

逍遙散加減化裁의 멜라닌 생성 억제와 작용기전에 관한 연구

대전대학교 한의과대학 부인과교실

김은섭, 임현정, 신선미, 김수민, 이정은, 유동열

ABSTRACT

Inhibitory Effect of Soyosangagamhwajae on Melanin Synthesis and its Action Mechanism in B16F10 Mouse Melanoma Cell

Eun-Seop Kim, Hyun-Jung Lim, Sun-Mi Shin, Soo-Min Kim, Jung-Eun Lee, Dong-Youl Yoo.

Dept. of Oriental Medicine Graduate School, Daejeon University

Purpose: This study was performed to determine the inhibitory effect of Soyosangagamhwajae(SYG) on melanin synthesis in B16F10 mouse melanoma cell.

Methods: The Inhibitory effects of Soyosangagamhwajae(SYG) on melanin synthesis were determined by in-vitro assay. To elucidate inhibitory effects of SYG on melanin synthesis, we determined the melanin release in B16F10 cell. And to investigate the action mechanism, we assessed the gene expression of tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA, PKC β in B16F10 cell.

Results:

1. SYG significantly inhibited melanin-release in B16F10 cell.
2. SYG significantly inhibited mushroom tyrosinase activity in vitro.
3. SYG significantly suppressed the expression of tyrosinase in B16F10 cell.
4. SYG significantly suppressed the expression of TRP-1, TRP-2 in B16F10 cell.
5. SYG significantly suppressed the expression of PKA, PKC β in B16F10 cell.

Conclusion: From these results, it may be concluded that SYG has the antimelanogenetic effect.

Key Words: Soyosangagamhwajae(SYG), antimelanogenetic effect, melanin synthesis, tyrosinase, TRP, PKA, PKC β , B16F10 mouse melanoma cell.

I. 緒 論

자외선은 피부 손상, 노화 및 주름살 형성의 주요한 원인으로 작용하고 있다. 자외선은 파장에 따라 UVA, UVB, UVC로 나뉘어지는데, 이 중 UVA는 피부에 색소침착을 일으키고, 즉각적인 반응을 유발하며 피부노화를 촉진한다. UVB는 피부 깊숙이 침투하여 피부에 화상을 일으키며, 멜라닌 세포를 자극해서 멜라닌의 생성을 촉진한다^{1,2)}.

피부의 색은 표피에 분포하는 melanin, 진피에 분포하는 hemoglobin, 피하 조직에 분포하는 carotene에 의해 결정되는데, 그 중 표피의 멜라닌 합성세포에서 생성되는 멜라닌의 양과 분포에 의해 거의 결정되기 때문에, 멜라닌 합성세포에서 멜라닌 생성을 억제시키는 것이 미백 연구의 주요 관심사가 되고 있다^{3,4)}.

미백효과에 대한 연구는 피부미백효과와 항산화작용 및 피부 노화방지를 포함하는 포괄적인 개념으로 진행되고 있는데, 특히 tyrosinase의 활성을 억제하여 멜라닌의 초기 생성을 감소시키는 기전이 주로 많이 연구되고 있다^{1,2,4)}.

한의학에서 색소침착증은 《黃帝內經·素門》〈至眞要大論〉⁵⁾에 ‘면진(面塵)’이라 하여 처음 언급된 이래, 형태와 색조에 따라, 면흑(面黑)⁶⁾, 간점(黥點)⁷⁾, 작란(雀卵)⁸⁾, 반간증(斑黥黯)⁹⁾, 염자(靨子)^{8,9)}, 작반(雀斑)¹⁰⁾, 흑반(黑斑)¹¹⁾, 여흑반(黧黑斑)¹⁰⁾, 호접반(胡蝶斑)¹²⁾, 황갈반(黃褐斑)¹²⁾ 등으로 다양하게 표현되어 왔다. 이 중 황갈반은 보통 ‘기미’라 불리는 것이며, 임신 중인 여성이나 肝 질환 환자에게 많이 나타나서 妊娠斑, 肝斑이라 부르기도 한다¹²⁾.

한약재를 이용한 미백 관련 연구로, 박 등¹³⁻¹⁵⁾은 서시옥용산(加減西施玉容散)이 미백효과가 있다고 보고하였으며, 이 등¹⁶⁾은 天花粉 추출물이, 윤 등¹⁷⁾은 白芨이 멜라닌 생성억제 효과를 가지고 있다고 보고하였다. 이외에도 기능성 화장품 개발을 위한 연구 등^{18,19)} 미백효과에 대한 많은 연구들이 보고되고 있다.

逍遙散은 《太平惠民和劑局方》²⁰⁾에 최초로 언급된 疎肝解鬱의 대표적 처방으로, 한방부인과 임상에서는 주로 월경과소, 월경선후 無定期, 갱년기증후 등 肝氣의 鬱滯로 발생하는 증상에 두루 사용되고 있다^{12,21,22)}. 逍遙散加減化裁는 소요산에서 시호, 박하, 생강을 去하고 익모초, 청피, 목단피를 加하여, 肝鬱氣滯로 인해 안면에 기혈의 濡養이 이루어지지 못하여 발생하는 黃褐斑을 치료하는 데에 활용되고 있다¹²⁾.

본 연구는 疎肝解鬱 濡養氣血 活血消斑의 효능이 있는 逍遙散加減化裁의 미백효과를 확인하고자, B16F10 mouse melanoma cell을 이용하여 逍遙散加減化裁가 melanin 유리에 미치는 영향을 측정하였고, in vitro에서 mushroom tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정하였으며, 그 작용 기전을 밝히기 위하여 B16F10 cell에서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA 및 PKC β 등의 유전자 발현에 대하여 연구한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재 료

1) 세포주

본 실험에 사용한 melanocyte는 서울대 학교 한국세포주은행에서 분양한 B16F10 mouse melanoma cell을 사용하였다.

