하여, 박 등¹³⁾은 白朮추출액의 멜라닌 억제에 관하여, 천 등²⁹⁾이 蘇木의 에틸아세테이트 추출물이 멜라닌 합성 억제에 미치는 영향에 관하여, 윤 등³⁰⁾이 白芫이 멜라닌 합성 억제에 미치는 영향에 관하여, 오 등⁶⁾은 더덕 분획별 추출물이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향에 관하여, 한³¹⁾이 항염증성 천연추출물이 멜라닌 생

성에 미치는 영향에 관하여 연구하는 등의 결과가 있었으나 대부분의 연구가 멜라닌 생성 억제에 초점을 맞추어 미백효과를 증명하는 방향으로 치우쳐 있었다. 또한 임상적으로 김 등⁸⁾이 苦蔘胡麻散과 密陀僧散을 이용하여 유의한 효과를 얻었다는 보고가 있었으나 이제까지 백반증에 치료법과 치료성과에 관한 보고는 미비한 실정이다.

이러한 앞선 연구들 중 양 등³²⁾의 논문은 피부질환 치료제 및 미백제 개발의 일환으로 山茱萸가 멜라닌 생성에 영향을 주는지를 관찰하려던 원래 의도와 달리 山茱萸 물 추출물이 멜라닌 생성을 오히려 증가시켰다는 결과를 보여주고 있다.

補骨脂에 관한 한의학적인 연구로 공 등³³⁾은 補骨脂水鍼이 부신피질 기능부전에 미치는 영향을, 이³⁴⁾은 補骨脂 전탕액이 대식세포 및 림프구의 기능에 미치는 영향을, 권 등³⁵⁾은 補骨脂가 골다공증의 예방과 치료에 미치는 영향을 연구하였다. 그러나 외용약으로서 補骨脂가 피부질환, 특히 백반증에 미치는 효과에 대한 연구는 없었다. 이에 저자는 본원에서 백반증 환자를 대상으로 외용제로 사용하여 임상적인 효과를 보고 있는 補骨脂 추출액을 직접 멜라닌 세포와 접촉시키는 방법을 사용하여 외용제제의 효과를 증명하고자 하였다.

補骨脂는 豆科(Leguminosae)에 속한 補骨脂 *Psoralea corylifolia* L.의 성숙한 과실을 건조한 것으로, 異名으로는 破故紙, 破固脂, 破故子, 懷故子, 川故子, 胡菲子, 天豆, 破古芷 등으로 불리며 外用으로는 白癜風, 斑禿에 활용되고 있는 한약제이다¹⁴⁻¹⁹⁾.

補骨脂는 백반증에 外用으로 많이 사용되었고, 약리작용으로 melanin 색소 신생작용이 밝혀져 있고¹⁵⁻¹⁸⁾ 南北朝 시대 <雷公炮炙論>³⁶⁾에 최초로 收載된 이후 많은 본초서에 인용이 되었으며 효능은 <本草品匯精要>³⁷⁾에서는 “主五勞七傷風虛冷骨髓傷敗 腎冷精流及婦人血氣墮胎”라고 하였다.

補骨脂의 주요 성분을 살펴보면, coumarin양 화합물로는 psoralen, isopsoralen, angelicin, psoralidin, isopsoralidin, corylidin, 8-methoxypsoralen가 밝혀졌고, flavon류 화합물로는 bavachalcone, isobavachalcone,

corylifolinin, bavachin, coryfolin, bavachinin, isobavachinin, psoralenol 등이 밝혀졌으며, 이 외에 휘발유, 수지, 지방류, bakuchiol, stigmasterol, β -sitosterol-D-glucoside, triacontane, psoraldehyde, saponin 등이 있다^{38,39)}.

이 중에서 psoralen은 서양의학적으로 광화학요법(PUVA)에 사용되는 약물로서 B.C. 2000년경에 인도나 이집트에서 백반증 치료제로 사용된 기록이 있으며, 1948년 El-Mofty⁴⁰⁾가 백반증 치료에 사용하였고 1974년 Parrish 등이 광감작제인 psoralen을 복용한 후 UVA를 조사하는 광화학요법(PUVA)을 개발한 후 색소성 피부질환의 치료에 있어서 전 세계적으로 이용되어 왔다²⁵⁾.

