

## 백강잠의 멜라닌 생성 억제와 미백효과에 관한 연구

오한철 · 임규상 · 황충연 · 윤인환 · 김남권  
원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

### A Study on the Melanin Synthesis Inhibition and Whitening Effect of Bombysis Corpus

Han-Cheol Oh · Kyu-Sang Lim · Chung-Yeon Hwang · In-Hwan Youn · Nam-Kwen Kim

**Objective** : This study was performed to assess the whitening effect of Bombysis Corpus on melanin synthesis.

**Methods** : The whitening effects of Bombysis Corpus were examined by in vitro melanin production assay. We assessed inhibitory effects of Bombysis Corpus on melanin-release from B16F10, on melanin production in B16F10, on mushroom tyrosinase activity in vitro, on tyrosinase activity in B16F10, effect of Bombysis Corpus on the expression tyrosinase, TRP-1, PKA, ERK-1 ERK-2, AKT-1, MITF in B16F10.

- Results** : 1. Bombysis Corpus inhibited melanin-release, melanin production in B16F10.  
2. Bombysis Corpus inhibited tyrosinase activity in vitro and in B16F10.  
3. Bombysis Corpus suppressed the expression of tyrosinase, TRP-1 in B16F10.  
4. Bombysis Corpus suppressed the expression of PKA in B16F10.  
5. Bombysis Corpus suppressed the expression of ERK-1, ERK-2, AKT-1 in B16F10.  
6. Bombysis Corpus suppressed the expression of MITF in B16F10.

**Conclusion** : The study shows that Bombysis Corpus inhibited melanin production on the melanogenesis.

**Key word** : Bombysis Corpus, whitening, melanin, tyrosinase, TRP-1, PKA, ERK, AKT, MITF.

### 1. 緒 論

한의학에서는 색소침착증을 형태와 색조에 따라

간점(黥點), 면흑(面黑), 작란(雀卵), 반간증(斑點黧), 염자(鰕子), 작반(雀斑), 흑반(黑斑) 등으로 다양하게 표현되어 왔다<sup>1)</sup>. 피부의 과색소 침착증에 대해 《黃帝內經·素門》〈至真要大論〉<sup>2)</sup>에 “歲陽明在天, 燥淫所勝... 面鹿, 身無膏澤, 足外反熱” 이라 하여 처음 수록되었고, 송<sup>3)</sup>은 기미의 원인을 크게 2가지로 구별하였는데, 오장육부(五臟六腑)에

교신저자: 김남권, 경기도 군포시 산본동 1126-1,  
원광대학교 산본한방병원 한방안이비인후피부과  
(Tel : 031-390-2671, Email : drkim@wonkwang.ac.kr)  
• 접수 2007/10/22 • 수정 2007/11/22 • 채택 2007/12/03

담음(痰飲), 즉 비생리적인 수분·어혈·가래 등과 같은 불순물질이 생겨 혈액순환 장애를 주거나, 외부로부터 찬 바람이나 찬 기운 제 철이 아닌 바람 등 나쁜 풍사(風邪)를 자주 접하게 되어 기(氣)와 혈(血)이 순조롭지 못할 때 기미가 생기기 쉽다고 하였다.

백강잠(Batryticatus Bombycis)은 蠶蛾科(누에나방과 ; Bombycidae)에 속한 곤충인 누에의 유충이 백강균(Beauveria bassiana)에 감염되어 죽은 잠체(蠶體)이다. 성(性)은 평(平), 무독(無毒)하고, 미(味)는 함(鹹), 신(辛)하며, 식풍해경(熄風解瘴), 소산풍열(疏散風熱), 화담산결(化痰散結) 등의 효능이 있어 경풍추축(驚風抽搐), 구안와사(口眼喎斜), 인후종통(咽喉腫痛), 풍열두통(風熱頭痛), 피부소양(皮膚癢) 등의 병증을 치료한다고 하였다<sup>4)</sup>. 이에 대한 실험적 연구로는 혈당강하<sup>5)</sup>, 신장조직에서 항산화 효과에 의한 세포손상 방지<sup>6)</sup>, 뇌신경 보호효과<sup>7)</sup>, 진경 효과<sup>8)</sup>, 항암 효과<sup>9)</sup> 등이 보고 되었다. 또한 임상에서는 당뇨병<sup>10)</sup>, 갑상선기능항진증<sup>11,12)</sup>의 치료에도 활용되고 있다.

한약재를 이용한 미백 관련 연구로는 마황(麻黃) 및 마황고(麻黃高)의 미백효과에 관한 연구<sup>13)</sup>와 사백산(瀉白散)의 미백효과 검증에 관한 연구<sup>14)</sup>, 가감서시옥용산(加減西施玉容散)의 미백효과에 관한 연구<sup>15-17)</sup>, 천화분(天花粉)이 멜라닌 형성에 미치는 영향<sup>18)</sup>, 백급(白芨)이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향<sup>19)</sup> 등이 보고되었다.

백강잠의 미백효과에 대한 연구로는 김<sup>20)</sup>이 피부미용에 사용가능한 한방약재에 대한 연구에서 문헌고찰을 통하여 백강잠이 미백제로서의 사용가능성을 보고하였으며, 이<sup>21)</sup>는 미백화장품의 천연원료를 개발하기 위한 신약개발사업의 일환으로 백강잠 메탄올추출물을 이용하여 미백활성물질을 분리하고 구조를 파악하였으나, 미백에 작용하는 기전에 대한 자세한 연구는 없었다.

이에 저자는 백강잠 추출물을 분획한 다음 얻어

진  $CHCl_3$ 층을 이용하여 melanin 생성에 미치는 영향과 melanin 생성에 관련되는 tyrosinase의 활성 및 유전자 발현에 대하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 시료 추출 및 분획조제

백강잠 100g을 MeOH 로 2시간 환류추출한 다음 이를 감압농축하여 MeOH 추출물 7.3g 을 얻었다. MeOH 추출물을 증류수에 현탁한 다음  $CHCl_3$ 로 추출분획(이하 BC)하여 감압 농축한 다음 냉동건조 시켜  $CHCl_3$  가용 성분 1.8g 을 얻었다.

