

五味子の 멜라닌 생성 억제와 미백효과에 관한 연구

두인선 · 임규상 · 황충연 · 박민철 · 김남권
원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

A Study on the Melanin Synthesis Inhibition and Whitening Effect of *Schizandrae Fructus*

In-Sun Doo · Kyu-Sang Lim · Chung-Yeon Hwang · Min-Cheol Park · Nam-Kwen Kim

Objective : The aim of this study is to assess the effect of *Schizandrae Fructus* on melanin synthesis inhibition and whitening effect.

Methods : We assessed inhibitory effects of *Schizandrae Fructus* on melanin-release from B16F10, on melanin production in B16F10, on mushroom tyrosinase activity in vitro, on tyrosinase activity in B16F10 and effect of *Schizandrae Fructus* on the expression tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA, ERK-1 ERK-2, AKT-1, MITF in B16F10.

Results and Conclusion : 1. *Schizandrae Fructus* inhibited melanin-release, melanin production in B16F10.
2. *Schizandrae Fructus* inhibited tyrosinase activity in vitro and in B16F10.
3. *Schizandrae Fructus* suppressed the expression of tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA, ERK-2 in B16F10.

Key word : *Schizandrae Fructus*, melanin-release, melanin production, tyrosinase, whitening effect

1. 緒 論

환경 오염으로 피부의 자외선 노출이 증가하고 있어 피부 노화에 의한 피부색의 침착이 심해지고 있다. 또한 미용적인 이유에서 피부 착색에 대한

관심이 높아지고 있어 이에 보다 안정적이고 효과적인 미백 소재를 발견하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다^{1,2)}.

미백 효과에 대한 연구는 tyrosinase 활성 억제, DOPA 산화 억제, 각질층 제거 촉진 및 자외선 차단에 대한 연구, 세포 독성억제연구, 활성산소 제거에 대한 연구 등으로 이루어지고 있다³⁾.

관련 연구들을 살펴보면 tyrosine의 산화를 촉매 하는 tyrosinase의 활성을 저해하는 물질에 대한

교신저자: 김남권, 경기도 군포시 산본동 1126-1
원광대학교 산본한방병원 한방안이비인후피부과,
(Tel : 031-390-2671, Email : drkim@wonkwang.ac.kr)
• 접수 2007/10/22 • 수정 2007/11/19 • 채택 2007/12/03

연구로 kojic acid⁴⁾, 알부틴⁵⁾, 감초추출물⁶⁾에 관한 연구가 있으며, 피부박리를 촉진하여 melanin 색소제거를 촉진시키는 소재에 대한 연구로는 레틴산⁷⁾ 등에 대한 연구가 있다. 하지만 이들 대부분의 것은 효과가 불충분하거나 제형상 불완전한 면이 있고, 피부에 대한 안전성 측면에서 그 사용이 제한되고 있다⁸⁾.

최근에는 천연물에서 미백제를 개발하려는 많은 연구들이 진행되고 있는데 白芨⁹⁾, 沙蔘¹⁰⁾ 등에 대한 연구가 있으며, 한약 복합제제에 대한 미백 연구로는 麻黃 및 麻風膏¹¹⁾, 加味歸脾湯¹²⁾ 등에 대한 연구가 이루어졌다.

黃帝內經에서는 “肺의 숨은 皮요, 營은 毛가 되며, 肺가 皮毛를 主管한다.” 하여 피부 질환에 있어 肺臟과의 연관성을 말하였다¹³⁻¹⁵⁾.

이를 근거로 肺經에 작용하는 약물이 피부에 작용하는 효과가 클 것으로 기대된다. 五味子是 歸經이 肺經, 腎經, 心經이며 斂肺滋腎의 효능이 있고 색소침착의 원인 중 腎陰不足을 개선시키는 補陰 補精 등의 효능이 있어¹⁶⁾ 五味子 추출물의 미백 효과에 대한 연구가 의미가 있을 것으로 생각된다. 五味子에 대한 실험연구로는 노 등의 간암세포 증식 억제 효과¹⁷⁾, 고 등의 혈당 강하 효과¹⁸⁾, 이 등의 항균 효과¹⁹⁾ 등이 있으나 미백에 대한 연구는 보고되지 않았다.

저자는 肺經에 작용하며 과색소 침착의 원인 중 腎陰不足을 개선시키는 補陰補精 등의 효능이 있는 五味子を 이용하여 피부 미백 효과에 관련된 효능을 알아보고자 五味子 추출물에 대하여 멜라닌 생성에 미치는 영향, 멜라닌 생성과 관련되는 tyrosinase의 활성 및 멜라닌 생합성에 관여하는 여러 효소와 유전자 발현에 미치는 영향에 대해 실험하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 실험재료

1) 시료 추출 및 분획조제

정선된 오미자 100 g을 MeOH로 2시간 환류추출한 다음 이를 감압농축하여 MeOH 추출물 18.4 g을 얻었다. MeOH 추출물을 증류수에 현탁한 다음 CHCl₃ 로 추출분획하여 감압 농축한 다음 냉동건조 시켜 CHCl₃ 가용 성분 4.7 g을 얻었다. 계속하여 n-BuOH 분획층을 얻고, 나머지 수층을 감압 농축한 후 냉동건조로 고형물을 얻었다.

