

補骨脂의 高粱酒, 燒酒 추출물이 B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 미치는 영향

서 형 식

상지대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

The effect of *Gorynju* and a Soju extract *Psoraleae fructus* on Melanin synthesis of B16 melanoma cells

Hyeong-Sik Seo

Objective : This research was carried out to compare the effect of *Gorynju* and a *Soju* extract *Psoraleae fructus* on melanin synthesis of B16 melanoma cells.

Methods : To investigate melanin synthesis of B16 melanoma cells, this research was measured cell survival, tyrosinase activity, melanin synthesis, western blot.

Results : Both *Gorynju* and *Soju* extract *Psoraleae fructus*, cell toxicity depended on the density. Tyrosinase activity depended on the density of *Gorynju* extract *Psoraleae fructus* and statistic was showed significant(0.5, 1, 2, 3 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$), in a *Soju* extract *Psoraleae fructus*, 1 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ were showed significant. Melanin synthesis was showed significant in a *Soju* extract *Psoraleae fructus*(3, 4 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$). Western blot was showed to depend on the density of *Gorynju* and a *Soju* extract *Psoraleae fructus*.

Conclusions : In a tyrosinase activity and a melanin synthesis, the intermediate alcohol of *Gorynju* and a *Soju* may be suitable to use.

Key words : *Psoraleae fructus*, melanogenesis, tyrosinase, vitiligo, *Gorynju*, *Soju*

I. 緒 論

백반증은 피부에 있는 멜라닌 색소의 결핍으로 인해 여러 가지 크기 및 형태의 백색 반점들이 피부에 나타나는 후천성 탈색소 질환으로 전 세계적으로 인구의 약 1%에서 나타나는 흔한 질환으로

교신저자 : 서형식, 강원도 원주시 우산동 238번지
상지대학교 부속한방병원 한방안이비인후피부과
(Tel: 033-741-9266, E-mail: aran99@sangji.ac.kr)
• 접수 2008/02/28 • 수정 2008/03/29 • 채택 2008/04/04

서, 인종이나 지역에 따른 차이는 없는¹⁾ 것으로 알려져 있다.

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 합성된다²⁾. 따라서 tyrosinase는 멜라닌 생합성 과정에서 반응을 촉매하는 속도조절효소로서 중요한 역할을 한다³⁾.

백반증은 한의학에서는 白癜風, 白癜 등으로 불려지고 있으며⁴⁾ 內服, 外用을 통한 한의학적 치료가 이루어지고 있으나 아직 확실한 치료법이 개발되지 않은 상태이다.

補骨脂는 補腎溫脾, 固精縮尿하는 효능이 있는 補陽藥으로 外用하면 피부의 melanin 新生을 촉진하는 효능이 있어 白癜風에 사용되고 있으며⁵⁾, 정등⁶⁾의 논문을 통해서도 임상적으로 백반증 치료에 효과를 보였다.

이에 저자는 酒精의 차이에 따른 효과를 알아보기 위하여 補骨脂를 高粱酒와 燒酒에 추출하여 B16 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 형성과정에서 중요한 효소인 tyrosinase 활성도와 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였으며, western blot을 통해 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 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를 高粱酒(50% 酒精)와 燒酒(21%

酒精) 500 ml에 각각 100 g씩 일주일 동안 침포한 후 여과하여 -70℃에서 건조 시킨 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와 燒酒 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 등⁷⁾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, 0.1 mM PMSF)를 넣어 얼음에 방치하였다. 원심분리 후 상층액을 취하여

효소용액으로 사용하였다. 반응은 100 mM Sodium phosphate(pH 7.0) 용액 100 μ l에 효소용액 50 μ l를 가하여 37°C에서 5분간 방치하였다. 여기에 100 mM catechol 50 μ l를 넣은 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

3) 멜라닌의 定量 측정

세포내 멜라닌 양 측정은 Hosoi 등⁸⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 세척한 후 원심분리하여 세포를 수확한 다음 10% DMSO(dimethyl sulfoxide)가 첨가된 1N NaOH를 200 μ l를 첨가하고 80°C에서 1시간 용해하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양 변화는 대조군을 100으로 하고 처리군의 상대적인 양을 백분율로 계산하였다.