#### 2) 검액 조제

실험용 검액은 각각의 추출물을 DMSO (Dimethylsulfoxide)에 녹인 후 0.22  $\mu$ m pore size 를 가지는 여과지를 이용하여 멸균하고 사용 시까지 냉장 보관하였다. 배양된 세포에 사용하기 직전에 실험농도에 맞도록 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL Co. USA) 배지로 조정된 다음 사용하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) 세포주 및 세포배양

Melanocyte는 서울대학교 한국 세포주은행에서 분양한 B16F10를 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS와 penicillin/streptomycin 이 포함된 DMEM 배지를 사용하였으며 1일 1회 배지를 교환하였다. FBS는 잔존하는 보체성분을 불활성화시키기 위해 실온에서 녹인 후 heat inactivation (56°C water bath에서 30분간 가열)하여 사용하였으며 배지는 0.2  $\mu$ m membrane

filter로 여과 후 사용하였다. Cell에 각 조건 별로 96well plate에는 well 당 100  $\mu$ l, 24 well plate에는 well 당 500  $\mu$ l로 medium을 넣어주었다. 세포를 회수할 때는 trypsin-EDTA 1 ml을 가하여 37°C에서 1분간 반응시킴으로써 부착된 세포를 분리하고 배지 4ml을 넣고 원심분리 (1,000 rpm, 3분)를 하여 세척한 후 실험에 사용하거나 필요시 액체질소에서 냉동 보관하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 를 사용한 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

## 2) Cell Proliferation 측정

세포를  $2 \times 10^4$  cells/ml의 농도로 6 well plate에 넣고 6시간 배양하여 plate에 부착한 다음, 분획하여 조제한 검액을 농도별로 첨가하여 1, 2, 3일간 배양하였다. 배양완료 후 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리한 다음, PBS로 희석하여 Hemacytometer(Fuchs-Rosenthal, Germany)로 B16F10 세포수를 계측하였다.

## 3) Mushroom tyrosinase 활성에 미치는 영향 측정

Tyrosinase 활성에 미치는 영향은 Mason and Peterson 등의 방법을 사용하였다. 즉, 0.1 M phosphate buffer (PH 6.8) 150  $\mu$ l, 3 mM L-tyrosine 수용액 20  $\mu$ l, 검액 20  $\mu$ l을 차례대로 가한 다음, 2500 U/ml mushroom tyrosinase 10  $\mu$ l를 가하여 반응을 시작하였다. 반응은 37°C에서 30분간 incubation 시켰으며 매 10분 격으로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 활성은 아래에 표시한 식으로 구하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성도 (\%)} = \frac{(B-B')}{(A-A')} \times 100$$

A: 대조군 반응 액의 흡광도

A': 대조군의 tyrosinase 대신 buffer 가한 반응액의 흡광도

B: 검액이 첨가된 반응 액의 흡광도

B': B 반응액 중 tyrosinase 대신 buffer 가한 반응액의 흡광도

## 4) Cell의 tyrosinase 활성도 측정

B16F10 cell의 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza<sup>22)</sup> 등의 방법을 사용하였다. 배양된 세포를 trypsin-EDTA를 처리하여 수확한 다음 11000 rpm에서 30초간 원심분리하고 100  $\mu$ l 세포 용해용 buffer (10 mM sodium phosphate containing 1% Triton X-100 and 0.1 mM PMSF)를 첨가한 다음 얼음 상에서 30분간 흔들면서 세포를 용해시켰다. 다시 원심분리하고 얻어진 세포용액을 사용하여 tyrosinase 활성을 측정하였다.

## 5) Melanin 생성량 측정

Melanin은 Hosei<sup>23)</sup> 등의 방법을 사용하였다. 3일간 배양된 B16F10 세포 배지에서 배양을 이용하여 melanin을 측정하였다. 세포내 melanin 생성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 3일간 배양된 세포를 PBS로 2회 씻고 1,500 rpm 으로 5분간 원심분리하였다. 10% DMSO가 함유된 1N NaOH 300  $\mu$ l를 넣고 80°C에서 1시간 동안 처리하여 용해시켰다. 세포내에서 생성되는 Melanin 량을 정량하기 위하여 475 nm에서 흡광도를 측정하고 합성 melanin을 표준품으로 사용하여 결정하였다. 또한, Washing buffer로 3번 다시 씻어 내고 Enzyme Conjugate 100  $\mu$ l를 가한 다음, 22°C에서 45분간 incubation 시켰다. 다시 3번 씻어낸 다음 기질용액 100  $\mu$ l를 가하고 22°C에서 30분간 incubation 시킨 다음 stop solution 50  $\mu$ l를 가하고 450 nm에서 optical density를 구했다.

## 6) 유전자 발현에 대한 영향

### ① 총 RNA 분리

배양하고 있는 B16F10 세포에 1 ml Trizol reagent (Invitrogen, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA에 100  $\mu$ l phenol과 100  $\mu$ l chloroform : isoamylalcohol (24:1)을 넣

고 잘 섞은 후 원심 분리하는 과정을 2번 반복함으로써 상층액을 분리한다. 0.5 ml isopropyl alcohol을 이용하여 RNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하고 자연 건조시킨다. RNAase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase-free DNase를 첨가하고 -70°C에서 저장하였다.

## ② cDNA 제조

대조군 및 시험군에서 각각 분리한 total RNA 액(13 µg RNA 함유)에 oligo dT 1 µl을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 70°C에서 5분간 incubation하였다. primer가 annealing 하도록 실온에서 약 10분간 방치한 다음, cyscript buffer, 0.1M DTT, dUTP nucleotide, dUTP Cydye-labelled nucleotide, Cyscript reverse transcriptase을 첨가한 후, 아주 조심스럽게 혼합하였다. 이 후, 42°C에서 90분간 incubation 한 후, 얼음 상에 방치하였다. 여기에 2.5M NaOH을 가한 후 37°C에서 15분간 incubation하였으며, 2 M HEPES buffer를 추가하여 중화시켰다.

