

음양곽과 α -MSH에 의한 B16 Melanoma 세포의 멜라닌화와 Retinoic Acid의 억제 효과

千賢子¹ · 金日光* · 禹元洪¹

¹원광대학교 한의학 전문대학원

원광대학교 자연과학대학

(2000. 7. 21 접수)

Inhibitory Effects of Retinoic Acid and Melanization of B16 Melanoma Cell by *Epimedium koreanum* Nakai and α -MSH

Hyunja Chun,¹ Ilkwang Kim,* and Wonhong Woo¹

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

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

(Received July 21, 2000)

요 약. 음양곽 불추출액과 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)에 의한 B16 melanoma 세포의 멜라닌화를 비교 조사하였으며, retinoic acid (RA)에 의한 억제효과도 연구하였다. B16 melanoma 세포(1×10^5 개 정도)를 α -MSH로 처리하고 72시간 배양한 결과 α -MSH 처리농도에 비례하여 tyrosinase 활성도와 melanin 생성이 증가되었으며, 8 ng/mL 처리시 tyrosinase 활성도는 350%, melanin 함량은 290% 이상이었다. 음양곽 불추출액으로 처리한 경우에는, 100 μ g/mL 처리시 tyrosinase 활성도는 200%, melanin 함량은 180% 이상이었다. 위 조건에 RA를 가하면, α -MSH의 경우 tyrosinase 활성도는 350%에서 210%로, melanin 함량은 290%에서 250%로 억제되었다. 음양곽 불추출액의 경우 tyrosinase 활성도는 200%에서 100%로, melanin 함량은 180%에서 120%로 억제되었다. 이 결과는 음양곽 불추출액이 cAMP 신호전달 경로를 통하여 B16 melanoma 세포의 멜라닌화를 촉진하며, RA는 그것을 억제하는 것으로 해석된다.

ABSTRACT. Melanization of B16 melanoma cells was comparatively studied by the aqueous extract of *Epimedium koreanum* Nakai(EK) and α -MSH. In addition, inhibitory effects of RA was investigated. B16 melanoma cells(about 1×10^5) have been shown an increase in tyrosinase activity and melanin contents in proportion to concentration of α -MSH when treated with α -MSH and incubated for 72 hrs. They indicated a 350% increase in tyrosinase activity and a 290% increase in melanin contents at 8 ng/mL. In case of EK, they have been shown a 200% increase in tyrosinase activity and a 180% increase in melanin contents at 100 μ g/mL. In addition of RA to the above condition, they have been shown an inhibition from 350% to 210% in tyrosinase activity and from 290% to 250% in melanin contents in α -MSH, and inhibition from 200% to 100% in tyrosinase activity and from 180% to 120% in melanin contents in EK. From the above results, it is suggested that EK promotes melanization of B16 melanoma cells through cAMP pathway, whereas RA inhibits it.

서 론

머리카락과 피부색을 이루는 색소 중의 하나인 멜라닌은 멜라닌세포의 멜라노솜에서 합성되며, 아미노산과 L-tyrosine이 3, 4-dihydroxyphenylalanine(L-dopa)으로

전환됨으로써 시작된다. L-dopa는 효소인 tyrosinase에 의해 dopa-quinone으로 산화된다. Dopa-quinone은 상대적으로 불안정한 중간 매체인 dopa-chrome으로 전환된 후 5, 6-dihydroxyindole을 거쳐 멜라닌 고분자를 형성한다.¹

멜라닌화에 영향을 미치는 인자로는 유전적 요인, 자외선과 같은 물리적 요인, melanocyte stimulating hormone(α -MSH), arachidonic acid와 그 대사산물 등이 있으며, 또한 여러 가지 cytokine 등이 관여하는 것으로 알려져 있다.²

멜라닌화에 영향을 미치는 인자 중 가장 많이 알려진 MSH는 α -, β -, γ -MSH 세 종류가 있으며, 전구체인 proopiomelanocortin(POMC)으로부터 유래하는 펩티드성 호르몬에 속한다.³

MSH에 의한 멜라닌 생합성과정은 정확한 메커니즘이 밝혀지지는 않았으나, 자외선에 의해 각질형성세포와 멜라닌세포에서 MSH 수용체가 증가함⁴과 동시에 표피세포에서 생산된 MSH가 색소세포의 표면에 존재하는 수용체와 결합한다. MSH와 그 수용체의 복합체가 세포내로 들어가서 adenylate cyclase를 활성화시킨다. 세포내 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)를 증가시켜 protein kinase A(PKA)와 tyrosinase가 활성화되고, tyrosinase에 의해 멜라닌이 합성되는 것으로 보고된 바 있다.^{5,8}

Lerner와 McGurie⁹가 인체피부의 멜라닌화와 MSH와의 연관성을 제시하였다. Fuller와 Meyskens¹⁰는 배양된 인체 멜라닌세포와 악성 흑색종세포주에 α -MSH를 첨가하여 tyrosinase의 활성도를 관찰하였다. Halaban¹¹과 Ranson¹²은 배양된 인체 멜라닌세포에서 α -MSH의 수용체와 α -MSH의 수용체를 발견하였으며, Donation¹³ 등은 α -MSH가 인체 멜라닌세포에서 세포내 신경전달물질인 cAMP의 양과 tyrosinase의 활성도를 증가시키는 것을 보고하였다.