4) Western bolt 분석

① 단백질 추출

단백질을 세포내에서 추출하기 위하여 1×10^7 의 세포 당 1% SDS 100 μ l로 현탁시켜 얼음 위에서만 시간 동안 방치하여 완전히 lysis시켜 단백질을 추출하였다. 그런 다음 10,000 \times 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 μ g/ μ l)를 농도별로 0, 1, 2, 4, 8, 16 μ g/ μ l에 BCA 용액 100 μ l를 첨가하여 20분간 37°C에서 방치한 다음 흡광도 540 nm에서 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 동시에 측정할 샘플을 2 μ l와 BCA 용액 100 μ l을 섞은 뒤 20분간 37°C에서 방치한 후 540 nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 단백질농도를 계산하였다.

③ 전기영동 및 Western blot

추출한 단백질 100 μ g를 12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. Membrane을 상온에서 5% milk를 함유한 PBS-Tween(0.01%)에서 1시간동안 hybridization하였다. 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 Fugii X-ray film으로 감광시켜 단백질을 가시화하였다.

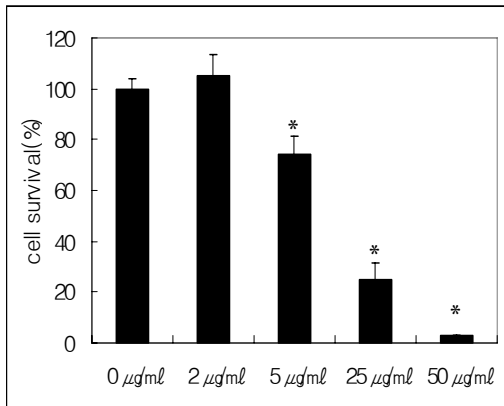
5) 통계분석을 통한 유의성 검증

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

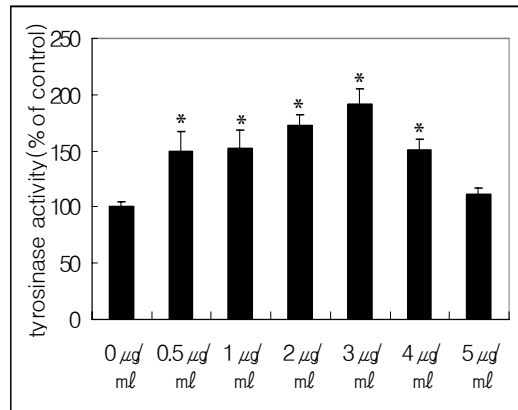
III. 實驗結果

1. 세포생존율에 미치는 영향

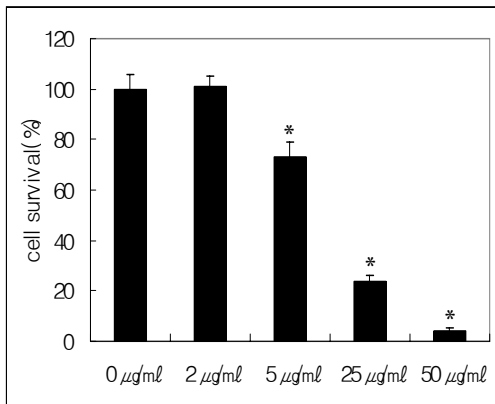
補骨脂의 高粱酒와 燒酒 추출물의 B16 melanoma 세포에 대한 생존율은 0에서 50 μ g/ml까지 처리한 결과 농도별로 점차 감소하였으며, 5 μ g/ml의 농도에서 각각 74%, 73%의 생존율을 보였다($p < 0.05$)(Fig. 1). 본 연구에서는 세포 생존율을 감안하여 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 μ g/ml의 농도에서 실험을 진행하였다.



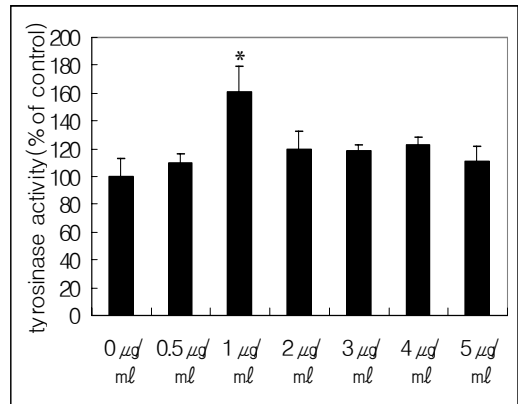
Gorynju extract *Psoraleae fructus*



Gorynju extract *Psoraleae fructus*



Soju extract *Psoraleae fructus*



Soju extract *Psoraleae fructus*

Fig. 1. The survival of B16 melanoma Cells treated with Gorynju and a Soju extract *Psoraleae fructus*(* p<0,05)