補骨脂는 내복하였을 때는 腎陽을 補하고 성기능을 補하는 작용이 있지만, 外用할 경우에는 자외선 조사법과 동반하여 白駁風의 치료에 사용하는데, 이는 본 약재에 함유된 psoralen의 색소를 신생시키는 작용때문이라고 추정되고 있다⁴¹⁾.

補骨脂 추출물이 B16 melanoma 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 $0\mu\text{g/ml}$ 에서 $100\mu\text{g/ml}$ 까지 다양한 농도로 처리하여 Crystal violet를 이용하여 세포의 생존율을 조사한 결과 농도 의존적으로 세포 생존력이 감소하여 $10\mu\text{g/ml}$ 에서 대조군에 비해 약 64.3%의 생존력을 나타내어 본 실험에서는 $0.5\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$, $2\mu\text{g/ml}$, $3\mu\text{g/ml}$, $4\mu\text{g/ml}$, $5\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 실험을 진행하였다.

멜라닌의 정량을 조사해 본 결과 처리 양이 증가함에 따라 대조군에 비하여 실험군에서 모두 통계적으로 유의성 있는 증가를 보였으나, $4\mu\text{g/ml}$ 이상에서는 다소 감소하는 경향을 보였는데 이는 세포 생존률과 관계가 있을 것으로 사려된다.

멜라닌 합성에 필요한 tyrosinase는 rate-limiting step으로 잘 알려진 효소이고, 멜라노솜내에서 tyrosine을 산화시켜 dopa를 만드는 tyrosinase hydroxylase로, dopa를 산화시켜 dopachrome을 만드는 dopa oxidase로 작용하여 최종적으로 melanin polymer를 합성하는데 있어서 주요 효소로 작용한다⁴⁸⁾.

Tyrosinase 활성도에 미치는 補骨脂 추출물의 영향을 조사해 본 결과 처리 양이 증가함에 따라 대조군에 비하여 실험군에서 모두 통계적으로 유의성 있는 증가를 보였으나, $4\mu\text{g/ml}$ 이상에서는 다소 감소하는 경향을 보였는데 이 또한 멜라닌 정량 실험과 마찬가지로 세포생존률과 관계가 있을 것으로 사려된다.

멜라닌 생성의 조절은 두 가지 형태로 분류하는데 그 하나는 멜라닌 생성의 주요효소인 tyrosinase 효소 자체를 직접 조절하는 형태이고, 또 하나는 세포로부터 분리한 tyrosinase에 대하여는 직접적인 조절을 나타내지 않지만, 피부 색소 세포 내에 있어서의 멜라닌 생성을 조절하는 형태이다⁴⁸⁾. 이는 tyrosinase가 멜라닌 세포의 합성에 있어서 중요한 영향을 미치는 효소이지만, 이 외에도 많은 다른 요소들의 복합적인 작용으로 멜라닌 세포가 형성되기 때문이다. 따라서 두가지로 나누어 관찰한 결과 補骨脂 추출물의 처리농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성과 멜라닌 양이 모두 농도 의존적으로 유의성 있는 증가를 보였는데 이것은 멜라닌 합성에 있어서 중간 과정과 최종 결과가 모두 증가된 결과를 보인 것으로 판단할 수 있다. 또한 여러 단백질의 혼합물로부터 어떤 특정 단백질의 존재여부를 밝혀내는 western blot을 실시한 결과 단백질의 양이 일정한지 확인하는 actin의 양은 변화가 없었으나 tyrosinase의 양은 증가하여 tyrosinase의 활성도가 입증되었다.

이상의 연구 결과 補骨脂 高粱酒 추출물은 B16 melanoma 세포에서 tyrosinase 활성을 증가시키고 멜라닌 합성을 증가시킴으로서 멜라닌화를 촉진시키는 작용이 있는 것을 알 수 있었으며, 이는 실제 임상에서 백반을 포함한 저색소 질환의 치료에 활용될 수 있을 것으로 사려된다.