한편, 비타민 A 합성 유도체인 all-trans-retinoic acid (RA)는 표피의 각질세포에서 멜라닌세포를 분산시켜 색소침착을 흐리게 하며,¹⁴ 색소세포의 수지상돌기에서 각질세포로의 색소전달을 방해하며, 표피교체를 가속시켜 색소손실을 촉진하는 것으로 보고된 바 있다.¹⁵ 특히, RA는 피부가 자외선에 노출 되어 나타나는 과색소침착의 예방과 치료에 효과를 주는 것으로 알려져 있다.

그러나 Zheng과 Kligman¹⁶은 Yucatan pig의 피부에 RA를 도포하면 멜라닌세포의 수와 크기가 증가하고 멜라닌 생성이 촉진된다는 결과를 보고하였고, Yaar와 Gilchrist¹⁷는 배양된 인체 멜라닌세포에서 RA는 멜라닌 양이나 tyrosinase의 활성도에 영향을 주지 않는다고 하였으며, Romero¹⁸ 등은 tyrosinase 활성도를 억제한다고 하였다. Garbe¹⁹와 Orlow²⁰ 등은 흑색

종 세포의 배양실험 결과 RA는 멜라닌세포의 증식을 억제하거나 분화를 촉진하여서 자외선에 노출되지 않은 조건에서 고유의 멜라닌 생성을 촉진하나, 자외선에 노출된 상태에서 호르몬이나 약물에 의해 가역적으로 유도되는 임의의 멜라닌 생성은 억제한다고 하였다.

이와 같이 멜라닌세포와 흑색종 세포 사이에서, 또는 인종 사이에서도 세포의 증식 및 멜라닌화에 대한 RA의 영향이 서로 상반되게 나타나는 것으로 보고되었을 뿐, 멜라닌화에 관련된 반응경로와 RA의 영향에 대해서는 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않다.

음양곽(*Epimedium koreanum* Nakai: EK)은 삼지구엽초의 지상부를 건조한 것인데, 한방에서는 강장, 강정제 및 음위치료제로 빈번히 처방, 부약되고 있으며 최근에는 생활수준의 향상으로 소비가 증가 추세에 있는 중요한 생약이다.²¹ 음양곽의 주성분은 flavonoid인 icarin, epimedo side A 등으로 밝혀졌으며, 이중 icarin은 고혈압에 효과를 나타내는 것으로 보고되었다.²²⁻²⁵

본 연구에서는 음양곽이 멜라닌세포의 멜라닌화에 관여하는 것과 멜라닌 생성의 반응경로 메커니즘에 미치는 영향을 규명하기 위하여, 음양곽 물추출액과 α -MSH에 의한 멜라닌 생성 및 tyrosinase 활성도를 조사하였으며, B16 melanoma 세포의 멜라닌화에 대한 RA의 영향을 조사하여 비교하였다.

실 험

한약재 추출. 한약재인 음양곽 400 g에 3차증류수 6.5 L를 가하여 3 시간 동안 끓여서 거름종이로 여과하였다. 3,200 rpm으로 30 분간 원심분리한 후 -70°C 에서 freeze dryer로 냉동, 건조시켜 42.75 g의 시료를 얻었다. 시료는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Co., USA) 배양액에 녹인 후 세포에 투여하기 전 $0.22\ \mu\text{m}$ 여과지로 여과하고 멸균하여 농도를 조정하여 다음 사용하였다.

시약제조. α -MSH(Sigma, USA)는 0.5 M acetic acid에 녹여 stock solution으로 만든 후 DMEM 배양액으로 희석하여 냉장고에 보관하면서 사용하였다. RA(Sigma)는 EtOH에 녹여 저장용액을 만들어 냉암소에 보관하면서 사용하였다.