Fig. 2. The tyrosinase activity of B16 melanoma cells treated with Gorynju and a Soju extract *Psoraleae fructus*(* p<0,05)

2. Tyrosinase 활성도에 미치는 영향

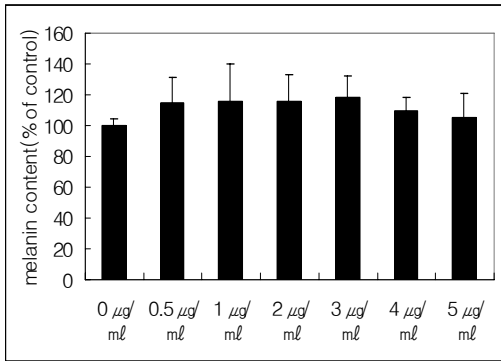
補骨脂의 高粱酒와 燒酒 추출물의 tyrosinase 활성도에 있어서 高粱酒 추출물은 4, 5 µg/ml의 농도를 제외하고 농도별로 증가하였으며 5 µg/ml를 제외한 모든 농도에서 유의성이 있었고, 燒酒 추출물은 1 µg/ml의 농도에서만 유의성이 있었다(p<0,05)(Fig. 2).

3. 멜라닌 합성에 미치는 영향

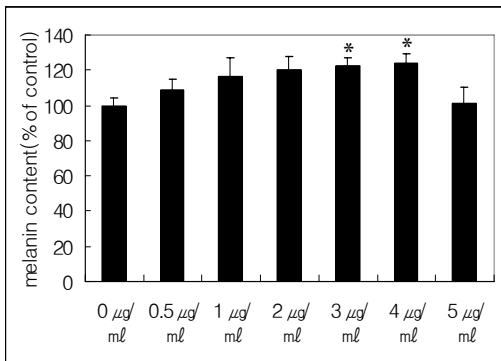
補骨脂의 高粱酒와 燒酒 추출물의 멜라닌 합성에 있어서 高粱酒 추출물은 4, 5 µg/ml의 농도를 제외하고 농도별로 증가하였으나 유의성은 없었으며, 燒酒 추출물 5 µg/ml의 농도를 제외하고 농도별로 증가하였으며 3, 4 µg/ml의 농도에서 유의성이 있었다(p<0,05)(Fig. 3).

4. Western blot

western blot을 실시한 결과 補骨脂의 高粱酒와 燒酒 추출물 모두 0 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$ 으로 처리하였을 때 tyrosinase의 양은 증가하였다(Fig. 4).

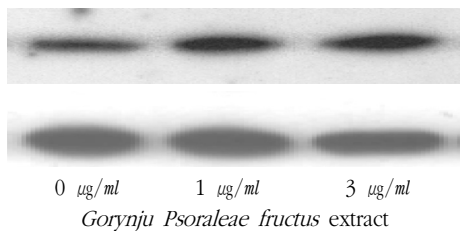


Gorynju extract *Psoraleae fructus*



Soju extract *Psoraleae fructus*

Fig. 3. The melanin content of B16 melanoma cells treated with Gorynju and a Soju extract *Psoraleae fructus*(* $p < 0.05$)



Tyrosinase

Actin

0 $\mu\text{g/ml}$ 1 $\mu\text{g/ml}$ 3 $\mu\text{g/ml}$
Gorynju *Psoraleae fructus* extract



0 $\mu\text{g/ml}$ 1 $\mu\text{g/ml}$ 3 $\mu\text{g/ml}$
Soju *Psoraleae fructus* extract

Fig. 4. Western blot analysis

IV. 考 察

백반증은 멜라닌세포가 파괴되어 정상적인 피부 색의 소실을 가져오는 탈색소성 질환으로 생명단축과 신체의 기능에 악영향을 주지는 않으나 사회생활의 어려움과 정신적 스트레스를 유발하여 때로는 정서적 갈등을 동반할 수 있는 질환이다. 그동안 백반증의 발병기전에 관한 많은 연구가 있었으며 치료에 대해서도 많은 연구가 있었지만 아직 정확한 발생기전이나 치료방법은 미흡한 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 형성하며⁹⁾, 이 과정에서 tyrosinase는 각 단계에서 촉매작용을 한다고 알려져 있다. 이러한 과정이 정상적이지 못할 경우 멜라닌 세포가 파괴되어 백반증이 유발된다고 하며, 유발병인으로는 멜라닌 세포에 대한 자가 항체로 인해 발생한다는 면역설, 신경 손상이나 스트레스 후에 발병하고 epinephrine과 norepinephrine이 tyrosine-tyrosinase의 반응을 억제하여 멜라닌 세포를 파괴한다는 신경 체액설, 멜라닌 형성 과정 중에 생기는 페놀복합체와 같은 중간 물질이나 대사 물질들에 대한 자체 방어력이 떨어져서 발생한다는 멜라닌 세포 자가 파괴설, 가족력에 의해 발생한다는 유전적 소인¹⁾ 등이 관여하는 것으로 소개되고 있다.

