

음양곽 물추출물이 B16 Mouse Melanoma 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향

천현자[#] · 문연자* · 김정훈* · 김일광** · 전병훈*** · 우원홍*

*원광대학교 한의학전문대학원, **원광대학교 자연과학대학, ***원광대학교 한의과 대학

(Received July 10, 2000)

Effect of the Aqueous Extract of *Epimedium Koreanum* Nakai on Melanin Formation in B16 Mouse Melanoma Cell Line

H. J. Chun[#], Y. J. Mun*, J. H. Kim*, I. K. Kim**, B. H. Jeon* and W. H. Woo*

*Professional Graduate School of Oriental Medicine, Won Kwang University, Iksan 570-749, Korea

**College of Natural Sciences, Won Kwang University, Iksan 570-749, Korea

***College of Oriental Medicine, Won Kwang University, Iksan 570-749, Korea

Abstract – To investigate how the aqueous extracts of *Epimedium koreanum* Nakai (EK) affects pigmentation of skin, the aqueous extract of EK at various concentrations were incubated with 1×10^5 melanoma cells per well for 72 h. The morphology and number of cell line were not changed, but the aqueous extract of EK increased the tyrosinase activity and the content of melanin polymer in the cell line. These results indicate that the aqueous extract of EK promotes melanogenesis of B16 mouse melanoma cell line.

Keywords □ Aqueous Extract of *Epimedium Koreanum* Nakai (EK), melanin content, tyrosinase activity.

피부에 색소침착을 일으키는 대표적인 것으로는 일광과 멜라닌세포 자극호르몬(melanocyte-stimulating hormone, α -MSH) 등이 있다. 이러한 색소침착은 피부를 구성하고 있는 각질형성세포, 멜라닌세포, 섬유아세포는 물론이고 외적 자극에 의한 염증세포와 cytokine의 출현, 그리고 MSH에 대한 반응의 변화 등이 연관되어 종합적으로 일어나는 현상이다.¹⁾

피부의 색소침착과 직접 관련이 있는 표피 멜라닌은 멜라닌세포의 멜라노솜에서 효소반응으로 합성된다. 생성된 멜라닌은 각질형성세포로 이동하여 자외선 등 외부자극에 대한 보호작용을 한다. 따라서 멜라닌을 합성하는 멜라닌세포가 색소침착에 주된 작용을 하게 된다.^{2,3)}

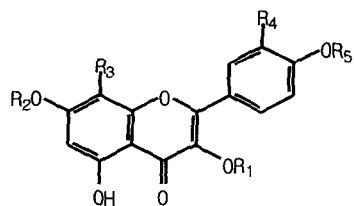
멜라닌세포의 멜라닌화를 나타내는 지표로는 세포내

멜라닌 소체의 수, 멜라닌 양 및 tyrosinase 활성도 등이 많이 이용되고 있으며, 멜라닌 합성과 세포내 tyrosinase 활성도는 밀접한 상관관계를 갖고 있다.

Tyrosinase는 동·식물계에 넓게 분포되어 있는 phenol oxidase로서 생체내에서 monophenol인 tyrosine을 *o*-diphenol(DOPA)로 산화시키는 tyrosine oxidase로서의 기능과 *o*-diphenol을 *o*-quinone(DOPA quinone)으로 산화시키는 dopa oxidase로서의 기능을 갖는다. 생체내에서의 이러한 기능 때문에 tyrosinase는 멜라닌 polymer를 생합성하는데 중요한 역할을 하고 있다.^{3,4)} Körner 등⁵⁾은 tyrosinase의 활성이 cyclic adenosine monophosphate(cAMP) 의존성 단백질 kinase(PKA)에 의존된다고 보고했다.

삼지구엽초는 주로 강원도 일대와 경기도 북부의 중산간지에 분포되어 있는 생약으로 그 지상부를 건조한 것을 음양곽 *Epimedium koreanum* Nakai(EK)이라고 하여 한방에서는 강장, 음위 및 강정제로 사용된다.⁶⁾

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 063-850-6938 (팩스) 063-850-6840



1. icariin: $R_1=Rha$, $R_2=Glc$, $R_3=-CH_2CH=C(CH_3)_2$, $R_4=H$, $R_5=CH_3$
2. quercetin: $R_1=R_2=R_3=R_5=H$, $R_4=OH$
3. anhydrocaritin-3-O- α -rhamnoside: $R_1=Rha$, $R_2, R_4=H$, $R_3=-CH_2CH=C(CH_3)_2$, $R_5=CH_3$
4. epimedeside A: $R_1=Rha$, $R_2=Glc$, $R_3=-CH_2CH=C(CH_3)_2$, $R_4, R_5=H$

Scheme 1 - Flavonoids from *Epimedium koreanum* Nakai.

