

大韓外官科學會誌 : 第14卷 第1號  
The Journal of Oriental Medical Surgery,  
Ophthalmology & Otolaryngology  
Vol. 14, No 1, May 2001.

## 天花粉이 멜라닌형성에 미치는 影響

李寬順\* · 金在柱 · 宋塚石 · 吳春根 · 林圭庠\*\*

### ABSTRACT

#### Effect of Radix Trichosanthis on the Melanogenesis

Recently many efforts were focused to understand the mechanical insights of melanogenesis to develop the agents for hyper-pigmentation and hypo-pigmentation. In the melanin biosynthetic pathway, tyrosinase is the rate limiting enzyme, and  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone(MSH) or cAMP-elevating agents stimulate melanogenesis and enhance the melanin synthesis and the tyrosinase activity. The author has analyzed the effects of *Radix Trichosanthis* on the basal melanogenic activities of B16/F10 mouse melanoma cells, and on the  $\alpha$ -MSH or forskolin-induced melanogenesis.

*Radix Trichosanthis* alone markedly suppressed melanin content and tyrosinase activity in a dose-dependent manner. Pretreatment of the cells with *Radix Trichosanthis* also suppressed the increase of  $\alpha$ -MSH (10 nM) or forskolin (20  $\mu$ M)-induced melanin content and tyrosinase activity. The decrease in the tyrosinase activity was paralleled by a decrease in the abundance of tyrosinase protein and tyrosinase promoter activity. Pretreatment of the cells with *Radix Trichosanthis* also inhibited the increase of forskolin(20  $\mu$ M) induced the amount of tyrosinase protein and tyrosinase promoter activity. The results of DOPA staining revealed that pretreatment of the cells with *Radix Trichosanthis* showed less intensity than B16 melanoma cells stimulated with  $\alpha$ -MSH or forskolin.

---

\* 원광대학교 한의과대학

\*\* 원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과

이 논문은 원광대학교 한의학전문대학원 BK-21 사업단의 지원에 의하여 연구되었음

These results suggest that *Radix Trichosanthis* inhibits melanogenesis and abrogates  $\alpha$ -MSH and cAMP-induced melanogenesis in B16 melanoma cells.

## I. 緒 論

미인에 대한 객관적인 기준은 시대나 장소에 따라 다양하게 변화해 왔지만, 깨끗하고 하얀 피부는 아름다움과 건강의 척도로서 변하지 않는 조건이며, 최근에도 이에 대한 관심은 날로 증가되고 있다<sup>45,58,62</sup>. 인간의 피부색은 멜라닌의 양에 의해서 주로 결정되며, 혈색소, 카로틴 같은 색소 성분과 혈관분포, 각질층의 두께 등에 의해서도 영향을 받는다<sup>47,60,61,69</sup>.

멜라닌은 표피의 기저층 사이나 기저층의 아래, 털주머니 등에서 주로 관찰되는 멜라닌세포로부터 합성되며, 세포질 돌기를 통해 각질형성세포로 운반되어 표피-멜라닌 단위를 형성한다<sup>47,60,69</sup>. 멜라닌의 합성은 세포의 유전적 요인과, 대사, 내분비, 염증, 감염, 종양 등과 같은 물리적 및 화학적 요인들에 의해 크게 좌우되는데<sup>70-72</sup>, 이러한 원인으로 인해서 멜라닌 합성에 이상이 발생하면, 아름다운 피부에 치명적인 손상을 끼치는 기미, 주근깨 등의 과색소 침착증이 발생한다<sup>58-62</sup>.

韓醫學 文獻에는 皮膚의 과색소 침착증에 대해 《黃帝內經·素問》〈至真要大論〉<sup>12)</sup>에 “歲陽明在天, 燥淫所勝... 面塵, 身無膏澤, 足外反熱”이라 하여 처음 收錄되었고, 이후 여러 醫家들은 發疹의 形態와 原因에 따라 黧黯, 面黑, 雀斑 등으로 다양하게 언급하였으며<sup>4,6-9,11,14-16,19,23-25,30-36,41-44</sup>, 治療方法으로는 허증과 실증으로 각각 변증하여 내복약과 외용약들을 사용하였다<sup>1-3,5,10,13,17,18,20-22,26-29,37-40,44</sup>.

天花粉(*Radix Trichosanthis*)은 黧黯, 面黑, 雀斑 등을 치료하는데 응용되는 玉容散, 紅玉散, 西施玉容散의 구성약물중 하나로서<sup>7,20,30,42,44</sup>, 박과

(Cucurbitaceae)에 속하는 하늘타리 및 同屬 近緣 植物의 塊根이다<sup>17,46,55,56</sup>. 전국적으로 자생하는 다년생 草本植物인 天花粉은 瓜蒌根, 括蒌根, 蒌根, 瑞雪 등으로도 불리우며, 淸熱生津, 淸肺化痰, 消腫排膿 등의 효능이 있어 熱病傷津, 口乾煩渴, 消渴, 肺熱燥咳, 癰腫瘡瘍, 瘡腫, 乳腺炎, 咳嗽 등의 치료에도 사용된다<sup>46,56</sup>.

天花粉의 실험적 연구로는 金<sup>66)</sup>은 饑餓家兔에서 血糖을 상승시키며, 李 등<sup>67)</sup>은 天花粉을 ether와 alcohol로 처리한 殘分을 精製水로 抽出하여 家兔에 經口投與하였을 때 혈당저하작용이 있다고 하였다. 또한 文<sup>68)</sup>은 天花粉抽出物이 低用量에서는 고혈당작용을, 高用量에서는 저혈당작용을 나타내며, alloxan에 의한 고혈당작용을 완화하였다고 보고하였다.

또한 피부의 멜라닌 형성에 미치는 한약재에 대한 실험적 연구로 朴 등<sup>17,18)</sup>은 白朮과 西施玉容散이  $\alpha$ -MSH에 의하여 活性化 되는 c-Jun N-terminal kinase(JNK)活性을 抑制시키고, AP-1과 같은 전사활성인자(transcriptional activator)를 不活性化시켜 멜라닌 量의 生成을 抑制시킨 것으로 보고하였으나 이부분에 대한 연구는 아직 미미한 수준이다.

이에 著者는 얼굴에 발생하는 皮膚 疾患에 應用되어 온 玉容散, 紅玉散, 西施玉容散 등의 構成 藥物이면서, 單方으로도 活用되어진 天花粉이 피부의 멜라닌 합성과정에서 어떠한 影響을 미치는지 알아보기 위하여 B16 melanoma 세포를 이용한 tyrosinase의 활성도와 멜라닌량을 측정하였으며, tyrosinase 단백질 발현정도와 tyrosinase 유전자 promoter 활성도에 미치는 영향을 조사하였고,  $\alpha$ -MSH에 의한 과색소생성 유발시 각 단계별 억제효과를 調查하여 有意性 있는 結果를 얻었기에

報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 試料調製

本 實驗에 사용한 天花粉은 圓光大學校 附屬 韓方病院에서 구입하였으며, 天花粉 100g에 물 1ℓ를 가하여 3시간 동안 끓인 후 거즈로 여과하고 3,200rpm으로 30분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. -70℃에서 freeze dryer로 동결건조 시킨 후 9.4g의 試料(수득률: 9.4%)를 얻었다. 試料는 세포에 투여하기 전 0.22 $\mu$ m pore의 여과지로 멸균하여 사용하였다.

### 2. 實驗方法

#### 1) B16 melanoma 세포주 배양

B16 melanoma 세포주(ATCC)의 배양은 CO2 배양기(37℃, 5%)에서 10% fetal bovine serum(Hyclones)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle medium(DMEM, Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지를 이용하였으며 약 48시간 주기로 배양액을 교체하여주었다.

