

柴胡疎肝散加減方이 멜라닌 생성 및 유전자발현에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과교실

김주영, 임현정, 신선미, 유동열

ABSTRACT

The Effect of *Sihosogansangagambang* (SS) on Melanin Synthesis and gene expression in B16F10 Mouse Melanoma Cell

Ju-Young Kim, Hyun-Jung Lim, Sun-Mi Shin, Dong-Youl Yoo
Dept. of Oriental Medicine Graduate School, Daejeon University

Purpose: This study was performed to determine the inhibitory effect of *Sihosogansangagambang* (SS) on melanin synthesis in B16F10 melanoma cells (B16F10).

Methods: The inhibitory effects of *Sihosogansangagambang* on melanin synthesis were used by *in vitro* assay. To elucidate inhibitory effects of SS on melanin synthesis, we determined the melanin release in B16F10. And to investigate the mechanism of inhibitory effect of SS, we assessed the gene expression of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and ERK-1 in B16F10.

Results:

1. SS decreased the release of melanin in B16F10 melanoma cells.
2. SS inhibited mushroom tyrosinase activity *in vitro*.
3. SS decreased the expression of tyrosinase, TRP-2 in B16F10 melanoma cells, but did not decreased the expression of TRP-1 in B16F10 melanoma cells.
4. SS decreased the expression of ERK-1 in B16F10 melanoma cells.

Conclusion: From these results, it may be suggested that SS is possessed of the antimelanogenetic effects.

Key Words: *Sihosogansangagambang* (SS), melanin synthesis, antimelanogenetic effect, tyrosinase, TRP, ERK

I. 서 론

최근 대기오염으로 인한 오존층 파괴와 이에 따른 자외선 노출이 증가되면서, 자외선으로 인한 피부노화와 피부색의 변화가 심해지고 있다. 또한 미용적인 이유로 피부착색에 대한 관심이 높아지고 있어, 이에 보다 안정적이고 효과적인 피부색소질환의 치료를 위하여 미백소재를 발견하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다¹⁻³⁾.

피부 중 표피에서의 색소침착을 유발하는 질환은 멜라닌 (melanin) 분비가 증가하여 발생하는 주근깨, 기미, 밀크커 피색 반점 등이 있으며, 활성화된 멜라닌세포의 수가 증가하여 발생하는 단순 흑자, 일광 흑자 등이 있다⁴⁾.

최근 미백효과에 대한 연구는 피부미백효과와 항산화작용 및 피부 노화방지를 포함하는 포괄적인 개념으로 진행되고 있는데, 특히 tyrosinase의 활성을 억제하여 멜라닌의 초기 생성을 감소시키는 기전이 주로 연구되고 있다⁴⁻⁶⁾.

한의학에서 색소침착증은 《黃帝內經·素門》〈至眞要大論〉⁷⁾에 ‘면진 (面塵)’이라 하여 처음 언급된 이래, 《諸病源候論》〈面皦黑黧候〉⁸⁾에서 그 병리기전과 형태에 대하여 구체적으로 언급하였고, 이후 제가들에 의해 형태와 색조에 따라 간증 (黥黯), 간점 (黥點), 면흑 (面黑), 면간증 (面黥黯), 작란 (雀卵), 반간증 (斑黥黯), 염자 (顰子), 작반 (雀斑), 여흑반 (鰲黑斑), 간암 (黥黯), 여흑간증 (鰲黑黥黯), 흑반 (黑斑) 등으로 다양하게 표현되어 있다⁹⁾.

한약을 이용한 미백 관련 연구로는 赤何首烏¹⁰⁾, 車前子¹¹⁾, 黃柏¹²⁾, 加味大黃膏

¹³⁾ 및 逍遙散加減化裁¹⁴⁾ 등이 멜라닌 생성억제효과가 있다고 보고되었다. 柴胡疎肝散에 관한 연구로, 정¹⁵⁾은 스트레스에 대한 예방효과가 있다고 하였으며, 박¹⁶⁾은 肝氣鬱結로 나타난 氣鬱脇痛을 호전시킨다고 보고하였다.