한의학적인 치료에 있어內服藥으로 蒼耳膏,

浮萍丸, 通竅活血湯의 빈도가 높았고 外用藥으로는 補骨脂煎, 密陀僧散, 玉粉膏가 많이 언급되었다. 또한 外用, 塗布로는 硫黃, 蛇蛻皮, 鱧鱺魚, 補骨脂 등이 다용되었다¹⁰⁾. 이 중 補骨脂는 백반증에 外用으로 많이 사용되었고, 약리작용으로 melanin 색소 신생작용이 밝혀져 있다¹¹⁻¹⁴⁾.

백반증 또는 멜라닌 세포에 대한 연구로는 강 등¹⁵⁾, 지 등¹⁰⁾이 백반증에 대한 문헌적 고찰, 박 등¹⁶⁾, 박 등¹⁷⁾, 임 등¹⁸⁾의 미백에 관한 실험적 고찰, 정 등¹⁹⁾, 서²⁰⁾의 멜라닌 합성에 관한 실험적 고찰로, 정 등⁶⁾의 백반증 환자에 관한 임상적 고찰 등이 있다. 특히 정 등⁶⁾의 백반증 환자에 관한 임상적 고찰에서 補骨脂 외용제를 이용하여 유효한 결과를 보고 하였으나, 1례의 보고라 많은 부족함이 있다.

이에 저자는 補骨脂에 관한 문헌적 내용과 정 등⁶⁾의 결과를 기초로 하여 酒精의 차이에 따른 효과를 알아보기 위하여 補骨脂를 高粱酒와 燒酒로 추출하여 멜라닌 합성에 관한 영향을 살펴보고자 B16 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 형성과정에서 가장 중요한 효소인 tyrosinase 활성도와 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였으며 western blot 을 실시하였다.

補骨脂의 高粱酒와 燒酒 추출물의 독성에 관한 실험에서는 0에서 50 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리한 결과 농도 의존적으로 세포생존율이 감소하였으며, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 74%, 73%의 생존률을 보였다. 따라서 세포 생존률을 감안하여 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 Tyrosinase 활성도, 멜라닌 합성 등의 실험을 진행하였다.

tyrosinase 활성도에 있어서 高粱酒 추출물은 4, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 제외하고 농도별로 증가하였으며 5 $\mu\text{g/ml}$ 를 제외한 모든 농도에서 유의성이 있었고, 燒酒 추출물은 다소 농도 의존적이기는 하였으나 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서만 유의성이 있어, 酒精의 농도가 높은 것이 tyrosinase 활성에 보다 효과적인 결

과를 보였다.

멜라닌 합성에 있어서 高粱酒 추출물은 4, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 제외하고 농도별로 증가하였으나 유의성은 없었으며, 燒酒 추출물 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 제외하고 농도별로 증가하였으며 3, 4 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의성이 있어, 앞서의 결과와는 다르게 燒酒 추출물이 유의한 결과를 보여 酒精의 농도가 낮은 것이 멜라닌 합성에 보다 효과적인 결과를 보였다.

western blot을 실시한 결과 단백질의 양이 일정한지 확인하는 actin의 양은 변화가 없었으나 tyrosinase의 양은 증가하여 tyrosinase의 활성도가 입증되었다.

위의 결과로 tyrosinase 활성에 가장 효과적인 농도는 高粱酒 3 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도였으며, 멜라닌 합성에 가장 효과적인 농도는 燒酒 3 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로나타나 高粱酒(50%)와 燒酒(21%) 중간의 酒精으로 추출물 3 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 가장 좋은 효과가 나타날 것으로 기대된다.