SRB assay. Sulforhodamine B(SRB) assay는 Skelan²⁶의 방법을 변형하여 측정하였다. 96 well 배양용기에

B16 melanoma(한국세포주은행 : KCLB)를 well 당 1×10^5 개가 되도록 배양하였다. 각 well에 4°C의 50% trichloroacetic acid(TCA) 용액 50 μ L를 조심스럽게 첨가하여 1시간 동안 4°C에서 보관하여 배양용기의 세포들을 고정하였다. 이를 흐르는 물로 5회 씻은 후 실온에서 건조시켰다. 여기에 1% 초산에 녹인 0.4% SRB(Sigma Co., U.S.A.)를 넣고 30분 동안 방치한 후 SRB를 제거하고 1% 초산으로 4회 씻고 이를 실온에서 건조시킨 후 10 mM unbuffered tris base (pH 10.5)를 첨가하였다. 실온에서 10분간 방치한 다음 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

멜라닌 양 측정. 멜라닌 양은 Hosoi²⁷ 등의 방법을 변형하여 사용하였다. 세포를 배양하여 phosphate buffered saline(PBS)로 2회 세척한 후 원심분리하여 세포 침전물을 만들었다. 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)가 첨가된 1 N NaOH 용액을 200 μ L 첨가하고 80°C에서 1시간 동안 용해하였다. 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 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-Esparza²⁸의 방법에 의하여 측정하였다. 각 well에서 멜라닌 세포를 수확하여 원심분리한 후 세포 침전물을 만들었다. 100 μ L 세포용해액(1% Triton X-100, 10 mM sodium phosphate, 0.1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride)을 넣고 얼음에 방치하여 세포를 파괴시킨 후 원심분리 하였고, 상층액을 취하여 효소용액으로 사용하였다. 100 mM sodium phosphate(pH 7.0) 용액 100 μ L에 시료인 효소 용액 50 μ L를 넣고 37°C에서 5분간 보온한 후 100 mM catechol 50 μ L를 가하였다. ELISA reader로 37°C, 405 nm에서 흡광도의 변화를 1시간 동안 관찰하였다.

통계방법. 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 Student's t-test를 사용하여, p-value가 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

세포생존율에 미치는 영향. 음양곽의 추출물이 B16

melanoma 세포의 생존율에 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 음양곽 물추출액을 1 μ g/mL에서 200 μ g/mL까지의 다양한 농도로 B16 melanoma 세포에 처리하고 72 시간 후에 SRB 방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 음양곽 물추출액에 의한 세포의 생존율에는 큰 변화를 나타내지 않았으나 200 μ g/mL의 농도에서는 약 5%의 감소를 보였다.

멜라닌 합성에 미치는 영향. 생체내에서의 melanin 합성과정은 먼저 tyrosine을 기질로 하여 L-3,4-dihydroxyphenylalanine을 생성시키고 이를 다시 L-dopaquinone으로 전이시키는 연속된 효소적 산화가 진행된 후 각 생성물의 중합 반응 등에 의해 이루어진다. α -MSH는 생체내 멜라닌 합성에 있어서 가장 중요한 물질로 뇌하수체에서 분비되며, 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMX), forskolin, dibutyryl cAMP(dbcAMP)와 마찬가지로 cAMP 의존형 신호전달 경로인 PKA 경로로 멜라닌화를 촉진한다.²⁹

α -MSH와 음양곽 물추출액이 B16 melanoma 세포의 멜라닌화에 미치는 영향을 알아보기 위하여, B16 melanoma 세포를 well 당 1×10^5 개씩 넣고 24시간 경과 후 새로운 배양액으로 교체한 다음 다양한 농도의 α -MSH와 음양곽 물추출액을 가하여 72시간 배양한 다음 멜라닌 양을 측정하고 비교하였다. 먼저 α -MSH가 멜라닌 합성에 미치는 영향을 보면 Fig. 2A에서 보는 바와 같이 α -MSH 처리군은 대조군에 비하여 모두 통계적으로 유의성 있는 증가를 보였으며($p < 0.05$ 와 $p < 0.01$), 특히 8 ng/mL에서는 대조군에 비하여 약 2.5 배의 멜라닌 생성 증

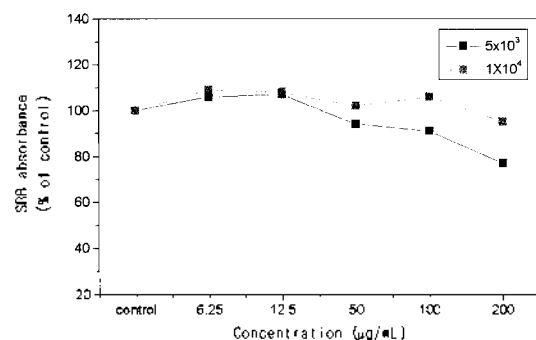


Fig. 1. Effect of the aqueous extract of *Epimedium koreanum* NaKai (EK) on the viability of B16 melanoma cells. The cells were treated with various concentrations of EK for 72 hrs. The viability of the cells was measured by SRB assay.