柴胡疎肝散加減方은 《中醫婦科臨床精華》에 수록된 처방으로 柴胡疎肝散¹⁷⁾에서 陳皮, 枳殼을 去하고 當歸, 鬱金, 黃芩, 丹蔘, 鷄血藤, 枳實炒를 加하여 肝鬱氣滯로 인해 顔面에 氣血의 濡養이 이루어지지 못하여 발생하는 黃褐斑을 치료하는 데에 활용되고 있다¹⁸⁾.

본 연구에서는 疏肝解鬱, 活血消斑의 효능이 있는 柴胡疎肝散加減方の 미백효과를 확인하고자, B16F10 mouse melanoma cell을 이용하여 柴胡疎肝散加減方이 melanin 유리에 미치는 영향을 측정하였고 *in vitro*에서 mushroom tyrosinase 활성화에 미치는 영향을 측정하였으며, 그 작용 기전을 밝히기 위하여 B16F10 melanoma cell에서 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, ERK-1 등의 유전자 발현에 대하여 연구한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실 험

1. 재 료

1) 세포주

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

2) 약 물

실험에 사용한 시호소간산가감방 (이

하 SS라 칭함.)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Sihosogansangagambang* (SS)

Herb name	Scientific name	Weight (g)
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	8
丹 蓼	<i>Salviae miltiorrhizae Radix</i>	8
鷄血藤	<i>Spatholobi Caulis</i>	8
柴 胡	<i>Bupleuri Radix</i>	4
當 歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	4
香附子	<i>Cyperi Rhizoma</i>	4
鬱 金	<i>Cucumae Radix</i>	4
黃 芩	<i>Scutellariae Radix</i>	4
枳 實	<i>Aurantii immaturus Fructus</i>	3
川 芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	3
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	3
TOTAL		53

3) 시약 및 기기

(1) 시 약

본 실험에 사용된 시약 중 Hank's balanced salt solution, dimethyl sulfoxide (DMSO), α -MSH, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), NaOH, mushroom tyrosinase, tyrosinase, L-tyrosine, phenol, isoamyl alcohol, isopropyl alcohol, ethanol, DTT, diethyl pyrocarbonate (DEPC), magnesium chloride ($MgCl_2$)는 Sigma (USA) 제품을, normal saline은 중외제약 제품을, TRIzol, superscript II RT는 Invitrogen (USA) 제품을, fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, Dulbecco's modified eagle's

medium (DMEM), trypsin-EDTA는 Gibco/BRL (USA) 제품을, RNase는 Pharmingen (USA) 제품을, TRP-1, TRP-2 등 ELISA kit는 R&D system (USA) 제품을, oligo dT, dATP, dGTP, dTTP, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV-RT)는 Promega (USA) 제품을, deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), Taq polymerase는 Biotools (Spain) 제품을, DNA marker는 Bioneer (USA) 제품을, DNA ligase는 BMS (USA) 제품을, cyanine3-dCTP, cyanine5-dCTP는 Amersham (USA) 제품을, PCR purification kit는 Nucleogen (USA) 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기 기

본 실험에 사용된 기기는 centrifuge (Hanil unicon 54R, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi 461, Switzerland), 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), hemacytometer (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-TOF (Shimadzu, Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific, Korea), conical 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 분획조제

시호소간산가감방 3첩 분량을 증류수 1,500 ml에 넣고 열탕추출기에서 100°C로 3시간 동안 가열 추출한 다음, 여과하여 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하고, freeze dryer로 동결 건조하여 분말 13.4 g (수득율 8.4%)을 얻었으며, 검액은 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 용해시켜 사용하였다.

2) 검액 조제

실험용 검액은 추출물을 PBS에 녹인 후 membrane filter (0.22 μm)로 여과하여 멸균하고 사용 시까지 냉장 보관하였다. 배양된 세포에 사용하기 직전에 실험농도에 맞도록 DMEM 배지로 조정한다음 사용하였다.

