

Original Article / 원저

## B16/F10 흑색종양세포에서 삼내자 메탄올 추출물의 멜라닌 생성에 미치는 억제효과

윤정원 · 한정민 · 윤화정 · 고우신  
동의대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실

### Inhibitory Effects of Methanol Extract of *Kaempferia galanga* on melanogenesis in B16/F10 Melanoma Cells

Jung-Won Yoon · Jung-Min Han · Hwa-Jung Yoon · Woo-Shin Ko

Dept. of Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology, Dong-eui University

#### Abstract

**Objective:** Recently the demands for the effective and safe depigmentative and anti-aging agents of the skin have increased due to the medical, pharmaceutical and cosmetic reasons. The purpose of this study is to investigate the MKG(Methanol Extract of *Kaempferia galanga*) and their dermal bioactivity properties related to cosmeceuticals such as depigmentation.

**Methods:** We assessed inhibitory effects of MKG on melanin production in B16/F10 melanoma cells, on mushroom tyrosinase activity, effects of MKG on the expression tyrosinase, TRP-1, TRP-2, GSK-3 $\beta$ , CREB, MITF in B16/F10 melanoma cells without cytotoxicity range. Cell viability was measured by MTT assay and tyrosinase activity was assessed using by DOPA staining, western-blot analysis.

We measured inhibition of melanin synthesis and tyrosinase activity by down-regulation of melanogenic enzyme expressions in  $\alpha$ -MSH induced melanogenesis B16/F10 melanoma cells.

**Results:** MKG inhibited tyrosinase-activity, total melanin contents and dendrite out-growth. MKG inhibited melanogenesis by down-regulation of tyrosinase, TRP-1, TRP-2, CREB, and MITF in B16/F10 cells. The treatment with MKG at the 12.5, 25  $\mu$ g/ml level significantly inhibited the melanin synthesis induced  $\alpha$ -MSH in B16/F10 melanoma cells compared with untreated control.

**Conclusion:** These results suggest that MKG inhibit melanin biosynthesis which is involved in hyper-pigmentation. So MKG is considered to be used as a whitening components reducing cytotoxicity.

**Key words :** MKG; melanogenesis; tyrosinase; TRP-1; TRP-2; GSK-3 $\beta$ ; CREB; MITF; depigmentation

## 1. 서 론

최근 환경오염에 의한 오존층 파괴, 환경 호르몬 증가, 각종 스트레스로 인하여 인체는 많은 악영향을 받고 있다. 그 중 피부는 자외선에 의해 화상이나 홍반, 멜라닌 색소침착, DNA 손상을 받게 되고, 만성 노출 시 피부주름 및 피부암을 유발할 수도 있으며 각종 스트레스 그리고 임신이나 폐경 등으로 인해 멜라닌 증가가 일어나 부분적으로 과도한 색소 침착이 일어날 수 있다<sup>1)</sup>.

멜라닌은 피부 표면의 표피 기저층에 존재하는 멜라닌세포의 멜라닌소체에서 합성되어, 수지상 돌기를 통해 표피의 각질형성세포로 이동되어 피부색을 나타내는 색소이고, 자외선에 의해 생성된 oxygen free radical을 제거하여 피부를 보호하는 긍정적인 기능을 하고 있다. 그러나 과도한 멜라닌 생성으로 인해 색소가 침착되어 기미, 주근깨 및 피부반점을 형성하고 피부노화 및 피부암 등 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>2,3)</sup>.

피부의 색소 침착 반응은 자외선에 의해 각질형성세포와 멜라닌세포에서  $\alpha$ -MSH가 세포막 수용체와 결합, 세포내 cAMP 양을 증가시켜 PKA, tyrosinase의 활성을 유도하는 과정으로 설명하고 있다. tyrosinase는 tyrosine을 DOPA, DOPA quinone으로 전환시키고, DOPA quinone은 자동 산화 효소 반응으로 DOPA chrome을 거쳐 TRP-1과 TRP-2에 의해 멜라닌을 생성한다<sup>4,5)</sup>.

화장품 시장에서 사용되는 미백물질은 작용기전에

따라 tyrosinase 효소 활성을 억제하는 kojic acid, arbutin과 vitamin C, hydroquinone 등과 자외선 차단제나 산란제, 각질층의 턴-오버 촉진, 활성 산소종을 소거하는 토크페롤 등으로 분류할 수 있다. 그러나 이런 물질들은 불안정하여 피부 알려지나 독성을 나타내기도 하며 분해나 착색, 이취, 효과의 불분명 및 안전성 문제 등으로 그 사용이 제한되고 있다<sup>6,7)</sup>. 따라서 안전하면서도 미백활성이 높은 새로운 물질의 개발이 요구되고 있으며, 보다 안전하고 효율적인 천연 한방 성분에 대한 관심이 높아지고 있다.

기존의 미백물질보다 안전하고 우수한 효과를 지닌 한약재를 탐색하기 위한 연구의 일환으로 피부질환에 사용되는 약재를 검색해 본 결과, 외용제 西施玉容散<sup>8,9)</sup>의 구성 약물인 삼내자(三乃子: *Kaempferia galanga*)가 색소침착증상에 다용되었고, 최근 미백항산화항염 효과에 집중되어 연구되고 있음을 알 수 있었다<sup>10)</sup>. 삼내자와 관련된 국내 연구로 미백 화장료 조성물<sup>11)</sup>, 미백 치약 조성물<sup>12)</sup>, 미용 비누<sup>13)</sup> 등이 있으며, 국외 연구로는 항염증작용과 통증의 완화, 상처 치료 등의 연구가 진행되고 있다<sup>14-16)</sup>. 그러나 삼내자 단독 추출물의 미백효과에 대한 연구는 미진하여 본 연구를 시행하였다.

본 연구에서는 삼내자를 메탄올 추출하여, B16/F10 melanoma cell에서 tyrosinase활성도, 총 멜라닌 양, DOPA 염색을 통한 수지상돌기의 변화, 세포 내 전사효소 활성을 조사하였다. 또한  $\alpha$ -MSH로 유도된 과색소 침착에 대하여 삼내자 메탄올 추출물(MKG: Methanol extract of *Kaempferia galanga*)이 멜라닌 합성을 억제하는지 알아보고, 멜라닌 합성 기전 중 어떠한 신호 전달체계에 관련하는지 실험하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

교신저자 : 고우신, 부산광역시 부산진구 양정2동 산 45-1 동의의료원  
(Tel : 051-850-8658, E-mail : wsko@deu.ac.kr)

• 접수 2013/1/11 • 수정 2013/2/8 • 채택 2013/2/15

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

실험에 사용된 삼내자(*Kaempferia galanga*)는 신우약업사(서울)에서 구입한 국산 규격품을 정선하여 원광대학교 한의학전문대학원의 약재보관 냉동고에 보관하여 사용하였다.

#### 2) 세포주 및 세포배양

한국 세포주 은행에서 분양받은 B16/F10 melanoma cell을 10% FBS가 첨가된 DMEM을 사용하여 CO<sub>2</sub> incubator(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

#### 3) 시약

DMEM, FBS은 Gibco(NY, USA)사, goat polyclonal IgG tyrosinase, TRP-1, TRP-2, tyrosinase는 Santa Cruz(CA, USA)사, rabbit polyclonal IgG phospho-CREB, phospho-Akt, phospho-GSK-3 $\beta$ 는 Cell Signaling(Danvers, MA, USA)사, anti-Goat, anti-Rabbit, anti-Mouse IgG HRP conjugate antibody, hybond-ECL nitrocellulose membrane, western blotting detection reagent는 Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England)사, non-fat skim milk는 Becton(Le Pont de Claix, France)사, DMSO,  $\alpha$ -MSH, BSA, PMSF, leupeptin, aprotonin, sodium fluoride(NaF), sodium orthovanadate(Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(TEMED), MTT, L-DOPA은 Sigma Chemical Co(St. Louis, MO, USA)사, 단백질 정량 시약은 Bio-Rad(CA, USA)사 제품을 사용하였다.

#### 4) 사용기기

Centrifuge HA-12, Clean bench, CO<sub>2</sub> incubator, Micro 17TR centrifuge는 한일기기사(Inchun, Korea),

ELISA reader는 Bio-TEK사(Winooski, USA), Electrophoresis power supply는 Amersham사 (Buckinghamshire, England), ChemidocXRS image analysis는 Bio-rad사(CA, USA) 제품을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 시료의 추출

삼내자 200 g에 100% methanol 1000 ml를 가하고 밀봉하여 24시간 동안 실온에서 진탕하고 1시간 초음파분쇄기로 처리하였으며, 동일한 과정을 3회 반복하였다. 이를 거즈로 여과하여 냉동건조기를 이용하여 감압 농축 후 9.91 g의 시료(수득률: 4.96%)를 얻어 냉장 보관하였다. MKG는 분주하여 DMSO에 녹여 사용하였다.