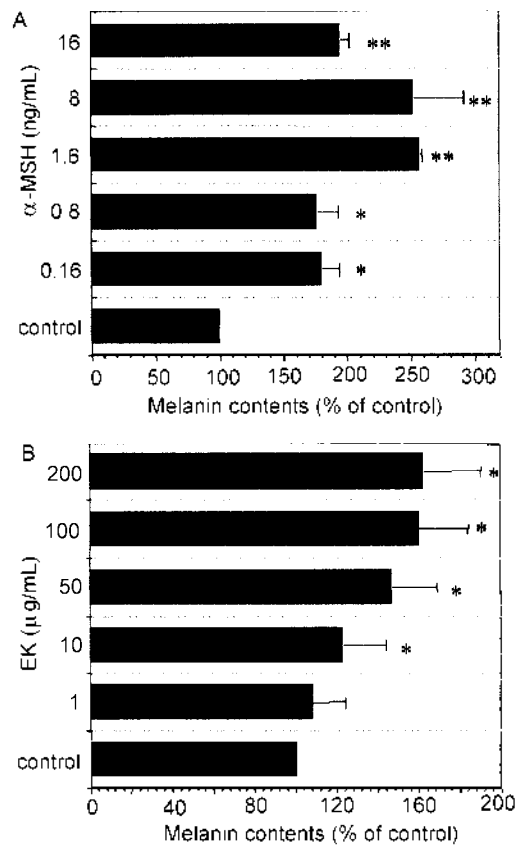


Fig. 2. Change in melanin contents according to treatment of α -MSH and EK on B16 melanoma cells. After treatment for 72 hrs, melanin contents was measured at 405 nm. Data were the mean \pm S.D. This experiment was repeated five times. A: α -MSH (* p <0.01, ** p <0.001), B: EK (* p <0.01).

가를 보였다. 이것은 박 등³⁶이 8 ng/mL α -MSH를 처리하여 2.6배의 멜라닌 증가를 얻은 결과와 잘 일치하였다.

음양곽 물추출액이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 알기 위하여 음양곽 물추출액을 1 μ g/mL에서부터 200 μ g/mL까지 다양하게 처리한 후 72시간 배양한 다음 B16 melanoma 세포의 전체 멜라닌 양을 측정된 결과는 Fig. 2B와 같다. α -MSH의 경우보다 증가폭이 작았지만, 음양곽 물추출액의 양이 증가함에 따라 대조군에 비하여 실험군이 모두 통계적으로 유의성 있게 증가하였고 (p <0.05와 p <0.01), 특히 100 μ g/mL 음양곽 처리군에서는 대조군에 비하여 약 1.6배의 멜라닌 생성 증가를 보였다.

Tyrosinase 활성도에 미치는 영향. 멜라닌 생합성

과정의 주된 효소인 tyrosinase는 페놀화합물을 기질로 이용하는 구리 함유 polyphenol oxidase 효소이다. Tyrosinase는 생체내에서 monophenol인 tyrosine을 DOPA (o-diphenol)로 산화시키는 tyrosine oxidase로서의 기능과 DOPA를 DOPA quinone(o-quinone)으로 산화시키는 dopa oxidase로서의 기능을 갖는다.³¹ 생체내에서의 이러한 기능 때문에 tyrosinase는 멜라닌 polymer를 생합성하는데 중요한 역할을 하고 있고, 따라서 멜라닌세포에서의 tyrosinase 활성은 피부 멜라닌 생성에 결정적으로 영향을 미치게 된다.

α -MSH로 처리하여 48시간 배양한 후 tyrosinase의 활성도를 측정하였다.

Fig. 3A에서 보는 바와 같이 α -MSH 처리군이 대

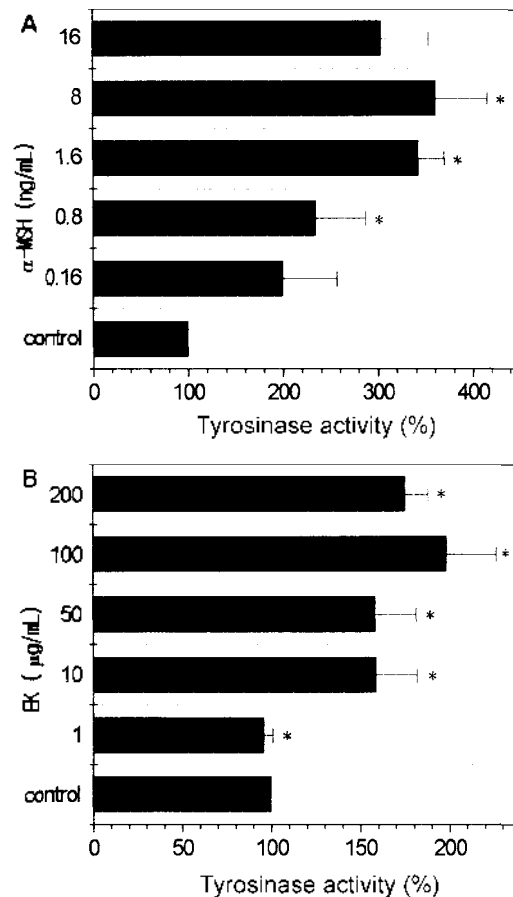


Fig. 3. Change in tyrosinase activity according to treatment of α -MSH and EK on B16 melanoma cells. After treatment for 48 hrs, tyrosinase activity was measured at 405 nm. Data were the mean \pm S.D. This experiment was repeated five times. A: α -MSH (* p <0.05), B: EK (* p <0.05).