#### 2) Sulphorhodamine B 정량

세포를  $1 \times 10^4$  cells/well이 되도록 조절하여 200  $\mu$ l씩 96well plate에 분주하고 24시간 배양한 후 새로운 배양액으로 교체하여, 적절한 농도의 天花粉을 처리하고 48시간 배양하였다. 대조군과 실험군들을 각각 3개의 well을 한 군으로 하였으며, Sulphorhodamine B assay(SRB 정량)는 Skehan et al. (1990)의 방법에 따라 측정하였다<sup>79)</sup>. 배양이 완료된 세포 배양액에 50% Trichloro acetic acid로 4℃에서 1시간 동안 고정시키고 0.4%(wt/vol) SRB(Sigma chemical Co.)/1% acetic acid로 염색한 후 1% acetic acid로 4회 세

척하고 건조시켰다. 10 mM Tris base로 bound된 protein stain을 녹인 후 ELISA reader(540 nM)에서 흡광도를 측정하였다.

#### 3) Tyrosinase 활성도 측정

Tyrosinase 활성도는 Martinez-Esparza M 등의 방법(1998)에<sup>80)</sup> 의하여 측정하였다. 멜라닌세포를 수확하여 세포침전물을 만들고, 100 $\mu$ l 세포용해액(lysis buffer: 1% Triton X-100, 10mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.1 mM PMSF)을 넣고 4℃ 얼음에서 30분간 때때로 흔들어주면서 세포를 파괴시킨 후 원심분리하여 상층액을 취하여 tyrosinase 활성측정용액으로 사용하였다. 50 $\mu$ l의 상층액에 100mM sodium phosphate(pH 7.0) 100  $\mu$ l를 넣고 30℃ 물중탕기에서 5분간 보온한 후 100mM catechol 50 $\mu$ l를 넣고 온도조절장치가 있는 분광광도계로 37℃, 405nm에서 흡광도의 변화를 1시간 관찰하였다.

#### 4) 멜라닌 정량(Melanin content) 측정

멜라닌 정량은 Hosei(1985) 등의 방법<sup>81)</sup> 변형하여 사용하였다. 배양세포는 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 세척, 원심분리하여 수확하였다. 세포침전물에 1ml의 증류수를 넣어 현탁 후 초음파로 분쇄한 후, 원심분리하여 침전물을 수확하였다. Acid-insoluble material을 얻기 위해 2배의 dimethyl sulfoxide(DMSO)가 첨가된 1N NaOH 300 $\mu$ l를 넣어 80℃에서 1시간 동안 처리하여 용해시켰다. 475nm에서 흡광도를 측정하였으며 멜라닌 정량은 합성멜라닌(Sigma chemical Co.)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

#### 5) Immunoblotting

B16 melanoma 세포( $5 \times 10^6$ )를 PBS로 세척하고 4℃에서 30분동안 lysis buffer(phosphate buffer, pH 6.8, 100IU Aprotinin, 1% AEBSF)에 용해하

고 20,000×g로 30분 동안 원심분리 시켰다. 원심 분리하여 얻은 상층액은 Amicon system을 이용하여 단백질을 농축시켰다. 농축된 단백질은 Bradford assay로 정량하고, 정량하여 얻은 단백질(50-100 $\mu$ g)을 7.5%나 10%의 SDS-PAGE상에서 전기영동하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 Nitrocellulose membrane에 옮긴 후 실온에서 2시간동안 blocking buffer(5% skim milk in TBST)에서 incubation시켰다. Tyrosinase antibody(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 1:500으로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 TBST에 3회 washing하고 1:1,000으로 희석시킨 secondary peroxidase-conjugated anti-mouse antibody(Sigma)에 반응된 단백질을 Amersham ECL system으로 확인하였다.

#### 6) Tyrosinase promoter activity 측정

##### ① Tyrosinase promoter의 reporter system의 제작

Tyrosinase 유전자 promoter의 증폭을 위해 필요한 oligonucleotide primer를 제작하였으며 이때 PCR product의 cloning을 용이하게 하기 위해 restriction enzyme site를 삽입하였다. 증폭한 product의 양끝을 해당 제한효소로 처리하였고 PGL2-basic vector에 ligation하여 E. coli JM83에 형질전환하였고, 재조합 plasmid를 mini prep 으로 double stranded DNA를 얻어 restriction map을 작성하였다. Insert DNA를 분석하여 dideoxy chain method로 염기서열을 분석하였다.

##### ② Transfection

B16 melanoma 세포를 24 well plate에서 24시간 배양하였으며 tyrosinase promoter plasmid와 control vector인 pRL-CMV와 lipofectamine을 섞어서 실온에서 약 40분 정도 반응시킨 후 serum free media를 첨가하여 B16 melanoma 세포에 넣어 주었다. 5시간 경과 후 serum이 포함된 media

로 바꾸어 주고 18-24시간 후에 media를 바꾸어 주었다.

##### ③ Luciferase assay

Transfection되어진 세포( $1.5 \times 10^4$ )에 天花粉을 처리하고 48시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS로 2회 세척하고 lysis buffer(phosphate buffer, pH 6.8, 100IU Aprotinin, 1% AEBSF) 100  $\mu$ l로 용해시켰다. 상층액 50 $\mu$ l를 취하여 Luciferase assay(Promega)과 반응시킨 후 Luminometer (Barnstead)를 이용하여 측정하였다.

#### 7) DOPA 염색

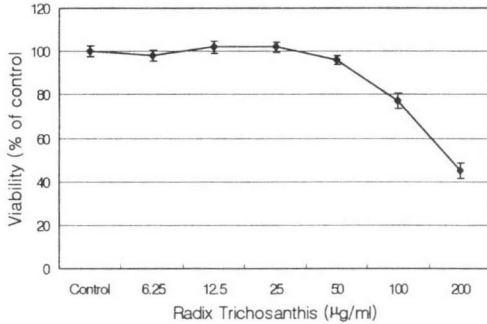
DOPA 염색은 chamber slide(Nunc Inc., Naperville, IL., USA)의 well에  $1 \times 10^4$ 개의 세포를 분주하여 실험한 후 배양액을 제거하고 PBS로 씻은 다음 5% formylsalin 용액으로 30분간 고정하였다. PBS로 2회 세척하고 0.1% L-dihydroxyphenylalanine(Sigma Chemical Co.)을 함유하는 0.1M PBS(pH 7.2) 용액으로 4시간 동안 실온에서 반응시켰다. 10% formylsaline으로 재고정하고 50%, 70%, 95% 및 100% 알콜로 탈수시킨 다음 glycerol로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

### Ⅲ. 臨床資料

#### 1. 天花粉이 B16 melanoma 세포의 세포 생존률에 미치는 영향

天花粉抽出物の 처리농도를 결정하기 위하여 天花粉이 B16 melanoma 세포의 생존률에 미치는 영향을 조사하였다. 天花粉을 6.25  $\mu$ g/ml에서 200  $\mu$ g/ml까지 다양한 농도로 B16 melanoma 세포에 처리한 후 세포의 생존률을 관찰하였다. 세포의 단백질을 측정하여 세포의 증식 정도를 알아보는 SRB 정량법을 사용한 결과 天花粉 50  $\mu$ g/ml 농도

까지 대조군과 비교하여 세포증식에 변화가 없었다. 그러나 이 이상의 농도에서부터 天花粉은 세포증식을 억제하여 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 세포생존률이 대조군의 77%, 200  $\mu\text{g/ml}$ 에서 45%로 감소하였다 (Fig. 1).

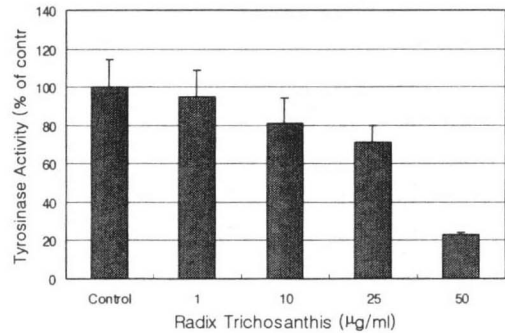


**Fig. 1.** Effect of the *Radix Trichosanthis* extract on the viability of B16 melanoma cells. Cells were treated with various concentrations of the *Radix Trichosanthis* extract. The viability of the cells were measured by SRB assay as described in Materials and Methods. Data are means  $\pm$  S.E. of three experiments performed in triplicate.