2) 검액 조제

실험용 검액은 각각의 추출물을 DMSO (Dimethylsulfoxide)에 녹인 후 0.22 μm pore size를 가지는 여과지를 이용하여 멸균하고 사용시까지 냉장 보관하였다. 배양된 세포에 사용하기 직전에 실험농도에 맞도록 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL Co, USA) 배지로 조정된 다음 사용하였다.

2. 실험방법

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 μm membrane filter로 여과 후 사용하였다. Cell에 각 조건 별로 96well plate에는 well 당 100 μl, 24well plate에는 well 당 500 μl로 medium을 넣어주었다. 세

포를 회수할 때는 trypsin-EDTA 1 ml을 가하여 37℃에서 1분간 반응시킴으로써 부착된 세포를 분리하고 배지 4 ml을 넣고 원심분리 (1,000 rpm, 3분)를 하여 세척한 후 실험에 사용하거나 필요시 액체질소에서 냉동 보관하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂를 사용한 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2) Cell Proliferation 측정

세포를 2×10^4 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 μ l, 3 mM L-tyrosine 수용액 20 μ l, 검액 20 μ l을 차례대로 가한 다음, 2500 U/ml mushroom tyrosinase 10 μ l를 가하여 반응을 시작하였다. 반응은 37℃에서 30분간 incubation 시켰으며 매 10분 간격으로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tyrosinase 활성은 아래에 표시한 식으로 구하였다.

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

A: 대조군 반응액의 흡광도

A': 대조군의 tyrosinase 대신 buffer 가한 반응액의 흡광도

B: 검액이 첨가된 반응액의 흡광도

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

4) Cell의 tyrosinase 활성도 측정

B16F10 cell의 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 등의 방법을 사용하였다. 배양된 세포를 trypsin-EDTA를 처리하여 수확한 다음 110 rpm에서 30초간 원심분리하고 100 μ l 세포 용해용 buffer (10 mM sodium phosphate containing 1% Triton X-100 and 0.1 mM PMSF)를 첨가한 다음 얼음상에서 30분간 흔들면서 세포를 용해시켰다. 다시 원심분리하고 얻어진 세포용액을 사용하여 tyrosinase 활성을 측정하였다.

5) Melanin 생성량 측정

Melanin은 Hosei 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 1 N NaOH 300 μ l를 넣고 80℃에서 1시간 동안 처리하여 용해시켰다. 세포내에서 생성되는 melanin 양을 정량하기 위하여 475 nm에서 흡광도를 측정하고 합성 melanin을 표준품으로 사용하여 결정하였다. 또한, Washing buffer로 3번 다시 씻어 내고 Enzyme Conjugate 100 μ l를 가한 다음, 22℃에서 45분간 incubation 시켰다. 다시 3번 씻어낸 다음 기질용액 100 μ l를 가하고 22℃에서 30분간 incubation 시킨 다음 stop solution 50 μ 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 μ l phenol과 100 μ l chloroform : isoamylalcohol (24:1)을 넣고 잘 섞은 후 원심 분리하는 과정을 2번 반복함

으로써 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℃에서 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℃에서 5분간 incubation하였다. primer가 annealing 하도록 실온에서 약 10분간 방치한 다음, cyscript buffer, 0.1 M DTT, dUTP nucleotide, dUTP Cydye-labelled nucleotide, Cyscript reverse transcriptase을 첨가한 후, 아주 조심스럽게 혼합하였다. 이 후, 42℃에서 90분간 incubation 한 후, 얼음 상에 방치하였다. 여기에 2.5 M NaOH을 가한 후 37℃에서 15분간 incubation하였으며, 2 M HEPES buffer를 가하여 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 MgCl₂, 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 GGT 이었으며, antisense는 TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC을 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, PKC-β의 sense primer는 AGA ACC ACA AAT TCA CCG CC, antisense는 TGA GAA CCT CTC TGT CGA TG, 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 TG 이었으며, 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 TA 이었다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA 이었으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. PCR 조건은 94℃ 4분, 30 cycles의 [94℃ (30초), 59℃ (30초), 72℃ (45초)], 72℃ 10분이었다(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 ng/µl 의 random hexamer 3 µl, 10 mM dNTP 1 µl를 넣고 DEPC H₂O를 가하여 10 µl의 RNA/primer mixture를 만들었다. 실험용 sample을 65℃에서 5

분간 incubation 시킨 후 1분 이상 얼음에 방치하였다. Reaction mixture으로 10배의 RT buffer 2 μ l, 25 mM MgCl₂ 4 μ l, 0.1 M DTT 2 μ l, RNAaseOUT 1 μ l을 섞어 준비하였다. Tyrosinase의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT 이었으며, 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 AA을 사용하였으며, PKC- β 의 sense primer는 AGA ACC ACA AAT TCA CCG CC, antisense는 TGA GAA CCT CTC TGT CGA TG, 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 TG 이었으며, 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 TA 이었다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA 이었으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. Reaction mixture를 RNA/primer mixture에 가하여 섞고 실온에 2분간 방치한 후, SuperScript II RT 1 μ l(50 units)를 가하고 25°C에 10분간 incubation 시켰다. 다시 4