EK의 주성분은 flavonoid인 icariin,^{7,8)} epimedeside A⁹⁾ 등으로 밝혀졌으며, 이중 icariin은 주 약효성분으로 고혈압에 효과를 나타내는 성분으로 보고되었으며,¹⁰⁾ flavonoid glycoside인 epimedin A, B 및 C가 추가로 보고되었다¹¹⁾(Scheme 1).

음양곽에 대한 연구로는 채취시기 및 산지별 성분차이,⁶⁾ 성분분석,¹²⁾ HPLC법에 의한 정량분석법¹³⁾ 및 항산화 성분의 분리 및 성질¹⁴⁾ 등에 관한 것들이 있다. 그러나 현재까지 멜라닌세포의 멜라닌화와 관련하여 음양곽이 연구된 경우는 전혀 없는 상태이다.

본 연구에서는 멜라닌 색소의 감소나 소실에 의해 유발되는 색소성 질환의 하나인 백반증의 치료에 적용될 수 있는지를 알아보기 위하여 음양곽의 물추출물이 B16 mouse melanoma 세포에서의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하였다. Melanoma 세포에 대한 음양곽 추출물의 실험에서 세포의 형태적 변화, 수적 변화, 멜라닌 양 및 tyrosinase 활성도를 측정하였으며, B16 mouse melanoma 세포에서의 멜라닌 생성을 관찰하였다.

실험방법

시료의 조제 - 음양곽 400 g에 H₂O(3차 증류수) 6.5 l를 가하여 3 시간 동안 끓였다. 거즈로 여과하고 3,200 rpm으로 30분간 원심분리한 후 상층액을 취하였으며, -70°C에서 freeze dryer로 냉동, 건조시킨 후 42.75 g의 시료를 얻어 사용하였다. 시료는 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Gibco. Co., USA) 배양액에 녹인 후 세포에 투여하기 전 0.22 μ m pore 여과지로 여과 멸균하여 농도를 조정된 다음 사용하였다.

세포배양 - B16 mouse melanoma 세포는 CO₂ 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 10% fetal bovine serum(Gibco. Co., USA)이 포함된 DMEM 배지를 사용하였다. 여기에 penicillin-streptomycin(Sigma Chemical Co., USA) 100 I.U.-100 μ g/ml를 첨가하였으며, 24 시간 주기로 DMEM 배양액을 교체하였다.

MTT Assay - 음양곽의 처리농도를 결정하기 위한 MTT <3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide>정량은 Mosmann의 방법¹⁵⁾을 변형하여 실시하였다. 즉 B16 mouse melanoma 세포에 음양곽 추출물을 처리하여 배양하였다. 48 시간 배양한 후 상층액을 버리고 당일 제조한 500 μ g/ml MTT를 배양 용기당 1 ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3 시간 동안 배양하였다. 살아 있는 세포는 MTT에 의해 세포에 보라색 불용성 formazan 침전물이 형성되며 이것을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 10% dimethyl sulfoxide(DMSO)를 200 μ l씩 넣고 15 분간 실온에서 방치한 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

SRB Assay - Sulforhodamine(SRB) assay는 Skehan¹⁶⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 배양 중인 96 well 배양용기의 각 well에 4°C의 50% TCA 용액 50 μ l를 조심스럽게 첨가하여 1 시간 동안 4°C에서 보관하여 배양용기의 바닥에 붙어 있는 세포들을 고정하였다. 이를 흐르는 물로 5 회 씻은 후 실온에서 건조시켰다. 여기에 1% 초산에 녹인 0.4% SRB(Sigma Chemical Co., USA)를 넣고 30 분 동안 방치한 후 SRB를 제거하고 1% 초산으로 4 회 씻고 이를 실온에서 건조시킨 후 10 mM Tris base(pH 10.5)를 첨가하고 실온에서 10 분간 방치한 다음 ELISA reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

형태학적 변화 - 약물처리 후 48, 72 시간 후에 위상차 현미경(Diaphot 300, Nikon, Japan)의 100 배율 하에서 대조군과 실험군의 세포의 크기, 수지상돌기의 모양 및 길이를 관찰하였다.