조군에 비하여 모두 통계적으로 유의성 있게 증가되었으며, 특히 8 ng/mL에서는 대조군에 비하여 약 3.6 배의 tyrosinase 활성을 보였다($p < 0.05$). 이것은 Fig. 2A의 멜라닌 양이 2.5배 증가한 것과 비교하면 더 많은 증가율을 보인 것이다.

음양곽 물추출액을 1 μ g/mL에서부터 200 μ g/mL까지 단계적으로 첨가하여 48시간 배양한 다음 tyrosinase 활성도를 측정된 결과를 Fig. 3B에 보였다. 음양곽 물추출액의 첨가 양이 증가함에 따라 대조군에 비하여 실험군에서 모두 통계적으로 유의성 있게 증가하였고, 특히 100 μ g/ml. 투여군에서는 대조군에 비하여 약 2배의 증가를 보였다($p < 0.05$).

α -MSH와 음양곽 물추출액을 각각 B16 melanoma 세포에 처리한 군이 대조군에 비하여 멜라닌 양과 tyrosinase 활성이 모두 증가하는 경향을 보였고, 증가하는 양상이 서로 비슷하였다. 이것은 α -MSH와 마찬가지로 음양곽 물추출액도 B16 melanoma 세포에 처리시 melanoma 세포의 멜라닌화를 자극하여 tyrosinase가 활성화되어 멜라닌화가 촉진되는 것으로 사료된다.

α -MSH와 음양곽 물추출액을 처리한 군들의 tyrosinase 활성과 Fig. 2의 멜라닌 양을 비교해볼 때 tyrosinase 활성이 멜라닌 양에 비하여 더 많은 증가를 보였는데, 이것은 α -MSH와 음양곽 물추출액을 B16 melanoma 세포에 처리함으로써 멜라닌 합성의 초기단계에서 tyrosinase의 활성이 증가하지만, 여러 단계의 반응경로들을 거치는 동안에 최종산물인 멜라닌의 생성수율이 낮아지기 때문일 것이다.

RA가 고유 멜라닌화에 미치는 영향. 대조군의 멜라닌 양과 tyrosinase 활성도를 측정하여 B16 melanoma 세포의 고유한 멜라닌화를 조사하였고, 실험군을 RA의 농도별로 처리하여 멜라닌 양과 tyrosinase 활성도를 측정하여 비교치를 Fig. 4A에 보였다.

Fig. 4A에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 RA로 처리한 실험군들에서 멜라닌 생성의 억제 효과를 보였으며, RA 1 μ M 농도에서 가장 큰 억제 효과(26%)를 보였다.

Tyrosinase 활성도에 미치는 영향은 Fig. 4B에서 보는 바와 같이 1×10^{-5} μ M에서는 억제 효과가 거의 없으나 RA의 농도가 증가할수록 tyrosinase의 활성도가 크게 억제되었으며, 10 μ M 농도에서 대조군에 비해 44%의 억제 효과를 보였다.

RA 처리에 따라 멜라닌 양과 tyrosinase 활성이 모

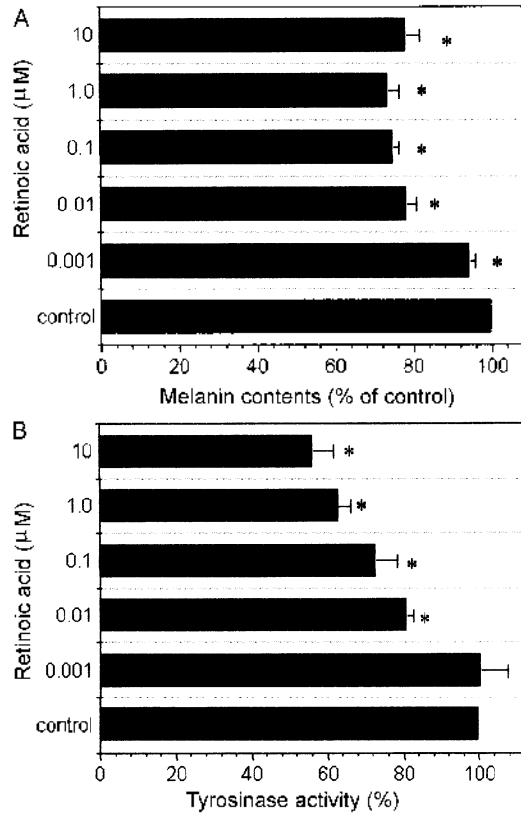


Fig. 4. Effect of RA concentration on melanin contents and tyrosinase activity of B16 melanoma cells. Melanin was measured from cultured cells for 72 hr. Data were the mean \pm S.D. This experiment was repeated five times. A: α -MSH (* $p < 0.05$). B: EK (* $p < 0.05$).