2°C에서 50분간 incubation 시킨 다음, 70°C에서 15분간 가열하여 inactivate 시키고 ice 상에서 식혔다. RNase 1 μ l를 가하고 다시 37°C에서 20분간 incubation 시킨 다음, 사용 시까지 -20°C에 보관하였다. 각각의 optical tube에 2배의 SYBR Green Mix 12.5 μ l, cDNA 0.2 μ l, 5 pmol/ μ primer pair mix 1 μ l, 11.3 μ l H₂O를 넣고, 50°C 2분 1 cycle, 95°C 10 min 1 cycle, 95°C 15sec, 60°C 30sec, 72°C 30sec 40 cycles, 72°C 10 min 1 cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 μ l를 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 이용하였고, 분석에 사용한 프로그램은 SPSS 12.0 version을 이용하였다. p < 0.05 인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

III. 實驗結果

1. 五味子が Melanocyte의 Melanin 유리에 미치는 영향

세포 배양액에 유출된 melanin의 양을 측정된 결과 α -MSH (10 nM)처리한 경우 처리하지 않은 군에 비해 melanin의 양이 유의성 있게 증가하였다. 五味子 추출물을 72시간 처리한 후 측정된 melanin의 양은 정상 대조군 및 α -MSH 처리군

에서 모두 유의성 있게 억제 되었다(Fig. 1).

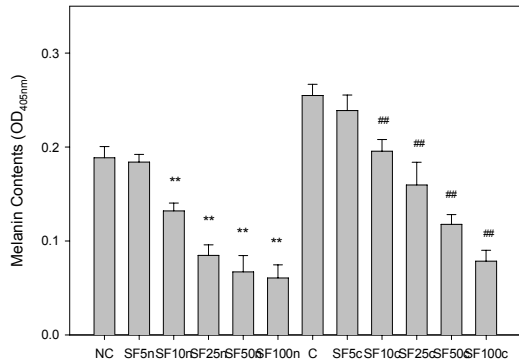


Fig. 1 Inhibitory effects of *Schizandrae Fructus*(SF) on melanin-release from B16F10. Melanin were determined in the culture medium after 72hrs incubation.

NC: Vehicle

SF5n: Vehicle + 5 $\mu\text{g/ml}$ of SF

SF10n: Vehicle + 10 $\mu\text{g/ml}$ of SF

SF25n: Vehicle + 25 $\mu\text{g/ml}$ of SF

SF50n: Vehicle + 50 $\mu\text{g/ml}$ of SF

SF100n: Vehicle + 100 $\mu\text{g/ml}$ of SF

C: α -MSH (10 nM)

SF5c: α -MSH (10 nM) + 5 $\mu\text{g/ml}$ of SF

SF10c: α -MSH (10 nM) + 10 $\mu\text{g/ml}$ of SF

SF25c: α -MSH (10 nM) + 25 $\mu\text{g/ml}$ of SF

SF50c: α -MSH (10 nM) + 50 $\mu\text{g/ml}$ of SF

SF100c: α -MSH (10 nM) + 100 $\mu\text{g/ml}$ of SF

** : $p < 0.01$ vs NC

: $p < 0.01$ vs C

2.五味자가 Melanocyte의 Melanin 생성에 미치는 영향

5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 거의 영향을 주지 못했으며, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 경우 α -MSH를 처리한 군과 처리하지 않은 군에서 공통적으로 현저히 억제 되었다(Fig. 2).

3.五味자가 Mushroom Tyrosinase 활성에 미치는 영향

五味子 추출물을 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 가한

경우 tyrosinase 활성이 유의성 있게 억제 되었다 (Fig. 3).

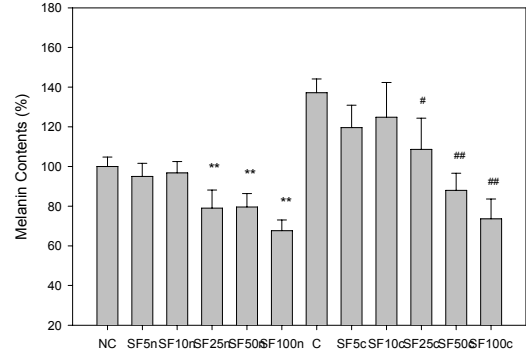


Fig. 2. Inhibitory effects of *Schizandrae Fructus*(SF) on melanin production in B16F10. Melanin were determined in the cell after 72hrs incubation.