B16 mouse melanoma 세포의 최적 배양조건 - 음양곽 물추출물이 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포 배양시간과 세포수에 따른 멜라닌 합성 양을 조사하였다. Melanoma 세포를 각 well 당 1×10^5 과 2×10^5 개씩 넣고 48 시간과 72 시간 배양한 결과 Fig. 1에서와 같이 well 당 1×10^5 개씩 넣고 72 시간 배양한 실험군에서 음양곽 물추출물의 투여량에 비

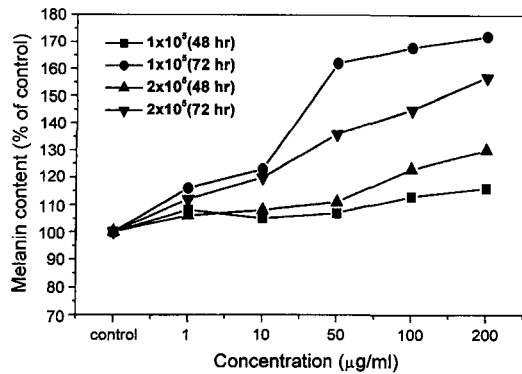


Fig. 1 - Comparison of melanin content according to cell number and culture time with various EK concentrations. Melanin content was measured at 405 nm.

례하여 가장 좋은 멜라닌 합성을 보였다. 따라서 이후로의 모든 실험은 melanoma 세포를 well 당 1×10⁵개씩 넣고 72 시간 배양하여 멜라닌 합성 양을 측정하였다.

멜라닌 양 측정 - 멜라닌 양은 Hosoi 등¹⁷⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 PBS로 2 회 세척한 후 원심분리하여 세포 침전물을 만들었다. 10% DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액을 200 µl 첨가하고 80°C에서 1 시간 동안 용해하였으며, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 합성 멜라닌(Sigma Co., USA)을 사용하여 작성된 표준 직선에서 구하고, 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하였다.

Tyrosinase 활성도 측정 - Matinez-Esparza¹⁸⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 각 well의 세포를 원심분리하여 세포 침전물을 만들고, 100 µl의 lysis buffer (1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate, 0.1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride)를 가하였다. 얼음에 방치하여 세포를 파괴시키고 원심분리한 후 상층액을 취하여 효소용액으로 사용하였다. 100 mM sodium phosphate(pH 7.0) 용액 100 µl에 시료인 효소용액 50 µl를 가하고 37°C에서 5 분간 유지한 후 100 mM catechol 50 µl를 넣고 ELISA reader로 37°C, 405 nm의 조건에서 흡광도의 변화를 1 시간 동안 관찰하였다.

통계방법 - 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 이용하였다.

실험결과 및 고찰

세포증식에 미치는 영향 - 음양곽의 물추출물이 B16 mouse melanoma 세포의 증식에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 음양곽 물추출물을 1 µg/ml에서 200 µg/ml까지의 다양한 농도로 B16 mouse melanoma 세포에 처리하고 72 시간 후에 MTT와 SRB 방법으로 세포의 증식을 관찰하였다. Fig. 2와 3에서 보는 바와 같이 음양곽 물추출물에 의한 세포의 증식은 낮은 농도에서는 유의할만한 변화를 나타내지 않았으나, 200 µg/ml 이상의 농도에서는 감소하는 경향으로 보아 이 농도 이상에서는 약물에 의한 세포독

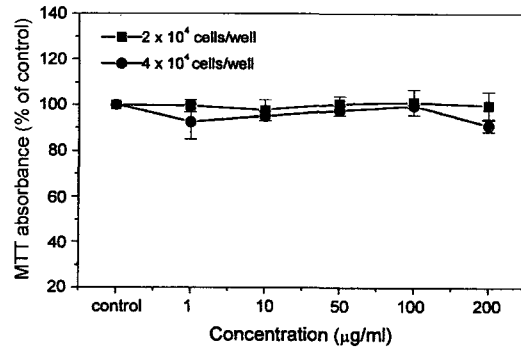


Fig. 2 - Effect of the aqueous extract of *Epimedium koreanum* Nakai on the proliferation of B16 mouse melanoma cells. The cells were treated for 72 hrs with various concentrations of EK extract. The proliferation of the cells was measured by MTT assay. Data were mean ± SD. This experiment was repeated five times.