## ③ Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

oligo (dT)12-18 (Promega, USA), reaction buffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, pH 8.3), 1 mM dNTP (Biotools, Spain)과 200 unit M-MLV-RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega)를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR은 total volume 15 µl에 10× PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 pmole의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA와 1.25 unit의 Taq polymerase (Biotools, Spain)을 넣어 PCR을 시행하였다. Tyrosinase의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT이었으며, antisense는 TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC 을 사용하였다. TRP-1의 sense primer는 GCT GCA

GGA GCC TTC TTT CTC, antisense는 AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT 을 사용하였으며, TRP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT, antisense는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC 이었다. PKA의 sense primer는 TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT, antisense는 TATA GGC TGG TCA GCG AAG AA 을 사용하였으며, ERK-1의 sense primer는 ATC AGA TCC TGA GAG GGC TA, antisense는 CAG AGC TTT GGA GTC AGC AT을 사용하였다. ERK-2의 sense primer는 CAT TGT TCA GGA CCT CAT GG, antisense는 AGA GCA TCT CAG CCA GAA TG이었으며, AKT-1의 sense primer는 CCG CTA CTA TGC CAT GAA GA, antisense는 AGC CCG AAG TCC GTT ATC TT을 사용하였다. 또한, MITF의 sense primer는 TAG ACA TGC CAG CCA AGT CC, antisense는 CGC TGT GAG CTC CCT TTT TA이었다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA이었으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. PCR 조건은 94°C 4분, 30 cycles의 [94°C (30초), 59°C (30초), 72°C (45초)], 72°C 10분이 었다 (Perkin Elmer, USA). 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동한다. 전기영동 결과 나온 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1(Media Cybernetics, USA)을 이용하여 구했다.

## ④ Real time RT-PCR

우선 시험관에 정량한 RNA 5 µg, 50 µg/µl 의 random hexamer 3 µl, 10 mM dNTP 1 µl를 넣고 DEPC H<sub>2</sub>O를 가하여 10 µl의 RNA/primer mixture를 만들었다. 실험용 sample을 65°C에서 5 분간 incubation 시킨 후 1분 이상 얼음에 방치하였다. Reaction mixture으로 10배의 RT buffer 2 µl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4 µl, 0.1 M DTT 2 µl,

RNAaseOUT 1  $\mu$ 을 섞어 준비하였다. Tyrosinase의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT이었으며, antisense는 TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC 을 사용하였다. TRP-1의 sense primer는 GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC, antisense는 AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT 을 사용하였으며, PKA의 sense primer는 TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT, antisense는 TATA GGC TGG TCA GCG AAG AA 을 사용하였으며, ERK-1의 sense primer는 ATC AGA TCC TGA GAG GGC TA, antisense는 CAG AGC TTT GGA GTC AGC AT을 사용하였다. ERK-2의 sense primer는 CAT TGT TCA GGA CCT CAT GG, antisense는 AGA GCA TCT CAG CCA GAA TG이었으며, AKT-1의 sense primer는 CCG CTA CTA TGC CAT GAA GA, antisense는 AGC CCG AAG TCC GTT ATC TT을 사용하였다. 또한, MITF의 sense primer는 TAG ACA TGC CAG CCA AGT CC, antisense는 CGC TGT GAG CTC CCT TTT TA이었다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA이었으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. Reaction mixture를 RNA/primer mixture에 가하여 섞고 실온에 2분간 방치한 후, SuperScript II RT 1  $\mu$ (50 units)를 가하고 25°C에 10분간 incubation 시켰다. 다시 42°C에서 50분간 incubation 시킨 다음, 70°C에서 15분간 가열하여 inactivate 시키고 ice 상에서 식혔다. RNase 1  $\mu$ 를 가하고 다시 37°C에서 20분간 incubation 시킨 다음, 사용 시까지 -20°C에 보관하였다. 각각의 optical tube에 2배의 SYBR Green Mix 12.5  $\mu$ , cDNA 0.2  $\mu$ , 5 pmol/ $\mu$  primer pair mix 1  $\mu$ , 11.3  $\mu$  H<sub>2</sub>O를 넣고, 50°C 2분 1cycle, 95°C 10 min 1cycle, 95°C 15sec, 60°C 30sec, 72°C

30sec 40cycles, 72°C 10 min 1cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5  $\mu$ 를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정했다. SDS 7000 software를 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다.

### 3. 현미경 관찰

Microscope(Leica DM IRM, Leica Germany)를 이용하여  $\times 100$ 에서 대조군과 실험군의 형태학적 변화를 관찰하였다.

### 4. 통계학적 분석

각 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하였다.  $p < 0.05$  인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

## III. 실험 결과

### 1. BC가 Melanocyte의 Melanin 유리에 미치는 영향

본 연구에서는 백강잠 메탄올 추출물을 CHCl<sub>3</sub>로 분획 추출하여 제조한 추출물을 이용하여 Melanin 억제효과를 관찰하였다. Melanin 생성세포로는 마우스에서 얻은 흑색종의 일종인 B16F10 melanoma를 이용하였다. 세포 독성이 없는 농도인 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml BC를 72시간 처리한 다음 세포 배양액에 유출되는 melanin을 측정하였으며, 약 24시간 후부터 melanin의 생성을 현미경 관찰할 수 있었다.  $\alpha$ -MSH는 UV와 같은 외부 스트레스를 받으면 피부 각질세포로부터 유리되며 Melanocyte에 존재하는 수용체에 결합하여 기능을 나타내는 growth hormone의 일종이다. Melanoma는  $\alpha$ -MSH (10 nM)처리한 경우 정상군에 비해 melanin 생성이

현저하게 증가하였다. BC를 72시간 처리한 후 측정된 melanin 생성량은 정상 대조군 및  $\alpha$ -MSH 처리군에서 유의성있게 억제하였다 (Fig. 1).