두 감소됨에 따라 RA가 B16 melanoma 세포의 멜라닌화에 직접 관여하여 세포의 멜라닌화를 억제시킨을 알 수 있었으며, 멜라닌보다는 tyrosinase 활성을 현저히 저하시켰다.

α -MSH와 음양곽 물추출액에 의한 멜라닌 생성에 미치는 RA의 영향. 외부자극에 의한 B16 melanoma 세포의 멜라닌화에 미치는 RA의 영향을 관찰하기 위하여 α -MSH와 음양곽 물추출액으로 자극함과 동시에 RA를 농도별로 부여하여 자극에 의한 멜라닌화에 미치는 RA의 영향을 관찰하였다.

Fig. 2A에서 멜라닌 합성이 가장 높게 나타난 8 ng/ml, α -MSH로 B16 melanoma 세포를 처리하고, 다시 RA를 농도별로 처리한 다음 72시간 배양한 후 멜라닌 양을 측정하여 Fig. 5A에 보였다.

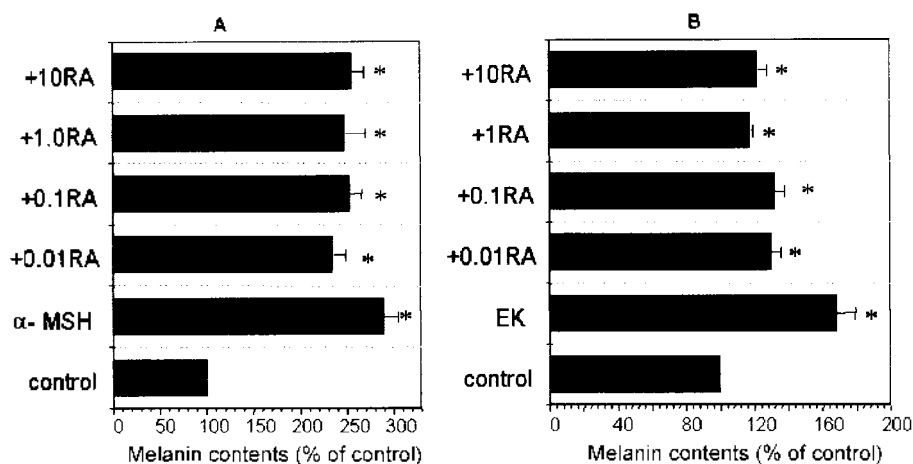


Fig. 5. Change in melanin contents according to concentration of RA in a given α -MSH and EK treatment on B16 melanoma cells. The cells were seeded at 1×10^5 cells/well. After treatment of RA for 72 hrs. melanin contents was measured at 405 nm. Data were the mean \pm S.D. This experiment was repeated five times. A: 8 ng/mL α -MSH-RA (* p <0.05), B: 100 μ g/mL EK-RA (* p <0.05).

Fig. 5A에서 보는 바와 같이 RA 농도 증가에 따라 α -MSH에 의한 멜라닌 양을 억제하는 효과를 나타내었고 억제 정도는 40% 안팎의 억제 효과를 나타내었으며 0.01 M RA 농도에서 54%의 가장 큰 억제 효과를 보였다.

Fig. 2B에서 멜라닌 함량이 가장 높게 나타난 100 μ g/mL 음양곽을 B16 melanoma 세포에 처리하고, 농도별로 RA를 처리한 다음 72시간 배양한 후 멜라닌 양을 측정하여 Fig. 5B에 보였다.

Fig. 5B에서 보는 바와 같이 음양곽에 의한 B16 melanoma 세포의 멜라닌화에 대한 RA의 영향은 RA

농도에 따라 멜라닌 양을 억제하는 효과를 나타내었다. 억제 정도는 α -MSH와 마찬가지로 40% 정도의 억제를 보였고 1 μ M RA 농도에서 50%로 가장 큰 억제 효과를 보였다.