## 2. 天花粉이 tyrosinase 활성도에 미치는 영향

天花粉이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 멜라닌 합성과정중 가장 중요한 효소인 tyrosinase 의 활성도를 측정하였다. 天花粉을 1  $\mu\text{g/ml}$ 에서 50  $\mu\text{g/ml}$  까지 처리하고 48시간 후 tyrosinase 활성도를 조사한 결과, 天花粉 1  $\mu\text{g/ml}$  처리군에서는 대조군에 비하여 95%, 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서 81%, 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서 71%, 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 23%로 감소하였다(Fig. 2).

따라서 天花粉은 세포내 tyrosinase 활성도를 억제하였고, 天花粉의 농도가 증가함에 따라 억제 효과도 증가하였다.

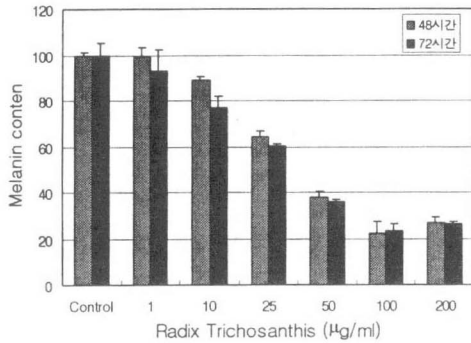


**Fig. 2.** Dose-dependent effects of *Radix Trichosanthis* extract on tyrosinase activity of B16 melanoma cells. Cells were seeded at  $1 \times 10^5$  cells/well. After 24 hr, cells were treated with various concentrations *Radix Trichosanthis* extract at 48 hr. Then, tyrosinase activity was measured as described in Materials and Methods. Data are means  $\pm$  S.E. of three experiments performed in triplicate.

## 3. 天花粉이 멜라닌 생성에 미치는 영향

天花粉이 직접적으로 멜라닌 생합성의 최종산물인 멜라닌량에 미치는 영향을 조사하였다. 天花粉을 1  $\mu\text{g/ml}$ 에서 50  $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리하고 48시간과 72시간 후 멜라닌량을 조사한 결과 1  $\mu\text{g/ml}$  처리군에서 대조군에 비하여 0.4%(99.6%), 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서 11%(89%), 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 62.1%(37.9%) 감소하였다(Fig. 3). 72시간 후 天花粉 1  $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 대조군에 비하여 7%(93%), 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서 23%(77%), 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 64%(36%) 감소하였다.

이상의 결과 天花粉은 최종적인 멜라닌양을 억제하였고, 天花粉의 처리농도와처리시간이 길어짐에 따라 억제효과도 증가하였다(Fig. 3).



**Fig. 3.** The effect of *Radix Trichosanthis* extract on melanin contents in B16 melanoma cells. B16 cells were treated with various concentrations *Radix Trichosanthis* extract for 48 hr and 72 hr. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means±S.E. of three experiments performed in triplicate.

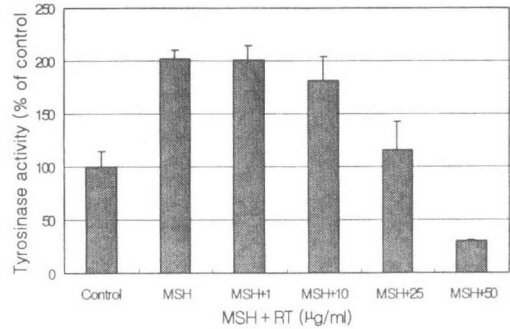
#### 4. α-MSH에 의한 과색소생성시 天花粉의 Tyrosinase 활성도 억제효과

자외선과 같은 외부환경에 의한 색소세포의 과색소형성시 미치는 天花粉의 억제효과를 조사하기 위하여, α-MSH로 과색소생성이 유발된 경우 天花粉의 효과를 관찰하였다. α-MSH는 세포내 cAMP의 농도를 증가시키고 신호전달에 관련되는 기작을 변화시켜 멜라닌 생합성을 증가시킨다. 따라서 α-MSH로 과색소형성이 유도되었을 때 天花粉의 효과를 관찰하였다.

天花粉을 1 µg/ml에서 50 µg/ml까지 처리하고 30분 후에 10nM MSH를 처리한 다음 48시간 경과 후에 B16 melanoma 세포의 tyrosinase 활성도를 측정하였다. α-MSH 처리군은 대조군에 비하여 약 2배 정도 tyrosinase 활성도가 증가하였다. α-MSH에 天花粉 1 µg/ml처리군은 α-MSH 단독 처리군에 비하여 0.7%(99.3%), 10 µg/ml에서는 9.9%(90.1%), 25 µg/ml에서는 44.1%(55.9%)로 감소하였다(Fig. 4).

이상의 결과 α-MSH에 의한 과색소생성시 天花粉은 tyrosinase 활성도를 억제하는 효과가 있음

을 알 수 있었다.



**Fig. 4.** *Radix Trichosanthis* extract inhibit tyrosinase activity in B16 melanoma cells stimulated with α-MSH. B16 cells were pretreated with various concentrations *Radix Trichosanthis* extract for 30 min, and cells were treated with 10 µM α-MSH for 48 hr. Tyrosinase activity was measured as described in Materials and Methods. Data are means±S.E. of three experiments performed in triplicate.

#### 5. α-MSH에 의한 과색소생성시 天花粉의 멜라닌생성 억제효과

α-MSH에 의한 색소세포의 과색소형성시 미치는 天花粉의 멜라닌생성 억제효과를 조사하였다. 天花粉을 1 µg/ml에서 50 µg/ml까지 처리하고 30분 후 10nM MSH를 처리한 다음 48시간과 72시간 경과 후에 멜라닌량을 측정하였다.

天花粉을 48시간 처리한 후 멜라닌량을 조사한 결과, α-MSH 처리군은 162%로 대조군에 비하여 약 1.6배 멜라닌량이 증가하였다. α-MSH에 天花粉 1 µg/ml처리군은 182%로 약간 증가하였으나, 10 µg/ml에서는 132%, 25 µg/ml에서는 70%로 α-MSH 단독처리군의 162%에 비하여 현저히 감소하였다(Fig. 5).

天花粉을 72시간 처리한 후 멜라닌량을 조사한 결과, α-MSH 처리군은 185%로 대조군에 비하여 약 1.8배 멜라닌량이 증가하였고, α-MSH에 天花粉 1 µg/ml처리군은 187%, 10 µg/ml에서는 156%,

25  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 87%로  $\alpha$ -MSH 단독 처리군에 비하여 현저하게 감소하였다(Fig. 5).

이상의 결과  $\alpha$ -MSH에 의한 과색소생성시 天花粉이 최종산물인 멜라닌생성을 억제하였고, 天花粉의 농도와 처리시간이 증가함에 따라 억제효과도 증가하였다

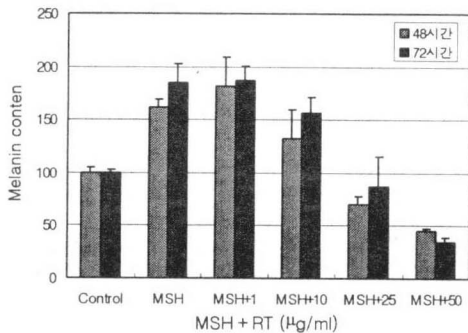


Fig. 5. *Radix Trichosanthis* extract inhibit melanin contents in B16 melanoma cells stimulated with  $\alpha$ -MSH. B16 cells were pretreated with various concentrations *Radix Trichosanthis* extract for 30 min, and cells were treated with  $10 \mu\text{M}$   $\alpha$ -MSH for 48 hr and 72 hr. Melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means  $\pm$  S.E. of three experiments performed in triplicate.

### 6. cAMP 증가에 의한 과색소생성시 天花粉의 Tyrosinase 활성도 억제효과

$\alpha$ -MSH는 멜라닌세포의 표면에 존재하는 특이적인 수용체와 결합하고,  $\alpha$ -MSH와 그 수용체의 복합체가 세포내의 cAMP를 증가시킴으로서 멜라닌 생합성이 증가되는 것으로 알려져 있다. 따라서 forskolin을 처리하여 adenylate cyclase를 활성화시키므로써 세포내 cAMP농도를 높여 cAMP 증가에 의한 과색소형성시 天花粉의 효과를 관찰하였다.