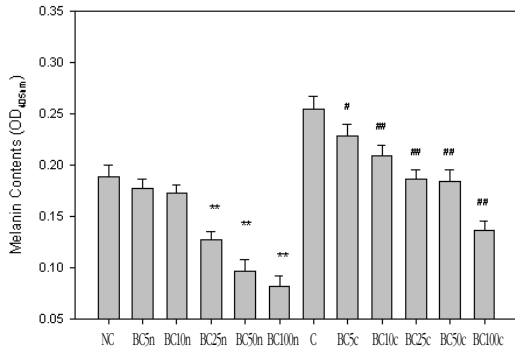


Fig. 1. Inhibitory effects of Bombyx Corpus(BC) on melanin-release from B16F10. Melanin were determined in the culture medium after 72 hrs incubation, (\*\* p<0,01 vs NC , # p< 0,05 vs C , ## p<0,01 vs C )

None Control(NC): Vehicle

BC5n: Vehicle + 5  $\mu$ g/ml of BC

BC10n: Vehicle + 10  $\mu$ g/ml of BC

BC25n: Vehicle + 25  $\mu$ g/ml of BC

BC50n: Vehicle + 50  $\mu$ g/ml of BC

BC100n: Vehicle + 100  $\mu$ g/ml of BC

Control(C):  $\alpha$ -MSH (10nM)

BC5c:  $\alpha$ -MSH (10nM) + 5  $\mu$ g/ml of BC

BC10c:  $\alpha$ -MSH (10nM) + 10  $\mu$ g/ml of BC

BC25c:  $\alpha$ -MSH (10nM) + 25  $\mu$ g/ml of BC

BC50c:  $\alpha$ -MSH (10nM) + 50  $\mu$ g/ml of BC

BC100c:  $\alpha$ -MSH (10nM) + 100  $\mu$ g/ml of BC

## 2. BC가 Melanocyte의 Melanin 생성에 미치는 영향

세포내의 melanin 생합성을 억제하는지 여부를 측정하기 위하여 BC를 가하여 3일간 배양한 다음, 배양된 B16F10을 PBS로 씻은 후 원심분리하여 얻은 세포를 파괴하였다. 세포를 파괴하고 다시 원심분리한 다음 얻어진 세포내 용액으로부터 melanin을 정량하였다. 실험 결과, BC는 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml의 농도에서는 거의 영향을 주지 못했으며, 25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 경우  $\alpha$ -MSH를 처리한 군과 처리하지 않은 군에서 공통적으로 유의성있게 억제하였다 (Fig. 2).

Fig. 2. Inhibitory effects of Bombyx Corpus(BC) on melanin production in B16F10. Melanin were determined in the cell after 72hrs incubation, (\*p<0,05 vs NC , \*\*p<0,01 vs NC , ##p<0,01 vs C )

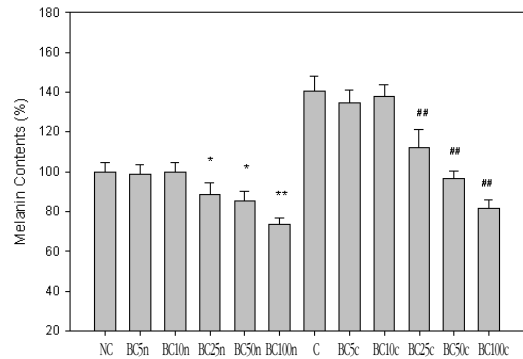


Fig. 2. Inhibitory effects of Bombyx Corpus(BC) on melanin production in B16F10. Melanin were determined in the cell after 72hrs incubation, (\*p<0,05 vs NC , \*\*p<0,01 vs NC , ##p<0,01 vs C )

## 3. BC가 Mushroom Tyrosinase 활성에 미치는 영향

Melanin 합성은 melanosome 내에 존재하는 tyrosinase의 작용을 통해 이루어진다. 이 tyrosinase는 L-tyrosine을 산화시켜 L-DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase로 작용하며 또한, DOPA를 산화시켜 DOPAquinone을 만드는 DOPA oxidase로 작용하여 melanin을 합성하는 중요한 효소로 알려져 있다. 따라서, melanin 생성을 억제하는 피부 미백제 개발에는 tyrosinase의 활성을 억제하는 것이 필수적이다. 따라서, BC가 melanin 합성을 억제하는 것을 확인하고, tyrosinase 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 mushroom의 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정하였다. BC를 25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml의 농도로 가한 다음 측정된 결과, 100  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml의 농

도에서 tyrosinase 활성도를 유의성있게 억제하였다 (Fig. 3).

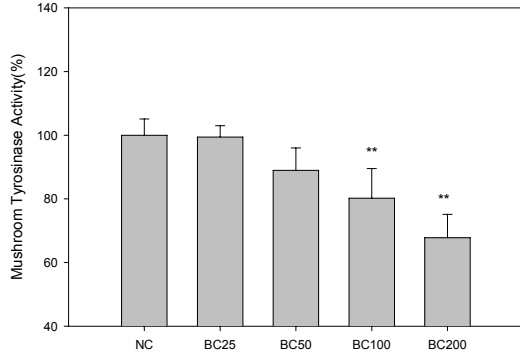


Fig. 3. Inhibitory effects of Bombysis Corpus(BC) on mushroom tyrosinase activity in vitro. (\*\*: p<0,01 vs C)

#### 4. BC가 Melanocyte의 Tyrosinase 활성에 미치는 영향

Melanocyte에서의 melanin의 합성은 세포내에 존재하는 tyrosinase가 L-tyrosine을 산화시켜 L-DOPA를 만드는 과정과 DOPA를 산화시켜 DOPAquinone을 만드는 과정을 활성화시켜 시작된다. 이러한 과정은 세포 외적 인자인 UV,  $\alpha$ -MSH, TGFbeta와 각종 cytokine에 의해 조절된다. 따라서, 약물이 실제로 세포 상태의 tyrosinase 활성을 저해할 수 있는지를 평가하는 것은 중요한 일이 될 것이다. 배양되는 B16F10에 BC를 처리한 다음 3일간 배양하고 PBS로 씻어낸 다음, 세포를 파괴하고 다시 원심분리하여 얻어진 세포내 용액으로부터 tyrosinase를 정량하였다. BC를 25  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 후 3일간 배양한 다음, 얻은 세포액을 이용하여 tyrosinase 활성을 측정하였다. 실험 결과, BC는 50  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 경우 대조군에 비해 유의한 효소활성 억제를 보였다 (Fig. 4).