2) 약 물

실험에 사용한 소오산가감화제의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Soyosangagamhwajae

藥材名	生 藥 名	重量(g)
益母草	LEONURI HERBA	12
當 歸	ANGELICAE GIGANTIS RADIX	6
白芍藥	PAEONIAE RADIX ALBA	6
白 朮	ATRACTYLODIS MACROCEPHALAE RHIZOMA	6
白茯苓	PORIA	4
青 皮	CITRI RETICULATAE VIRIDE PERICARPIUM	3
牡丹皮	MOUTAN CORTEX	3
甘 草	GLYCYRRHIZAE RADIX	2
Total		42

3) 시약 및 기기

(1) 시 약

본 실험에 사용된 시약 중 methanol, CHCl₃, n-BuOH, Hank's balanced salt solution, dimethyl sulfoxide (DMSO), CO₂, α-MSH, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), NaOH, 합성멜라닌, mushroom tyrosinase, tyrosinase, L-tyrosine, phenol, isoamyl alcohol, isopropyl alcohol, ethanol, DTT, diethyl pyrocarbonate (DEPC), magnesium chloride (MgCl₂)는 Sigma (Sigma, USA) 제품을, normal saline은 중외제약 제품을, TRIzol, Superscript II RT는 Invitrogen (Invitrogen, USA) 제품을, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), trypsin-EDTA는 Gibco/BRL (Gibco/BRL, USA) 제품을, RNase는 Pharmingen (Torreyana, USA) 제품을, TRP-1, TRP-2, PKA,

PKCβ 등 ELISA kit는 R&D system (Minneapolis, USA) 제품을, oligo dT, DTT, dUTP, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV-RT)는 Promega (Promega, USA) 제품을, deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), Taq polymerase는 Biotools (Biotools, Spain) 제품을, DNA marker는 Bioneer (Bioneer, USA) 제품을, DNA ligase는 BMS (BMS, USA) 제품을, cyanine3-dCTP, cyanine5-dCTP는 Amersham (Amersham, USA) 제품을, PCR purification kit는 Nucleogen (Nucleogen, USA) 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기 기

본 실험에 사용된 기기는 centrifuge (Hanil unicon 54R, Korea), rotary vaccum evaporator (Büchi 461, Swiss), deep freezer (Sanyo, Japan), freeze dryer (Eyela, Japan), roller Mixer

(Gowon scientific technology, Korea), 96 well plate, 24 well plate, 6 well plate (Seolin, Korea), CO₂ incubator (Sanyo, Japan), hematocytometer (Fuchs-Rosenthal, Germany), clean bench (Sejong, Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific, Korea), vortex mixer (Vision scientific, Korea), MALDI-TOP (Shimadzu, Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific, Korea), cornical tube (Falcon, USA), homogenizer (OMNI, USA), UV illuminator (VL TFX-20M, USA), liquid handler (Packard, USA), PCR Apparatus (Biometra T1, USA), image analyser (VL, USA), electrophoresis (BMS, USA), ELISA reader (BMS, USA), quantitative real time PCR apparatus (ABI Prism 7000, USA), Gel-Pro analyzer 3.1 (Media Cybernetics, USA) 등을 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료 추출 및 분획 조제

소요산가감화재 126 g을 MeOH로 2 시간 환류 추출한 다음 이를 감압 농축하여 MeOH 추출물 9.2 g을 얻었다. MeOH 추출물을 증류수에 현탁한 다음 CHCl₃로 추출, 분획하여 감압 농축한 다음 냉동건조 시켜 CHCl₃ 분획층 1.8 g을 얻었다. 계속하여 n-BuOH 분획층을 얻고, 나머지 수층을 감압 농축한 후 냉동건조로 고형물을 얻었다.

2) 검액 조제

실험용 검액 (소요산가감화재 추출물:

SYG)은 CHCl₃ 분획층을 DMSO에 녹인 후 0.22 μ m pore size를 가지는 여과지를 이용하여 멸균하고 사용 시까지 냉장 보관하였다. 배양된 세포에 사용하기 직전에 실험농도에 맞도록 DMEM 배지로 조정된 다음 사용하였다.

3) 세포 배양

세포 배양에 사용된 배지는 10% FBS와 penicillin, streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하였으며 1일 1회 배지를 교환하였다. FBS는 잔존하는 보체성분을 불활성화시키기 위해 실온에서 녹인 후 heat inactivation (56°C water bath에서 30분간 가열)하여 사용하였으며, 배지는 0.2 μ m membrane filter로 여과 후 사용하였다. B16F10 mouse melanoma cell (이하 B16F10 cell이라 칭함)에 각 조건 별로 96well plate에는 well 당 100 μ l, 24well plate에는 well 당 500 μ l로 medium을 넣어주었다. 세포를 회수할 때는 trypsin-EDTA 1 ml을 가하여 37°C에서 1분간 반응시킴으로써 부착된 세포를 분리하고 배지 4 ml을 넣고 원심분리 (1,000 rpm, 3분)를 하여 세척한 후 실험에 사용하거나 필요시 액체질소에서 냉동 보관하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂를 사용한 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

4) B16F10 cell proliferation 측정

세포를 2×10⁴ cells/ml의 농도로 6 well plate에 넣고 6시간 배양하여 plate에 부착한 다음, 분획하여 조제한 검액을 농도별로 첨가하여 1, 2, 3일간 배양하였다. 배양완료 후 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리한 다음, D-PBS로 희석하여 hematocytometer로 B16F10 세포수를 계측하였다.

5) Melanin 유리량 측정

Melanin 유리량 측정은 Hosoi 등의 방법²³⁾을 사용하였다. Melanin 생성 세포로는 마우스에서 얻은 흑색종의 일종인 B16F10 cell을 이용하였다. 배양된 B16F10 세포에 α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) 10 μ M를 처리한 다음(대조군), 다시 300, 150, 75, 37 μ g/ml 농도의 SYG를 가하여 3일간 배양한 후(실험군), 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양을 측정하였다. 405 nm에서 흡광도 (optical density)를 측정하였으며, melanin 정량은 합성멜라닌을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

6) Mushroom tyrosinase 활성에 미치는 영향 측정

Tyrosinase 활성에 미치는 영향은 Mason and Paterson 등의 방법²⁴⁾을 사용하였다. 즉, 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) 150 μ l, 3 mM L-tyrosine 수용액 20 μ l, 검액 20 μ l을 차례대로 가한 다음 2,500 U/ml mushroom tyrosinase 10 μ l를 가하여 반응을 시작하였다. 반응은 37°C에서 30분간 incubation 시켰으며 매 10분 간격으로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 활성은 아래에 표시한 식으로 구하였다.