α -MSH와 음양곽 물추출액에 의한 tyrosinase 활성에 미치는 RA의 영향. Tyrosinase 활성에 미치는 RA의 영향을 조사하기 위하여 8 ng/mL α -MSH로 처리한 B16 melanoma 세포에 RA를 농도별로 처리한 후 tyrosinase 활성도를 측정한 결과를 Fig. 6A에 보였다. Fig. 6A에서 보는 바와 같이 RA가 억제작용을 하여 α -MSH에 의한 tyrosinase의 활성을 통계적으로

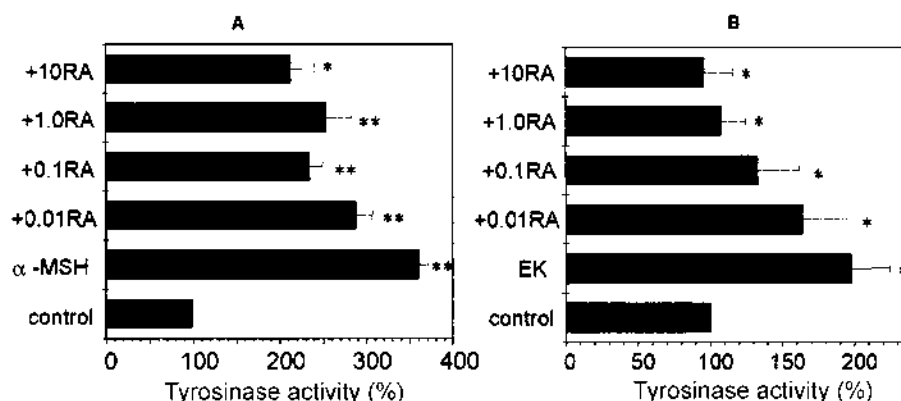
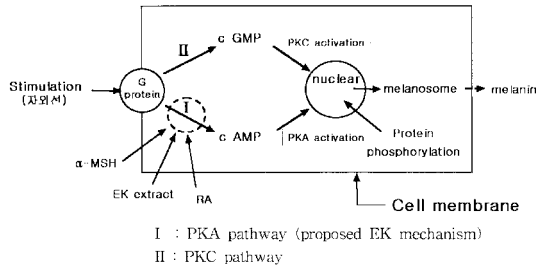


Fig. 6. Change in tyrosinase activity according to concentration of RA in a given α -MSH and EK treatment on B16 melanoma cells. After treatment of RA for 48 hrs. tyrosinase activity was measured at 405 nm. Data were the mean \pm S.D. This experiment was repeated five times. A: 8 ng/mL α -MSH+RA (* p <0.05, ** p <0.001), B: 100 μ g/mL EK-RA (* p <0.05).



Scheme 1. Intracellular signal transduction pathway in melanogenesis. I: PKA pathway (proposed EK mechanism), II: PKC pathway.

유의성 있게 감소시켰으나($p < 0.05$ 혹은 $p < 0.01$), 100 $\mu\text{g/mL}$ 음양광 불추출액으로 처리한 B16 melanoma 세포에 RA를 농도별로 처리하고 48시간 배양한 후 tyrosinase 활성도를 측정한 결과는 Fig. 6B와 같다. 음양광으로 처리하지 아니한 B16 melanoma 세포에서와 마찬가지로 음양광으로 처리한 군에서도 RA 처리에 따라 tyrosinase 활성이 모두 감소되는 것으로 나타났으며($p < 0.05$), 10 M의 RA에서는 대조군의 100% 이하로까지 감소되었다.

RA는 α -MSH나 음양광 처리의 유무에 관계 없이 멜라닌화를 억제하는 것으로 사료된다. 동일 농도의 RA에 의한 억제 정도가 α -MSH와 음양광으로 처리한 군에서 더 크게 나타난 것으로 볼 때 멜라닌세포의 과색소를 보이는 병변에서 RA의 억제 효과가 더 있을 것으로 기대된다.

α -MSH와 음양광 처리에 의한 멜라닌 생성 및 tyrosinase 활성도가 거의 비슷한 경향을 보이는 것으로 보아 음양광 불추출액에 의한 B16 melanoma 세포의 멜라닌화는 α -MSH의 경우와 마찬가지로 cAMP 의존형 신호 전달경로인 PKA 경로와 관련이 있으리라 추정되며, Imokawa³² 등의 α -MSH 메커니즘을 참고하면 음양광 불추출액의 멜라닌화 과정의 메커니즘은 Scheme 1과 같이 제안할 수 있다.

결 론

본 연구에서는 음양광에 의한 멜라닌 생성의 신호전달 메커니즘을 규명하기 위하여 음양광이 멜라닌색소 형성에 미치는 영향을 알아보고 α -MSH와 음양광에 의한 멜라닌 생성을 비교하였으며, α -MSH와 음양광에 의한 멜라닌화에 미치는 RA의 영향을 조사하였다.