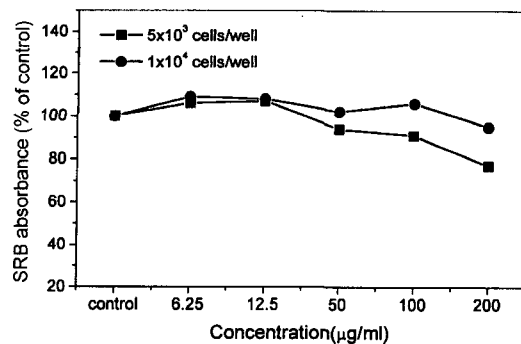


Fig. 3 - Effect of the aqueous extract of *Epimedium koreanum* Nakai on the proliferation of B16 mouse melanoma cells. The cells were treated for 72 hrs with various concentrations of EK. The proliferation of the cells was measured by SRB assay.

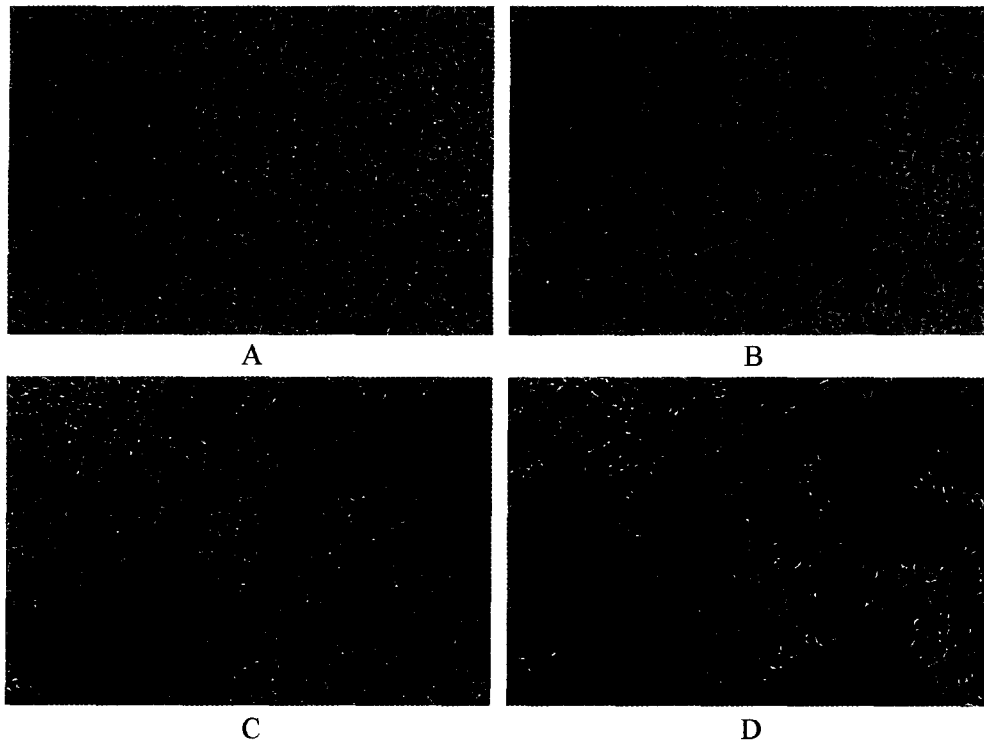


Fig. 4 - Morphology of control group and EK-treated experiment group. There was no morphologic difference in size of cell body, number and length of dendrites between control group and EK-treated group. A : control B, C and D : cells treated with 10, 100 and 200 µg/ml EK respectively

성을 나타내는 것으로 생각된다.

세포의 형태학적 변화 - B16 mouse melanoma 세포의 형태학적 변화는 대조군과 실험군 사이에 큰 차이를 보이지 않았다. 72 시간 후에 대조군에 비하여 실험군에서 세포의 크기가 약간 커졌고, 일부 수지상돌기의 형태와 길이가 약간 길어짐을 관찰하였다(Fig. 4).

B16 mouse melanoma 세포의 수적 변화 - 음양곽 물추출물이 B16 mouse melanoma 세포의 수에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 음양곽 물추출물을 처리하고 72 시간 배양한 후에 세포수를 조사해본 결과 대조군에 비하여 음양곽 처리군은 세포수가 약간 감소되는 경향을 보였으나 통계적으로 유의성은 없었다(Table I).