Tyrosinase 활성도 (%)

$$= (B-B')/(A-A') \times 100$$

A: 대조군 반응액의 흡광도

A': 대조군의 tyrosinase 대신 buffer를 가한 반응액의 흡광도

B: 검액이 첨가된 반응액의 흡광도

B': B 반응액 중 tyrosinase 대신 buffer를 가한 반응액의 흡광도

7) 유전자 발현에 대한 영향

(1) 총 RNA 분리

배양하고 있는 B16F10 세포에 1 ml TRIzol reagent를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA에 100 μ l phenol과 100 μ l chloroform/ isoamyl alcohol (24:1)을 넣고 잘 섞은 후 원심분리하는 과정을 2번 반복함으로써 상층액을 분리하였다. 0.5 ml isopropyl alcohol을 이용하여 RNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하고 자연 건조시켰다. RNase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase-free DNase를 첨가하고 -70°C에서 저장하였다.

(2) cDNA 제조

대조군 및 실험군에서 각각 분리한 total RNA 액 (13 μ g RNA 함유)에 oligo dT 1 μ l를 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 70°C에서 5분간 incubation하였다. Primer가 annealing 하도록 실온에서 약 10분간 방치한 다음, cyscript buffer, 0.1 M DTT, dUTP nucleotide, dUTP cydye-labelled nucleotide, cyscript reverse transcriptase를 첨가한 후, 조심스럽게 혼합하였다. 이후, 42°C에서 90분간 incubation 한 후, 얼음물에 방치하였다. 여기에 2.5 M NaOH을 가한 후 37°C에서 15분간 incubation하였으며, 2 M Hepes buffer를 가하여 중화시켰다.

(3) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Oligo dT 12-18, reaction buffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 8.3), 1 mM dNTP와 200 unit M-MLV-RT를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR은 total volume 15 μ l에 10배의 PCR buffer, 0.2 mM dNTP, 2 pmole의 sense 및

antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA 와 1.25 unit의 Taq polymerase를 넣어 PCR을 시행하였다.

Tyrosinase의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT이었으며, antisense는 TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC를 사용하였다. TRP-1의 sense primer는 GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC, antisense는 AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT를 사용하였으며, TRP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT, antisense는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC를 사용하였다. PKA의 sense primer는 TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT, antisense는 TATA GGC TGG TCA GCG AAG AA를 사용하였으며, PKC β 의 sense primer는 AGA ACC ACA AAT TCA CCG CC, antisense는 TGA GAA CCT CTC TGT CGA TG를 사용하였다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA이었으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC이었다. PCR 조건은 94°C 4분, 30 cycles의 (94°C 30초, 59°C 30초, 72°C 45초), 72°C 10분이었다. 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동하였다. 전기영동 결과 나온 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1 (Media Cybernetics, USA)을 이용하여 구했다.

(4) Real time RT-PCR

먼저 시험관에 정량한 RNA 5 μ g, random hexamer (50 pM/3 μ l), 10 mM dNTP 1 μ l를 넣고, DEPC 처리된 증류수를 가하여 10 μ l의 RNA/primer

mixture를 만들었다. 실험용 sample을 65°C에서 5분간 incubation 시킨 후 1분 이상 얼음물에 방치하였다. Reaction mixture로 10배의 RT buffer 2 μ l, 25 mM MgCl₂ 4 μ l, 0.1 M DTT 2 μ l, RNase 1 μ l를 섞어 준비하였다. Tyrosinase의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT이었으며, antisense는 TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC를 사용하였다. TRP-1의 sense primer는 GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC, antisense는 AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT를 사용하였으며, TRP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT, antisense는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC를 사용하였다. PKA의 sense primer는 TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT, antisense는 TATA GGC TGG TCA GCG AAG AA를 사용하였으며, PKC- β 의 sense primer는 AGA ACC ACA AAT TCA CCG CC, antisense는 TGA GAA CCT CTC TGT CGA TG를 사용하였다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA이었으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC이었다. Reaction mixture를 RNA/primer mixture에 가하여 섞고 실온에 2분간 방치한 후, Superscript II RT 1 μ l (50 units)를 가하고 25°C에 10분간 incubation 시켰다. 다시 42°C에서 50분간 incubation 시킨 다음, 70°C에서 15분간 가열하여 inactivate 시키고 얼음물에서 식혔다. RNase 1 μ l를 가하고 다시 37°C에서 20분간 incubation 시킨 다음, 사용시까지 -20°C에 보관하였

다. 각각의 optical tube에 2배의 SYBR green mix 12.5 μ l, cDNA 0.2 μ l, 5 pmol/ μ l primer pair mix 1 μ l, 11.3 μ l H₂O를 넣고, 50°C 2분 1 cycle, 95°C 10분 1 cycle, (95°C 15초, 60°C 30초, 72°C 30초) 40 cycles, 72°C 10분 1 cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 μ l를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정했다. SDS 7000 software를 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다.

3. 통계학적 분석

각 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test와 Anova test를 이용하였다. p<0.05인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

III. 實驗成績

1. SYG가 B16F10 cell에서 melanin 유리에 미치는 영향

실험결과 소요산가감화제 추출물 (SYG)은 300, 150 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비하여 melanin 유리를 유의성 있게 (p<0.01) 억제하였다(Fig. 1).

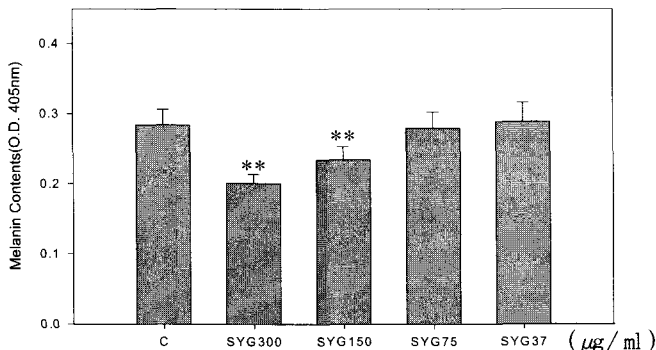


Fig. 1. Inhibitory effects of SYG on melanin released from B16F10 cells. Melanin was determined in the culture medium after 72 hrs incubation.