또한 서양의학적 광화학요법의 경우는 psoralen이 자외선의 효과를 돕는 보조적인 작용을 하는 것에 비하여 補骨脂 추출액의 경우는 자외선 조사가 없어도 멜라닌 합성의 증가를 나타내어 주었으므로 이는 부작용이 많은 광선요법의 대안이 될 수 있음을 시사하여 준다. 다만 실험 방법상에 있어서 자외

선 조사를 했을 경우에는 어떤 결과가 될지 계획하지 못했던 점이 아쉬움으로 남으며 이는 앞으로의 연구가 좀 더 필요하다고 보여진다. 또한 外用 시에 補骨脂가 psoralen이 아닌 한의학적으로 어떤 기전이 있는지 밝혀내지 못했던 것 역시 보완해야 할 점으로 생각되며, 앞으로 補骨脂의 멜라닌 합성과 백반증의 치료에 대한 더욱 정확한 작용기전과 응용방법 등의 개발 등 많은 연구가 필요하리라 사려된다.

結 論

補骨脂 추출물이 피부의 멜라닌 색소 형성에 어떠한 영향을 나타내는지 알아보기로 멜라닌 합성에 대한 영향을 판단할 수 있는 tyrosinase 활성과 최종 산물인 멜라닌의 정량측정을 시행한 연구에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 補骨脂 추출물은 농도 의존적으로 세포독성을 나타내어 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 약 64.3%의 세포 생존율을 나타내었다.

2. 補骨脂 추출물을 각각 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 결과 tyrosinase 활성도는 3 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 점차 증가하였고, 4 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서는 감소하였으나 대조군보다는 유의성 있는 증가를 보였다.

3. 補骨脂 추출물을 각각 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 멜라닌 생성을 살펴 본 결과 3 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 점차 증가하였고, 4 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서는 감소하였으나 대조군보다는 유의성 있는 증가를 보였다.

4. Western blot으로 tyrosinase protein level을 확인한 결과, 補骨脂 추출물 처리군에서 tyrosinase 활성 증가와 비슷한 경향으로 농도가 높아질수록 증가함을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 補骨脂 추출물이 B16 melanoma 세포에서 tyrosinase 활성을 증가시키고, 멜라닌 합성을 증가시킴으로써 멜라닌화를 촉진하는 작용이 있음이 확인되었다. 그러나 좀 더 심도있는 연구가 필요하며, 이를 통하여 補骨脂의 백반증 치료에 대한 좀 더 폭넓은 활용에 도움이 될 수 있을 것으로 사려된다.

참고문헌

1. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 피부과학. 개정4판. 서울: 여문각. 2001:3, 8, 404-7.
2. 강원형. 피부질환 아트라스. 서울: 한미의학. 2003:3, 4, 227-236.
3. 안성구, 이승헌, 박윤기. 흔히보는 피부질환. 서울: 고려의학. 1993:131-138.
4. 이유신. 임상피부과학. 서울: 여문각. 1987: 206-209.
5. 이무형, 김진환, 박재경, 허충림. 배양 정상 인체 멜라닌세포의 성장과 멜라닌화에 L-티로신의 영향. 대한피부과학회지. 1996:34(1):25-30.
6. 오한철, 홍철희, 이수형, 황충연, 김남권. 디덕분획별 추출액이 멜라닌 생성에 미치는 영향. 대한안이비인후피부과학회지. 2004:17(2): 59-71.
7. 이선동. 백반증 사용약물에 대한 문헌적 고찰. 대한한의학회지. 1995:16(2):44-61.
8. 김중호, 채병윤. 백전풍에 대한 임상적 연구. 대한한의학회지. 1987:8(2):90-95.
9. 지선영, 권영규, 신상기. 백반증의 동서의학적 고찰. 제한동의학술원 논문집. 1999:4(1):262-285.
10. 강경준, 안철. 백전풍, 백박풍의 치료에 대한 문헌적 고찰. 대한외과학회지. 1990:3(1): 109-126.
11. 박지선, 남우열, 문연자, 조광호, 전병훈, 우원홍. B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 대