3) 세포배양

세포배양에 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 μm membrane filter로 여과 후 사용하였다. B16F10 mouse melanoma cell에 각 조건 별로 96 well plate에는 well 당 100 μl , 24 well plate에는 well

당 500 μl 로 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 액체 질소에서 냉동 보관하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂를 사용한 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

4) B16F10 Melanoma Ccell (Melanocyte) Proliferation 측정

세포를 2×10^4 cells/ml의 농도로 6 well plate에 넣고 6시간 배양하여 plate에 부착시킨 다음, 분획하여 조제한 검액을 농도별로 첨가하여 1, 2, 3일간 배양하였다. 배양완료 후 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리한 다음, PBS로 희석하여 hemacytometer로 세포수를 계측하였다.

5) B16F10 Melanocyte의 Melanin 유리량 측정

Melanin 유리량 측정은 Hosoi 등의 방법¹⁹⁾을 사용하였다. Melanin 생성 세포로는 마우스에서 얻은 흑색종의 일종인 B16F10 melanoma cell을 이용하였다. 배양된 B16F10 melanoma cell (정상군)에 α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone, 10 μM)를 처리한 다음 (대조군), 다시 300, 150, 75, 37 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 SS를 가하여 3일간 배양한 후 (실험군), 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양을 측정하였는데, 약 24시간 후 부터 세포내 melanin의 생성을 현미경으로 관찰할 수 있었다. 세포 배양액은 10% DMSO가 함유된 1 N NaOH 300 μl 에 넣고 80°C에서 1시간 동안 처리하여 melanin을 용해시켰다. 405 nm에서 흡광도 (optical density)

를 측정하였으며, melanin 정량은 합성 멜라닌 (Sigma Co., USA)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

6) Mushroom Tyrosinase 활성에 미치는 영향 측정

Tyrosinase 활성에 미치는 영향은 Mason and Peterson 등의 방법²⁰⁾을 사용하였다. 즉, 0.1M 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 가하였다. 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 반응 액의 흡광도

A': 대조군의 tyrosinase 대신 buffer 가한 반응액의 흡광도

B: 검액이 첨가된 반응 액의 흡광도

B': B 반응액 중 tyrosinase 대신 buffer 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 phenol 과 100 μ l chloroform/ isoamyl alcohol (24:1)을 넣고 잘 섞은 후 원심 분리하는 과정을 2번 반복함으로써 상층액을 분리하였다. 0.5 ml isopropyl alcohol을 이용하여 RNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하고 자연 건조시켰다. RNAase free water에서 RNA를 녹인 후

RNase-free DNase를 첨가하고 -70°C에서 저장 보관하였다.

(2) cDNA 제조

대조군 및 시험군에서 각각 분리한 total RNA 액 2 μ l (2 μ g RNA 함유)에 oligo dT 2 μ l (10 pM)을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 90°C에서 5분간 incubation하였다. primer가 annealing 하도록 4°C로 유지하며 10 \times RT buffer 2 μ l, 0.1M DTT 2 μ l, 10mM dNTP nucleotide mix 1 μ l, reverse transcriptase 1 μ l를 가하고 여기에 H₂O 10 μ l을 첨가하여 20 μ l로 한 다음, 아주 조심스럽게 손으로 tipping혼합하였다. 이 후, 42°C에서 90분간 incubation 한 다음, 얼음에 방치하였다. 그리고 다시 H₂O 100 μ l을 첨가하여 -20°C에 보관하였다. 각의 시약은 Amersham Bioscience (USA)에서 구입하였다.

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

Oligo dT 12-18 μ l, reaction buffer (50 mM tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 8.3), 1 mM dNTP과 200 unit M-MLV-RT를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR은 total volume 15 μ l에 10배의 PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 pmole의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA와 1.25 unit의 Taq polymerase을 넣어 PCR을 시행하였다. Tyrosinase의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT이였으며, antisense primer는 TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC 을 사용하였다. TRP-1의 sense primer는 GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC, antisense primer는 AAG ACG CTG

CAC TGC TGG TCT 을 사용하였으며, TRP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT, antisense primer는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC 이었다. ERK-1의 sense primer는 ATC AGA TCC TGA GAG GGC TA, antisense primer는 CAG AGC TTT GGA GTC AGC AT를 사용하였다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA이였으며, antisense primer는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. 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 3.1을 이용하여 용량을 산출하였다.