#### 2) 세포독성(cell cytotoxicity) 측정

B16/F10 melanoma cell을 serum-free DMEM배지를 사용하여 CO<sub>2</sub> incubator(37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였으며, 세포생존을 측정은 Mosmann의 방법<sup>17)</sup>에 의하여 실시하였다. 24 well plate 각 홀에 B16/F10 melanoma cell 3 $\times$ 10<sup>4</sup> 개를 분주하여 24시간동안 배양한 후, MKG를 농도별로 처리한 다음 72시간 배양하였다. 배양완료 후 0.05% MTT용액을 넣어 2시간 37°C에서 배양한 다음, 상층액을 제거하고 formazan 침전물에 1 ml의 DMSO를 넣어 약 15분간 실온에서 방치한 후, 540 nm의 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 계산하였다.

#### 3) B16/F10 melanoma cell의 tyrosinase 활성 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Matinez-Esparza 등의 방법<sup>18)</sup>으로 측정하였다. B16/F10 melanoma cell을 6 well 배양용기에 5 $\times$ 10<sup>4</sup>/well씩 분주하여 24시간 동안 배양하여 세포를 부착시킨 후, 시료와  $\alpha$ -MSH(100  $\mu$ M)을 각각 처리하고 3일간 배양하였다.

배양이 끝난 세포는 PBS로 세척하고 lysis buffer(5 mM EDTA, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0), triton X-100, 0.1 M PMSF)로 세포를 용해하였다. 4°C, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리를 하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성측정 용액으로 사용하였고, Bio-rad protein assay 용액으로 595 nm에서 흡광도를 측정, 동량의 단백질 양을 계산하였다. 시료 50  $\mu$ l와 0.1 M sodium phosphate buffer 150  $\mu$ l, 0.1 M catechol 50  $\mu$ l를 분주하여 혼합한 후 ELISA reader기로 37°C에서 405 nm의 파장으로 1시간동안 10분 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다. 활성율은 대조군의 흡광도를 기준으로 한 백분율로 환산하여 결과로 나타내었다.

$$\text{Tyrosinase 활성율(\%)} = \frac{\text{시료가 첨가된 용액의 흡광도}}{\text{대조물질의 흡광도}} \times 100$$

#### 4) B16/F10 melanoma cell의 멜라닌 측정

멜라닌 정량은 Hosoi 등의 방법<sup>19)</sup>을 변형하여 사용하였다. B16/F10 melanoma cell을 직경 10 cm 배양용기에  $1 \times 10^5$ /dish개씩 분주하여 부착 후, MKG와  $\alpha$ -MSH (20 nm)를 각각 처리하여 3일 동안 배양하였다. 각 군당  $2 \times 10^6$ 개의 세포를 수거하여 멜라닌을 측정하였다. Lysis buffer(5 mM EDTA, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0), Triton X-100)로 세포를 용해하고 원심 분리하여 얻은 세포침전물에 알코올을 가하여 세척한 후 건조시켰다. 1% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액에 85°C에서 1시간 동안 멜라닌을 용해시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5) Cell-free tyrosinase 측정

tyrosinase의 활성 측정은 L-DOPA를 기질로 하여 475 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 측정 방법은 0.1 mM potassium phosphate buffer를 160  $\mu$ l와 0.01%의 L-DOPA를 20  $\mu$ l를 넣고 시료와 효소액(mushroom tyrosinase)을 각각 10  $\mu$ l를 첨가한 후

37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 475 nm에서의 흡광도를 측정하여 대조군의 흡광도를 기준으로 한 백분율로 환산하여 tyrosinase 활성도를 결과로 나타내었다.

#### 6) DOPA 염색

B16/F10 melanoma cell을 chamber slide(8 chamber, Nunc)에 배양하고 일정시간 시료를 처리한 후 5% formalin 용액으로 고정하였다. 0.1% DOPA 용액으로 염색하고 탈수하여 봉입한 후 광학 현미경으로 관찰하였다<sup>20)</sup>.

#### 7) Western blot 분석

B16/F10 melanoma cell을 10 cm 배양용기에  $2 \times 10^5$  개의 세포를 부착시키고 12.5, 25  $\mu$ g/ml의 시료를 처리한 후 3일 동안 배양하였다. 배양된 세포를 모두 수거하여 세포침전물을 세포용해액(Nonidet P-40, Sodium dodecyl sulfate, 0.1 M Tris-HCl(pH 7.2), 100 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin)에 용해시킨 후 13,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 취하였다. 총 단백질량은 Bio-rad protein assay 용액을 이용하여 정량하였고, 50  $\mu$ g 단백질과 2X sample buffer(1 ml of glycerol, 0.5 ml of  $\beta$ -mercaptoethanol, 3 ml of 10% SDS, 1.25 ml of 1 M Tris-HCl, 1~2  $\mu$ g of bromophenol blue)를 동량으로 혼합한 후 7.5% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. Nitrocellulose membrane에 전이시키고 5% non-fat skim milk로 blocking 시킨 후, tyrosinase, actin, TRP-1, TRP-2의 일차항체를 1:500으로 희석하여 각각 실온에서 3시간 반응시켰다. TBST로 3회 세척한 후, tyrosinase는 anti-rabbit HRP로, actin, TRP-1 및 TRP-2는 goat polyclonal IgG로 2차 antibody를 1:1000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. TBST로 세척한 후, ECL solution으로 발광 후 ChemidocXRS image analysis를 이용하여 band의 사진을 촬영하였다.

## 8) 통계처리

실험 결과는 One way ANOVA test를 이용하여 p-value를 구하여 유의성을 검증하였다.

## III. 실험 결과

### 1. 삼내자 메탄올 추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향

#### 1) 세포 생존율

MKG의 B16/F10 melanoma cell에 대한 처리 농도를 결정하기 위하여 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하고 72시간 후 MTT assay 방법으로 세포생존율을 조사하였다.

실험 결과 MKG 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 B16/F10 melanoma cell의 세포 생존율은 각각 대조군의 94%, 93%, 87%, 66%, 19%로 나타났다(Fig. 1). 따라서 MKG는 B16/F10 melanoma cell에 대한 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 66%와 19%로 현저한 감소를 나타냈다.

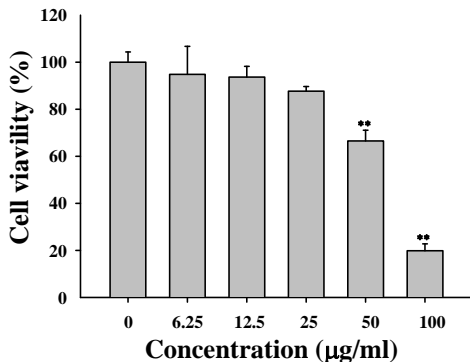


Fig. 1. Effects of MKG on cell viability.

B16/F10 cells were serum-starved for 24 hours and MKG was added to serum-free medium at 6.25 ~ 100  $\mu\text{g/ml}$  for 72 hours. Cell viabilities were measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are means  $\pm$  S.D. of three experiments performed in triplicate. \*\*p(0,01): compared to control.

#### 2) Tyrosinase 활성도

MKG가 B16/F10 melanoma cell의 tyrosinase 효소 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, MKG 12.5  $\mu\text{g/ml}$  과 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 대조군의 92%, 71%로 나타났다(Fig. 2).

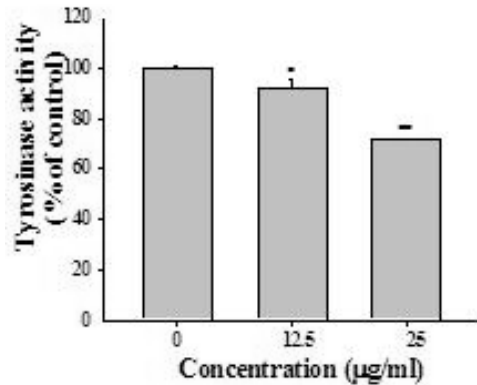


Fig. 2. Effects of MKG on tyrosinase activity.

The effect on tyrosinase activity was tested with various doses of MKG in B16/F10 cells for 3 days. Data are expressed as percent (%) of control and each column represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments performed in triplicate. \*p<0,05, \*\*p<0,01: compared with control.

#### 3) 총 멜라닌 양

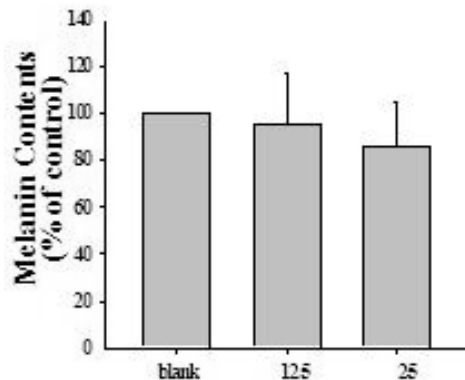


Fig. 3. Effects of MKG on melanin contents.

Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of MKG, and cultured for 3 days. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means  $\pm$  S.D. of three experiments performed in triplicate.