天花粉을 1  $\mu\text{g/ml}$ 에서 50  $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리하고 30분 후에  $20 \mu\text{M}$  forskolin을 처리한 다음 48시간 경과 후에 B16 melanoma 세포의 tyrosinase 활성

도를 측정하였다. Forskolin 처리군은 대조군에 비하여 약 2배 정도 tyrosinase 활성도가 증가하였다. Forskolin에 天花粉 1  $\mu\text{g/ml}$  처리군은 forskolin 단독 처리군에 비하여 99.5%, 10  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 91.8%, 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 58.79%로 forskolin 단독 처리군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 6).

이상의 결과 cAMP 증가에 의한 과색소생성시 天花粉이 tyrosinase 활성도를 억제하였다.

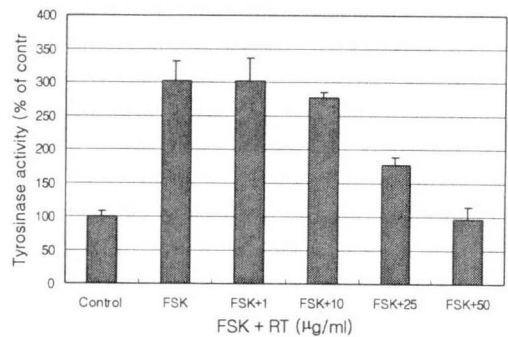


Fig. 6. *Radix Trichosanthis* extract inhibit tyrosinase activity in B16 melanoma cells stimulated with  $20 \mu\text{M}$  forskolin. B16 cells were pretreated with various concentrations *Radix Trichosanthis* extract for 30 min, and cells were treated with  $10 \mu\text{M}$  forskolin for 48 hr. Tyrosinase activity was measured as described in Materials and Methods. Data are means  $\pm$  S.E. of three experiments performed in triplicate.

### 7. cAMP 증가에 의한 과색소생성시 天花粉의 멜라닌생성 억제효과

cAMP 증가에 의한 과색소형성시 미치는 天花粉의 멜라닌생성 억제효과를 조사하기 위하여 cAMP-elevating agent인 forskolin을 처리하고 天花粉의 멜라닌 생성 억제효과를 관찰하였다.

天花粉을 처리하고 30분 후에  $20 \mu\text{M}$  forskolin을 처리한 다음 48시간과 72시간 경과 후에 멜라닌량을 측정하였다. forskolin 처리군은 221%로 대조군에 비하여 약 2.2배 멜라닌량이 증가하였고,

forskolin에 天花粉 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군은 157%, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 136%, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 70%로 forskolin 단독 처리군에 비하여 현저하게 감소하였다(Fig. 7).

天花粉을 72시간 처리한 후 멜라닌량을 조사한 결과, forskolin 처리군은 333%로 대조군에 비하여 약 3.3배 멜라닌량이 증가하였다. Forskolin에 天花粉 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군은 330%, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 263%, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 124%로 forskolin 단독 처리군 비하여 현저히 감소하였다(Fig. 7).

이상의 결과 cAMP 증가에 의한 과색소생성시 天花粉이 멜라닌생성을 억제하였고, 天花粉 농도와 처리시간이 증가함에 따라 억제효과도 증가하였다.

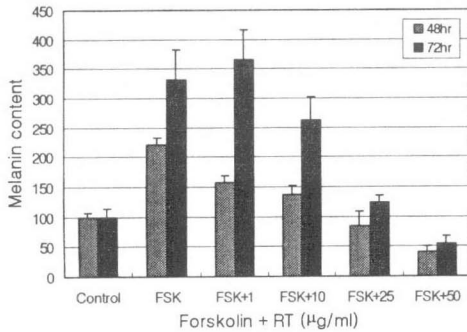


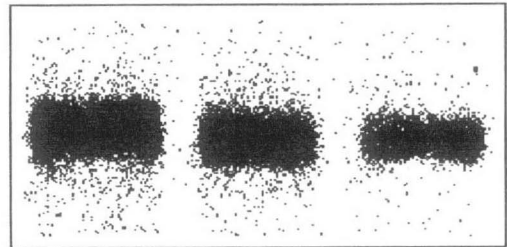
Fig. 7. *Radix Trichosanthis* extract inhibit melanin contents in B16 melanoma cells stimulated with 20  $\mu\text{M}$  forskolin. B16 cells were pretreated with various concentrations *Radix Trichosanthis* extract for 30 min, and cells were treated with 20  $\mu\text{M}$  forskolin for 48 hr and 72 hr. Melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are means  $\pm$  S.E. of three experiments performed in triplicate.

### 8. Immunoblotting

天花粉이 tyrosinase protein 발현양상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 tyrosinase antibody를 이용한 western blotting으로 세포내 tyrosinase protein level을 조사하였다.

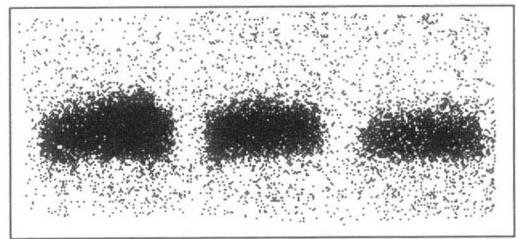
天花粉 처리군에서 tyrosinase protein level은 tyrosinase 활성도 감소와 같은 경향으로 감소하였고(Fig. 8), forskolin으로 과색소생성 유도시 forskolin 처리군은 대조군보다 tyrosinase protein level이 증가하였으나, forskolin과 天花粉 처리군은 forskolin 단독 처리군보다 감소하였다(Fig. 9).

天花粉은 tyrosinase protein 발현을 억제하였고, cAMP 증가에 의한 과색소생성시에도 tyrosinase protein 발현을 억제하였다.



Control RT(10ul) RT(25ul)

Fig. 8. *Radix Trichosanthis* extract inhibits expression of tyrosinase in B16 melanoma cells. B16 cells were treated for 48hr with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *Radix Trichosanthis* extract. Total protein were electrophoresed in 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membrane. Specific detection of tyrosinase was performed with the antibody tyrosinase.



FSK FSK+RT(10ul) FSK+RT(25ul)

Fig. 9. *Radix Trichosanthis* extract inhibits expression of tyrosinase in B16 melanoma cells stimulated with 20  $\mu\text{M}$  forskolin. B16 cells were pretreated with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *Radix Trichosanthis* extract for 30 min, and cells were treated with 20  $\mu\text{M}$  forskolin for 48 hr. Total protein were electrophoresed in 10% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membrane. Specific detection of tyrosinase was performed with the antibody tyrosinase.



### 9. 天花粉이 Tyrosinase promoter 활성에 미치는 영향

天花粉이 tyrosinase 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 tyrosinase reporter system을 이용하여 tyrosinase promoter의 활성을 측정하였다. B16 melanoma 세포에 天花粉을 48시간 처리한 경우 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군은 天花粉을 처리하지 않은 대조군에 비하여 96.4%, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군에서는 76.7%로 tyrosinase promoter 활성이 약간 감소하였다(Fig. 10).

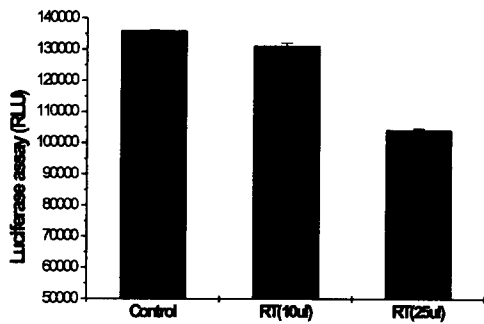


Fig. 10. *Radix Trichosanthis* extract inhibits promoter activity of tyrosinase in B16 melanoma cells. B16 cells were transfected with 0.3  $\mu\text{g}$  of luciferase reporter plasmids pTyro. Cells were treated for 48hr with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *Radix Trichosanthis* extract. Data are means  $\pm$  S.E. of three experiments performed in triplicate.