(4) Real time RT-PCR

우선 시험관에 정량한 RNA 5 µg, random hexamer (50 pmol/3 µl), 10 mM dNTP 1 µl를 넣고 DEPC 처리된 증류수를 가하여 10 µl의 RNA/primer mixture를 만들었다. 실험용 sample을 65°C에서 5분간 incubation 시킨 후 1분 이상 얼음에 방치하였다. Reaction mixture으로 10배의 RT buffer 2 µl, 25mM MgCl₂ 4 µl, 0.1 M DTT 2 µl, RNAase 1 µl을 섞어 준비하였다. Tyrosinase의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT이였으며, antisense primer는 TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC 을 사용하였다. TRP-1의 sense primer는 GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC, antisense primer는 AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT 을

사용하였으며, TRP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT, antisense primer는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC 이었다. ERK-1의 sense primer는 ATC AGA TCC TGA GAG GGC TA, antisense primer는 CAG AGC TTT GGA GTC AGC AT를 사용하였다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA 이였으며, antisense primer는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. Reaction mixture를 RNA/primer mixture에 가하여 섞고 실온에 2분간 방치한 후, superscript II RT 1 µl (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 µl를 가하고 다시 37°C에서 20분간 incubation 시킨 다음, 사용 시까지 -20°C에 보관하였다. 각각의 optical tube에 2배의 SYBR green Mix 12.5 µl, cDNA 0.2 µl, 5 pmol/µl primer pair mix 1 µl, 11.3 µl 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 10 분 1 cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5µl를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정했다. SDS 7,000 software를 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다.

3. 통계학적 분석

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

III. 실험 결과

1. B16F10 Melanocyte의 Melanin 유리에 미치는 영향

B16F10 melanoma cell은 α -MSH (10 μ M)를 처리한 경우 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양이 유의성 있게 증가하였다. 그러나 SS는 300, 150 μ g/ml의 농도에서 증가한 melanin의 양을 대조군에 비해 각각 21%, 14% 억제하였다 (Fig. 1).

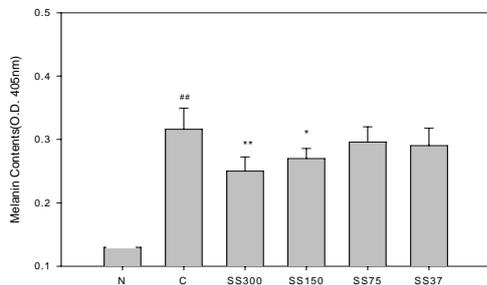


Fig. 1. Effects of SS on the release of melanin from B16F10 melanoma cells. N(Normal): Vehicle
C(Control): α -MSH (10 μ M)
SS300: α -MSH (10 μ M) + 300 μ g/ml of SS
SS150: α -MSH (10 μ M) + 150 μ g/ml of SS
SS75: α -MSH (10 μ M) + 75 μ g/ml of SS
SS37: α -MSH (10 μ M) + 37 μ g/ml of SS
##: $p < 0.01$ vs N
**: $p < 0.01$ vs C, *: $p < 0.05$ vs C

2. Mushroom Tyrosinase 활성에 미치는 영향

SS는 300, 150 μ g/ml 농도에서 tyrosinase 활성을 대조군에 비해 각각 30%, 14% 억제하였다(Fig. 2).

3. Tyrosinase 발현에 미치는 영향

Tyrosinase는 α -MSH (10 μ M) 처리 시 발현이 정상군에 비해 유의성 있게

($p < 0.01$) 증가하였으며, SS는 증가한 유전자 발현을 200 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도 ($p < 0.01$)와 25 μ g/ml 농도 ($p < 0.05$)에서 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 3).