Control (C): 10 μ M α -MSH treated group

SYG300: 10 μ M α -MSH and 300 μ g/ml SYG treated group

SYG150: 10 μ M α -MSH and 150 μ g/ml SYG treated group

SYG75: 10 μ M α -MSH and 75 μ g/ml SYG treated group

SYG37: 10 μ M α -MSH and 37 μ g/ml SYG treated group

** : p<0.01 vs C

2. SYG가 mushroom tyrosinase 활성화에 미치는 영향

실험결과 SYG는 300, 150, 75 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비하여 tyrosinase 활성을 유의성 있게 (p<0.01, p<0.05) 억제하였다(Fig. 2).

3. SYG가 B16F10 cell에서 tyrosinase 발현에 미치는 영향

실험결과 tyrosinase는 α -MSH(10 μ M) 처리시 발현이 증가하였으며, SYG는 200, 100, 50 μ g/ml의 농도에서 증가한 유전자 발현을 현저히(p<0.01) 억제하였다(Fig. 3).

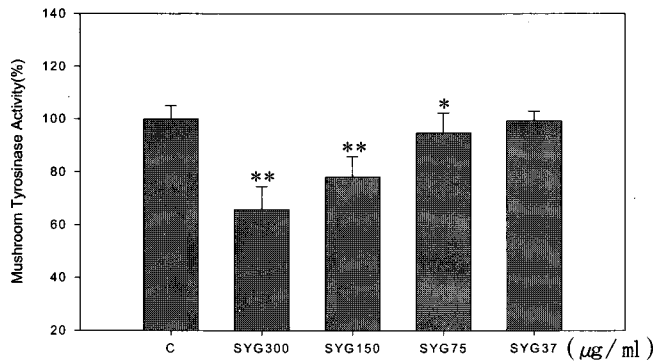


Fig. 2. Inhibitory effects of SYG on mushroom tyrosinase activity in vitro.

Control (C): Vehicle treated group
 SYG300: Vehicle and 300 µg/ml SYG treated group
 SYG150: Vehicle and 150 µg/ml SYG treated group
 SYG75: Vehicle and 75 µg/ml SYG treated group
 SYG37: Vehicle and 37 µg/ml SYG treated group, **: p<0.01 vs C, *: p<0.05

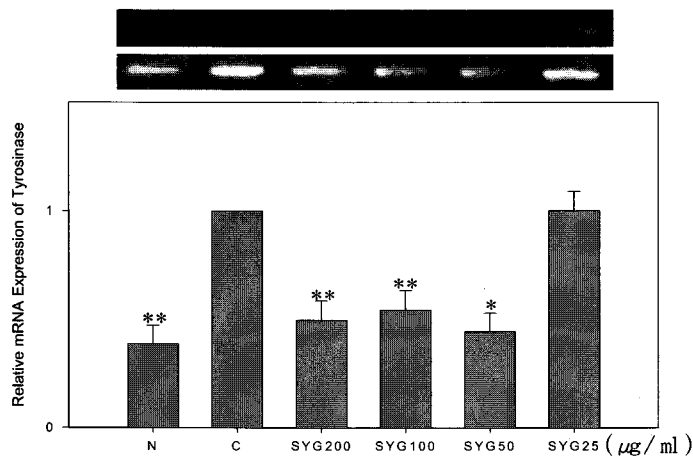


Fig. 3 Effects of SYG on the expression of tyrosinase in B16F10 cells.

Normal (N): Vehicle treated group
 Control (C): Vehicle and 10 µM α-MSH treated group
 SYG200: Vehicle, 10 µM α-MSH and 200 µg/ml SYG treated group
 SYG100: Vehicle, 10 µM α-MSH and 100 µg/ml SYG treated group
 SYG50: Vehicle, 10 µM α-MSH and 50 µg/ml SYG treated group
 SYG25: Vehicle, 10 µM α-MSH and 25 µg/ml SYG treated group, **: p<0.01 vs C

4. SYG가 B16F10 cell에서 TRP-1 발현에 미치는 영향

실험 결과 TRP-1은 α-MSH 10 µM 처리시 발현이 증가하였으며, SYG는 200, 100 µg/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 유의성 있게 (p<0.01) 억제하였다(Fig. 4).

5. SYG가 B16F10 cell에서 TRP-2 발현에 미치는 영향

실험 결과 TRP-2는 α-MSH 10 µM 처리시 발현이 증가하였으며, SYG는 200, 100, 50 µg/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 유의성 있게 (p<0.01) 억제하였다(Fig. 5).

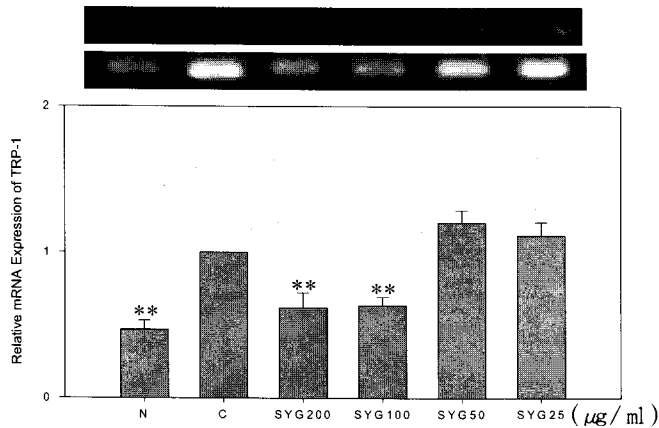


Fig. 4 Effects of SYG on the expression of TRP-1 in B16F10 cells.