** : $p < 0.01$ vs NC, ## : $p < 0.01$ vs C, # : $p < 0.05$ vs C

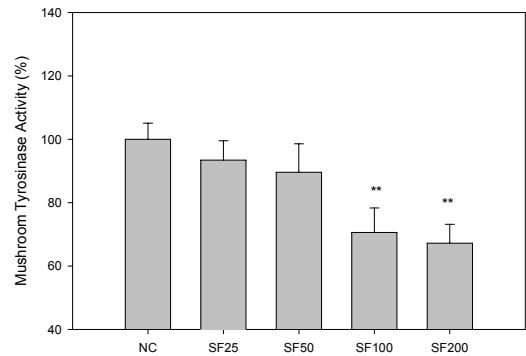


Fig. 3. Inhibitory effects of *Schizandrae Fructus*(SF) on mushroom tyrosinase activity in vitro.

** : $p < 0.01$ vs NC

4.五味자가 Melanocyte의 Tyrosinase 활성에 미치는 영향

五味子 추출물을 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 경우 대조군에 비해 유의성 있게 tyrosinase 효소활성 억제를 보였다(Fig 4).

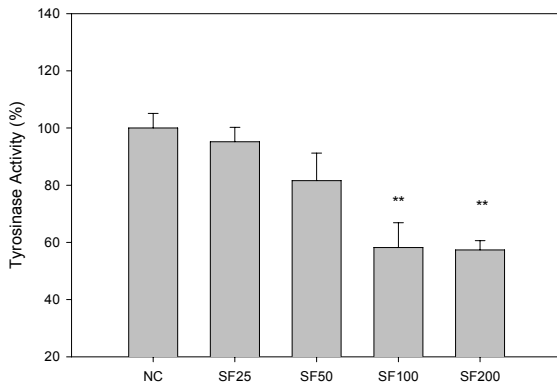


Fig. 4. Inhibitory effects of *Schizandrae Fructus*(SF) on tyrosinase activity in B16F10 cells.

** : $p < 0.01$ vs NC

5.五味子が Tyrosinase(TRS) 발현에 미치는 영향

五味子 추출물을 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 경우五味子 추출물을 처리하지 않은 대조군에 비해 유의성 있게 억제 되었다(Fig. 5).

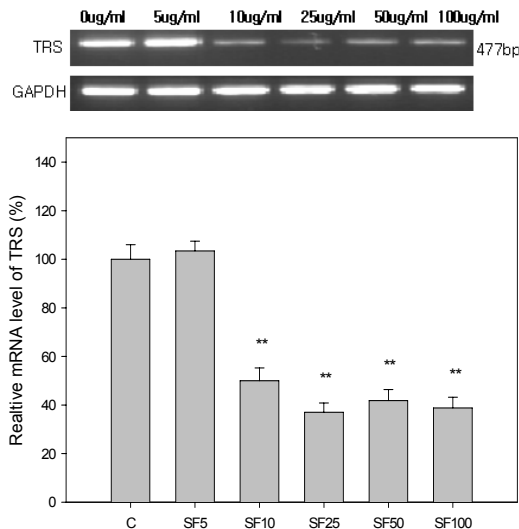


Fig. 5. Effects of *Schizandrae Fructus*(SF) on the expression of tyrosinase(TRS) in B16F10 cells.

** : $p < 0.01$ vs C

6.五味子が TRP-1 발현에 미치는 영향

五味子 추출물 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 경우五味子 추출물을 처리하지 않은 대조군에 비해 유의성 있게 억제 되었다(Fig. 6).

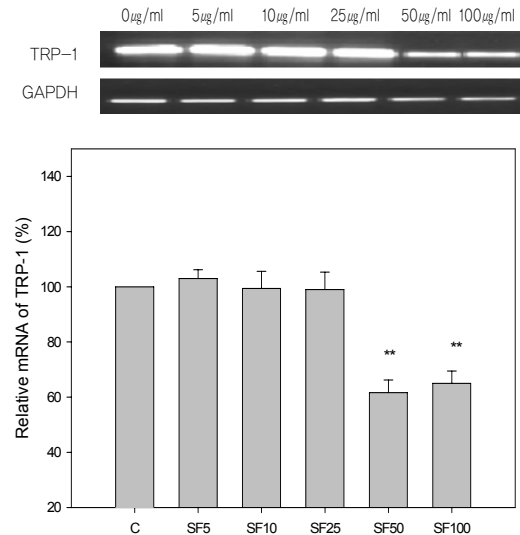


Fig. 6. Effects of *Schizandrae Fructus*(SF) on the expression of TRP-1 in B16F10 cells.

** : $p < 0.01$ vs C

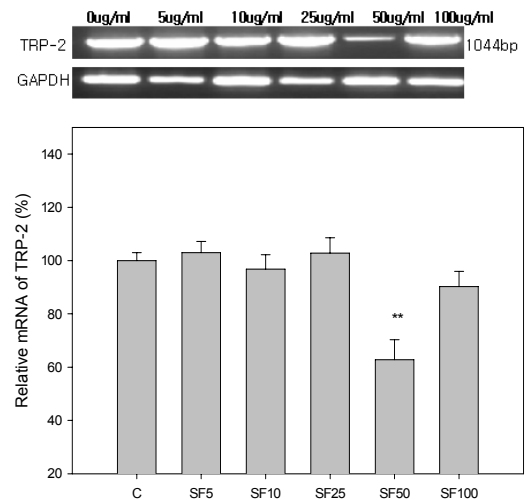


Fig. 7. Effects of *Schizandrae Fructus*(SF) on the expression of TRP-2 in B16F10 cells.