멜라닌 양의 측정 - α -MSH나 UV 같은 외부적인 요인이 melanoma 세포를 자극하면 여러 단계를 거쳐 멜라닌화가 촉진되어 멜라닌을 합성하게 된다.

음양곽이 멜라닌화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 melanoma 세포를 well 당 1×10^5 개씩 넣고 24 시간 후 새로운 배양액으로 교체하고 음양곽을 배양액

Table I - Comparison of the number of melanoma between control group and experiment group at 72 hr culture

Treatment (µg/ml)	Number of melanoma cell line
Control	100 ± 0
1	98.1 ± 14
10	96.0 ± 16
50	96.4 ± 4.2
100	95.3 ± 10
200	73.0 ± 3.5

n=5

에 투여하였다. 72 시간 배양한 후 관찰해본 결과 세포 내에서뿐만 아니라 상층액인 배양액에서도 육안적으로 멜라닌 생성을 관찰할 수 있었다. 그래서 melanoma 세포뿐만 아니라 상층 배양액 모두에서 멜라닌 양을 조사하였다. Table II에서 보는 바와 같이 세포내에서뿐만 아니라 상층 배양액에서도 melanoma 세포의 11%에 해당하는 멜라닌 양을 측정할 수 있었다. 이것은 melanoma 세포에서 생성된 멜라닌의 일부가

Table II – Comparison of melanin content between cell and medium in B16 mouse melanoma cells

	Mean(%)	SD
Cell	100	0
Medium	11.12	2.59*

The cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After treatment of EK for 72 hrs, melanin content was measured at 405 nm (*P<0.001). This experiment was repeated five times.

배양액으로 추출되어 나오는 것으로 사료된다. 따라서 이후로 멜라닌 양은 세포와 배양액 모두를 시료로 취하여 측정하였다.

α -MSH가 멜라닌 합성에 미치는 영향 – 멜라닌세포 자극 호르몬(MSH, melanocyte stimulating hormone)은 뇌하수체에서 ACTH(adrenocorticotrophic hormone), Lipotropic 호르몬과 Endorphin의 전구체인 POMC(proopiomelanocortin)의 형태로 분비되며, 흑색종 세포와 실험동물의 멜라닌세포(murine melanocyte)의 멜라닌화를 자극하는 것으로 알려져 왔다.¹⁹⁾ 1961년에는 Lerner와 McGuire²⁰⁾가 인체에 멜라닌 세포 자극 호르몬을 주입한 후 피부의 색소침착을 관찰하고 인체 피부의 멜라닌화와 이 호르몬과의 연관성을 제시하였다. 음양광 물추출물이 B16 mouse melanoma 세포의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 측정하기 전에 먼저 멜라닌 합성에 가장 효능이 있는 활성제로 알려진 α -MSH에 의한 멜라닌 함량을 측정하였다. B16 mouse melanoma 세포를 24 시간 배양한 후 α -MSH를 0.01 nM에서 10 nM까지 다양한 농도로 처리하고 72

시간 배양한 다음 멜라닌 양을 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 α -MSH 처리군이 대조군에 비하여 모두 의미 있게 증가하였으며(p<0.05), 특히 5 nM에서는 대조군에 비하여 약 2.5배의 멜라닌 생성 증가를 보였다. 결과는 박 등²¹⁾이 0.5 nM α -MSH를 처리하여 멜라닌 양이 2배 증가되었다는 연구결과와 일치하였다.

α -MSH가 tyrosinase 활성에 미치는 영향 – α -MSH가 멜라닌 합성에 미치는 영향을 밝히기 위하여 α -MSH 처리 후에 tyrosinase의 활성도를 *in vitro*에서 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 α -MSH 처리군이 대조군에 비하여 모두 의미있게 증가되었으며, 특히 5 nM에서는 대조군에 비하여 약 3.6 배의 tyrosinase 활성을 보였다(p<0.05). 이것은 멜라닌 양이 2.5 배 증가한 것과 비교하면 더 많은 증가를 보인 것이며, 전체적으로 tyrosinase 활성이 대조군에 비하여 더 많은 증가를 보인 반면, 멜라닌의 생성 양은 그에 미치지 못하였다. 이것은 tyrosinase 작용이 멜라닌 합성의 초기단계로서 활성이 크게 증가하지만, 멜라닌은 최종산물이므로 초기단계에 증가하는 tyrosinase 활성에 비하여 멜라닌은 다른 경로들도 많고 여러 단계를 거치므로 적게 만들어지기 때문인 것으로 사료된다. 이것은 배양된 인체 멜라닌 세포에 α -MSH를 투여하여 α -MSH의 세포내 신호 전달물질인 cAMP의 증가와 tyrosinase 활성도가 증가된 것²²⁾과 멜라닌 세포의 멜라닌화뿐만 아니라 세포의 증식도 일어난다고 보고된 내용²³⁾과 같은 결과이다. α -MSH가 세포막에 존재하는