Normal (N): Vehicle treated group

Control (C): Vehicle and 10 μ M α -MSH treated group

SYG200: Vehicle, 10 μ M α -MSH and 200 μ g/ml SYG treated group

SYG100: Vehicle, 10 μ M α -MSH and 100 μ g/ml SYG treated group

SYG50: Vehicle, 10 μ M α -MSH and 50 μ g/ml SYG treated group

SYG25: Vehicle, 10 μ M α -MSH and 25 μ g/ml SYG treated group, **: $p < 0.01$ vs C

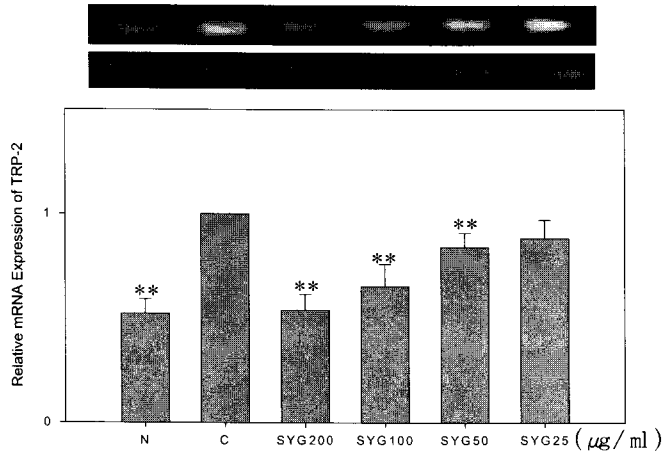


Fig. 5. Effects of SYG on the expression of TRP-2 in B16F10 cells.

Normal (N): Vehicle treated group

Control (C): Vehicle and 10 μ M α -MSH treated group

SYG200: Vehicle, 10 μ M α -MSH and 200 μ g/ml SYG treated group

SYG100: Vehicle, 10 μ M α -MSH and 100 μ g/ml SYG treated group

SYG50: Vehicle, 10 μ M α -MSH and 50 μ g/ml SYG treated group

SYG25: Vehicle, 10 μ M α -MSH and 25 μ g/ml SYG treated group, **: $p < 0.01$ vs C

6. SYG가 B16F10 cell에서 PKA 발현에 미치는 영향

실험 결과 PKA는 α -MSH 10 μ M 처리 시 발현이 증가하였으며, SYG는 200, 100, 50 μ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을

유의성 있게 ($p < 0.01$) 억제하였다(Fig. 6).

7. SYG가 B16F10 cell에서 PKC β 발현에 미치는 영향

실험 결과 PKC β 는 α -MSH 10 μ M 처

리시 발현이 증가하였으며, SYG는 200, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 증가한 유전자 발현을 유의성 있게 ($p < 0.01$) 억제하였다 (Fig. 7).

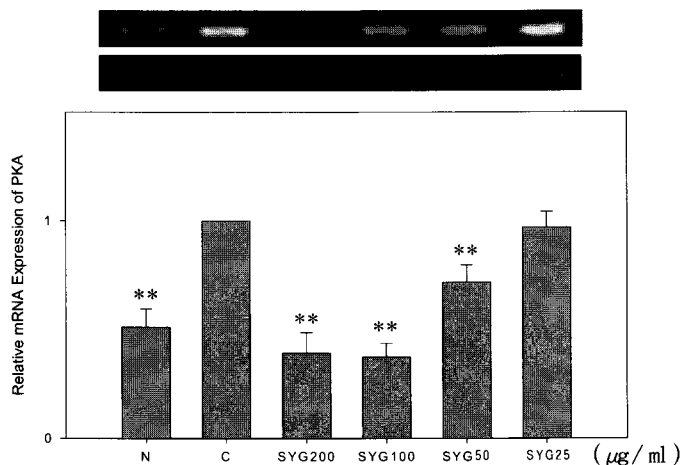


Fig. 6. Effects of SYG on the expression of PKA in B16F10 cells.

Normal (N): Vehicle treated group

Control (C): Vehicle and 10 μM α -MSH treated group

SYG200: Vehicle, 10 μM α -MSH and 200 $\mu\text{g/ml}$ SYG treated group

SYG100: Vehicle, 10 μM α -MSH and 100 $\mu\text{g/ml}$ SYG treated group

SYG50: Vehicle, 10 μM α -MSH and 50 $\mu\text{g/ml}$ SYG treated group

SYG25: Vehicle, 10 μM α -MSH and 25 $\mu\text{g/ml}$ SYG treated group. **: $p < 0.01$ vs C

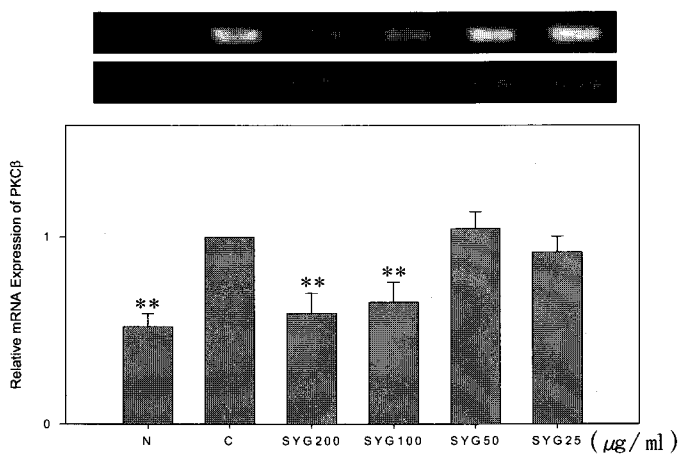


Fig. 7. Effects of SYG on the expression of PKCβ in B16F10 cells.

Normal (N): Vehicle treated group

Control (C): Vehicle and 10 μM α -MSH treated group

SYG200: Vehicle, 10 μM α -MSH and 200 $\mu\text{g/ml}$ SYG treated group

SYG100: Vehicle, 10 μM α -MSH and 100 $\mu\text{g/ml}$ SYG treated group

SYG50: Vehicle, 10 μM α -MSH and 50 $\mu\text{g/ml}$ SYG treated group

SYG25: Vehicle, 10 μM α -MSH and 25 $\mu\text{g/ml}$ SYG treated group. **: $p < 0.01$ vs C

IV. 考 察

최근 피부의 자외선 노출 증가로 야기되는 피부의 광노화(光老化)는 피부미백에 대한 관심을 증가시키고 있다. 자외선은 급성적으로는 일광화상을 일으켜 홍반을 발생시키는데 심하면 부종, 수포, 동통을 동반하고, 장기적으로 자외선의 조사가 반복되면 광노화가 초래된다^{3,25,26}.

피부가 자외선에 노출되면 멜라닌세포는 그 파장에 따라 즉시형 색소침착과 지연형 색소침착이 발생하는데 주근깨, 기미, 밀크커피색 반점, 모반, 흑자 등이 이에 해당한다⁴.