** : $p < 0.01$ vs C

7.五味자가 TRP-2 발현에 미치는 영향

五味子 추출물을 5, 10, 25, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 경우 변화를 나타내지 못했으나, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 경우 대조군에 비해 유의성 있게 억제 되었다(Fig. 7).

8.五味자가 PKA(Protein Kinase A) 발현에 미치는 영향

五味子 추출물을 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 경우 대조군에 비해 유의성 있게 억제 되었다(Fig. 8).

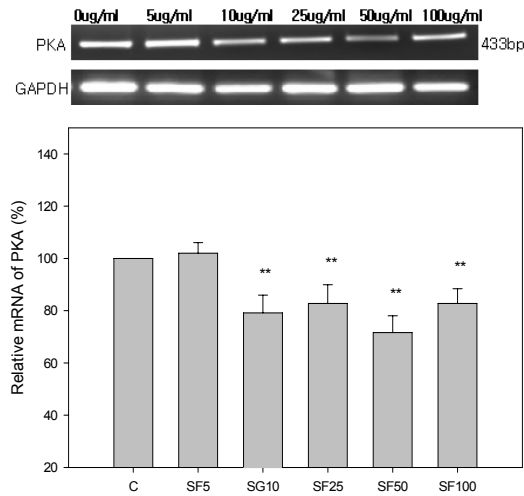


Fig. 8. Effects of *Schizandrae Fructus*(SF) on the expression of PKA in B16F10 cells.

** : $p < 0.01$ vs C

9.五味자가 ERK-1 발현에 미치는 영향

五味子 추출물을 5, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 경우 ERK-1 발현이 증가되었으나, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 ERK-1 발현이 억제 되었다(Fig. 9).

10.五味자가 ERK-2 발현에 미치는 영향

五味子 추출물을 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 경우 대조군에 비해 발현이 유의성 있

게 억제 되었다(Fig. 10).

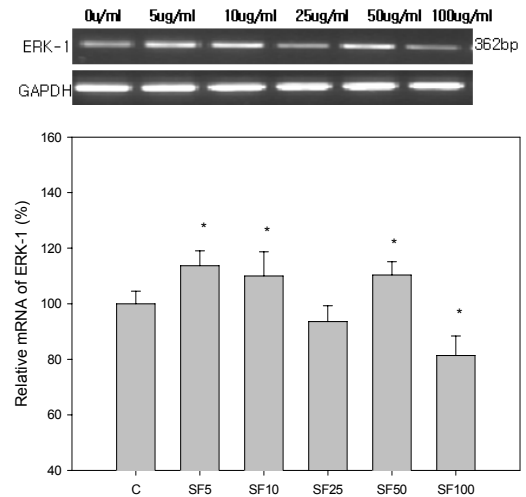


Fig. 9. Effects of *Schizandrae Fructus*(SF) on the expression of ERK-1 in B16F10 cells.

* : $p < 0.05$ vs C

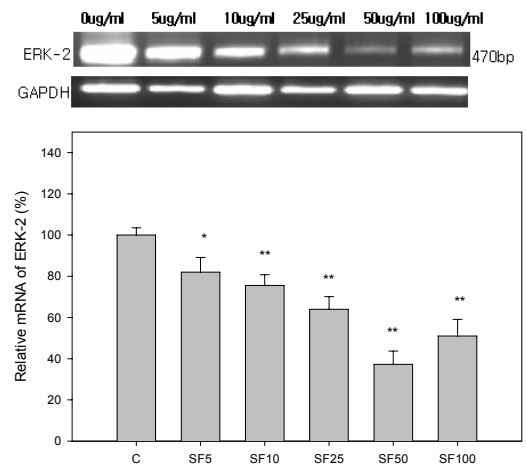


Fig. 10. Effects of *Schizandrae Fructus*(SF) on the expression of ERK-2 in B16F10 cells.

** : $p < 0.01$ vs C * : $p < 0.05$ vs C

11.五味자가 AKT-1 발현에 미치는 영향

五味子 추출물을 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 경우 발현이 약간 억제되었으나 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 영향을 나타내지 못했다(Fig. 11).

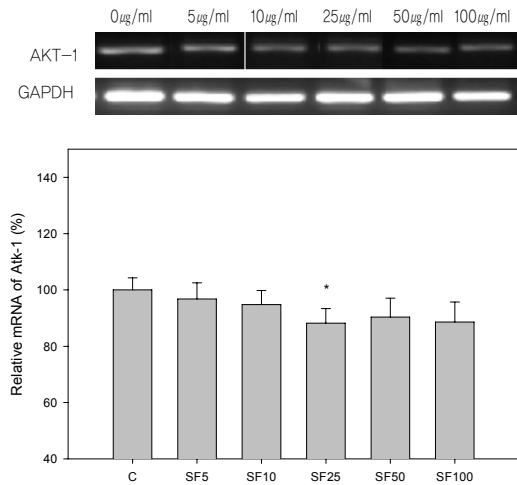


Fig. 11. Effects of *Schizandrae Fructus*(SF) on the expression of AKT-1 in B16F10 cells.