본 연구에서 MKG가 B16/F10 melanoma cell의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MKG를 12.5  $\mu\text{g/ml}$ 와 25  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하여 3일간 배양한 후 총 멜라닌 양을 측정하였다. 그 결과 MKG 12.5  $\mu\text{g/ml}$ 와 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 대조군의 95%, 86%로 나타나(Fig. 3), MKG는 멜라닌 합성을 감소시킴을 알 수 있었다.

#### 4) DOPA 염색

멜라닌 세포는 일반적인 염색방법으로 염색되지 않으나 DOPA를 처리하면 멜라닌 세포의 tyrosinase 효소에 의하여 산화되어 암갈색 침착물을 형성하므로 DOPA염색을 이용하여 멜라닌 세포내에 생성된 멜라닌 양을 형태적으로 관찰하였다.

본 실험에서 MKG를 각각의 농도별로 처리한 후 3일 동안 배양하였다. 배양 후 DOPA 염색을 실시하여 세포내 tyrosinase의 형태학적 활성을 관찰하였다. 실험결과, MKG 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 대조군에 비하여 수직상 돌기가 감소하였고 DOPA의 염색강도가 떨어졌음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

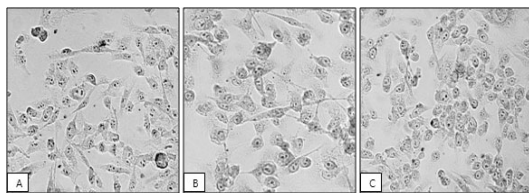


Fig. 4. Observation of tyrosinase activity by DOPA stain after treatment with MKG.

Cells were incubated with MKG at 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$ . After 3 days, cells were stained with DOPA as described in Materials & Methods. A: control, B: 12.5  $\mu\text{g/ml}$  MKG, C: 25  $\mu\text{g/ml}$  MKG.

#### 5) Cell-free system에서 삼내자 메탄올 추출물의 효과

Mushroom tyrosinase의 저해제는 tyrosinase 활성부위 구리이온의 상태 변화에 관여함으로써 tyrosinase의 산화, 환원 과정을 조절할 수 있기 때문에 mushroom tyrosinase를 이용한 시험관 내 tyrosinase

활성 억제 실험은 피부 미백제의 개발에 있어서 유용한 일차 평가법으로 인정되고 있다.

본 실험에서 Mushroom tyrosinase를 이용하여 MKG의 직접적인 tyrosinase 억제 효과를 실험하였다. 실험결과, MKG는 직접적으로 mushroom tyrosinase 효소의 활성을 억제하지 않았다(Fig. 5).

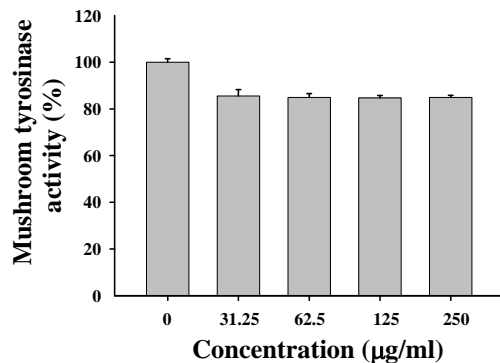


Fig. 5. Effects of MKG on tyrosinase activity in cell-free system.

The direct effect of MKG on cellular tyrosinase activity was measured as described in Materials and Methods. Data are expressed as percent (%) of control and each column represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments performed in triplicate.

#### 6) 멜라닌 합성 관련 단백질 발현에 미치는 영향

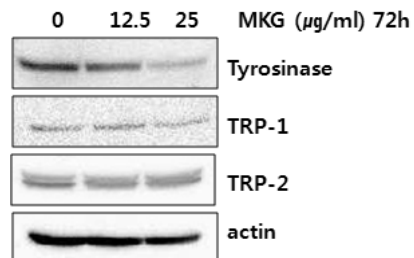


Fig. 6. Effects of MKG on the tyrosinase, TRP-1, and TRP-2 protein expressions in B16/F10 cells.

B16/F10 cells were incubated with MKG. After 3 days, cells were analysed using Western blotting as described in materials & methods.

MKG가 B16/F10 melanoma cell의 tyrosinase, TRP-1 그리고 TRP-2 단백질 발현을 조절하는지 알아보기 위해 Western blot을 시행했다. 실험 결과

MKG 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 구간에서 tyrosinase, TRP-1은 농도 의존적으로 단백질 발현이 감소하였다(Fig. 6).

7) GSK-3 $\beta$  발현에 미치는 영향

tyrosinase, TRP-1, TRP-2 의 발현과 멜라닌 생성을 조절하는 인자인 MITF의 활성화는 AKT, GSK-3 $\beta$ 의 인산화와 연관이 있다. Wnt signal로도 잘 알려져 있는 GSK-3 $\beta$ 는 AKT의 인산화에 의해 조절된다.

본 연구에서 MKG가 GSK-3 $\beta$ 의 인산화에 어떠한 영향을 미치는지 실험해 본 결과 MKG 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 GSK-3 $\beta$ 의 9번 세린의 인산화 발현이 대조군과 비교했을 때 차이가 나타나지 않았다(Fig. 7).

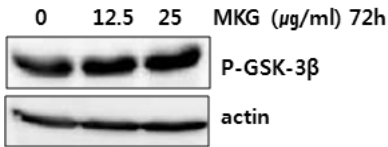


Fig. 7. Effects of MKG on the GSK-3 $\beta$  protein expressions in B16/F10 cells.

B16/F10 cells were incubated with MKG. After 3 days, cells were analysed using Western blotting as described in materials & methods.

8) CREB 발현에 미치는 영향

MKG가 CREB의 인산화에 어떠한 영향을 미치는지 실험해 본 결과 MKG 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 농도 의존적으로 CREB의 인산화가 억제된 것을 확인하였다(Fig. 8).

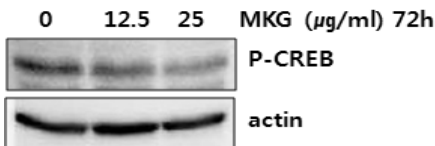


Fig. 8. Effects of MKG on the p-CREB protein expressions in B16/F10 cells.

B16/F10 cells were incubated with MKG. After 3 days, cells were analysed using Western blotting as described in materials & methods.

9) MITF 발현에 미치는 영향

MKG가 CREB의 인산화 억제를 통해 MITF의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 MKG를 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 72시간 배양하였다. 실험결과 MKG에 의해 MITF의 발현이 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 9).

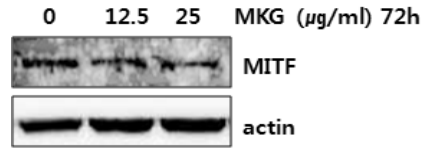


Fig. 9. Effects of MKG on the MITF protein expressions in B16/F10 cells.

B16/F10 cells were incubated with MKG. After 3 days, cells were analysed using Western blotting as described in materials & methods.

2.  $\alpha$ -MSH 유도 과색소 침착에 대한 삼내자 메탄올 추출물의 효과

MKG가  $\alpha$ -MSH receptor를 경유한 멜라닌 생성에 영향을 미치는지 조사하고자,  $\alpha$ -MSH 자극에 의해 과색소 형성을 유도한 후 MKG를 병용 처리하여 살펴보았다.

1) Tyrosinase 활성도

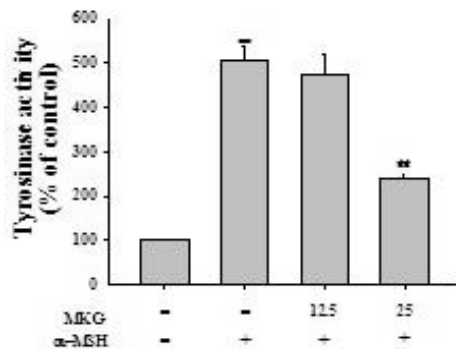


Fig. 10. Effects of MKG on tyrosinase activity in  $\alpha$ -MSH stimulated cells.

The effect on tyrosinase activity was tested with various doses of MKG and  $\alpha$ -MSH in B16/F10 cells for 3 days. Data are expressed as percent (%) of control and each column represents the mean  $\pm$  S.D. of at least three experiments performed in triplicate. \*\*p<0.01: compared to control, \*\*p<0.01: compared to the  $\alpha$ -MSH treated group.

MKG가 멜라닌을 생성하는 세포 수준에서 미백 효과가 있는지를 확인하기 위하여 B16/F10 melanoma cell의 tyrosinase 효소 활성에 미치는 영향을 조사한 결과,  $\alpha$ -MSH 처리군은 tyrosinase 활성이 534%로 대조군의 약 5배 증가하였으며 MKG와 병용 처리군의 경우 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 대조군에 비하여 512%, 234%로 나타났다(Fig. 10). 따라서 MKG는 특히 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서  $\alpha$ -MSH 처리군에 비하여 56.2% tyrosinase 활성을 억제하였다.