한의학에서 과색소침착증에 대해서는 《黃帝內經·素問》〈至眞要大論〉⁵에 “歲陽明在天, 燥淫所勝... 面鹿, 身無膏澤, 足外反熱”이라 하여 처음 언급된 이래, 諸文獻에서 형태와 색조에 따라 간증(黥黯)²⁷, 간점(黥點)⁷, 면흑(面黑)⁶, 면간증(面黥黯)⁷, 작란(雀卵)⁸, 반간증(斑黥黯)⁹, 염자(黥子)^{8,9}, 작반(雀斑)¹⁰, 여흑반(黥黑斑)¹⁰, 간암(黥黯)²⁸, 여흑간증(黥黑黥黯)²⁹, 흑반(黑斑)¹¹, 황갈반(黃褐斑)¹² 등으로 다양하게 표현되어 왔으며, 송³⁰은 역대 의가(醫家)의 설과 현대적인 이론을 접목한 결과 얼굴에 생기는 질병의 대부분은 위장이 주관을 하지만 심장 기능 및 혈액순환이 관련된다고 주장하였다.

자외선은 파장에 따라 UVA, UVB, UVC로 나누어지는데, UVB (280~320 nm)는 주로 피부의 표피층까지 침투하여 melanin 합성을 자극하고, UVA (320~380 nm)는 진피층까지 도달하여 활

성산소의 생성을 유발하며 피부 각질세포 및 진피세포에 손상을 주며, UVC (200~280 nm)는 소독력, 살균력을 가지고 있으며, 피부색과는 관계가 없다²⁶.

UV 등의 외부 스트레스는 피부각질세포로부터 α -MSH와 같은 growth hormone과 함께 TGF β , PGE₂ 등을 분비하는데, 이러한 cytokine類는 melanocyte에 존재하는 수용체에 결합하여 세포기능을 활성화 시킨다. 활성화된 melanocyte는 melanosome에서 페놀류의 고분자 물질인 melanin을 합성하는데, 이러한 melanin은 외부 스트레스로부터 피부를 방어하는 기전의 일환으로 작용하게 된다. Keratinocyte (각질형성세포)에 의해 분비된 α -MSH에 의해 자극을 받은 melanocyte로부터 생성된 melanin은 dendrite 등을 통하여 다시 keratinocyte 등에 전해져서 스트레스에 의한 세포상해를 억제하는 작용을 나타내게 한다³¹⁻³³.

미백효과에 대한 연구는 피부미백효과와 항산화작용 및 피부 노화방지를 포함하는 포괄적인 개념으로 진행되고 있는데, 자외선 차단소재 연구, 멜라닌세포에 멜라닌(melanin)의 합성을 명령하는 신호전달물질인 cytokine의 작용을 조절하는 연구, 유전자발현 억제, tyrosinase작용 억제, 활성산소 제거소재, 색소환원, 각질층 제거촉진소재 연구 등 다양하게 진행되고 있다. 이 중에서도 tyrosinase의 활성을 억제하여 멜라닌의 초기 생성을 감소시키는 기전이 주로 많이 연구되고 있다^{1,2,4}.

또한 피부 미백제로는 Kojic acid, arbutin, ascorbic acid, hydroquinone 등이 많이 사용되고 있는데, 이들 제품의 안전성에 문제가 있기 때문에^{34,35}, 미백

효과가 뛰어나면서도 세포 독성이 적은 소재를 발굴하기 위해 많은 연구가 진행되고 있다^{13-19,36-38)}.

한약재를 이용한 미백 관련 연구로 이³⁷⁾는 마황(麻黃) 및 마풍고(摩風膏)가, 박 등¹³⁻¹⁵⁾은 서시옥용산(西施玉容散)이 미백효과가 있다고 보고하였으며, 이 등¹⁶⁾은天花粉 추출물이, 윤 등¹⁷⁾은白芨이, 이 등³⁸⁾은 뽕나무가지 추출물이 멜라닌 생성억제 효과를 가지고 있다고 보고하였다. 이외에도 기능성 화장품 개발을 위한 연구 등^{18,19)} 미백효과에 대한 많은 연구들이 보고되고 있다. 또한 소오산에 대한 실험적 연구로 최 등³⁹⁾은 항스트레스효과와 소염 및 진통작용이 있다고 보고하였고, 김 등⁴⁰⁾은 항우울효과가 있다고 연구 보고하였다.

逍遙散은 《太平惠民和劑局方》²⁰⁾에 최초로 언급된 疎肝解鬱의 대표적 처방으로, 한방부인과 임상에서는 주로 월경과소, 월경선후 무정기, 갱년기증후 등 肝氣의鬱滯로 발생하는 증상에 두루 사용되고 있다^{12,21,22)}. 逍遙散加減化裁는 소오산에서 시호, 박하, 생강을 去하고 익모초, 청피, 목단피를 加하여, 肝鬱氣滯로 인해 안면에 기혈의濡養이 이루어지지 못하여 발생하는 黃褐斑을 치료하는 데에 활용되고 있다¹²⁾. 소오산가감화재 구성약물의 효능을 살펴보면, 益母草는 活血調經, 利水退腫, 當歸는 補血和血, 調經止痛, 白芍藥은 養血柔肝, 緩中止痛, 白朮은 補脾益胃, 燥濕和中, 白茯苓은 利水滲濕, 健脾寧心, 靑皮는 疏肝破氣, 散結消痰, 牡丹皮는 清熱涼血, 活血散瘀, 甘草는 和中緩急, 調和諸藥의 효능이 있다⁴¹⁾. 이상으로 보아 소오산가감화재는 活血調經, 補血和血, 健脾寧心, 疎肝解鬱,

消痰散瘀하므로, 肝鬱氣滯로 인해 기혈의濡養이 이루어지지 못하여 발생하는 피부질환에 효과가 있을 것으로 사료된다.

저자는 이를 확인하고자 소오산가감화재 추출물을 분획한 다음 얻어진 CHCl₃ 분획층을 이용하여 melanin 유리, mushroom tyrosinase의 활성 및 이 과정에서 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하였다.