V. 結 論

補骨脂의 高粱酒, 燒酒 추출물이 B16 melanoma 세포에서 멜라닌 색소 형성에 어떠한 영향을 나타내는지를 알아보고자 멜라닌 합성에 대한 영향을 판단할 수 있는 tyrosinase 활성과 최종산물인 멜라닌의 정량측정을 시행한 연구에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 補骨脂의 高粱酒, 燒酒 추출물은 농도 의존적으로 세포독성을 나타내었으며, 5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 74%, 73%의 세포 생존률을 나타내었다.
2. tyrosinase 활성도에 있어서 補骨脂 高粱酒 추출물은 0.5, 1, 2, 3 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의성을 보였으며 농도 의존적으로 증가하였고, 補骨脂

燒酒 추출물은 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서만 유의성을 보였다.

3. 멜라닌 합성에 있어서 補骨脂 高粱酒 추출물은 4, 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 제외하고 농도별로 증가하였으나 유의성은 없었으며, 補骨脂 燒酒 추출물 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 제외하고 농도별로 증가하였으며 3, 4 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의성이 있었다.
4. Western blot으로 tyrosinase protein level을 확인한 결과, 補骨脂의 高粱酒, 燒酒 추출물 모두 tyrosinase 활성 증가와 비슷한 경향으로 농도가 높아질수록 증가함을 알 수 있었다.

위의 결과로 tyrosinase 활성에 가장 효과적인 농도는 高粱酒 3 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도였으며, 멜라닌 합성에 가장 효과적인 농도는 燒酒 3 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 나타나 高粱酒(50%)와 燒酒(21%) 중간의 酒精으로 추출물 3 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 가장 좋은 효과가 나타날 것으로 기대된다.

參考文獻

1. 강원형. 피부질환 아트라스. 서울:한미의학. 2003:227-31.
2. 이무형, 김진환, 박재경, 허충림. 배양 정상 인체 멜라닌세포의 성장과 멜라닌화에 L-티로신의 영향. 대한피부과학회지. 1996;34(1):25-30.
3. 오한철, 홍철희, 이수형, 황충연, 김남권. 더덕 분획별 추출액이 멜라닌 생성에 미치는 영향. 대한안이비인후피부과학회지. 2004;17(2):59-71.
4. 전국 한의과대학 피부외과학 교재편찬위원회. 한의피부외과학. 부산:선우. 2007:453.
5. 이상인, 안덕균, 신민교. 한약임상응용. 서울:성보사. 1982:382.
6. 정재호, 서형식. 백반증의 치험 1례. 한방안이비인후피부과학회지. 2005;18(3):121-12
7. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, Garcia-Borrón JC. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. Eur J Biochem. 1998;255:139-46.
8. 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;45:1474-8.
9. Pawelek J, Korner A, Bergstrom A, et al. New regulation of melanin biosynthesis and autodestruction of melanoma cells. Nature. 1980;286:617-9.
10. 지선영, 권영규, 신상기. 백반증의 동서의학적 고찰. 제한동의학술원 논문집. 1999;4(1):262-85.
11. 지형준, 이상인 編著. 대한약전의 한약(생약)규격집 주해서. 서울:한국메디칼인텍스사. 1997:174.
12. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 외. 완역 중약대사전 4권. 서울:도서출판 정담. 1997:1779-84.
13. 과학·백과사전출판사 편. 약초의 성분과 이용. 서울:일월서각. 1994:336-8.
14. 서부일, 최호영 共編著. 임상한방본초학. 서울:도서출판 영림사. 2004:819-22.
15. 강경준, 안철. 백전풍, 백박풍의 치료에 대한 문헌적 고찰. 대한외관과학회지. 1990;3(1):109-26.
16. 박지선, 김용수, 이진우, 박협우, 전병훈, 우원홍, 정우열. 백출추출액이 멜라닌 생성에 미치는 영향. 대한동의병리학회지. 1999;13(2):91-8.
17. 박지선, 남우열, 문연자, 조광호, 전병훈, 우원홍. B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 대한 서시옥용산의 효과. 대한동의병리학회지. 2000;14(1):160-70.

18. 임덕우, 이진우, 이무형. 감초추출액이 멜라닌 세포의 증식과 멜라닌화에 미치는 영향. 경희 의학. 2000;16(2):143-50.
19. 정재호 서형식. 보골지 추출물이 B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 미치는 영향. 대한한의학회지. 2005;26(3):55-65
20. 서형식. 자하거 약침액이 B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 미치는 영향. 대한약침 학회지, 2006;9(1):75-82.