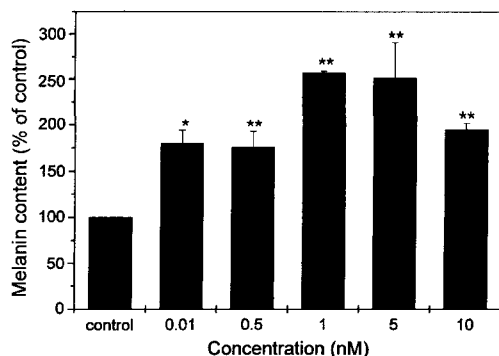


Fig. 5 – Effect of α -MSH concentration on melanin content of B16 mouse melanoma cells. The cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After treatment of α -MSH for 72 hrs, melanin content was measured at 405 nm. Data were means \pm SD. This experiment was repeated five times.

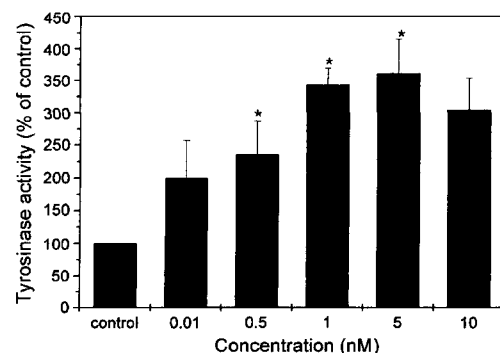


Fig. 6 – Effect of α -MSH concentration on tyrosinase activity of B16 mouse melanoma cell. The cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After treatment of α -MSH for 48 hrs, tyrosinase activity was measured at 405 nm. Data were means \pm SD. This experiment was repeated five times.

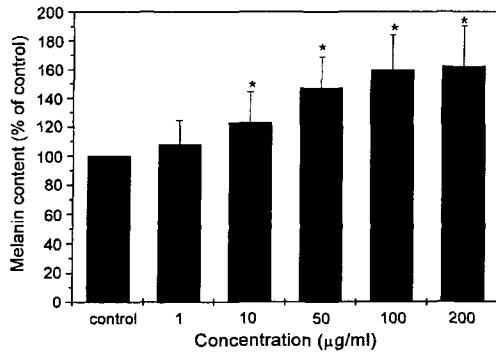


Fig. 7 - Effect of EK concentration on melanin content of B16 mouse melanoma cells. The cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After treatment of EK for 72 hrs, melanin content was measured at 405 nm. Data were means \pm SD. This experiment was repeated five times.

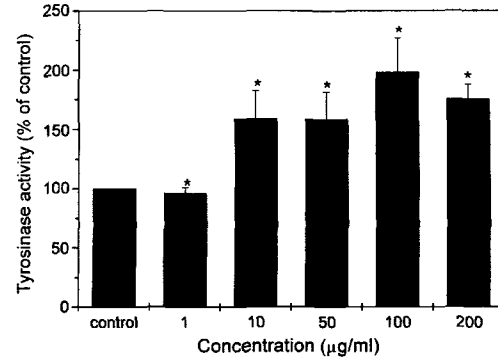


Fig. 8 - Effect of EK concentration on tyrosinase activity of B16 mouse melanoma cells. The cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After treatment of EK for 48 hrs, tyrosinase activity was measured at 405 nm. Data were means \pm SD. This experiment was repeated five times.

수용체와 결합하면 adenylate cyclase가 활성화되어 세포내 cAMP를 증가시키고, 증가된 cAMP에 의하여 cAMP-dependent protein kinase(PKA)가 활성화된다. 그 후 일련의 과정을 거쳐 tyrosinase가 활성화되어 멜라닌화가 진행되는 것으로 설명할 수 있다.^{24,26)}

음양곽 물추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향 - 음양곽 물추출물이 *in vitro*에서 멜라닌 합성에 미치는 영향을 직접적으로 확인하기 위하여 최종산물인 멜라닌 양을 측정하였다. B16 mouse melanoma 세포를 24 시간 배양한 후 배양액을 교체하고 음양곽 물추출물을 1 µg/ml에서부터 200 µg/ml까지 다양하게 처리하였다. 72 시간 배양한 다음 B16 mouse melanoma 세포의 전체 멜라닌 양을 측정하고 결과 음양곽 처리군 모두가 대조군에 비하여 의미 있게 증가하였다($p < 0.01$). 특히 100 µg/ml 음양곽 처리군에서는 대조군에 비하여 약 1.6 배의 멜라닌 생성 증가를 보였다(Fig. 7).