*: $p < 0.05$ vs C

12.五味자가 MITF 발현에 미치는 영향

五味子 추출물을 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리한 경우 모두 별다른 영향을 나타내지 못했다(Fig. 12).

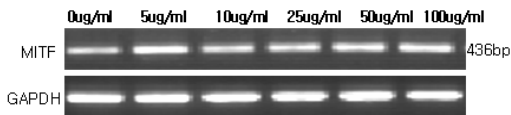
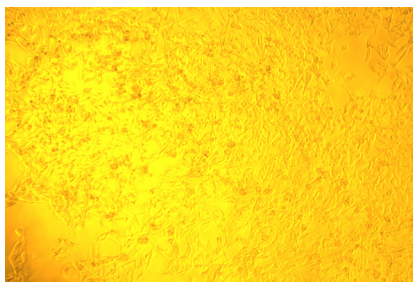
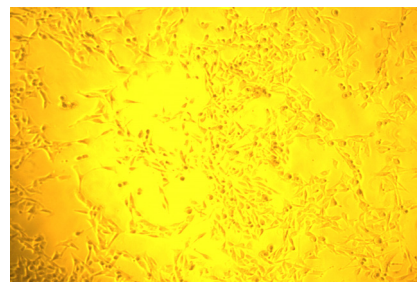


Fig. 12. Effects of *Schizandrae Fructus*(SF) on the expression of MITF (microphthalmia transcription factor) in B16F10 cells.

13. 현미경 관찰



(A) NC



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

IV. 考 察

韓醫學 文獻에는 피부의 과색소 침착증에 대해 《黃帝內經·素問》〈至真要大論〉에 “歲陽明在天, 燥淫所勝... 面鹿, 身無膏澤, 足外反熱”²⁰⁾ 이라 하여 처음 수록되었고, 이후 여러 醫家들은 피부의 형태와 원인에 따라 黧黯, 面黑, 雀斑 등으로 다양하게 언급하였다²¹⁻²⁵⁾.

과색소 침착증의 원인을 樓 등은 內經의 面鹿에 대한 文獻을 인용하여 陽明病으로 보았으며, 顧 등은 思慮過多와 飲食失調로 인한 脾胃損傷을 원인으로 보았다. 또, 祁 등은 風邪와 痰飲이 증상을 유발한다고 보았고, 顧 등은 발병기전 중에서 여성에 주로 나타난다는 언급과 함께 陰虛火動을 원인으로 보았다²⁶⁻³²⁾. 최근 문헌들³³⁻³⁸⁾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 등의 원인으로 자세히 분류하였다. 치료방법으로는 辨證施治에 의한 疏肝解鬱, 滋補肝腎, 健脾益氣, 滋陰降火, 祛風濕, 清熱解毒 등의 內治法과 軟膏劑나 粉末 洗劑 등을 사용하는 外治法, 體針, 耳針 등을 이용하는 針治療法 등이 기록되어 있다³⁹⁻⁴²⁾.

인간의 피부색은 멜라닌의 양에 의해서 주로 결정되며, 혈색소, 카로틴 같은 색소 성분과 혈관분포, 각질층의 두께 등에 의해서도 영향을 받는다. 특히 표피에 분포하는 멜라닌 세포는 멜라닌을 합성하여 피부의 색소 침착에 중요한 역할을 할 뿐

아니라 생성된 멜라닌이 각질형성세포로 이동하여 과도한 자외선을 흡수하고 차단하는 광보호 작용을 한다⁴⁴⁻⁴⁶.

기미, 주근깨 등 피부에 생기는 색소침착은 표피 내에서 melanin 색소의 이상적 증가에 기인한다. 멜라닌의 주된 생성과정은 아미노산의 일종인 tyrosine이 tyrosinase에 의해 산화되어 dopa, dopaquinone이 되고 이것이 다시 5,6-dihydroxy indole, indole 5,6-quinone로 자동 산화되고 최종적으로 중합에 의해 melanin polymer를 생성하는 것으로 되어있다⁴⁷. 이러한 색소침착을 치료하기 위해 tyrosinase의 활성을 억제하여 멜라닌 생성을 억제하는 hydroquinone, resorcinol 등의 페놀 유도체나 L-ascorbic acid와 그 유도체 및 kojic acid, arbutin 등이 개발되었으나, 효과가 충분치 않거나 피부 자극성 또는 안정성에 문제가 있어 제한적으로 사용되고 있다⁴⁸⁻⁵⁰.