Melanin은 외부 스트레스로부터 피부를 방어하는 기전의 일환으로 melanocyte에서 합성된다⁴⁾. 그러나 피부미백에 부정적 영향을 주기 때문에 melanin 합성을 차단하기 위한 다양한 시도가 있었다. 본 연구에서는 소오산가감화재 추출물(이하 SYG)을 이용하여 melanin 생성 억제를 시도하였다. Melanin 생성세포로는 마우스에서 얻은 흑색종의 일종인 B16F10 melanoma cell을 이용하였다. 실험 결과 B16F10 melanoma cell에 α-MSH 10 μM를 처리한 경우, 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양이 증가하였으며, 소오산가감화재 추출물은 300, 150 μg/ml의 농도에서 대조군에 비하여 유출되는 melanin의 양을 유의성 있게 (p<0.01) 억제하였다(Fig. 1).

Melanin 합성은 melanosome 내에 존재하는 tyrosinase의 작용을 통해 이루어진다. 이 tyrosinase는 L-tyrosine을 산화시켜 L-DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase로 작용하며, DOPA를 산화시켜 DOPAquinone을 만드는 DOPA oxidase로 작용하여 melanin을 합성하는 중요한 효소로 알려져 있다⁴⁾. 그러므로 melanin 생성을 억제하는 피부 미백제 개발에는 tyrosinase의 활성을 억제하는 것이 필수적이다. 따라서 SYG가 melanin 합

성을 억제하는 것을 확인하고, tyrosinase 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 mushroom의 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정하였다. Mushroom tyrosinase의 저해제는 tyrosinase 활성부위 구리이온의 상태변화에 관여함으로써 tyrosinase의 산화, 환원과정을 조절할 수 있기 때문에, 버섯 tyrosinase를 이용한 시험관내 tyrosinase 활성억제실험은 피부미백제의 개발에 있어서 유용한 일차 평가법으로 인정되고 있다⁴²⁾. 실험결과 SYG는 300, 150, 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조군에 비하여 tyrosinase 활성을 유의성 있게 ($p<0.01$, $p<0.05$) 억제하였다(Fig. 2).

Melanocyte내 유전자 발현이 증가하면 melanin 합성이 증가하게 된다⁴³⁻⁴⁵⁾. 따라서 tyrosinase 발현을 억제하면 melanin 합성을 억제할 수 있다. 본 연구에서는 SYG가 melanin 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 tyrosinase의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. 실험결과 tyrosinase는 α -MSH 10 μM 처리시 발현이 증가하였으며, SYG는 200, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 증가한 유전자 발현을 유의성 있게 ($p<0.01$) 억제하였다(Fig. 3).

TRP-1은 tyrosinase related protein으로 알려져 있는 단백질로서 TRP-2에 의해 생성된 DHICA (5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid)를 산화시켜 IQCA (indole-2-carboxylic acid)를 생성하는데, IQCA는 흑갈색을 나타낸다^{46,47)}. 따라서 TRP-1 발현을 억제하면 미백효과를 기대할 수 있다. 실험 결과 TRP-1은 α -MSH 10 μM 처리시 발현이 증가하였으며, SYG는 200, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서

증가한 유전자 발현을 유의성 있게 ($p<0.01$) 억제하였다(Fig. 4).

TRP-2는 DOPachrome tautomerase로 알려져 있는 효소로서 DOPachrome을 이용하여 DHICA를 생성한다. DHICA는 TRP-1에 의해 산화되어 IQCA를 생성하는데, IQCA는 흑갈색을 나타낸다^{46,47)}. 따라서, TRP-2 발현을 억제하면 미백효과를 기대할 수 있다. 실험 결과 TRP-2는 α -MSH 10 μM 처리시 발현이 증가하였으며, SYG는 200, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 증가한 유전자 발현을 유의성 있게 ($p<0.01$) 억제하였다(Fig. 5).

Melanocyte가 활성화되어 melanogenesis가 진행될 때, adenylate cyclase의 활성이 증가하며 cAMP 농도가 증가한다. PKA는 cAMP 의존적 protein kinase로서 각종 효소의 활성을 조절하고, 세포 증식에 관여하는 것으로 알려져 있다. PKA의 활성 증가는 tyrosinase의 인산화와 활성 증가를 유발한다⁴³⁾. 따라서 PKA 발현을 억제하는 경우 tyrosinase의 활성화를 방지를 통하여 melanin 생성을 억제하게 된다. 실험 결과 PKA는 α -MSH 10 μM 처리시 발현이 증가하였으며, SYG는 200, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 증가한 유전자 발현을 유의성 있게 ($p<0.01$) 억제하였다(Fig. 6).

또한 PKC β 는 여러 효소를 인산화하여 활성을 증가시키며, 세포의 증식을 자극하는 효소이다⁴³⁾. 따라서 PKC β 의 활성이 증가하면 melanocyte의 기능이 증가한다. 실험 결과 PKC β 는 α -MSH 10 μM 처리시 발현이 증가하였으며, SYG는 200, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 증가한 유전자 발현을 유의성 있게 ($p<0.01$) 억제하였다(Fig. 7).

이상의 결과를 종합해 보면, SYG는 B16F10 melanoma 세포에서 melanin 유리를 억제하였고, in vitro에서 mushroom tyrosinase의 활성을 억제하였으며, B16F10 melanoma 세포에서 α -MSH 10 μ M에 의해 증가되는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA 및 PKC β 의 발현을 억제하여 melanin 합성을 억제하는 것으로 나타났다.

V. 結 論

소요산가감화재의 미백효과를 확인하고자, 소요산가감화재 추출물 (SYG)이 melanin 유리와 mushroom tyrosinase의 활성에 미치는 영향을 측정하였으며, 그 작용 기전을 밝히기 위하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA, PKC β 등의 유전자 발현에 대한 연구를 실행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. SYG는 B16F10 세포에서 melanin 유리를 유의성 있게 억제하였다.
2. SYG는 mushroom tyrosinase의 활성을 유의성 있게 억제하였다.
3. SYG는 B16F10 세포에서 α -MSH 10 μ M에 의해 증가되는 tyrosinase 발현을 유의성 있게 억제하였다.
4. SYG는 B16F10 세포에서 α -MSH 10 μ M에 의해 증가되는 TRP-1, TRP-2 발현을 유의성 있게 억제하였다.
5. SYG는 B16F10 세포에서 α -MSH 10 μ M에 의해 증가되는 PKA, PKC β 발현을 유의성 있게 억제하였다.