음양곽 물추출물이 tyrosinase activity에 미치는 영향 - Tyrosinase는 멜라닌 합성 과정에서 속도제한(rate-limiting) 효소이며 멜라닌 합성의 주요한 조절적 단계를 나타내는 효소이다. 음양곽 물추출물이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 음양곽 물추출물 처리 후에 tyrosinase의 활성도를 *in vitro*에서 측정하였다. B16 mouse melanoma 세포를 24 시간 배양한 후 배양액을 교체하고 음양곽 물추출물을 1 µg/ml에서부터 200 µg/ml까지 다양하게 처리하고 배양시간에 따라 tyrosinase의 활성도를 측정하였다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 음양곽 물추출물 처리 양이 증가함에 따

라 tyrosinase 측정값은 대조군에 비하여 모두 의미있는 증가율을 보였다. 특히 100 µg/ml 투여군에서는 대조군에 비해 약 2배의 증가를 보였다($p < 0.05$). 음양곽 물추출물을 B16 mouse melanoma 세포에 처리시 대조군에 비하여 멜라닌 양과 tyrosinase 활성이 모두 증가하는 경향을 보였다. 이것은 α -MSH와 마찬가지로 음양곽 물추출물을 B16 mouse melanoma 세포에 처리시 tyrosinase가 활성화되어 멜라닌화가 증가되는 것으로 해석된다. 한편, 음양곽 물추출물을 처리한 군들의 tyrosinase 활성과 멜라닌 양을 비교해볼 때 α -MSH와 마찬가지로 tyrosinase 활성이 멜라닌 양에 비하여 더 많은 증가를 보였는데 이것은 음양곽 물추출물을 B16 mouse melanoma 세포에 처리함으로써 멜라닌 합성의 초기단계인 tyrosinase 활성이 증가하나 여러 단계의 반응경로를 지나는 동안에 최종산물인 멜라닌의 생성율이 낮아지는 것으로 설명될 수 있다. 또한 α -MSH와 음양곽 처리에 의한 멜라닌 생성 및 tyrosinase 활성도가 거의 비슷한 경향을 보이는 것으로 보아 음양곽 물추출물에 의한 B16 mouse melanoma 세포의 멜라닌화는 α -MSH와 마찬가지로 cAMP 의존형 신호 전달경로인 PKA 경로와 관련이 있으리라고 추정되나 확실치 않으므로 cAMP 양을 직접 정량하는 실험들을 보완하는 연구가 진행 중에 있다.

결론

음양곽이 피부의 멜라닌 색소 형성에 어떠한 영향

을 나타내는지를 규명하기 위하여 B16 mouse melanoma 세포에 다양한 양의 음양곽을 처리하여 음양곽에 의한 B16 mouse melanoma 세포의 형태적 변화, 수적 변화, 멜라닌 양의 변화 및 tyrosinase 활성도를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 음양곽 물추출물은 B16 mouse melanoma 세포의 형태에 큰 영향을 주지 않았다.

2. 대조군에 비해 음양곽 처리된 B16 mouse melanoma 세포의 수가 약간 감소하였으나 통계적인 유의성은 없었다.

3. Tyrosinase 활성도는 음양곽 처리군 모두에서 통계적으로 유의한 증가를 보였으며, 특히 100 µg/ml 처리군에서 가장 큰 증가를 보였다.

4. 멜라닌 양은 음양곽 처리군 모두에서 통계적으로 유의한 증가를 보였다.