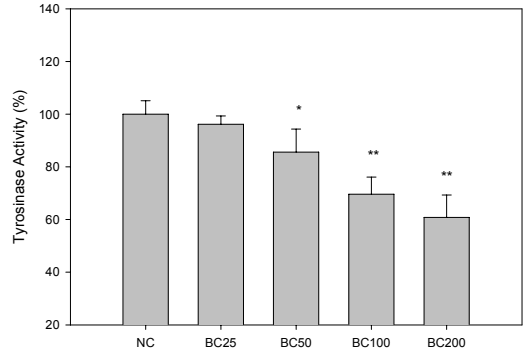


Fig. 4. Inhibitory effects of Bombysis Corpus(BC) on tyrosinase activity in B16F10 cells. (\*: p<0,05 vs C, \*\*: p<0,01 vs C)

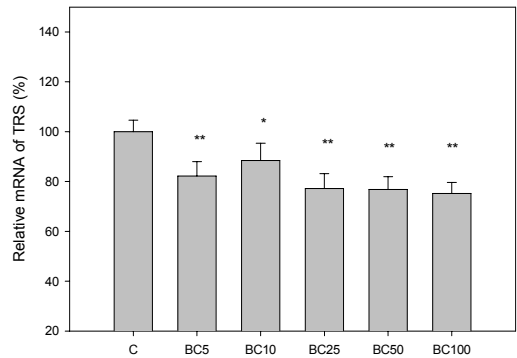
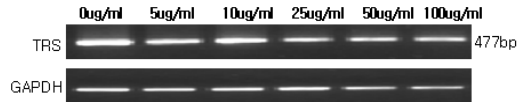


Fig. 5. Effects of Bombysis Corpus(BC) on the expression of tyrosinase(TRS) in B16F10 cells. (\*: p<0,05 vs C, \*\*: p<0,01 vs C)

#### 5. BC가 Tyrosinase 발현에 미치는 영향

Tyrosinase는 melanin을 생성하는 효소계로서 tyrosine hydroxylase, DOPA oxidase의 활성을 나타내며, L-tyrosine이 DOPA를 거쳐 DOPAquinone, melanin을 생성시킨다. Melanocyte 세포내 유전자 발현이 증가하면 melanin 합성이 증가하게 된다.

따라서, tyrosinase 발현을 억제하면 melanin 합성을 억제할 수 있다. 본 연구에서는 BC가 melanin 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 Tyrosinase의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. 실험 결과 BC는 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 BC를 처리하지 않은 대조군에 비해 유의성있게 억제하였다 (Fig. 5).

### 6. BC가 TRP-1 발현에 미치는 영향

TRP-1은 tyrosinase related protein으로 알려져 있는 단백질로서 TRP-2에 의해 생성된 DHICA (5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid)를 oxidation 시켜 IQCA(indole-2-carboxylic acid)를 생성하는데, IQCA는 흑갈색을 나타낸다. 따라서, TRP-1 발현을 억제하면 미백효과를 기대할 수 있다. 실험 결과, BC는 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 BC를 처리하지 않은 대조군에 비해 유의성있게 억제하였다 (Fig. 6).

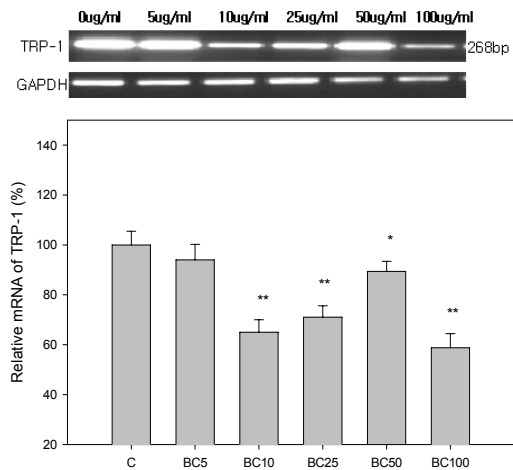


Fig. 6. Effects of Bombysis Corpus(BC) on the expression of TRP-1 in B16F10 cells. (\*:  $p < 0.05$  vs C, \*\*:  $p < 0.01$  vs C)

### 7. BC가 PKA 발현에 미치는 영향

Melanocyte가 활성화되어 melanogenesis가 진행될 때, adenylate cyclase의 활성이 증가하며 cAMP 농도가 증가한다. PKA는 cAMP 의존적 protein kinase로서 각종 효소의 활성을 조절하고, 세포 증식에 관여하는 것으로 알려져 있다. PKA의 활성 증가는 tyrosinase의 인산화와 활성 증가를 유발한다. 따라서, PKA 발현을 억제하는 경우 tyrosinase의 활성화를 방지를 통하여 melanin 생성을 억제하게 된다<sup>24)</sup>. 실험 결과, BC는 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 억제 효과를 나타내었다 (Fig. 7).

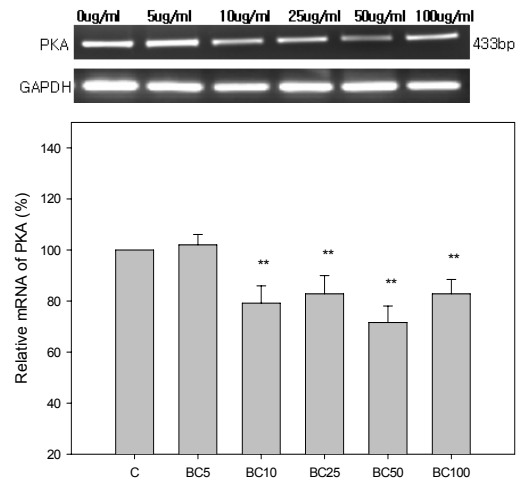


Fig. 7. Effects of Bombysis Corpus(BC) on the expression of PKA in B16F10 cells. (\*\*:  $p < 0.01$  vs C)

### 8. BC가 ERK-1 발현에 미치는 영향

ERK(extracellular regulated kinase)는 세포내 신호전달단백질로 유전자 발현을 조절하는 인자로 알려져 있으며, ERK의 발현이 억제되면 melanin 색소 생성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서, ERK-1의 발현이 증가하면 색소 생성이 억제될 수 있다<sup>24)</sup>. 본 연구에서는 BC가 유전자 발현을



조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 ERK-1의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, BC는 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 ERK-1 발현을 억제하였으나, 25  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 영향을 주지 못했다 (Fig. 8).