## 2) 총 멜라닌양

본 연구에서 MKG가 B16/F10 melanoma cell에 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여  $\alpha$ -MSH와 MKG를 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하여 3일간 배양한 후 총 멜라닌 양을 측정하였다.

$\alpha$ -MSH 처리군은 총 멜라닌양이 235%로 대조군의 약 2.3배 증가하였으며, MKG와 병용 처리군의 경우 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 194%, 115%로 나타났다(Fig. 11). 특히 MKG는 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서  $\alpha$ -MSH 처리군에 비하여 51.1% 멜라닌 합성을 억제하였다.

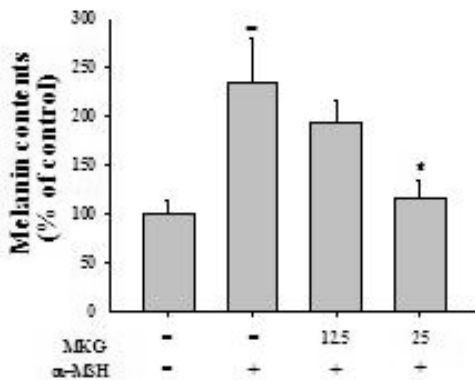


Fig. 11. Effects of MKG on melanin contents in  $\alpha$ -MSH stimulated cells.

B16/F10 cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of MKG and  $\alpha$ -MSH for 3 days. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means  $\pm$  S.D. of three experiments performed in triplicate. \*\*p<0.01: compared to control group, #p(0.05): compared to the  $\alpha$ -MSH treated group.

## 3) DOPA 염색

본 연구에서 DOPA 염색을 통하여 MKG의 멜라닌 합성 억제 효과를 형태적으로 관찰하기 위하여 MKG와  $\alpha$ -MSH를 병용처리하고 3일간 배양한 후 대조군과 비교하였다. 실험결과,  $\alpha$ -MSH 처리군에서는 수지상 돌기와 멜라닌 생성이 현저히 발달하였다. 그러나 MKG 병용처리군은  $\alpha$ -MSH 처리군에 비하여 수지상 돌기가 감소하였고 색깔이 옅어졌음을 확인할 수 있었다(Fig. 12).

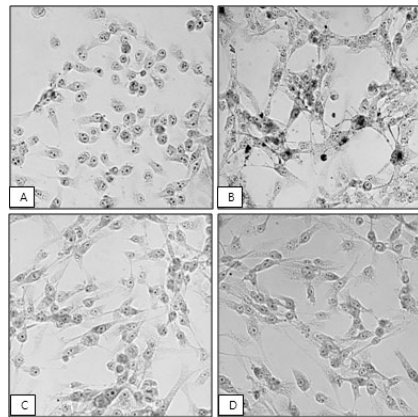


Fig. 12. Observation of tyrosinase activity by DOPA stain after treatment with MKG and  $\alpha$ -MSH.

Cells were incubated with MKG and  $\alpha$ -MSH. After 3 days, cells were stained with DOPA as described in Materials & Methods. A: control, B:  $\alpha$ -MSH, C:  $\alpha$ -MSH+12.5  $\mu\text{g/ml}$  MKG, D:  $\alpha$ -MSH+25  $\mu\text{g/ml}$  MKG.

## 4) 멜라닌 합성 관련 단백질 발현에 미치는 영향

MKG가  $\alpha$ -MSH에 의한 과색소 침착 시 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현에 미치는 영향을 Western blot을 이용하여 조사하였다. 실험결과  $\alpha$ -MSH 단일 처리군에 비해 MKG를 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도별로 처리 시 대조군에 비해 tyrosinase 단백질 발현이 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었으며 TRP-2 단백질 발현도 약간 감소된 것을 확인할 수 있었다. TRP-1 단백질 발현의 차이는 크게 확인할 수 없었다(Fig. 13).



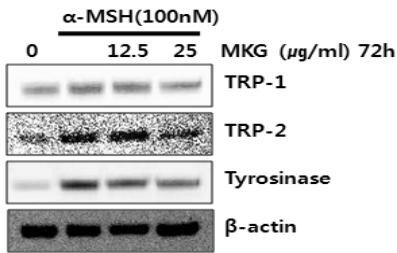


Fig. 13. Effects of MKG and  $\alpha$ -MSH on tyrosinase protein expression.

Cells were incubated with MKG and  $\alpha$ -MSH. After 3 days, whole cell lysates were then subjected to Western blot analysis using antibodies against tyrosinase as described in Materials & Methods.

#### 6) CREB 발현에 미치는 영향

본 연구에서  $\alpha$ -MSH로 유도된 멜라닌 합성에서 MKG가 CREB의 인산화에 어떠한 영향을 미치는지 실험해 본 결과 MKG 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  에서 CREB의 인산화가 농도 의존적으로 억제된 것을 확인하였다 (Fig. 14).

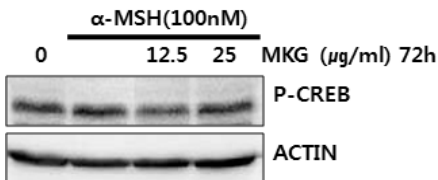


Fig. 14. Effects of MKG and  $\alpha$ -MSH on CREB protein expression.

Cells were incubated with MKG and  $\alpha$ -MSH. After 3 days, whole cell lysates were then subjected to Western blot analysis using antibodies against tyrosinase as described in Materials & Methods.

#### 7) MITF 발현에 미치는 영향

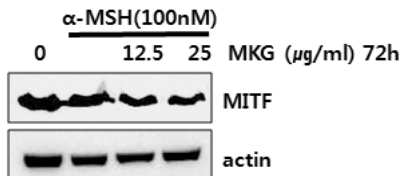


Fig. 15. Effects of MKG and  $\alpha$ -MSH on MITF protein expression.

Cells were incubated with MKG and  $\alpha$ -MSH. After 3 days, whole cell lysates were then subjected to Western blot analysis using antibodies against tyrosinase as described in Materials & Methods.

$\alpha$ -MSH로 유도된 멜라닌 합성에 대해 MKG가 MITF의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 실험해 본 결과 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  처리 농도구간 모두 MITF의 발현이 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 15).

### IV. 고찰

피부색을 결정하는 인자는 피부의 melanin, 진피층의 hemoglobin, 피하조직에 분포하는 carotene 3 가지에 의해서 결정되는데, 이 중 가장 중요한 역할을 하는 것이 melanin이다<sup>21)</sup>. melanin의 가장 주된 역할은 피부에서 발생하는 active oxygen이나 free radical을 제거하고, 자외선 투과를 막아 피부의 내부를 보호하는 것이다.

melanin은 인체 내에서 피부, 모발구, 눈, 귀, 대뇌에 분포하며, 멜라닌세포에 의해 방출되는 페놀류의 고분자 물질로 피부와 머리카락 색을 결정하는 중요한 인자로<sup>22)</sup>, 자외선(UV)등 외부 스트레스에 의해 melanin 세포, melanin 세포 주변의 섬유아세포, 각질형성세포, 염증세포가 출현하고, prostaglandin, 여러 가지 cytokine,  $\alpha$ -MSH의 변화 등이 연관되어 색소 침착이 조절된다<sup>23)</sup>. 특히 각질형성세포에서 분비된  $\alpha$ -MSH, ACTH,  $\beta$ -endorphin 등 여러 인자가 멜라닌 세포의 성장과 형태 및 분화에 영향을 미치며, 궁극적으로 멜라닌은 수상돌기를 통하여 다시 각질형성세포에 전해져서 스트레스에 의한 세포 상해를 억제하는 작용을 나타내게 한다<sup>24)</sup>.

melanogenesis는 피부의 melanocyte에서 melanin이 생성되는 과정으로, 대표적인 관여효소는 tyrosinase이다. tyrosinase는 멜라닌 합성과정의 주요한 속도 조절적 단계(rate-limiting step)를 나타내는 효소로, 생체 내 아미노산인 tyrosine이 L-DOPA, DOPA quinnone으로 산화되는 과정에 관여한다. DOPA quinnone은 두 가지 다른 경로를 통해 pheomelanin과 eumelanin을 생합성하게 되는 중요한 전구물질로

서 작용하게 된다. brownish-black을 띄는 eumelanin을 생성하는 eumelanogenesis를 살펴보면 DOPA quinone이 DOPA chrome으로 변환되고, DOPA chrome이 TRP-2에 의해 DHICA가 되고 다시 TRP-1에 의해 DHICA eumelanin이 된다. 한편 DOPA chrome이 환원 및 탈탄산반응에 의해 DHI가 생성되고 tyrosinase oxidase에 의해 Indole-5, 6-quinone로 전환되어 DHI eumelanin이 최종적으로 생성된다. 그리고, yellow~reddish-brownish을 만드는 pheomelanogenesis는 cysteine, glutathione과 같은 황 함유 아미노산의 농도가 높은 경우 DOPA quinone이 cysteinyl DOPA를 형성하고 몇 차례의 전환을 거쳐 pheomelanin으로 생성되는 경로이다. 일반적으로 melanin이라고 하면 eumelanogenesis에 의해 생성된 eumelanin을 지칭한다<sup>25)</sup>. 이후 멜라닌소체에서 생산된 melanin은 수지상 돌기를 통하여 표피의 각질화세포로 전달되어 turn-over에 의해 표면으로 이동, 최종적으로 분리 탈락된다.