최근에는 천연물에서 미백제를 개발하려는 많은 연구들이 진행되고 있는데 윤 등의 白芨이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향⁹, 강 등의 沙蔘 물 추출물의 멜라닌 형성 억제 효과¹⁰ 등에 대한 연구가 있으며, 한약 복합제제에 대한 미백 연구로는 이의 麻黃 및 麻風膏의 미백 효과에 관한 연구¹¹, 박의 加味歸脾湯의 미백 효과에 관한 연구¹²가 이루어졌다.

五味子是 木蓮科에 속한 多年生 落葉 蔓木인 五味子나무 및 同屬近緣植物의 성숙한 果實로 6-8월에 꽃이 피어 열매는 9-10월에 성숙하여 심홍색을 띄며 서리가 내린 후 채취하여 사용한다. 性味는 酸 溫 無毒하며 肺 腎 心 3經에 歸經하고 滋養強壯의 收斂劑로서 斂肺滋腎, 生津斂汗, 澀精止瀉, 寧心安神, 補陰補精 등의 효능이 있어 口渴, 自汗, 盜汗, 遺精, 久瀉, 心悸失眠, 健忘 등을 치료한다¹⁶. 五味子の 성분은 휘발성 정유 3% 중에 sesquicarene, β -2 bisabolene, β -chamigrene, α -ylangene이 확인되었으며, 건조한 열매 중에는

citric acid 12%, malic acid 10%, tartaric acid, schizandrin, schizandrol 등이 함유되어 있다⁴³. 五味子에 대한 실험연구로는 노 등의 간암세포 증식 억제 효과¹⁷, 고 등의 혈당 강하 효과¹⁸, 이 등의 항균 효과¹⁹ 등이 있으나 미백에 대한 연구는 보고되지 않았다.

黃帝內經에서는 “肺의 숨은 皮요, 營은 毛가 되며, 肺가 皮毛를 主管한다.” 하여 피부 질환에 있어 肺臟과의 연관성을 말하였다¹³⁻¹⁵. 이를 근거로 肺經에 작용하는 약물이 피부에 작용하는 효과가 클 것으로 기대된다. 五味子是 歸經이 肺經, 腎經, 心經이며 斂肺滋腎의 효능이 있고 색소침착의 원인 중 腎陰不足을 개선시키는 補陰補精 등의 효능이 있어¹⁶ 五味子 추출물이 미백 효과에 대한 연구가 의미가 있을 것으로 기대되어 멜라닌 생성에 미치는 영향에 대해 실험하였다.

연구 결과, 五味子 추출물의 $CHCl_3$ 분획물은 melanin 생성에 관여하는 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2, PKA 발현을 억제하여 melanocyte의 tyrosinase의 생합성을 억제하여 melanin 합성을 억제하는 것으로 판단되었다. 따라서, 五味子の melanin 합성 억제 효과에 대한 정확한 작용 기전과 응용법의 개발 등 체계적인 연구가 이루어진다면, 미백 작용이 우수하면서도 피부 부작용이 적은 화장품으로 응용될 수 있을 것이며, 기미나 주근깨 등의 과색소 침착증을 치료하는 약물로 활용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

오미자 추출물을 이용하여 melanin 생성에 미치는 영향과 melanin 생성과 관련되는 tyrosinase의 활성과 유전자 발현에 대한 연구를 한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 五味子是 B16F10의 melanin 생성을 유의성 있

게 억제 하였다.

- 2.五味子是 Tyrosinase 의 활성 및 B16F10 세포 내 합성을 유의성 있게 억제 하였다.
- 3.五味子是 B16F10 에서의 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2 유전자 발현을 억제하였다.
- 4.五味子是 B16F10에서 PKA 발현을 억제하였다.
- 5.五味子是 B16F10의 유전자 발현을 조절하는 신호전달인자인 ERK-1의 발현을 증가시켰으나, ERK-2의 발현은 억제하였다.
- 6.五味子是 B16F10 에서의 MITF(microphthalmia transcription factor)와 AKT-1 발현에는 별다른 영향을 주지 못했다.

이상의 결과, 오미자 추출물의 CHCl_3 분획물은 melanin 생성에 관여하는 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2, PKA 발현을 억제하여 melanocyte의 tyrosinase의 생합성을 억제하여 melanin 합성을 억제하는 것으로 사료된다.

參考文獻

1. Maeda K 외. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes, J Soc Cosmet Chem, 1991;42:361-8.
2. Mishima Y 외. Overview for development of future innovative skin whitening agents, Fragrance J. 1996;24:13.
3. 하병조. 기능성화장품. 서울:신광출판사. 2001: 66-84, 138-40, 143-7.
4. Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a show-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. J Pharmacol, 1994;46(12):982-5.