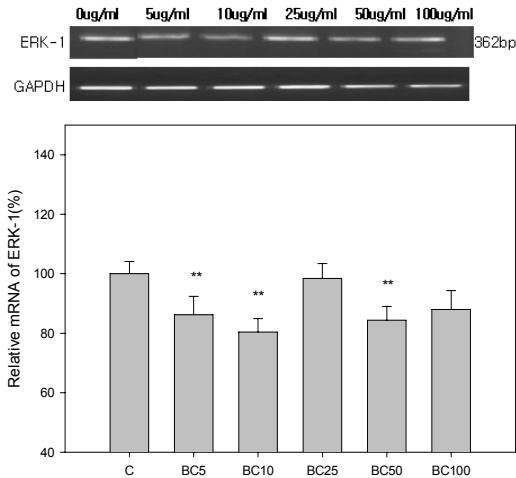


Fig. 8. Effects of Bombysis Corpus(BC) on the expression of ERK-1 in B16F10 cells. (\*\*:  $p < 0.01$  vs C)

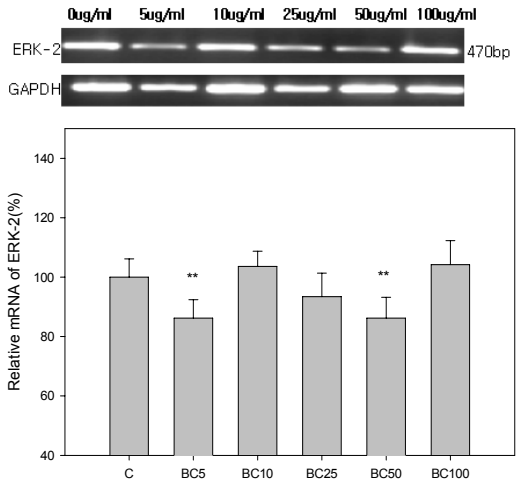


Fig. 9. Effects of Bombysis Corpus(BC) on the expression of ERK-2 in B16F10 cells. (\*\*:  $p < 0.01$  vs C)

### 9. BC가 ERK-2 발현에 미치는 영향

ERK(extracellular regulated kinase)는 세포내 신호전달단백질로 유전자 발현을 조절하는 인자로 알려져 있으며, ERK의 발현이 억제되면 melanin 색소 생성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서, ERK-2의 발현이 증가하면 색소 생성이 억제될 수 있다<sup>24)</sup>. 실험 결과, BC는 5  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 억제효과를 보였으나, 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 별다른 영향을 나타내지 못했다 (Fig. 9).

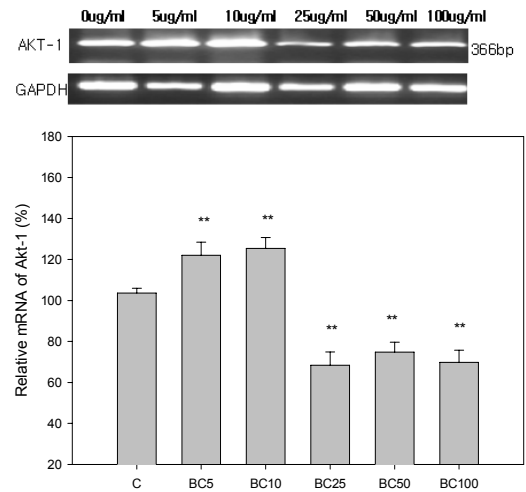


Fig. 10. Effects of Bombysis Corpus(BC) on the expression of AKT-1 in B16F10 cells. (\*\*:  $p < 0.01$  vs C)

### 10. BC가 AKT-1 발현에 미치는 영향

세포내 신호전달단백질의 일종인 AKT는 ERK, CREB, RSK-1등과 함께 세포 기능을 조절하는 신호전달 단백질로 유전자 발현을 조절하는 인자로 알려져 있다. AKT의 발현이 증가하면 MITF (microphthalmia transcription factor)의 발현이 억제되어 tyrosinase 발현을 억제한다<sup>24)</sup>. Tyrosinase의 발현억제는 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다. 따라서, AKT-1의 발현이 증가하면 색소 생성

이 억제될 수 있다. 실험 결과, BC는 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 증가시켰으며 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 억제효과를 나타내었다 (Fig. 10).

### 11. BC가 MITF 발현에 미치는 영향

MITF는 microphthalmia transcription factor로서 tyrosinase 발현을 조절한다. MITF의 억제는 tyrosinase의 발현억제를 통하여 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다. 따라서, MITF의 발현이 억제되면 색소 생성이 억제될 수 있다<sup>24</sup>. 실험결과, BC는 5  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 억제효과를 나타내었다 (Fig. 11).

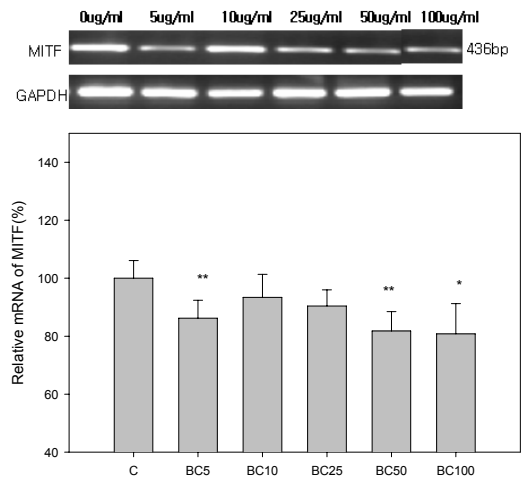
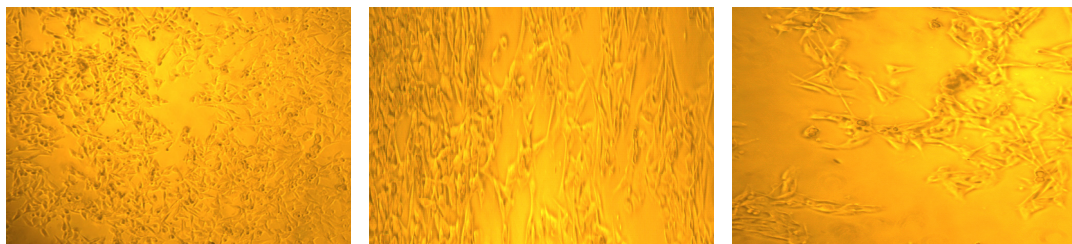