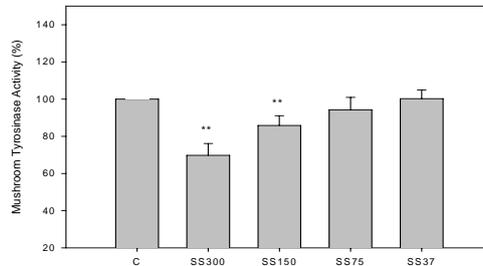


Fig. 2. Effects of SS on mushroom tyrosinase activity *in vitro*.
C(Control): Vehicle
SS300: 300 μ g/ml of SS
SS150: 150 μ g/ml of SS
SS75: 75 μ g/ml of SS
SS37: 37 μ g/ml of SS
**: $p < 0.01$ vs C

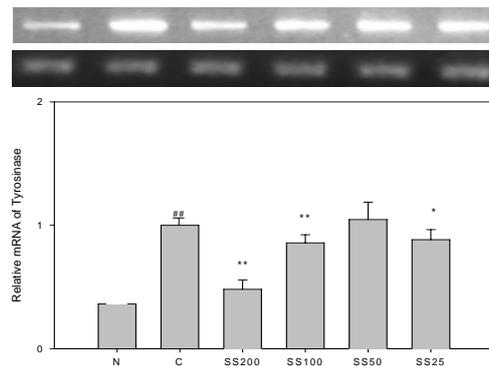


Fig. 3. Effects of SS on the expression of tyrosinase in B16F10 melanoma cells. N(Normal): Vehicle
C(Control): α -MSH (10 μ M)
SS200: α -MSH (10 μ M) + 200 μ g/ml of SS
SS100: α -MSH (10 μ M) + 100 μ g/ml of SS
SS50: α -MSH (10 μ M) + 50 μ g/ml of SS
SS25: α -MSH (10 μ M) + 25 μ g/ml of SS
##: $p < 0.01$ vs N
**: $p < 0.01$ vs C, *: $p < 0.05$ vs C

4. TRP-1 발현에 미치는 영향

TRP-1은 α -MSH (10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.01$) 증가하였으며, SS는 200, 100, 50, 25 μ g/ml의 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 억제하는 경향은 보였으나 유의성이 없었다(Fig. 4).

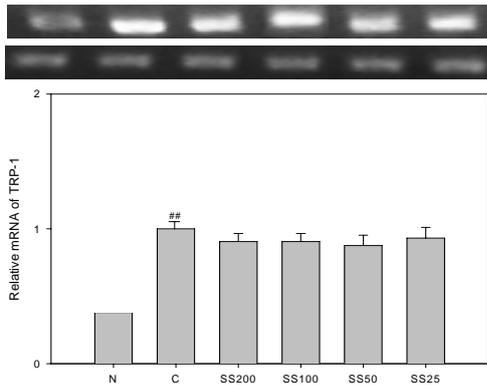


Fig. 4. Effects of SS on the expression of TRP-1 in B16F10 melanoma cells.
 N(Normal): Vehicle
 C(Control): α -MSH (10 μ M)
 SS200: α -MSH (10 μ M) + 200 μ g/ml of SS
 SS100: α -MSH (10 μ M) + 100 μ g/ml of SS
 SS50: α -MSH (10 μ M) + 50 μ g/ml of SS
 SS25: α -MSH (10 μ M) + 25 μ g/ml of SS
 ##: $p < 0.01$ vs N

5. TRP-2 발현에 미치는 영향

TRP-2는 α -MSH (10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.01$) 증가하였으며, SS는 200, 100, 50 μ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.01$) 억제하였다(Fig. 5).

6. ERK-1 발현에 미치는 영향

ERK-1은 α -MSH (10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.01$) 감소하였으며, SS는 감소한 유전자 발현을 200, 100, 25 μ g/ml 농도 ($p < 0.01$)와

50 μ g/ml 농도 ($p < 0.05$)에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 6).

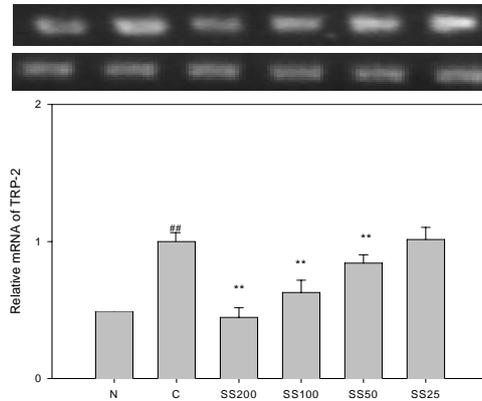


Fig. 5. Effects of SS on the expression of TRP-2 in B16F10 melanoma cells.
 N(Normal): Vehicle
 C(Control): α -MSH (10 μ M)
 SS200: α -MSH (10 μ M) + 200 μ g/ml of SS
 SS100: α -MSH (10 μ M) + 100 μ g/ml of SS
 SS50: α -MSH (10 μ M) + 50 μ g/ml of SS
 SS25: α -MSH (10 μ M) + 25 μ g/ml of SS
 ##: $p < 0.01$ vs N
 **: $p < 0.01$ vs C