### 10. cAMP에 의한 과색소생성시 天花粉의 Tyrosinase promoter 활성 억제효과

Forskolin을 처리하여 cAMP 증가에 의한 과색소형성시 天花粉이 tyrosinase promoter의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. Forskolin 처리군에서는 134.4%로 대조군에 비하여 tyrosinase promoter 활성도가 증가하였고, forskolin에 天花粉 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군은 125.5%, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군은 120.65%로 약간 감소하였다(Fig. 11). 이상의 결과 天花粉은 cAMP 증가에 의한 tyrosinase promoter 활성도를 감소시켰다.

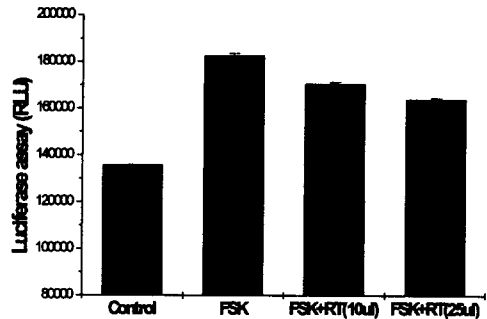


Fig. 11. *Radix Trichosanthis* extract inhibits promoter activity of tyrosinase in B16 melanoma cells stimulated with 20  $\mu\text{M}$  forskolin. B16 cells were pretreated with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *Radix Trichosanthis* extract for 30 min, and cells were treated with 20  $\mu\text{M}$  forskolin for 48 hr. B16 cells were transfected with 0.3  $\mu\text{g}$  of luciferase reporter plasmids pTyro. Cells were treated for 48hr with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  *Radix Trichosanthis* extract. Data are means  $\pm$  S.E. of three experiments performed in triplicate.

### 11. DOPA stain

DOPA 염색을 이용한 형태학적 관찰 결과, B16 melanoma 세포는 DOPA 염색 양성 소견을 보였고, 天花粉 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군은 대조군에 비해 DOPA 염색 양성의 강도가 약하였다(Fig. 12, 13). 또한  $\alpha$ -MSH 처리군과 forskolin 처리군(Fig. 14, 16)은 DOPA 염색 양성의 강도가 대조군보다 강하였으나, 天花粉 전처리군에서는 DOPA 염색 양성의 강도가 현저히 약하였다(Fig. 15, 17).

## IV. 考 察

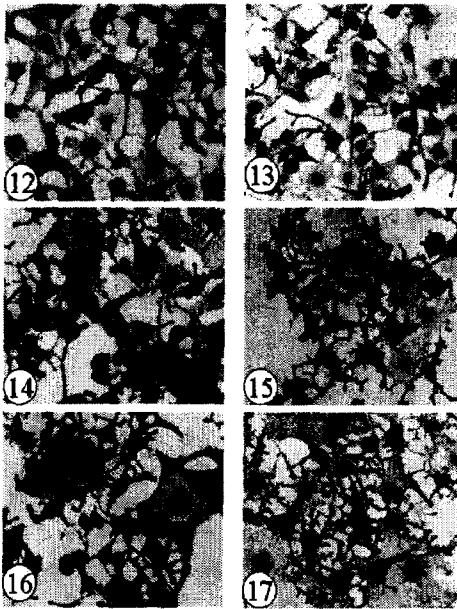


Fig. 12. DOPA staining of cultured B16 melanoma cells in control group. All cells showed DOPA-positive( $\times 200$ ).

Fig. 13. DOPA staining of B16 melanoma cells treated with 10µg/ml *Radix Trichosanthis* extract for 72 min. The DOPA staining showed less intensity than control group.

Fig. 14. DOPA staining of B16 melanoma cells stimulated with 10nM  $\alpha$ -MSH. All cells showed more DOPA-positive than control group.

Fig. 15. DOPA staining of B16 melanoma cells treated with 10µg/ml *Radix Trichosanthis* extract and 10nM  $\alpha$ -MSH. The DOPA staining showed less intensity than B16 melanoma cells stimulated with 10nM  $\alpha$ -MSH.

Fig. 16. DOPA staining of B16 melanoma cells stimulated with 20µM forskolin. All cells showed more DOPA-positive than control group.

Fig. 17. DOPA staining of B16 melanoma cells treated with 10µg/ml *Radix Trichosanthis* extract and 20µM forskolin. The DOPA staining showed less intensity than B16 melanoma cells stimulated with 20µM forskolin.

皮膚은 人體와 外部 環境과의 境界를 이루는 器官으로서 표피층, 진피층, 피하지방층의 독특한 3개 층으로 구성되어 있으며, 체온을 조절하고 외부로부터 내부 장기를 보호하는 등의 생명유지를 위한 주요 기능과, 피부 호흡을 하거나, 피부색을 형성하거나, 특정 물질을 선택적으로 흡수하는 등의 부수적인 기능을 갖고 있다<sup>47,58,60-62</sup>.

최근에는 아름다움에 대한 관심이 높아지면서, 피부 미용을 해치는 기미나 주근깨 등과 같은 과색소 침착으로 인한 피부질환에 대한 인식이 높아지고 있다<sup>58,60-62</sup>.

韓醫學에서는 기미, 주근깨 등의 과색소 침착증에 해당하는 질환이 《黃帝內經·素問》〈至眞要大論〉<sup>12)</sup>에 “歲陽明在天, 燥淫所勝... 面塵, 身無膏澤, 足外反熱”이라하여 처음 기록된 이래, 巢<sup>15)</sup>는 《諸病源候論·面皰黑證候》에서 風邪가 皮膚에 侵入하고 痰飲이 臟腑에 쌓이면 ‘烏麻’나 ‘雀卵上之色’이 얼굴에 나타난다 하여 原因과 症狀을 비교적 자세히 言及하였고, 以後 많은 醫家들 4,6-9,11,14-16,19,23-25,30-36,41-44)에 의해 面黑, 黧黯, 雀斑, 鰐黑斑 등의 異名으로 記錄되었다.

과색소 침착증의 原因을 樓 등<sup>9,24)</sup>은 內經의 面塵에 대한 文獻을 引用하여 陽明病으로 보았으며 또 顧 등<sup>4,7,23,35)</sup>은 憂思過多와 飲食失節로 인한 脾胃損傷을 原因으로 보았는데, 이는 最近 鞠<sup>59)</sup>이 臨床論文에서 밝힌 胃腸機能 障礙 患者에게서 기미가 많이 나타난다는 것과 관련이 있는 것으로 思料된다. 또, 李 등<sup>7,19,31,32,41,44)</sup>은 巢<sup>15)</sup>의 文獻을 引用하여 風邪와 痰飲이 症狀을 誘發한다고 보았고, 陳 등<sup>4,7,9,20,42)</sup>은 發病機轉 中에서 女性에게 主로 나타난다는 言及과 함께 陰虛火動을 原因으로 보았는데 이는 高 등<sup>5,26)</sup>이 臨床論文에서 밝힌 기미환자 中에서 月經不調를 호소하는 女性이 많다는 內

容과 일맥 상통한 것으로 思料된다. 近來 文獻들<sup>29,37-39,50-54)</sup>은 肝鬱氣滯, 瘀血內停, 腎陰不足, 陰虛火旺, 脾虛不運, 濕熱內蘊, 日曬熱毒, 火鬱孫絡, 風邪外搏 등의 原因으로 자세히 분류하였다.

이상의 病因病機를 綜合하면 內因으로는 肝鬱氣滯, 瘀血內停, 腎陰不足, 陰虛火旺, 脾虛不運 등이, 外因으로는 風邪, 火邪, 濕熱邪, 熱毒 등이 각각 과색소 침착증을 유발하는 것으로 思料된다. 治療方法으로는 辨證施治에 의한 內治법과, 軟膏劑나 粉末 洗劑 등을 使用하는 外治法, 體鍼, 耳鍼 등을 이용하는 針治療法으로 분류할 수 있다. 內治法은 肝鬱氣滯에 疏肝解鬱하는 逍遙散을, 瘀血內停에는 通經活絡하는 通竅活血湯을, 腎陰不足에는 滋補肝腎하는 知柏地黃丸을, 脾虛不運에는 健脾益氣하는 加味歸脾湯 등을 爲主로 加味하여 각각 사용하였다. 外治法에 사용된 外用藥은 玉容散, 紅玉散, 西氏玉容散, 玉肌散, 黃柏霜, 祛斑霜 등을 여러 가지 製法으로 얼굴에 使用하였다.