5. Kennechi T. Mechanism of arbutin inhibitory effect on melanogenesis and effect on the human skin with cosmetic use, Fragrance J. 1990;4:72-7.
6. Yokota T, Nishio H, Kubota Y, Mizoguchi M. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation, Pigment Cell Research, 1998;11(6):355-61.
7. Griffiths. Tropical tretinoin(retinoic acid) treatment of hyperpigmented lesions associated with photoaging in Chinese and Japanese patients-A vehicle controlled trial, Am Acad Dermatol, 30:76-84.
8. 이현호. 최근 미백화장품의 개발동향. 대한화장품학회지. 1997; 23(1):43-56.
9. 윤화정 외. 백금이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향. 대한안이비인후피부과학회지. 2003;16(1): 100-11.
10. 강현성 외. 사삼 물 추출물의 멜라닌 형성 억제 효과. 동의생리병리학회지. 2004;18(2):440-5.
11. 이상희. 마황 및 마풍고의 미백효과에 관한 연구. 경희대학교 동서의학대학원. 2001.
12. 박호순. 가미귀비탕의 미백효과에 관한 연구. 경희대학교 경희대학원 석사학위논문. 2004.
13. 洪元植編譯. 精校黃帝內經素問. 서울:동양의학연구원 출판부. 1984:293-305.
14. 李珩九, 鄭昇紀. 東醫肺系內科學. 서울:民瑞出版社. 1988:7-8.
15. 金完熙. 韓醫學原論. 서울:성보사. 1982:10-107.
16. 신민교. 임상본초학. 서울:남산당, 1986:241-3.
17. 노숙령 외. 오미자 추출물의 간암세포증식 억제 효과. 한국영양학회지. 2002;35(2):201-6.
18. 고병섭 외. 오미자 추출물의 혈당강하 효과에 관한 연구. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem, 2004;47(2):258-64.

19. 이주연. 오미자로부터 항균 활성 물질의 분리 및 항균효과. 한국식품과학회지. 2001;33(3):384-94.
20. 楊維傑 編. 黃帝內經 素問. 臺北:樂羣出版事業有限公司. 1990:624-79.
21. 龔廷賢. 萬病回春. 서울:의성당, 1993:271.
22. 巢元方. 巢氏諸病原後論. 서울:대성문화사. 1992:200, 302.
23. 李 梴. 編註醫學入門 雜病篇. 서울:대성문화사. 1990:29, 63-4, 224.
24. 趙 佶. 聖濟總錄. 北京:人民衛生出版社. 1987:1763.
25. 朱震亨. 丹溪醫集. 北京:人民衛生出版社. 1993:24.
26. 樓 英. 醫學綱目. 서울:대성문화사. 1986:1081.
27. 王肯堂. 證治準繩 卷1. 北京:人民衛生出版社. 1991:368-9, 824.
28. 顧世道. 瘍醫大全. 北京:人民衛生出版社. 1987:479, 481-2.
29. 祁 坤. 外科大成. 臺北:文光圖書有限公司. 1968:218.
30. 吳 謙. 醫宗金鑒. 北京:人民衛生出版社. 1982:1680-2.
31. 沈金鰲. 沈氏尊生書. 臺北:自由出版社. 1979:530.
32. 楊思澍 외. 中醫臨床大全. 中國:北京科學技術出版社. 1991:896-987, 923-4.
33. 辺天羽 외. 中西結合皮膚病學. 天津:天津科學技術出版社. 1999:46-9.
34. 宋兆友. 中醫皮膚科臨床手冊. 北京:人民衛生出版社. 1996:3-6.
35. 李 林. 實用中醫皮膚病學. 北京:中醫古籍出版社. 1998:1-17.
36. 南惠貞. 肝斑에 관한 문헌적 고찰. 대한외관과학회지. 1996;9(1):16-23.
37. 朴惠峻 외. 雀斑의 원인, 증상 및 치방에 관한 문헌적 고찰. 대한외관과학회지. 1997;10(1):247-62.
38. 申延祥. 기미에 관한 문헌적 고찰. 대한외관과학회지. 1998;11(1):82-98.
39. 顧伯華 외. 實用中醫外科學. 上海:上海科學技術出版社. 1985:529-530, 532-5.
40. 涂晉文 외. 中醫治療學. 北京:中國醫藥技術出版社. 1990:583.
41. 范瑞強. 實用皮膚病性病驗方精選. 廣東出版社. 1994:336.
42. 柳基遠. 診療와 優秀處方. 서울:정보사. 1992:328.
43. 安德均. 한국 본초도감. 서울:교학사. 1999:740.
44. 박경아 외. 조직학. 서울:고려의학. 1999:405-11.
45. 대한피부과학회. 피부과학. 서울:여문각. 1994:2-7, 328-37.
46. 은희철 외. 피부면역학. 서울:서울대학교출판부. 1999:143.
47. Hearing, V. J and Ekel, T. M. Mammalian tyrosinase. Biochem. J. 1976;157:549-557.
48. Ando, S., Ando, O., Suemoto, Y. and Mishima, Y. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor. J. Invest Dermatol. 1993;100:150-5.
49. Imokawa, G and Mishima, Y. Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glycosilation inhibitors within malignant melanoma. Cancer Res. 1982;42:1994-2002.
50. Masuda, M., Tejima, T. and Suzuki, T. Skin lighteners. Cosmetics & Toiletries. 1996;111:65-77.
51. 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.