이상의 결과, 소요산가감화재 추출물

은 melanin 유리를 억제하고, tyrosinase의 활성을 억제하여 melanin 생성을 억제함으로써 미백효과를 나타내는 것으로 사료된다. 따라서 향후 한방부인과 임상에서 황갈반 치료에 유용하리라고 생각된다.

- 투 고 일 : 2008년 1월 18일
- 심 사 일 : 2008년 1월 28일
- 심사완료일 : 2008년 2월 1일

참고문헌

1. 김종대. 피부관리학. 서울: 고문사, 1994:23-26, 111-113.
2. 김복희. 뉴피부미용학. 서울: 양생의학사, 1998:73-74, 302-311.
3. 이유신. 임상피부과학. 서울: 여문각, 1998:210, 296-297.
4. 대한피부과학회교과서편찬위원회. 피부과학. 서울: 여문각, 2001:7-9, 334, 409, 533-535.
5. 홍원식. 精校 黃帝內經素問. 서울: 동양의학연구원출판부, 1985:11, 295, 296.
6. 樓 英. 醫學綱目. 서울: 대성문화사, 1986:1081.
7. 趙 佶. 聖濟總錄. 북경: 인민위생출판사, 1987:1763.
8. 주명신. 醫門寶鑑. 서울: 행림서원, 1975:186-187.
9. 許 浚. 東醫寶鑑. 서울: 대성문화사, 1990:97-98, 308-309.
10. 祁 坤. 外科大成. 文光圖書有限公司, 1980:211-212.
11. 顧世澄. 瘍醫大全. 북경: 인민위생출

- 판사, 1992:479, 481.
12. 한의부인과학 편찬위원회. 한의부인과학(상). 서울: 정담, 2001:144, 150, 233, 395-396.
 13. 박지선 등. B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 대한 西施玉容散의 효과. 대한동의병리학회지. 2000:14(1):160-170.
 14. 손동석 등. 加減西施玉容散의 미백효과에 관한 연구. 대한안이비인후피부과학회지. 2002:15(2):104-117.
 15. 전병훈 등. 멜라닌 합성의 신호전달 기전에 미치는 西施玉容散의 효과. 대한동의병리학회지. 2001:15(1):73-83.
 16. 이관순 등. 天花粉이 멜라닌 형성에 미치는 영향. 대한외관과학회지. 2001:14(1):209-225.
 17. 윤화정 등. 白芨이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향. 대한안이비인후피부과학회지. 2003:16(1):100-111.
 18. 박수남 등. 식물유래 성분의 미백화장품(기능성화장품)에의 응용. 서울산업대학교 논문집. 2001:52:205-220.
 19. 이현호. 최근 미백화장품의 개발동향. 대한화장품학회지. 1997:23(1):43-56.
 20. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 북경: 인민위생출판사. 1985:308.
 21. 盧永範. 臨床方劑學講座. 서울: 大成醫學社. 2000:408-409.
 22. 朴喜守, 李泰勳. 隱白會 臨床處方講座. 서울: 大星文化社. 2000:182-185.
 23. Hosoi J. et al. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by vitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res., 1985:45:1474-1478.
 24. Mason H. S., Paterson E. W.. Melanoproteins I. Reaction between enzyme-generated quinones and amino acids. Biochim. Biophys. Acta., 1965:111:134-146.
 25. Kligman L. H. Photoaging manifestations, prevention and treatment. Dermatol. Clin., 1986:4:517-528.
 26. 윤재일. 자외선에 의한 피부반응. 방사선방어학회지. 1995:20(3):181-186.
 27. 李 槌. 編註醫學入門(雜病篇). 서울: 대성문화사. 1990:29, 224.
 28. 張 璐. 張氏醫通. 상해: 상해과학기술출판사. 1995:442-443.
 29. 吳 謙 등. 醫宗金鑑. 북경: 중국중의약출판사. 1990:745-746, 1680-1682.
 30. 송점식. 한방피부미용. 효림. 1993:188-192, 223-225.
 31. Tong X. et al. Apigenin prevents UVB-induced cyclooxygenase 2 expression: coupled mRNA stabilization and translational inhibition. Mol. Cell Biol., 2007:27(1):283-296.
 32. Sawyer T. K. et al. α -Melanocyte stimulating hormone. Amer. Zool., 1983:23:529-535.
 33. Aroca P. et al. Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. J. Biol. Chem., 1993:268:25650-25655.
 34. Curto E. V. et al. Inhibitors of mammalian melanocytes tyrosinase in vitro Comparisons of alkyl Esters of Gentisic acid with other putative inhibitors. Biochemical Pharmacology. 1992:57:663-672.
 35. Chakraborty A. K. et al. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. Pigment Cell Res., 1998:11(4):206-212.

36. 강현성 등. 사삼물추출액의 멜라닌 형성 억제 효과. 대한안이비인후피부과학회지. 2004;17(1):82-93.
37. 이상희. 麻黃 및 摩風膏의 미백효과에 관한 연구. 경희대학교 동서의학대학원 석사학위논문. 2001.
38. 이정훈 등. 뽕나무가지 추출물의 melanin 생성 억제효과. 대한피부연구학회지. 2001;8(2):86-90.
39. 최은수, 이인선. 소요산·가미소요산의 효능에 관한 실험적 연구. 대한한방부인과학회지. 1996;9(1):41-53.
40. 김윤상 등. 소요산이 난소적출 흰쥐에 미치는 항우울효과. 대한한방부인과학회지. 1996;14(2):69-84.
41. 전국한의과대학본초학교수. 본초학. 서울: 영림사, 2000:193, 302, 349, 422, 536, 540, 578, 581.
42. 山孝一良 and Hearing V.J. 멜라닌產生의 制御因子. Fragrance Journal. 1990;6:24-28.
43. Lee J., Kim Y. S., Park D. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. Biochem Pharmacol. 2007;74(7):960-968.
44. Huang S. C. et al. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-kappa B and c-Jun.. Biochem. Pharmacol.. 2004;69(2):221-232.
45. Jiménez-Cervantes C. et al. Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor. J Cell Sci. 2004;114(Pt 12):2335-2344.
46. Jackson I. J. et al. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPachrome tautomerase. EMBO J. 1992;11:519.
47. Jimbow K. et al. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. British J. Derma. 2001;144:55.