Fig. 11. Effects of Bombysis Corpus(BC) on the expression of MITF in B16F10 cells. (\*:  $p < 0.05$  vs C, \*\*:  $p < 0.01$  vs C)

### 12. 멜라닌 세포의 형태적 관찰



(A) NC

(B) 50  $\mu\text{g/ml}$  of BC

(C) 100  $\mu\text{g/ml}$  of BC

## IV. 考 察

melanin은 melanocyte 내의 독특한 소기관인 melanosome에서 만들어진다. melanosome 내에서의 melanin 생성은 tyrosinase의 합성 및 전달에 관여하는 세포내 조절인자, tyrosinase, dopachrome tautomerase, peroxidase, catalase, glutathione reductase 등의 효소 그리고 구리, 아연, 철 등의 금속이온 및 interferon(IFN), prostaglandin(PG), histamine 등이 melanin 합성과 전달에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>25</sup>. 피부의 색소 침착은 melanin 합성 세포인 melanocyte에서 melanin 색소의 과잉 생산에 따른 melanin 색소의 피부 침착에 기인한다. melanin 색소는 피부 표피의 기저층에 존재하는 melanocyte에서 효소 및 비효소적 산화반응에 의해 tyrosinase로부터 생성되며 표피를 구성하고 있는 각질 세포로 전이된다. melanocyte는 표피세포, 각질세포 등과 서로 밀접한 세포간 정보망을 구성하고 있다<sup>26</sup>.

melanogenesis는 피부의 모낭 내부의 melanocyte에서 melanin이 생성되는 과정으로, 대표적인 관여효소는 tyrosinase이다. tyrosinase는 생체내 아미노산인 tyrosine이 L-DOPA가 DOPAquinone으로 산화되는 과정에 관여한다. DOPAquinone은 두가지 다른 경로를 통해 pheomelanin과 eumelanin을 생합성하게 되는 중요한 전구물질로서 작용하게 된다. 갈색 혹은 흑색을 나타내는 melanin인 eumelanin을 생성하는 eumelano genesis

를 살펴보면 DOPAquinone이 DOPACHROME으로 변환되고, DOPACHROME이 TRP-2(DOPACHROME tautomerase)에 의해 DHICA (5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid)를 생성하게 된다. DHICA는 TRP-1(DHICAoxidase)에 의해 Indole-5, 6-quinone-carboxylic acid(DHICA)가 생성되며 이것이 갈색을 나타낸다. 한편 DOPA chrome이 환원 및 탈탄산 반응에 의해 DHI(5,6-dihydroxyindole)이 생성되고 이것이 DHI oxidase에 의해 Indole-5, 6-quinone이 생성되며 이것은 흑색을 나타낸다. 그리고 적색 혹은 황색의 색소를 만드는 pheomelanogenesis는 cysteine, glutathione과 같은 황 함유 아미노산이 관여하는 경로이다. 일반적으로 melanin이라고 하면 eumelanogenesis에 의해 생성된 eumelanin을 지칭한다<sup>27,28)</sup>.

최근 미백에 대한 관심이 증가함에 따라 melanin 합성의 부정적인 측면인 과색소 침착을 억제하는 미백 화장품에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며 현재 활용되고 있는 미백제로는 Kojic acid, arbutin, ascorbic acid, hydroquinone 등이 사용되고 있으나 제품의 안정성이 낮다는 문제가 있다<sup>29,30)</sup>. 이에 따라 세포에 독성이 적으면서 melanin 합성을 감소시키고 동시에 non-mutagenic한 미백제를 찾기 위한 연구가 진행되고 있으며, 특히 천연물질이 날로 각광 받고 있다<sup>31)</sup>.

미백의 기전과 관련된 연구는 다음의 세 가지 관점에서 주로 연구되어 왔다. 첫째, melanin 합성의 주효소인 tyrosinase 활성을 조절하기 위하여 tyrosinase 합성저해물질이나, tyrosinase의 기질에 대한 길항물질을 개발한다. 둘째, melanin 합성장소인 melanocyte의 기능을 저하시키기 위해 melanocyte에 독성을 나타내는 물질을 개발한다. 셋째로 멜라닌 생성기구인 tyrosinase와 DOPA chrome에서 DHICA로의 변환을 촉매하는 제2효소인 DOPA chrome tautomerase, DHICA (dihydroxyindole carboxylic acid)에서 indole-5,

6-quinone-2-carboxylic acid로 변환을 촉매하는 제3의 효소의 활성을 동시에 감소시킨다<sup>32,33)</sup>.

본 연구에서는 백강잠(Bombysis Corpus) 추출물을 분획한 다음 얻어진  $CHCl_3$ 층을 이용하여 melanin 생성, tyrosinase의 활성 및 melanin 합성에 관여하는 여러 효소에 미치는 영향과, 이 과정에서 유전자 발현에 관련된 인자에 대해 관찰하였다.