- 한 서시옥용산의 효과. 대한동의병리학회지. 2000;14(1):160-170.
12. 임덕우, 이진우, 이무형. 감초추출액이 멜라닌 세포의 증식과 멜라닌화에 미치는 영향. 경희의학. 2000;16(2):143-150.
 13. 박지선, 김용수, 이진우, 박협우, 전병훈, 우원홍, 정우열. 백출추출액이 멜라닌 생성에 미치는 영향. 대한동의병리학회지. 1999;13(2):91-98.
 14. 전국한의과대학 본초학교실 共編著. 본초학. 서울 : 도서출판 영림사. 1995:559-560.
 15. 지형준, 이상인 編著. 대한약전의 한약(생약) 규격집 주해서. 서울 : 한국메디칼인텍스사. 1997:174.
 16. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 외. 완역 중약 대사전 4권. 서울 : 도서출판 정담. 1997:1779-1784.
 17. 과학·백과사전출판사 편. 약초의 성분과 이용. 서울 : 일월서각. 1994:336-338.
 18. 서부일, 최호영 共編著. 임상한방본초학. 서울 : 도서출판 영림사. 2004:819-822.
 19. 임종필. 본초생약학. 서울 : 도서출판 신일상사. 2003:366-368.
 20. 김갑성, 김명동, 김윤범, 김장현, 김중호, 이원철, 임양근, 정찬길. 실용 동서의학 임상총서 6권. 서울 : 정담. 2001:364-369.
 21. 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. 1998;255:139-146.
 22. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res. 1985;45:1474-1478.
 23. 이기호, 이무형, 박재경, 허충림. 인체 멜라닌 세포의 배양에 관한 연구. 대한피부과학회지. 1990;28(2):136-146.
 24. Pawelek J, Korner A, Bergstrom A, et al. New regulation of melanin biosynthesis and autodestruction of melanoma cells. Nature. 1980;286:617-619.
 25. Thomas P. Habif. Clinical Dermatology a color guide to Diagnosis and Therapy. St. Louis : The C.V. Mosby Company: 1985:395-398.
 26. 김연수, 서기범, 이증훈, 박장규. 백반증 환자의 PUVA 치료 반응에 관한 연구. 대한피부과학회지. 1999;37(12): pp. 1752-1759.
 27. 이선동. 백반증의 한방치료. 서울 : 도서출판 정담. 1996:121-123, 127-129.
 28. 巢元方. 諸病源候論. 台北 : 集文書局. 1965:302.
 29. 천현자, 김용수, 남항우, 윤성찬, 우원홍. 소목의 에틸아세테이트 추출물이 B16/F10 흑색종 세포의 멜라닌 합성에 미치는 효과. 동의생리병리학회지. 2001;15(6):961-966.
 30. 윤화정, 윤정원, 윤소원, 고우신, 우원홍. 백급이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향. 대한안이비인후피부과학회지. 2003;16(1):100-111.
 31. 한영숙. 항염증성천연추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향. 아주대학교. 2002.
 32. 양현옥, 최원형, 전병훈, 백승화, 천현자. 산수유 추출물이 B16/F10 melanoma 세포주의 멜라닌 생성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2002;16(4):818-822.
 33. 공복철, 고운채. 보골지 수침이 백서의 부신피질 기능부전에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1995;10(1):165-176.
 34. 이수형. 보골지전탕액의 투여가 대식세포 및 림프구의 기능에 미치는 영향. 원광대학교. 1995.
 35. 권혁태, 서부일, 김선희, 김미려. 보골지가 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1997;12(2):21-38.

36. 雷敷, 雷公炮炙論. 上海; 上海中醫學院出版社. 1986:71-72.
37. 劉文泰. 本草品匯精要. 北京: 人民衛生出版社. 1982:347-348.
38. 中國醫學科學院藥物研究所. 中藥志(第三冊). 北京: 人民衛生出版社. 1984:429-435.
39. 王浴生. 中藥藥理與應用. 北京: 人民衛生出版社. 1983:547-550.
40. El-Mofty, A.M.. Vitiligo and psoralen. oxford: Pergamon Press Ltd. 1963:143.