天花粉(Radix Trichosanthis)은 雀斑, 黥黯, 黑鬚斑子 등의 과색소 침착증의 치료에 應用되는 外用藥인 玉容散·紅玉散·西施玉容散의 구성약물중의 하나이며, 清熱生津, 清肺化痰, 消腫排膿 등의 효능이 있어 熱病傷津, 口乾煩渴, 消渴, 肺熱燥咳, 癰腫瘡瘍, 瘡腫, 乳腺炎, 咳嗽 등의 治療에도 사용된다<sup>46,56,57)</sup>. 박과(Cucurbitaceae)에 속하며 하늘타리 및 同屬 近緣植物의 塊根으로서 전국적으로 자생하는 다년생 草本植物로, 7-8월에 개화하고 10월에 원형으로 황색과실이 달리며, 이 종자를 瓜囊根, 括囊根, 囊根, 瑞雪 등으로 부르기도 한다. 그 뿌리는 큰 塊根을 형성하고 있으며 껍질을 제거한 후 건조하여 분쇄한 것을 天花粉이라 하는데 다량의 전분을 함유하고 있어 단방약으로도 피부병의 치료에 사용된다고 한다<sup>46,55-57)</sup>.

인간의 피부색은 멜라닌과 카로텐의 量, 眞皮에 있는 血管의 數, 흐르는 血液의 색깔등으로 결정되는데, 그 중 멜라닌은 멜라닌 細胞에서 합성된

것으로 細胞質 들기를 통하여 表皮의 기저층과 가시층의 細胞로 운반된다<sup>47,69)</sup>. 한편 表皮에서 特殊하게 分化된 멜라닌 細胞는 주로 基底層細胞 사이나 基底細胞의 아래 그리고 털주머니에서 觀察되며, 백피증(albinism)이나 백반증(vitiligo)의 피부 질환은 melanin 색소의 감소로 인하여 나타나고, 반대로 에디슨병(Addison's disease)은 副腎皮質에서 코티솔의 生成이 缺乏되어 副腎皮質刺戟호르몬이 과잉 生産되므로써 色素침착을 增加시킨다<sup>95)</sup>. 본 실험에서 관찰한 멜라닌은 tyrosine으로부터 세 가지 단계, 즉 tyrosinase, tyrosinase related protein 1(TRP-1), DOPA chrome tautomerase (TRP-2)에 의해서 합성되는데, 이 중 tyrosinase는 rate-limiting step으로 멜라닌색소 형성과정 중 가장 중요한 효소이다<sup>82-84)</sup>. 이 tyrosinase는 동·식물계에 넓게 분포되어 있는 polyphenol oxidase로서 생체 내에서 두 가지의 다른 반응을 촉매하는데, 그 하나는 tyrosinase oxidase의 기능이고, 다른 하나는 dopa oxidase의 기능으로서, melanin polymer를 생합성하는데 중요한 역할을 하고 있다. 따라서 멜라닌세포에서의 tyrosinase 활성은 피부 멜라닌 생성에 결정적으로 영향을 미치게 되고, 피부 멜라닌 생성 억제제 개발에 있어서 tyrosinase 활성 억제제는 매우 큰 의미를 갖게 된다<sup>73-76,82-85)</sup>.

본 실험에서 天花粉 추출물은 B16 mouse melanoma 세포의 tyrosinase 활성을 억제하였고, 최종산물인 멜라닌양도 억제하였다. 따라서 天花粉은 피부 미백제로서 개발 가능성이 높은 물질로 사료되어 멜라닌 형성과정에 관여하는 작용 기전을 분석하였다.

생체에서 피부 색소침착을 일으키는 가장 주요한 자극은 자외선으로서, UV radiation은 멜라닌 세포를 직접 자극하고, 또 interleukin, prostaglandin,  $\alpha$ -MSH와 같은 keratinocyte-derived factor에 의해서 간접적으로

멜라닌 합성을 조절한다. 이들 중  $\alpha$ -MSH는 가장 강력하게 멜라닌 합성을 촉진시키며, pro-inflammatory cytokine이나 UV 조사 후 각질 형성세포와 멜라닌세포, 면역세포(immune cell) 등에서  $\alpha$ -MSH가 분비된다<sup>86-89)</sup>.

따라서 본 실험에서 피부 과색소 침착이 유발된 경우 天花粉의 멜라닌 생성 억제효과를 관찰하였다.  $\alpha$ -MSH로 과색소 침착을 유발시킨 경우 tyrosinase 활성도와 멜라닌생성이 증가하였는데, 이는 Hunt 등(1994)<sup>90)</sup>의 배양 인체 멜라닌세포에서, Hill 등(1989)<sup>91)</sup>의 B16 mouse melanoma 세포에서  $\alpha$ -MSH에 의해 멜라닌 합성이 증가된 결과와 일치하였으며, 天花粉 전처리군에서는 tyrosinase 활성도와 멜라닌생성을 감소시켜 天花粉이  $\alpha$ -MSH에 의해서 피부 과색소 침착이 유도된 경우 멜라닌 생성을 억제하였다.

$\alpha$ -MSH는 G-protein linked signal transduction pathway 활성화에 의해 cAMP level을 증가시켜 멜라닌 합성을 유도하는데, forskolin, cholera toxin, isobutylmethylxanthine(IBMx)와 같은 cAMP-elevating agent에 의해서도 유사한 효과가 나타나며, 이는 cAMP pathway가 멜라닌 합성 조절에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다<sup>84,92,93)</sup>.

따라서 본 실험에서 cAMP pathway에 의한 멜라닌 합성과정에 天花粉이 관여하는지 조사하기 위해 forskolin을 처리하여 天花粉의 효과를 관찰하였다. Forskolin 처리군에서는 tyrosinase 활성도와 멜라닌생성량이 증가하여, Park 등<sup>77)</sup>의 결과와 일치하였으며, 天花粉 전처리군에서는 tyrosinase 활성도와 멜라닌생성량을 감소시켰다. 또한 western blotting으로 tyrosinase protein level을 확인한 결과 天花粉 처리군에서 tyrosinase 활성도 감소와 같은 경향으로 감소하였으며, forskolin으로 증가된 tyrosinase protein level이 天花粉 전처리군에서 감소하였다.

최근 몇 년 동안  $\alpha$ -MSH의 tyrosinase, TRP1, TRP2 mRNA level 조절에 대한 논란이 되어 Abdel-Malek 등(1995)<sup>94)</sup>은 mRNA level의 변화 없이 protein양의 증가에 melanogenesis가 유도된다고 하였고, Kuzumaki 등(1993)<sup>82)</sup>과 Bertolotto 등(1998)<sup>92)</sup>은 cAMP-elevating agents에 의해 mRNA level에서 tyrosinase와 TRP1의 발현이 증가한다고 하였다.

天花粉의 tyrosinase gene transcription 효과를 보기 위해 luciferase reporter plasmid를 이용하여 tyrosinase promoter의 활성도를 조사한 결과, pTyro로 transfection시킨 후 天花粉 처리군은 농도에 비례하여 활성도가 감소하였다.  $\alpha$ -MSH와 forskolin 처리시 luciferase activity가 증가하여 Kuzumaki 등(1993)과 Bertolotto 등(1998)의 결과와 일치하였고<sup>82,92)</sup>,  $\alpha$ -MSH와 forskolin에 天花粉 전처리군은 luciferase activity가 감소하여 天花粉은 tyrosinase gene transcription을 억제하는 것으로 생각된다.