최근 미백 기전과 관련된 연구는 다음의 3가지 관점에서 연구되어 왔다. 첫째, melanin 합성의 주효소인 tyrosinase 활성 조절하기 위하여 tyrosinase 합성 저해물질이나 tyrosinase의 기질에 대한 길항물질을 개발하고, 둘째 melanin 생합성 장소인 멜라닌 세포의 기능을 저하시키기 위해 멜라닌 세포에 독성을 나타내는 물질을 개발하며, 셋째로 멜라닌 생성기구인 tyrosinase와 DOPA chrome에서 DHICA로의 변환을 촉매하는 TRP-2, DHICA에서 indole-5, 6-quinone-2-carboxylic acid로 변환을 촉매하는 TRP-1의 활성을 동시에 감소시키는 방향으로 연구되고 있다<sup>26)</sup>.

피부색 및 피부 색소 침착은 각질형성세포에 있는 멜라닌 양과 분포에 의해 결정되므로, 피부 미백제 개발에는 tyrosinase의 활성을 억제하여 멜라닌 생성을 저해하는 것이 필수적이다.

현재까지 tyrosinase 활성 억제제로 알려진 물질은 hydroquinone과 kojic acid, arbutin 등이 있으며,

tyrosine의 산화반응을 막아 멜라닌 생성을 억제하는 것으로 vitamin C, glutathione 등이 있다. 이외에 피부 각질층의 제거 촉진 효능을 가진 살리실산, 레조르신, retinoic acid, 알파하이드록시산(AHA) 소재에 대한 연구, 자외선 차단소재 연구, 세포독성 억제 소재 연구, 활성산소 제거 소재에 대한 연구 등으로 이루어지고 있다<sup>27)</sup>. 그러나, kojic acid, arbutin은 아직 임상에서 효과적이지 않고, 비교적 효능이 탁월하다고 알려진 hydroquinone은 세포독성이 강하여 잠재적인 돌연변이원이 될 수 있다고 보고되고 있다. Vitamin C는 수용액에서 빨리 산화 분해되기 때문에 국소 제제로서의 임상적 사용에는 한계가 제시되어 왔다.

이러한 이유로 천연물로부터 보다 높은 tyrosinase 활성 억제 여부를 스크리닝함으로써, 미백관련 화장품 및 의약품 소재로 사용하려는 연구가 널리 이루어지고 있다.

현재까지 연구된 미백 관련 한방 단일 약재로는甘草<sup>28)</sup>, 白朮<sup>29)</sup>, 天花粉<sup>30)</sup>, 더덕<sup>31)</sup>, 沙蔘<sup>32)</sup>, 白芨<sup>33)</sup>, 白殭蠶<sup>34)</sup>, 蘆薈, 紫花地丁<sup>35)</sup>, 五倍子<sup>36)</sup> 石斛, 石榴<sup>37)</sup>, 射干<sup>38)</sup> 등의 추출물이, 복합제제로 摩風膏<sup>39)</sup>, 加味防風通聖散<sup>40)</sup>, 加味歸脾湯<sup>41)</sup>, 瀉白散<sup>42)</sup>, 六味地黃湯加減方<sup>43)</sup> 등에서 멜라닌 합성 억제와 미백 효능이 보고되었다.

韓醫學 문헌에서 피부의 과색소 침착증에 대해서 《黃帝內經 素問》<sup>44)</sup> 〈至真要大論〉 “歲陽明在泉 燥淫所勝...面塵 身無膏澤, 足外反熱”이라 처음 수록되었고, 《諸病原候論 面皮疔 黑黧候》<sup>45)</sup>에서 風邪가 피부에 침입하고 痰飲이 臟腑에 쌓이면 ‘烏癩’ 나 ‘雀卵上之色’이 얼굴에 나타난다고 하여 병리기전과 형태에 대하여 구체적으로 언급한 이후에, 黚點, 面黑, 雀卵, 斑黚黧, 黧子, 雀斑, 黑斑 등으로 다양하게 표현되어 왔다<sup>46)</sup>. 이후에 《聖濟總錄》<sup>47)</sup>에서는 風邪와 痰飲으로 氣血不和, 《瘍醫大全》<sup>48)</sup>에서는 憂思過多와 飲食失節로 인한 脾胃損傷, 《醫學入門》<sup>49)</sup>에서는 思慮過多와 飲食失節로 인한 脾胃損傷, 《外科正宗》<sup>50)</sup>에서는 腎水不足으로 인한 虛火의 발생, 《丹溪醫集》<sup>51)</sup>

에서는 熱을 주된 원인으로 보았다. 송<sup>52)</sup>은 기미의 원인을 五臟六腑의 痰飲, 즉 비생리적인 수분 어혈 가래 등과 같은 불순 물질이 생겨 혈액순환 장애를 주거나, 외부로부터 찬 바람이나 찬 기운, 제철이 아닌 바람 등 나쁜 風邪를 자주 접하게 되어 氣血이 순조롭지 못할 때 생기기 쉽다고 하였다. 최근 문헌<sup>53)</sup>을 정리해보면 內因은 肝鬱氣滯, 瘀血內停, 腎陰不足, 陰虛火旺, 脾虛不運, 火鬱孫絡, 日晒熱毒과 外因으로는 風邪, 火邪, 濕熱邪, 熱毒 등이 피부 과색소 침착증을 유발하는 것으로 사료된다.

또한, 얼굴 피부질환인 여드름·주근깨·기미 등에 대하여는 오래전부터 많은 치료경험이 있었는데, 예로 《東醫寶鑑 外形篇 面上雜病》<sup>54)</sup> “얼굴에 발생하는一切 여드름같이 돋은 피부발진(風刺), 여드름(粉刺), 주근깨(雀卵斑), 기미(黚黚), 검정사마귀(黧子)에는 玉容散, 連翹散, 紅玉散, 玉容西施散, 黃帝塗容金面方, 玉容膏가 적당하다”고 하여 다양한 처방들이 얼굴에 발생하는 여러 가지 피부 질환에 응용되어 왔다. 이 중, 西施玉容散은 菘豆·白芷·白芨·白蘂·白僵蠶·白附子·天花粉·甘松·三乃子·藿香·零陵香·防風·藁本·皂角子로 구성되었으며 “매번 세수할 때마다 사용하면 얼굴색이 백옥과 같이 된다”고 하였다<sup>55)</sup>. 최근 西施玉容散<sup>8,9)</sup>에 관한 연구에서 tyrosinase activity와 멜라닌 양을 효과적으로 억제하였다고 보고되었다.

삼내자(三乃子)는 생강과 식물인 산내(山柰: *Kaempferia galanga* L.)의 根莖에서 유래된 다년생 초본으로, 異名은 三柰子, 三柰, 三賴, 山柰, 山辣 등이 있다. 性味는 辛溫, 無毒하고 歸經은 胃經으로 行氣 溫中 散寒, 除濕, 辟穢, 消食, 止痛하여 胸膈脹滿, 腕腹冷痛, 飲食不消, 跌打損傷, 齒痛 등의 치료에 사용되었다<sup>56,57)</sup>. 《東醫寶鑑 雜病篇 辟瘟疫豫防法》에서 瘟疫에 걸리지 않게 하고 사기가 흩어지게 하기 위하여 알약을 만들어 태워쓰는 재료로 사용하였고, 이외에 돌을 연하게 하고, 동상에 바르는 외용제 용도로 사용하였다.

韓醫學에서는 내복약으로 적용된 처방은 없으나, 삼내자의 성분 중의 kaempferol<sup>10)</sup>은 메탄올로 추출되는 플라보노이드로 antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, anticancer, cardioprotective, neuroprotective, antidiabetic, anti-osteoporotic, estrogenic/antiestrogenic, anxiolytic, analgesic and anti-allergic activities, kaempferide도 플라보노이드로 antioxidant, anti-inflammatory, anticancer 효능이 보고되고 있다. 삼내자의 약리작용에 관한 연구로는 고<sup>58)</sup>의 삼내자 에탄올 추출물 중 ethyl-p-methoxyl cinnamate 성분의 미백효과, 裴<sup>59)</sup>의 연구에서 tyrosinase 활성을 억제하여 melanin 합성을 저해하는 것을 보고하였다.

본 연구에서는 먼저 MKG의 세포 생존을 검사를 통해 피부에 쓰기 적합한 범위를 알아본 결과, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도 이상에서 세포 생존률이 66%로 감소하였으므로, 실험 결과 농도 범위 내에서 MKG의 독성이 없는 50  $\mu\text{g/ml}$  이하인 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 실험을 실시하였다(Fig. 1).