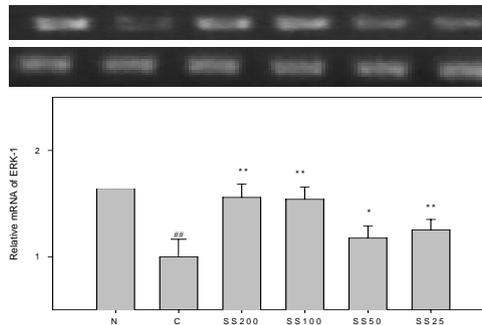


Fig. 6. Effects of SS on the expression of ERK-1 in B16F10 melanoma cells.
 N(Normal): Vehicle
 C(Control): α -MSH (10 μ M)
 SS200: α -MSH (10 μ M) + 200 μ g/ml of SS
 SS100: α -MSH (10 μ M) + 100 μ g/ml of SS
 SS50: α -MSH (10 μ M) + 50 μ g/ml of SS
 SS25: α -MSH (10 μ M) + 25 μ g/ml of SS
 ##: $p < 0.01$ vs N
 **: $p < 0.01$ vs C, *: $p < 0.05$ vs C

IV. 고찰

최근에는 대기오염으로 인한 오존층의 파괴와 이에 따른 자외선의 유해성에 대한 관심이 증가하면서, 이로 인한 피부 노화에 따른 피부색의 변화, 침착이 심해지고 있으며, 또한 미용적인 이유에서 피부착색에 대한 관심이 높아지고 있다¹⁻³⁾.

피부는 표피층, 진피층, 피하지방층의 3개 층으로 구성되어 있으며, 체온 조절과 외부로부터 내부장기를 보호하는 등 생명유지를 위한 주요 기능과, 부수적으로 피부호흡, 특정 물질에 대한 선택적 흡수, 피부색 형성 등의 기능이 있다^{4,21-24)}. 피부색은 3가지의 요인에 의하여 결정되는데, 피부 속에 들어있는 카로틴과 진피에 있는 혈관에서 스며나온 혈액 색깔 및 멜라닌이 중요한 요인이 된다²⁵⁾.

피부의 멜라닌 세포는 자외선에 노출되면 색소침착을 일으키는데, 표피에서의 색소침착을 유발하는 질환은 주근깨, 기미, 밀크커피색 반점, 단순 흑자, 일광 흑자 등이 있다. 주근깨는 주로 일광노출부위의 피부에 생기는 황갈색의 작은 색소반을 말하며, 기미는 다양한 크기의 갈색 색소반이 태양광선의 노출부위 특히 얼굴에 발생하는 질환으로서 경구피 임약 등에 의해 악화되는 것으로 알려져 있으며, 밀크커피색 반점은 직경이 2-20 mm에 이르는 경계가 분명하고 균일한 밀크커피색의 색소반을 말한다. 단순 흑자는 경계가 명확하고 갈색이나 검은색을 띠는 2-3 mm의 둥근 반점으로서 한 개 또는 몇 개가 체점막의 어느 곳에서

도 생길 수 있으며, 일광 흑자는 햇빛의 노출부위 특히 얼굴과 손등에 불규칙한 모양과 균일한 검은색을 보이는 색소반이 산재하여 발생 한다⁴⁾.

멜라닌 색소의 주요기능은 피부에서 발생하는 active oxygen이나 free radical을 제거하고, 자외선을 흡수 또는 분산시켜 체내에 자외선이 들어가지 못하도록 피부를 보호하는 역할을 하는데⁴⁻⁶⁾, 궁극적으로 색소 침착을 유발하게 된다.