- 1) 음양광은 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리시 세포생존율이 95% 이상으로 자체 세포독성 효과는 거의 나타나지 않았다.
- 2) α -MSH와 음양광 모두 tyrosinase activity를 증가시켰다.
- 3) α -MSH와 음양광 모두 최종산물인 멜라닌 양의 생성을 촉진시켰다.
- 4) RA는 B16 melanoma의 멜라닌화와 tyrosinase 활성을 억제시켰다.

이상의 결과에서 α -MSH와 음양광으로 melanoma 세포를 처리한 경우에 멜라닌 생성 및 tyrosinase 활성도가 거의 비슷하게 증가되었으며, RA의 처리에 의해서는 비슷한 감소를 보이는 것으로 보아 음양광에 의한 멜라닌화는 α -MSH와 마찬가지로 cAMP 신호 전달 경로를 통해 촉진되는 것으로 해석되었다.

본 연구는 BK 21 사업의 연구비 지원으로 수행되었으며 저자 중 김일광은 한국과학재단지정 원광대학교 의학자원연구센터 및 전라북도 도청의 연구비지원에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Pawelek, J. M.; K mer, A. M. *Am. Sci.* **1982**, *70*, 136.
2. Bologna, J. J. *Invest. Dermatol.* **1989**, *92*, 651.
3. Gilchrist, B. A.; Park, H. Y.; Eller, M. S. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 1.
4. Chakraborty, A.; Slominski, A.; Ermak, G. *J. Invest. Dermatol.* **1995**, *105*, 655.
5. Im, S.; Moro, O.; Peng, F. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 47.
6. Luger, T. A.; Scholzen, T.; Grabbe, S. *Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **1997**, *2*, 87.
7. Hadley, M. E. *Source Synthesis, Chemistry, Secretion and Metabolism in the Melanotropic Peptides*. Vol 1. CRC Press Boca, Raton FL, 1988.
8. Jose, H. *J. Invest. Dermatol.* **1992**, *99*, 435.
9. Lemer, A. B.; McGuire, J. S. *Nature.* **1961**, *189*, 176.
10. Fuller, B. B.; Meyskens, F. L. Jr. *J. Natl. Cancer Inst.* **1981**, *66*, 799.
11. Halaban, R.; Ponerantz, S. H.; Marshall, S. *J. Cell Biol.* **1983**, *97*, 480.
12. Ranson, M.; Posen, S.; Mason, R. S. *J. Invest. Dermatol.* **1988**, *91*, 593.
13. Donation, P. D.; Hunt, G.; Pieron, C. *Arch. Dermatol. Res.* **1992**, *284*, 424.
14. Kligman, L. H. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1986**, *15*, 779.
15. Kligman, A. M.; Willis, I. *Arch. Dermatol.* **1975**, *111*.

- 40.
16. Zheng, P.; Kligman, A. M. *J. Invest. Dermatol.* **1991**, *96*, 576.
17. Yarr, M.; Gilchrist, B. A. *J. Invest. Dermatol.* **1991**, *97*, 611.
18. Romero, C.; Aberdam, E.; Lamier, C. *J. Cell Sci.* **1994**, *107*, 1095.
19. Garbe, C.; Krasagakis, K.; Kruger, S. *J. Invest. Dermatol.* **1991**, *96*, 1000.
20. Orlow, S. J.; Chakraborty, A. K.; Pawelek, J. M. *J. Invest. Dermatol.* **1990**, *94*, 461.
21. Shin, K. H.; Lim, S. S. *Kor. J. Medicinal Crop. Sci.* **1996**, *4*(4), 321.
22. Kang, S. S.; Shin, K. H.; Chung, S. G.; Cho, E. H. *Kor. J. Pharmacogn.* **1988**, *19*(2), 93.
23. Xu, G. W.; Xu, B. J.; Wang, M. T. *Chin. Pharm. Bull.* **1987**, *22*, 129.
24. Xu, S. C.; Wang, Z. X.; Wu, L. J.; Wang, N. B.; Chen, Y. *J. Chin. Trad. Herb Drugs.* **1982**, *13*, 9.
25. Miyase, T.; Ueno, A.; Takizawa, N.; Kobayashi, H.; Oguchi, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 3713.
26. Skelan, P.; Storeng, R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107.
27. Hosoi, J.; Abe, E.; Suda, T.; Kuroki, T. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 1474.
28. Matinez-Esparza, M. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *225*, 139.
29. Bryan, B. F. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *114*(2), 268.
30. Park, J. S.; Nam, W. Y.; Mun, Y. J.; Jeon, B. H.; Woo, W. H. *Kor. J. Orient. Med. Pathol.* **2000**, *14*(1), 160.
31. Vamons-Vigyazo, L. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1981**, *15*, 49.
32. Imokawa G. T. *Pigment Cell Res.* **1997**, *10*, 218.
-