MKG는 Tyrosinase 활성도에서 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 각각 대조군의 92%, 71%로 나타났다(Fig. 2). 따라서 MKG는 B16/F10 melanoma cell의 tyrosinase 활성을 감소시켰음을 알 수 있었다. 총 멜라닌 양 검사에서는 대조군의 95%, 86%로 멜라닌 합성을 감소시켰는데, 이는 tyrosinase 활성도의 결과와 유사한 경향으로 나타났다(Fig. 3). 앞선 실험에서 tyrosinase 활성도와 총 멜라닌 양 감소를 확인하였기에 형태학적 관찰로 다시 검증해 보았다. DOPA 염색을 실시한 결과, MKG 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도 처리군에서 대조군에 비하여 수치상 돌기가 감소하였고 색깔이 얼어졌음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

cell 수준에서 먼저 MKG가 tyrosinase 활성을 감소시켜 멜라닌 생성을 억제함을 확인하였으므로, 구체적으로 멜라닌 합성관련 단백질 및 전사 인자 발현에 관한 실험을 진행해 보았다.

MKG가 멜라닌 생성의 key enzyme인 tyrosinase

활성을 직접적으로 억제하는지 알아보기 위해서 Cell-free system에서 Mushroom tyrosinase를 이용하여 실험한 결과, Mushroom tyrosinase 효소 활성을 직접적으로 억제하지 않았음을 확인하였다(Fig. 5). 이 결과로 MKG는 B16/F10 melanoma cell의 신호 전달 경로를 통해 간접적으로 tyrosinase 활성을 억제하고 있음을 알 수 있었다.

이런 결과는 MKG 미백제 개발 가능성을 보여주는 것으로서, 멜라닌 형성과정에 관여하는 작용기전을 분석하였다. 특히, 멜라닌 생성단계에서 MKG에 의한 효소 활성 억제와 관련하여 생각해 볼 수 있다.

따라서 MKG가 멜라닌 합성에 관련된 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현을 조절하는지 구체적으로 알아보기 위해 Western blot을 시행한 결과, MKG 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 구간에서 tyrosinase, TRP-1는 농도 의존적으로 단백질 발현이 감소하였고, TRP-2는 별 차이를 나타내지 않았다(Fig. 6).

멜라닌 합성에 관련된 단백질 발현이 감소되는 것을 확인하고, 전단계로 일어나는 멜라닌 합성 전사 과정을 밝히기 위하여 melanogenesis pathway 중 Wnt/AKT/GSK-3 $\beta$  signaling pathway에 MKG가 관여하는지 알아보기 위해 GSK-3 $\beta$ 의 활성 여부를 Western blot 방법으로 조사하였다.

세포내 신호 전달 단백질의 일종인 AKT는 CREB 등과 함께 유전자 발현을 조절하는 인자로 알려져 있고, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현과 멜라닌 생성을 조절하는 인자인 MITF의 활성화는 AKT, GSK-3 $\beta$ 의 인산화와 연관이 있다<sup>71)</sup>. MITF의 인산화는 멜라닌을 생성하는 주효소의 전사를 증가시켜 tyrosinase 발현을 촉진시키는 DNA 프로모터 영역에 결합, 멜라닌 생성 증가를 유도한다.

Wnt signal로도 잘 알려져 있는 GSK-3 $\beta$ 는 AKT의 인산화에 의해 조절되고, GSK-3 $\beta$ 의 활성은 9번 세린과 216번 티로신의 인산화에 의해 활성이 조절된다. 9번 세린의 인산화는 GSK-3 $\beta$ 를 비활성 상태를 나타내며, 216번 티로신의 인산화는 GSK-3 $\beta$ 의

활성 증가를 나타낸다. GSK-3 $\beta$ 가 활성을 띠게 되면 세포질내의  $\beta$ -catenin이 감소되어 MITF의 발현이 감소되게 된다. Wnt signal pathway에서 signaling에 의해 자극 받지 않은 GSK-3 $\beta$ 의 역할은  $\beta$ -catenin을 인산화시켜 proteasome에 의해 분해가 되도록 하여 세포질 내에서 낮은 농도를 유지하도록 한다. Wnt signal receptor가 활성화되면 GSK-3 $\beta$ 를 억제시켜서 세포질내의  $\beta$ -catenin이 GSK-3 $\beta$  인산화와 동시에 인산화되어 proteasome에 의해 분해되지 않으면 세포질 내의  $\beta$ -catenin의 농도가 쌓여, 축적된  $\beta$ -catenin이 핵 내로 유입, MITF의 유전자 발현을 유도하게 된다. 핵 내로 유입되는  $\beta$ -catenin이 많아지면 많아질수록 MITF의 유전자 발현이 많아진다<sup>61)</sup>.

본 연구에서 MKG가 GSK-3 $\beta$ 의 인산화에 어떠한 영향을 미치는지 실험해 본 결과 MKG 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 GSK-3 $\beta$ 의 9번 세린의 인산화 발현이 대조군과 비교했을 때 차이가 나타나지 않았다(Fig. 7). 따라서 MKG는 Wnt signal에 의한 멜라닌 합성 조절이 이루어지기보다는 다른 경로에 의한 것으로 볼 수 있다.

MKG가 다른 멜라닌 합성 경로에 관여하는지 알아보기 위해  $\alpha$ -MSH/MC1R-cAMP/PKA/CREB-dependent signaling pathway 경로 중 CREB 발현에 미치는 영향을 조사하였다. CREB의 인산화를 통하여 MITF의 발현을 증가시키는데, MITF는 tyrosinase의 발현을 강하게 자극하고, 멜라닌 생성의 조절에 중요한 역할을 한다.

본 연구에서 MKG가 CREB의 인산화에 어떠한 영향을 미치는지 실험해 본 결과, MKG 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 농도 의존적으로 CREB의 인산화가 억제된 것을 확인하였다(Fig. 8). 따라서 MKG는 cAMP/PKA를 경유한 CREB의 인산화 억제를 통해 MITF의 발현을 억제시켜 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현을 억제하는 것으로 보인다.

또한, MKG가 MITF 발현에 미치는 영향도 조사하

여 합성경로에 대하여 정확하게 규명하고자 하였다.

앞서 실험에서 MKG가 CREB 인산화를 억제하는 것을 확인하였고(Fig. 8), MKG가 CREB의 인산화 억제를 통해 MITF의 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위해 MKG를 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  의 농도로 처리하고 72시간 배양한 결과 MKG에 의해 MITF의 발현이 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 9).

따라서, MKG는 cAMP/ PKA/ CREB/ MITF 전사인자 발현에 영향을 미쳐 tyrosinase에 작용하여 멜라닌 합성을 조절하는 것으로 생각된다.

$\alpha$ -MSH는 뇌하수체 및 피부를 포함한 여러 가지 말초조직에서 분비되는 다면발현성 분자(pleiotropic molecule)로써 표피세포의 성장과 증식, 국소조직의 면역 조절, 멜라닌 색소 생성 등 다양한 생리적 기능에 관여한다<sup>30)</sup>. 이는 MC1R와 결합하여 Gs단백질을 활성화시키고, 이차적으로 adenylate cyclase 활성화에 의해 cAMP가 증가되고 연속적으로 PKA, tyrosinase 활성화 등을 통하여 멜라닌 생성을 촉진시킨다. 또한 CREB, MITF 단백질의 발현을 증가시켜 tyrosinase 유전자의 발현을 촉진하고, 멜라닌 생성의 조절에 중요한 역할을 한다<sup>62)</sup>.

특히, Lerner<sup>63)</sup> 등은 인체에  $\alpha$ -MSH를 주입한 후 피부의 색소 침착을 관찰하고 인체 피부의 멜라닌화와 이 호르몬의 연관성을 제시하였다. 따라서 본 실험에서 과색소 침착에 대한 MKG 효과를 알아보기 위하여  $\alpha$ -MSH로 tyrosinase 활성화와 멜라닌 합성을 유도한 후에 MKG가 미치는 영향을 조사하였다.  $\alpha$ -MSH는 B16/F10 melanoma cell의 tyrosinase 활성을 약 5배 증가시켰고, MKG 병용 처리군 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 56.2%로 감소시켰다. 또한  $\alpha$ -MSH는 B16/F10 melanoma cell의 멜라닌 합성을 약 2.3배 증가시켰고 병용처리군 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서 51.1%로 현저히 감소시켰다(Fig. 10, 11). 이러한 결과는 西施玉容散<sup>8,9)</sup> 추출물을 전 처리한 후  $\alpha$ -MSH로 처리한 실험군에서는 tyrosinase 활성이 대조군에 비하여 36% 감소, 총 멜라닌 양은 20% 정도 억제된 논문과 비교

해 본다면, MKG가 효과적인 미백효과를 나타내었다. 西施玉容散 연구에서는 증류수 추출을 통한 검사였으며, 삼내자는 메탄올로 약리성분을 추출하여 사용된 차이점이 있다. 대부분의 생약재의 약리 활성은 에탄올과 메탄올 추출물에서 활성이 나타나고 있으며<sup>58)</sup>, 이는 생리 활성 물질이 주로 극성 용매에 녹는 극성 물질임을 예측할 수 있다.