또한 DOPA 염색을 이용한 형태학적 관찰 결과, 天花粉은 대조군에 비해 DOPA 염색 양성의 강도가 약하였고,  $\alpha$ -MSH와 forskolin 처리군은 DOPA 염색 양성의 강도가 대조군보다 강하였으나, 天花粉 전처리군에서는 DOPA 염색 양성의 강도가 현저히 약하였다.

이상의 연구 결과 天花粉은 B16 melanoma 세포의 멜라닌 형성 억제효과가 있었으며, tyrosinase 활성도와 tyrosinase protein 발현, tyrosinase promoter activity를 억제하였고,  $\alpha$ -MSH와 cAMP signal pathway에 의한 멜라닌 합성 경로를 억제하는 것으로 생각된다. 따라서 앞으로 天花粉의 멜라닌 합성 억제효과에 대한 더욱 정확한 작용기전과 응용법의 개발 등 체계적인 연구가 이루어진다면, 미백작용이 우수하면서도 피부 부작용이 없는 화장품이나, 기미나 주근깨 등의 과색소 침착증을 치료하는 천연약품 등으로

應用될 수 있을 것으로 思料된다.

## V. 結 論

天花粉抽出物이 B16 멜라닌세포의 멜라닌 생성 과정에 어떠한 영향을 나타내는지를 규명하기 위하여 세포 생존률과 멜라닌 합성에 대한 影響을 判斷할 수 있는 tyrosinase 활성과 最終產物인 멜라닌의 정량측정을 시행하였으며, tyrosinase 단백질의 발현정도와 tyrosinase 유전자 promoter의 활성도 및 DOPA 염색을 시행하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 天花粉은 SRB 정량에 의한 세포 생존률을 관찰한 결과 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도가 지 대조군과 유사하였다.

2. 天花粉은 B16 melanoma 세포의 tyrosinase 활성도와 최종산물인 멜라닌생성량을 억제하였다.

3. 天花粉은  $\alpha$ -MSH에 의한 과색소생성 유도시 tyrosinase 활성도와 멜라닌생성량을 억제하였다.

4. 天花粉은 forskolin에 의한 과색소생성 유도시 tyrosinase 활성도와 멜라닌생성량을 억제하였다.

5. 天花粉은 단독처리시 tyrosinase 단백질 발현을 억제하였고, forskolin에 의한 과색소생성 유도시에도 tyrosinase 단백질 발현을 억제하였다.

6. 天花粉은 단독처리시 tyrosinase promoter 활성을 억제하였고, forskolin에 의한 과색소생성 유

도시에도 tyrosinase promoter 활성을 억제하였다.

7. DOPA 염색에 의한 형태적 관찰에 있어서 B16 melanoma 세포는 DOPA 염색 양성 소견을 보였으나, 天花粉 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군과 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리군은 대조군에 비해 DOPA 염색 양성의 강도가 약하였다. 또한  $\alpha$ -MSH 처리군과 forskolin 처리군은 대조군에 비하여 DOPA 염색 양성의 강도가 강하였으나, 天花粉 전처리군에서는 양성의 강도가 약하였다.

以上の 연구결과를 종합하면 天花粉抽出物은 B16 melanoma 세포의 멜라닌 생성을 억제하였으며,  $\alpha$ -MSH와 cAMP에 의한 과색소생성 유도시에도 멜라닌생성을 감소시켰다. 따라서 天花粉의 멜라닌 생성 억제효과는 피부 부작용을 줄이는 화장품의 미백물질로서 개발 가능성이 높으며, 더욱 정확한 작용기전의 규명과 응용법 등의 연구가 필요할 것으로 思料된다.

## 參考文獻

1. 乾祖望 外 : 實用中醫外科學, pp530-532, 1985.
2. 顧伯康 : 中醫外科臨床手冊, 中國, 上海科學技術出版社, p426, 1983.
3. 顧伯華 外 : 實用中醫外科學. 上海. 上海科學技術出版社. p. 1985.
4. 顧世澄 : 瘍醫大全, 北京, 人民衛生出版社, pp479, 481-482, 1987.
5. 高云 外 : 中西醫結合治療女性黃褐斑 36例臨床觀察, 杏林中醫藥, 第6期, 1995.
6. 龔廷賢 : 萬病回春, 서울, 醫聖堂, p.271, 1993.
7. 郝坤 : 外科大成, 臺北, 文光圖書有限公司,

- p.218, 1968.
8. 南京中醫學院：諸病源候論校釋. 北京. 人民衛生出版社. p. ,1983.
9. 樓英：醫學綱目, 서울, 大星文化社, p.1081, 1986.
10. 徐晉文 外：中醫治療學, 中國醫藥技術出版社, p.583, 1990.
11. 武之望：濟陰綱目, 서울, 柳林文化社, p.484, 1990.
12. 楊維傑 編：黃帝內經 素問, 臺北, 樂羣出版事業有限公司, pp.624-679, 1994.
13. 范瑞強：實用皮膚病性病驗方精選, 廣東出版社, p.336, 1994.
14. 薛瑜：編輯外科心法要訣, 臺灣, 大中國圖書公司, p.85, 1984.
15. 巢元方：巢氏諸病原候論, 서울, 大星文化社, p.200, 1992.
16. 孫震元 譯：瘍科會粹, 北京, 人民衛生出版社, pp.364-365, 1987.
17. 辛民教 外：鄉藥集成方, 서울, 永林社, p.1039, 1989.
18. 失數道明：漢方治療百話, 서울, 동남출판사, p.181, 1984.
19. 沈金鰲：沈氏尊生書, 臺北, 自由出版社, p.530, 1979.
20. 楊思澍 外：中醫臨床大全, 中國, 北京科學技術出版社, pp.923-924, 1991.
21. 嚴規良：皮膚病知識, 上海. 上海科學技術出版社. pp., 1983.
22. 施惠：施惠中醫皮膚病臨床經驗集, 北京, 中國醫藥科技出版社, pp.62-65, 1971.
23. 吳謙：醫宗金鑒, 北京, 中國醫藥學出版社, pp.1680-1682, 1982.
24. 王肯堂：證治準繩, 北京, 人民衛生出版社, 卷1, p.824, 1991.
25. 王壽：外臺秘要, 上海, 文光圖書有限公司, p.p870-880, 1968.
26. 王愉 斗：中藥祛斑倒模粉治療黃褐斑 110例臨床觀察, 北京中醫 제3期, 1995.
27. 顧伯華：實用中醫外科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp.529-530, 1985.
28. 柳基遠：診療와 優秀處方, 서울, 成輔社, p.328, 1992.
29. 劉愛民：損容性皮膚病的診斷與治療, 中國, 中國中醫藥出版社, p.177, 1992.
30. 李槌：偏註醫學入門. 서울. 大星文化社. 雜病篇. p.29, 224. 1990.
31. 張璠：張氏醫通, 上海, 上海科學技術出版社, pp.442-443, 1995.
32. 浙江省中醫研究所. 湖州中醫院. 校：醫方類聚. 北京. 人民衛生出版社. p.509. 1979.
33. 程國彭：醫學心悟. 香港. 友聯出版社. p.290. 1961.
34. 趙佶：聖濟總錄, 北京, 人民衛生出版社, p.1763, 1987.
35. 周命新：醫門寶鑑, 서울, 杏林書院, pp.186-187, 1975.
36. 朱震亨：丹溪醫集. 北京. 人民衛生出版社. p.24. 1993.
37. 周洪範：白話中醫秘方全書. 대만. p.494. 1986.
38. 中醫研究院：中醫症狀鑑別診斷學, 中國, 人民衛生出版社, p.524, 1987.
39. 陳貴廷 外：實用中西醫結合診斷治療學, 서울, 一中社, p.1501, 1991.
40. 陳夢雷 外：醫部全錄. 서울. 大星文化社. 제 6권. p.267, 1989.
41. 陳昭遇 外：太平聖惠方, 北京, 人民衛生出版社, p.1208, 1986.
42. 陳實功：外科正宗, 上海, 上海科學技術出版社, p.290,298, 1989.
43. 陳自明：婦人大全良方. 북경. 人民衛生出版