실험 결과에서 BC는 tyrosinase의 활성저하를 통하여 melanin의 유리와 합성을 유의있게 억제하였으며, 그 기전에 대한 유전자 연구에서는 melanin형성과 관여하는 Tyrosinase, TRP-1, PKA, MITF의 유전자 발현을 유의있게 억제하였다. 그러나 ERK와 AKT의 유전자 발현에는 오히려 색소생성을 증가하는 방향으로 결과가 나왔으며, 이에 대하여 BC의 미백효과에 작용하는 유전자 발현에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 結 論

백강잠(Bombysis Corpus) 추출물을 분획한 다음 얻어진  $CHCl_3$  층을 이용하여 melanin 생성에 미치는 영향을 측정하였다. 또한, melanin 생성과 관련되는 tyrosinase의 활성과 유전자 발현에 대한 연구를 통하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. BC는 B16의 melanin 생성을 억제하였다.
2. BC는 Tyrosinase의 활성 및 세포내 합성을 억제하였다.
3. BC는 B16F10에서의 tyrosinase 및 TRP-1 유전자 발현을 억제하였다.
4. BC는 B16F10에서 PKA 발현을 억제하였다.
5. BC는 B16F10의 유전자 발현을 조절하는 신호 전달인자인 ERK-1, ERK-2, AKT-1의 발현을 억제하였다.
6. BC는 B16F10의 MITF의 발현을 억제하였다.

이상의 결과, 백강잠 추출물의  $\text{CHCl}_3$  분획물은 melanin 생성에 관여하는 유전자인 Tyrosinase, TRP-1, PKA, MITF 발현 억제를 통하여 melanocyte의 tyrosinase의 생합성을 억제하여 melanin 합성을 억제하는 것으로 판단되었다. 따라서, 피부 미백제로 활용가능성이 있다고 평가된다.

### 參考文獻

1. 신연상, 노석선. 기미에 관한 문헌적 고찰. 대한외관과학회지. 1998;11(1):82-98.
2. 楊維傑 編. 黃帝內經 素門. 臺化:樂羣出版社業有限公司. 1994:624-79.
3. 송점식. 한방피부미용. 효림. 1993:188-92, 223-5.
4. 신민교. 임상본초학. 영림사. 2000:619.
5. 權寧哲. 蠶이 Alloxan 투여 家兔의 혈당량에 미치는 영향. 서울:경희대학교대학원. 1986.
6. 李武炯, 尹哲浩, 鄭智天. 신장조직에서 白蠶蠶 추출물의 항산화 작용에 관한 연구. 동국대학교 한의학 연구소 논문집. 1998;7(1):87-98.
7. 김희준. 흰쥐의 뇌 astrocyte에서 amyloid- $\beta$  25-35로 유발된 세포독성, 세포막 지질의 과산화, 항산화 효소계 및 NO 생성에 미치는 白蠶蠶의 보호효과. 동국대학교 대학원. 2000.
8. 張逸鎮. 天麻와 白蠶蠶수침이 진경 효과에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1988.
9. 權一浩. 白蠶蠶 추출액의 피부암 세포주에서 세포사멸 유도작용에 대한 연구. 원광대학교 대학원. 2003.
10. 王浴生. 中藥藥理與應用. 臺化:인민위생출판사. 1983:1238-9.
11. 余永譜. 中醫治療內分泌代謝病. 浙江:浙江科學技術出版社. 1992:41.
12. 楊思澍, 張樹生, 傅景華. 中醫臨床大全. 서울:醫聖堂. 1993:236-7.
13. 이상희. 麻黃 및 麻黃膏의 미백효과에 관한 연구. 경희대학교 동서의학대학원. 2001.
14. 김성옥. 瀉白散의 미백효과 검증에 관한 연구. 경희대학교한의과대학. 1991.
15. 손동석 외. 加減西施玉容散의 미백효과에 관한 연구. 대한안이비인후피부과학회지. 2002;15(2):104-17.
16. 박지선 외. B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 대한 西施玉容散의 효과. 대한동의병리학회지. 2000;14(1):160-70.
17. 전병훈 외. 멜라닌 합성의 신호전달기전에 미치는 西施玉容散의 효과. 대한동의병리학회지. 2001;15(1):73-83.
18. 이관순 외. 天花粉이 멜라닌 형성에 미치는 영향. 대한외관과학회지. 2001;14(1):209-25.
19. 윤화정 외. 白芨이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향. 대한안이비인후피부과학회지. 2003; 16(1):100-11.
20. 김혜향. 皮膚美容에 사용 가능한 漢方藥材와 그 효과에 대한 고찰. 대구카톨릭대학교. 뷰티 코디네이터디자인과. 2003.
21. 이승호. 백강잠(白蠶蠶)으로부터 멜라닌생성 억제제의 개발. 보건복지부. 신약개발지원사업최종보고서. 2004.
22. Martinez-Esparza M, et al. Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. Eur J Biochem 1998;255(1):139-46.
23. Hosei J, et al. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by  $1\alpha,25$ -dehydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res 1985;45:1474-8.
24. Zhang Weihua, Rachel Tsan et al., Loss of Adhesion in the Circulation Converts Amelanotic Metastatic Melanoma Cells to Melanotic by Inhibition of AKT. Neoplasia. 2006;8(7):543-50.

25. 山孝一 良 and hearing, V. J.,メラニン産生の制御因子, *Fragrance Journal*, 1990;6:24-8.
26. 崔鍾玩, A study on the antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of uv-b sunscreen and preservative in cosmetic products, 건국대학교 대학원 박사학위논문, 1996.
27. Jackson I.J. et al, A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase, *EMBO J*, 1992;11:519.
28. Jimbow K, et al, Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in viltigo, *British J. Derma*, 2001;144:55.
29. Curto E. V. et al, Inhibitors of mammalian melanocytes tyrosinase:In vitro Comparisons of alkyl Esters of Gentisic acid with other putative inhibitors, *Biochemical Pharmacology*, 1992;57:663-72.
30. Chakraborty AK et al, Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes, *Pigment Cell Res*, 1998;11(4): 206-12.
31. 강현성 외 4인, 사삼 물 추출액의 멜라닌 형성 억제 효과, *대한안아비인후피부과학회지*, 2004; 17(1):82-93.
32. 손애량, 이승자, *한국미용학회지*, 2000;6(1):239-54.
33. 김은철 외, 천연물에 포함된 미백성분의 추출 및 미백효과, *한국공업화학학회지*, 2005;16(3): 348-53.