DOPA 염색을 통해서 MKG 처리군은 대조군에 비하여 형태학적으로 확연하게 수지상 돌기가 감소하고 색깔이 얼어졌음을 알 수 있었다(Fig. 12). Western blot 방법을 이용하여  $\alpha$ -MSH에 의한 과색소 침착시 tyrosinase 단백질 발현에 미치는 영향을 조사한 결과,  $\alpha$ -MSH 처리군에서 대조군에 비하여 tyrosinase 발현이 현저히 증가하였으며,  $\alpha$ -MSH와 MKG 병용 처리군에서는 현저히 감소하였다(Fig. 13).

본 실험 결과에서  $\alpha$ -MSH에 의해 증가된 tyrosinase 활성화와 멜라닌 합성을 효과적으로 억제하였기 때문에, MKG가  $\alpha$ -MSH/ MC1R-cAMP/ PKA/ CREB signaling pathway 경로를 조절하여 tyrosinase 활성화와 멜라닌 합성을 조절하는지 구체적으로 알아보기 위해 B16/F10 melanoma cell을  $\alpha$ -MSH로 처리하고 결과를 관찰하였다.

Wnt signal에서 GSK-3 $\beta$ 는 Wnt signaling이 없을 경우에는  $\beta$ -catenin을 분해하여 세포질내의  $\beta$ -catenin의 농도가 낮게 유지된다. signaling이 없으면 GSK-3 $\beta$ 의 활성화로 인하여 핵 내로 이동되는  $\beta$ -catenin의 농도가 낮아져 MITF의 발현도 낮아지게 된다.

$\alpha$ -MSH로 유도된 멜라닌 합성에서 MKG가 CREB 발현에 미치는 영향을 Western blotting 실시해 본 결과 MKG 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 CREB의 인산화가 억제된 것을 확인하였다(Fig. 14).

MITF는 멜라닌 합성과정에 중요한 전사 인자로 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질의 발현을 조절하며, cAMP/PKA/CREB 경로에 의해 활성화 되는 것으로 알려져 있다.  $\alpha$ -MSH로 유도된 멜라닌 합성에

대해 MKG 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  처리 농도구간 모두 MITF의 발현이 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 15).

따라서 MKG의 멜라닌 합성 억제 효과는 cAMP/PKA를 경유한 CREB의 인산화 억제를 통해 MITF의 발현을 감소시켜 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 단백질 발현 감소로 인한 것임을 확인하였다.

현재까지 melanosome의 수송기전과 조절에 대하여 거의 알려진 바는 없으나, melanosome은 kinesin, dynein, myosin V와 같은 운동단백질(motor protein)과 microtubule, actin filament에 의하여 가지돌기를 따라 각질 형성 세포로 이동되는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. Hunt 등<sup>64)</sup>은  $\alpha$ -MSH에 의해 tyrosinase 활성화, 멜라닌, tyrosinase와 TRP-1, mRNA의 발현이 증가되었으며 수지상 가지 돌기의 발달 등 형태적으로도 멜라닌화가 촉진되었다고 보고하였다. 또한 Busca 등<sup>65)</sup>은 cAMP 증가는 Rac과 Rho를 통하여 actin의 재배열(disorganization)을 일으키고, 결과적으로 멜라닌세포의 수지상 가지 돌기가 증가한다고 하였다. 본 실험 결과  $\alpha$ -MSH에 의하여 수지상 가지 돌기가 증가하였으나, MKG를 병용 투여하였을 때 수지상 가지 돌기의 형성을 억제하였다(Fig. 12). 따라서 본 실험에서 Rac과 Rho에 미치는 영향은 조사하지 않았으나 MKG는 가지 돌기의 형성을 효과적으로 억제하였으며, 이는 수지상 가지 돌기의 생성 억제작용이 kinesin, dynein, myosin V(motor protein)과 microtubule, actin filament에 영향을 미쳤을 가능성이 있다.

이상의 연구 결과 MKG는 B16/F10 melanoma cell에서 tyrosinase 활성도와 tyrosinase 발현을 저해하며 melanin 합성 관련 단백질 발현을 효과적으로 억제하였고,  $\alpha$ -MSH로 유도되는 MC1R-cAMP/PKA/ CREB signaling pathway에 의해 멜라닌 합성을 감소시키는 것으로 추정된다.

결론적으로, MKG는 멜라닌 기능 항진 시 미백효과가 있음을 알 수 있었고, 피부에 활용할 경우 기미나 주근깨 등의 과색소 침착증을 치료하는 약물 재료

로 활용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

추후 미백효과와 안정성을 보다 체계적으로 규명하기 위한 실험과 미백 가능성 물질의 구조 규명이 필요할 것으로 생각되며, 다양한 melanogenesis pathway에 대한 체계적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

## V. 결 론

1. MKG는 세포독성 검사에서 50  $\mu\text{g/ml}$  이상 농도에서 세포 생존율이 감소하였다.
2. MKG는 Tyrosinase 활성도와 총 멜라닌 양, 멜라닌 세포의 수지상돌기를 감소시켰다.
3. MKG는 Mushroom tyrosinase 효소 활성을 직접적으로 억제하지 않았다.
4. MKG는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다.
5. MKG는 GSK-3 $\beta$  발현과는 무관하고, CREB/MITF 발현을 감소시켜 tyrosinase 발현을 억제시켰다.
6. MKG는  $\alpha$ -MSH에 의한 과색소 침착시에, tyrosinase 활성화와 멜라닌 생성을 효과적으로 억제하였고, DOPA 염색에 의한 형태학적 관찰에 있어서 수지상 돌기가 감소하고 색깔이 얼어졌다.
7. MKG는  $\alpha$ -MSH에 의한 과색소 침착시에, 멜라닌 합성 관련 단백질 발현은 농도 의존적으로 억제되었다.
8. MKG는  $\alpha$ -MSH에 의한 과색소 침착시에, GSK-3 $\beta$  발현과는 관계없이, CREB/MITF 발현을 감소시켜 tyrosinase 발현을 억제시켰다.

MKG는  $\alpha$ -MSH/ MC1R-cAMP/ PKA/ CREB signaling pathway에 작용하여, 멜라닌 생성에 관여하는 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2 단백질 발현 감소로 멜라닌 세포의 tyrosinase의 생합성을 억제하여

멜라닌 합성을 감소시키는 것으로 연구되었다.

### 참 고 문 헌

1. Lee SH, Lee SE, Ahn SG, Hong SP. Skin Barrier. Seoul:Yeomoongak, 2010.
2. Chenm JS, Wei C, Marshall MR. Inhibition mechanism of Kojic acid on polyphenol oxidase. J Agric Food Chem. 1991;39:1897-901.
3. Urabe K, Aroca P, Tsukamoto K, Mascagna D, Paulumbo A, Prota G, et al. The inherent cytotoxicity of melanin precursors. Biochim Biophys Acta. 1994;1221:272-8.
4. Tsukamoto K, Jackson IJ, Urabe K, Montague PM, Hearing VJ. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. EMBO J. 1992;11(2):519-26.
5. Boissy RE, Sakai C, Zhao H, Kobayashi T, Hearing VJ. Human tyrosinase related pretein-1(TRP-1) does not funcion as a DHICA oxidase acivity in contrast to murine TRP-1. Exp Dermatol. 1998;7(4):198-204.
6. Curto EV, Kwong C, Hermersdörfer H, Glatt H, Santis C, Virador V, et al. Inhibitors of mammalian melanocytes tyrosinase: In vitro comparisons of alkyl esters of Genticic acid with other putative inhibitors. Biochemical Pharmacology. 1992;7:663-72.
7. Chakraborty AK, Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M. Effect of arbutin on malanogenic proteins in human melanocytes. Pagment Cell Res. 1998;11(4):206-12.
8. Park JS, Nam WY, Moon YJ, Cho KH, Jeon BH, Woo WH. Effect of Seosiokyongsan on the Melanogenesis of B16 Melanoma Cell Line. Korean J oriental medical pathology. 2000;14(1):160-70.
9. Woo WH, Nam WY, Jeong WY, Park RG, Kim JS, Kim WS, et al. Effect of Seosiokyongsan on the Signaling Pathway of Melanogenesis. Korean journal of oriental medical pathology. 2001;15(1):73-83.
10. JM Calderón-Montaño, E Burgos-Morón, C Pérez-Guerrero, M. López-Lázaro. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. Medicinal Chemistry. 2011;11:298-344.
11. Jang DI, Kim MJ, Shin ES, Lee JS. Cosmetic compositions for skin whitening containingextract of galenical medicines. Korean intellectual property office. Patent application:1019990045952, 1999.
12. Moon KT, Choi JH, Ahn JH, Ha WH, Kim YH, Roh SS. Tooth whitening composition using oriental drug. Korean intellectual property office. Patent application:1020030003341, 2003.
13. Lee NH. Beauty treatment soap made of natural material. Korean intellectual property office. Patent application:1019870011783, 1987.
14. Ridditid W, Sae-wong C, Reanmongkol W, Wongnawa M. Antinociceptive activity of the methanolic extract of *Kaempferia galanga* Linn. in experimental animals. J Ethnopharmacol. 2008;118:225-30.
15. Sulaiman MR, Zakaria ZA, Daud IA, Ng FN, Ng YC, Hidayat MT. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of *Kaempferia galanga* leaves in animal models. Nat Med. 2008;62:221-7.
16. Tara Shanbhag B, Chandrakala S, Sachidananda A, Kurady BL, Smita S,