- 社. p.12-13, 578-579. 1986.
44. 許俊 : 東醫寶鑑 서울, 南山堂, pp.211,212, 1981.
45. 전완길 외 : 한국생활문화100년, 서울, 장원, pp.19-21, 1995.
46. 辛民敎 : 臨床本草學 서울 永林社, pp.369-372, 1987.
47. 박경아 등 : 조직학, 서울 고려의학, pp.405-411, 1999.
48. 鄭遇悅 등 : 韓方臨床病理學, 서울, 永林社, pp.111-115, 1998.
49. 이선동 : 백반증의 한방치료, 서울, 도서출판 정담 pp.30-54, 1996.
50. 徐宜厚 外 : 皮膚病中醫診療學, 北京, 人民衛生出版社, pp.8-17, 1997.
51. 梁勇才 : 實用皮膚病診療全書, 北京, 學苑出版社, pp.17-24, 27-30, 1996.
52. 辺天羽 外 : 中西醫結合皮膚病學, 天津, 天津科學技術出版社, pp.46-49, 1999.
53. 宋兆友 : 中醫皮膚科臨床手冊, 北京, 人民衛生出版社, pp.3-6, 1996.
54. 李林 : 實用中醫皮膚病學, 北京, 中醫古籍出版社, pp.1-17, 1998.
55. 이창복 : 대한식물도감, 鄉文社, pp.718, 1989.
56. 康秉秀 외 : 臨床配合本草學, 서울, 永林社, pp.635-637, 1994.
57. 辛民敎 : 原色臨床本草學, 서울, 永林社, pp.223, 1992.
58. 국홍일 : 고운피부 젊은피부, 서울, 도서출판 동지, pp.19-20, 130-131, 1995.
59. 국홍일 : 기미환자의 임상소견과 신체정신건강상태에 관한 연구, 대한피부과학회지, 17:1, 1979.
60. 대한피부과학회 : 피부과학, 서울, 여문각, pp.2-7, 328-337, 1994.
61. 은희철 외 : 피부면역학, 서울, 서울대학교출판부, p. 143, 1999.
62. 최국주 : 피부미인, 서울, 동명사, pp.17-23, 1996.
63. 南惠貞 외 : 肝斑에 關한 文獻的 考察, 大韓外官科學會誌, 9:1, pp.16-23, 1996.
64. 朴惠峻 외 : 雀斑의 原因, 症狀 및 治方에 關한 文獻的 考察, 大韓外官科學會誌, 10:1, pp.247-262, 1997.
65. 申延祥 외 : 기미에 關한 文獻的 考察, 大韓外官科學會誌, 11:1, pp.82-98, 1998.
66. 金赤松 : 新訂和漢藥, 醫齒藥出版株式會社, 東京, pp. 58-60, 1974.
67. 李敦日, 丁明鉉, 金成鎬, 李治榮 : 製藥研究, 朝鮮大學校製藥研究紙, 光州, pp. 5-10, 1978.
68. 文錫哉 : 天花粉 Extract의 家兔血糖 濃도에 미치는 影響에 關한 研究, 東西醫學, 7(1):38-45, 1982.
69. Bloom W, Fawcett DW: A textbook of histology, 11th ed, W.B. Saunders Company, USA, pp. 543-558, 1986.
70. Halaban R., Pomerantz S.H., Marshall S., Lambert D.T., Lerner A.B., : Regulation of tyrosinase in human melanocytes grown in culture. J Cell Biol 97(2):480-488, 1983.
71. Iozumi, K., Hoganson, G.E., Pennella, R., : Role of tyrosinase and the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes. J. Invest Dermatol 100:806-811, 1993.
72. Prota, G., : Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. J. Invest Dermatol. 75: 122-127, 1980.
73. Hearing VJ : Biochemical control of

- melanogenesis and melanosomal organization. *J Invest Dermatol* 4(1):24-28, 1999.
74. Nordlund JJ, Collins CE, Rheins LA : Prostaglandin E2 and D2 but not MSH stimulate the proliferation of pigment cells in the pinnal epidermis of the DBA2 mouse. *J Invest Dermatol* 86:433-437, 1986.
75. Gordon PR, Mansur CP, Gilchrist BA : Regulation of human melanocyte Growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J Invest Dermatol* 92(4):565-572, 1989.
76. Yada Y, Higuichi K, Imokawa G : Effects of endothelin on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *J Biol. Chem.* 266:18352-18357, 1991.
77. Park JS, Kim JS, Lee JW, Park RG, Jeon BH, Woo WH, Jeong WY : Effect of *Rhizoma Atractylodis macrocephalae* on the melanogenesis, *J Oriental Medical Pathology* 13(2):91-97, 1999.
78. Park JS, Kim JS, Lee JW, Park RG, Jeon BH, Woo WH, Jeong WY : Effect of *Seosiokyongsan* on the melanogenesis of B16 melanoma cell line, *J Oriental Medical Pathology* 14(1):160-170, 2000.
79. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bdesch H, Kenney S, Boyd MR : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J National Cancer Institute* 82:1107-1112, 1990.
80. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Solano F, Lozano JA, Garcia-Borron JC : Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur J Biochem* 255(1):139-146, 1998.
81. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T : Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1  $\alpha$ ,25-dehydroxyvitamin D3 and retinoic acid, *Cancer Res* 45:1474-1478, 1985.
82. Kuzumaki T, Matsuda A, Wakamatsu K, Ito S, Ishikawa K : Eumelanin biosynthesis is regulated by coordinate expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 genes. *Exp Cell Res* 207(1):33-40, 1993.
83. Rungta D, Corn TD, Fuller BB : Regulation of tyrosinase mRNA in mouse melanoma cells by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Invest Dermatol* 107(5):689-693, 1996.
84. Jimbow K, Gomez PF, Toyofuku K, Chang D, Miura S, Tsujiya H, Park JS : Biological role of tyrosinase related protein and its biosynthesis and transport from TGN to stage I melanosome, late endosome, through gene transfection study. *Pigment Cell Res* 10:206-213, 1997.
85. Hearing VJ and Jimenez M : Mammalian tyrosinase the critical regulatory control point in melanocyte pigment. *Int J Biochem* 19(12), 1141- , 1987.
86. Friedman PS, Gilchrist BA : Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocytes. *J. Cell Physiol* 133(1): 88-94, 1987
87. Luger TA, Scholzen T, Grabbe S : The role of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone in cutaneous biology. *Jid. Symposium*



Proceedings 2(1):87-93, 1977.

88. Martinez-Esparza M, Jimenez-Cervantes C, Beermann F, Aparicio P, Lozano JA, Garcia-Borrón JC : Transforming growth factor- $\beta$ 1 inhibits basal melanogenesis in B16/F10 mouse melanoma cells by increasing the rate of degradation of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1. *J Biol Chem* 272(7):3967-3972, 1997.

89. Thody AJ and Graham A : Dose  $\alpha$ -MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Res* 11:265-274, 1998.

90. Hunt G, Todd C, Cresswell JE, Thody AJ : Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4Dphe7 alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J Cell Sci* 107:205-211, 1994.

91. Hill SE, Buffey J, Thody AJ, Oliver I, Bleehen SS, MacNeil S : Investigation of the regulation of pigmentation in alpha-melanocyte stimulating hormone responsive and unresponsive cultured B16 melanoma cells. *Pigment Cell Res* 2(3):161-166, 1989.

92. Bertolotto C, Busca R, Abbe P, Bille K, Aberdam E, Ortonne JP, Ballotti R : Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: Pivotal role of M boxes(GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Molecular and Cellular Biology* 18(2):694-702, 1998.

93. Park HY, Russakovsky V, Ao Y, Fernandez E, Gilchrist BA : Alpha-melanocyte stimulating hormone-induced

pigmentation is blocked by depletion of protein kinase C. *Exp Cell Res* 227(1):70-79, 1996.

94. Abdel-Malek Z, Swope VB, Suzuki I, Akcali C, Harriger D, Boyce ST, Urabe K, Hearing V : Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1789-1793, 1995.

95. J.A.A.Hunter, J.A.Savin, M.V.Dahl : *Clinical Dermatology*, London, Blackwell Science, pp.210-218, 1994.