이상의 결과를 종합해보면 음양곽 물추출물은 B16 mouse melanoma 세포의 형태와 증식에는 영향을 주지 않았으나 melanoma 세포의 멜라닌 생성은 증가시키는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 BK 21 사업의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Abdel-Malek, Z. A. : Endocrine factors as effects of integumental pigmentation. *Dermatol. Clin.* **6**, 175 (1988).
- 2) Im, S., Moro O., Peng, F., Medrano, E. E. and Cornelius, J. : Activation of the cAMP pathway by α -melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer Res.* **58**, 47 (1998).
- 3) Luger, T. A., Scholzen, T. and Grabbe, S. : The Role of α -melanocyte stimulating hormone in cutaneous biology. *Invest Dermatol Symp Proc.* **2**, 87 (1997).
- 4) Hearing, V. J. and Jimenez, M. : Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigment. *Int. J. Biochem.*, **19**(12), 1141 (1987).
- 5) Körner, A. M. and Pawelek, K. : DOPAchrome conversion: A possible control point in melanin biosynthesis. *J. Invest. Dermatol.*, **75**, 192 (1980).
- 6) Shin, K. H. and Lim, S. S. : Difference in components of *Epimedium koreanum* in compliance with seasons and places of collection. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **4**(4), 321 (1996).
- 7) Kang, S. S., Shin, K. H., Chung, S. G. and Cho, E. H. : Flavonoids from *Epimedium koreanum*. *Kor. J. Pharmacogn.* **19**(2), 93 (1988).
- 8) Xu, G. W., Xu, B. J. and Wang, M. T. : Isolation and identification of icariin and icariside I. *Chin. Pharm. Bull.* **22**, 129 (1987).
- 9) Xu, S. C., Wang, Z. X., Wu, L. J., Wang, N. B. and Chen, Y. J. : Isolation and identification of icariin and epimedeside A. *Chin. Trad. Herb Drugs.* **13**, 9 (1982).
- 10) Hong, H. : *Oriental materia medica. Oriental Healing Arts Institute*, Taiwan, 563 (1986).
- 11) Miyase, T., Ueno A., Takizawa, N., Kobayashi, H. and Oguchi, H. : Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum* (II). *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 3713 (1987).
- 12) Kang, S. S. : Phytochemical studies on *Epimedium Herba* (II). *Kor. J. Pharmacogn.* **21**(1), 56 (1990).
- 13) Shin, K. H. : Determination of icariin in *Epimedium Herba* by high performance liquid chromatography. *Kor. J. Pharmacogn.* **20**(1), 21 (1989).
- 14) Kim, S. Y., Kim, J. H. and Kim, S. K. : Isolation and characterization of antioxidant components in *Epimedium koreanum* Nakai extract. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **24**(6), 535 (1992).
- 15) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immun. Methods.* **65**, 55 (1983).
- 16) Skelan, P. and Storeng, R. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107 (1990).
- 17) Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. : Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α -25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**, 1474 (1985).
- 18) Matinez-Esparza, M. : Mechanisms and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **225**, 139 (1998).
- 19) Hadley, M. E. : Source synthesis, chemistry, secretion and metabolism in the melanotropic peptides, Vol 1,

- CRC Press Boca, Raton FL (1988).
- 20) Lerner, A. B. and McGuire, J. S. : Effect of alpha- and beta-melanocyte stimulating hormone on the skin color of man. *Nature* **189**, 176 (1961).
- 21) Park, J. S., Nam, W. Y., Mun, Y. J., Jeon, B. H. and Woo, W. H. : Effect of seosikyongsan on the melanogenesis of B16 mouse melanoma cell line, *Kor. J. Orient. Med. Pathol.* **14**(1), 160 (2000).
- 22) Ranson, M., Posen, S. and Manson, R. S. : Human melanocytes as a target tissue for hormone: *in vitro* studies with 1 α -25-dihydroxyvitamine D3, α -melanocyte stimulating hormone and beta estradiol. *J. Invest. Dermatol.* **91**, 593 (1988).
- 23) Swope, V. B., Medrano, E. E. and Smalara, D. : Long-term proliferation of human melanocytes is supported by the physiologic mitogens α -melanotropin, endothelin-1 and basic fibroblast growth factor. *Exp. Cell Res.* **217**, 453 (1996).
- 24) Luger, T. A., Scholzen, T. and Grabbe, S. : The role of α -melanocyte stimulating hormone in cutaneous biology. *Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **2**, 87 (1997).
- 25) Kligman, L. H. and Kligman, A. M. : The nature of photoaging: its prevention and repair. *Photodermatol.* **3**, 215 (1986).
- 26) Weiss, J. S. and Ellis, C. N. : Topical tretinoin improves photoaged skin: a double-blind, vehicle-controlled study. *JAMA* **259**, 527 (1988).