- Ganesh S. Wound healing activity of alcoholic extract of *Kaempferia galanga* in Wistar rats. *Indian Physiol Pharmacol*. 2006;50:384-90.
17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxic assay. *J Immun Methods*. 1983;65:55-63.
18. Martinez - Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, Garcia - Borron JC. Mechanism of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor - alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem*. 1998;255:139-46.
19. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by  $1\alpha, 25$ -dehydroxyvitamin D<sub>3</sub> and retinoic acid. *Cancer Res*. 1985;45:1474-8.
20. Jeongugimsangbyeongnigyosuhyeobuihoe. *Histotechnology*. Seoul:Goryeouihak, 1998.
21. Provance DW, Jr Wei M, Ipe V, Mercer JA. Cultured melanocytes from dilute mutant mice exhibit dendritic morphology and altered melanosome distribution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:14554-8.
22. Kim DS, Park SH, Kwon SB, Youn SW, Park KC. Effects of lysophosphatidic acid on melanogenesis. *Chem and Phy of Lipid*. 2004;127:199-206.
23. Hearing VJ. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1999;4(1): 24-8.
24. Eun HC, et al. *Skin immunology*. Seoul:Soeul university press, 1999:143.
25. K Jimbow, H Chen, JS Park, PD Thomas. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. *British J Derma*. 2001;144:55.
26. Kim EC, Ahn SY, Hong ES, Lee GH, Kim EK, Row KH. Extraction of whitening agents from natural plants and whitening effect. *J Korean Ind Eng Chem*. 2005;16(3):348-53.
27. Ha BJ. *Functional cosmetics*. Seoul:Singwang. 2001:66-84,138-40,143-7.
28. Moon YJ, Kim J, Yim NY, Lee SY, Kwak S, Hwang CY, et al. Inhibitory Effect on Melanogenesis of Radix Glycyrrhizae Water Extract. *Korean journal of oriental physiology & pathology*. 2002;16(6):1230-5.
29. Chun HJ, Choi EY, Yoon SC, Nam HW, Beak SH. Inhibitory Effects of Ethanol Extract of *Atractylodis Rhizoma alba* on Melanin Biosynthesis. *Yakakoeji*. 2001;45(3): 269-75.
30. Lee GS, Kim JJ, Song CS, Oh CG, Yim GS. Effect of Radix *Trichosanthis* on the Melanogenesis. *The Journal of Oriental Medical Surgery, Ophthalmology & Otolaryngology*. 2001;14(1):209-25.
31. Lee SY, Kim JM, Oh HC, Yim SJ, Hwang CY, Moon YJ, et al. The effect of *Codonopsis lanceolata* on the melanogenesis. *The Korean journal of oriental medical prescription*. 2002;10(2):199-211.
32. Yim NY, Kwon GJ, Kim YS, Beak SG, Yim JR, Moon YJ, et al. Inhibitory Effect of Methanolic Extract from *Adenophorae Radix* on Melanogenesis. *Korean journal of oriental physiology & pathology*. 2004;18(3):747-53.



33. Yoon HJ, Yoon JW, Yoon SW, Ko WS, Woo WH. Inhibitory effect on melanogenesis of Rhizoma Bletillae. The Journal of Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2003;16(1):100-11.
34. Oh HC, Yim GS, Hwang CY, Yoon IH, Kim NG. A Study on the Melanin Synthesis Inhibition and Whitening Effect of Bombysis Corpus. The journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2007;20(3):1-13.
35. Kim CH, Jung HA, Noh SS, Hong SH. Effects of Aloe and Viola herba Extract on the Anti-oxidant, Anti-inflammatory, Anti-wrinkle and Whitening. The journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2010;23(1):23-43.
36. Park JM, Kim KJ. The Anti-wrinkle Effects and Whitening Effects of Galla Rhois. The journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2010;23(1):135-48.
37. Hwangbo M, Noh SS, Soe HS. Effects of Dendrobii herba and Punica granatum Extract on the Anti-oxidant, Anti-inflammatory, Anti-wrinkle and Whitening. The journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2010;23(3): 11-32.
38. Kim DS, Sung BG, Lee JC, Lee BG, Woo WH, Yim GS. Inhibitory Effect of Belamcandae Rhizoma on the Melanogenesis in MSH-stimulated B16F10 cells. The journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2011;24(1): 25-35.
39. Lee SH. Research on Whitening Effect of Ephedra Sinica and Mapunggo. Kyunghee University. 2001.
40. Lee SE, Kim HJ, Kim Yb. The Study on Depigmentation of Kamibangpungtongsung-San. The journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2004;17(1):94-103.
41. Park HS, Kim HJ, Kim YB. The Study on Depigmentation of Kamikwibi-Tang. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2004;17(2):48-58.
42. Kim SM, Yoo DY. The Effect of Mibaeksan(MB) on Melanin Synthesis and Gene Expression. The Journal of oriental obstetrics & gynecology. 2009;22(4):1-8.
43. Kim JK, Yoo DY. The Effect of Yukmijihwangtang -gagambang (YMG) on Melanin Synthesis and Gene Expression. The Journal of oriental obstetrics & gynecology. 2009;22(3):66-82.
44. Yang YG. Hwangjenaegyongsomun. Daebuk: Nakgunchulpansaobuyuhangongsa. 1994:624-79.
45. So WB. Sossijebyeongwonhuron. Seoul: Daeseongmunhwasa. 1992:200.
46. Shin YS, Roh SS. A Literature studies on the causes and treatments of the melasma. The Journal of Oriental Medical Surgery, Ophthalmology & Otolaryngology. 1998;11 (1):82-98.
47. Jo G. Seongjechongnok. Beijing:Inminwisaengchulpansa. 1987:1763.
48. Go SJ. Yanguidaejeon. Beijing:Inminwisaengchulpansa. 1986:479,481-2.
49. Lee C. Pyeonjuuihagimmun. Seoul:Daeseong-

- munhwasa, 1990:29,224.
50. Jin SG. Oegwajeongjiong. Shanghai:Sanghaegwahakgisulchulpansa, 1989:290-8.
51. Ju JH. Dangyeuijip. Beijing:Inminwisaengchulpansa, 1993:24.
52. Song JS. Hanbangpibumiyong. Hyorim, 1993:188-92,223-5.
53. Yang SJ. Junguiimsangdaejeon. China:Bukgyeongwahakgisulchulpansa, 1991:896-7,923-4.
54. Heo J. Donguibogam. Seoul:Daeseongmunhwasa, 1985:97-9.
55. Hwang DY. Daeyeokjeungmaek bangyakhappyeon. Seoul:Namsandang, 1992:282-3.
56. Seoul Nat'l Univ. cheonyeonmulgwahagyeonguso munheonjeongbohagyeongusilpyeon. Dongyanguiyakgwahakdaejeon, 2003:217.
57. Jeontonguihagyeonguso. Bonchoyakjaedogam. Seoul:seongbosa, 1994:200.
58. Go HJ. Whitening Effects of Extract of *Kaempferia galanga*. Chungang Univ, 2011.
59. Bae IW. Study on compounds having strong inhibition effect toward tyrosinase and glutathione S-transferase activities from natural products. Chungang Univ, 2005.
60. Wu D, Pan W. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. Trends Biochem Sci, 2010;35(3):161-8.
61. Bienz M. beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. Curr Biol, 2005;15(2):64-7.
62. Leeuw SM, Smit NP, Van Veldhoven M, Pennings EM, Pavel S, Simons JW, et al. Melanin content of cultured human melanocytes and UV-induced cytotoxicity. J Photochem Photobiol B, 2001;61(3):106-13.
63. Lerner AB, McGuire JS. Effect of alpha- and beta-melanocyte stimulating hormone on the skin color of man. Nature, 1961.
64. Hunt G, donatien PD, Lunec J. Cultured human melanocytes respond to MSH peptides and ACTH. Pigment Cell Res, 1994;7:217-21.
65. Busca R, Bertolotto C, Abbe P, Englaro W, Ishizaki T, Narumiya S, et al. Inhibition of Rho is required for cAMP-induced melanoma cell differentiation. Mol Biol Cell, 1998;9:1367-78.