UV 등의 외부 스트레스는 피부각질세포로부터 α -MSH와 같은 growth hormone과 함께 TGF- β , PGE₂ 등을 분비하는데, 이러한 cytokine류는 melanocyte에 존재하는 수용체에 결합하여 세포기능을 활성화 시킨다²⁶⁾. 활성화된 melanocyte는 melanosome에서 페놀류의 고분자 물질인 melanin을 합성하는데, 이러한 melanin은 외부 스트레스로부터 피부를 방어하는 기전의 일환으로 작용하게 된다²⁷⁾. Keratinocyte (각질형성세포)에 의해 분비된 α -MSH에 의해 자극을 받은 melanocyte로부터 생성된 melanin은 dendrite 등을 통하여 다시 keratinocyte등에 전해져서 스트레스에 의한 세포상해를 억제하는 작용을 나타내게 한다²⁸⁾.

한의학에서 색소침착증은 《黃帝內經·素門》〈至真要大論〉⁷⁾에 ‘면진(面塵)’이라 하여 처음 언급된 이래, 《諸病源候論》〈面疢黑黯候〉⁸⁾에서 그 병리기전과 형태에 대하여 구체적으로 언급하였고, 이후 제가들에 의해 형태와 색조에 따라 간증(黥黯), 간점(黥點), 면흑(面黑), 면간증(面黥黯), 작란(雀卵), 반간증(斑黥黯), 염자(黥子), 작반(雀斑), 여흑반(鰲黑斑), 간암(黥黯), 여흑간증(鰲黑黥黯), 흑반(黑斑) 등으로 다양하

게 표현되어 있다⁹⁾. 한의학적 병인으로 첫째 陽明之氣不足을 들었고⁷⁾, 둘째 風邪와 痰飲으로 氣血이 不和됨을 원인으로 보았으며⁸⁾, 셋째 思慮過多로 인하여 脾胃를 傷하여 발생한다고 하였고²⁹⁾, 넷째는 腎水不足으로 인한 虛火의 발생을³⁰⁾, 다섯째는 熱을 주된 원인으로 파악하였다³¹⁾.

최근 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 있다⁴⁻⁶⁾.

또한 피부 미백제로는 Kojic acid, arbutin, ascorbic acid, hydroquinone 등이 많이 사용되고 있는데, 이들 제품의 안정성(stability)에 문제가 있기 때문에^{32,33)}, 화학적인 물질이 아닌 천연물에서 부작용을 줄이면서 안전성 있는 물질을 찾는 연구를 수행하고 있으며 이로 인해 초점이 한방으로 돌려지고 있는 실정이다³⁴⁾.

한약재를 이용한 미백 관련 연구로는 赤何首烏⁹⁾, 車前子¹¹⁾, 黃柏¹²⁾, 五味子³⁵⁾, 白僵蠶³⁶⁾, 補骨脂³⁷⁾, 側柏葉³⁸⁾, 川芎³⁹⁾, 白朮⁴⁰⁾, 細辛⁴¹⁾, 枳實⁴²⁾, 桂皮⁴³⁾ 등의 추출액들이 멜라닌 생성억제 효과가 있다고 보고하였으며, 한약복합제제에 대한 미백연구로 麻黃 및 摩風膏⁴⁴⁾, 瀉白散⁴⁵⁾,

加減西施玉容散⁴⁶⁾, 加味歸脾湯⁴⁷⁾, 加味大黃膏¹³⁾ 및 逍遙散加減化裁¹⁴⁾ 등에 대한 연구가 이루어졌다.

柴胡疎肝散은 疏肝·行氣·活血·止痛의 효능이 있어 肝經受邪로 인한 左脇痛을 치료 할 목적으로 창방되었다^{17,48)}. 張⁴⁹⁾은 柴胡疎肝散 원방에서 靑皮를 陳皮醋炒로, 枳殼을 枳殼醋炒로 변화시켰는데, 근대의 의서들에서는 張의 處方을 주로 인용하여 사용하고 있다^{50,51)}.

柴胡疎肝散加減方은 《中醫婦科臨床精華》에 수록된 처방으로 柴胡疎肝散에서 陳皮, 枳殼을 去하고 當歸, 鬱金, 黃芩, 丹蔘, 鷄血藤, 枳實炒를 加하여 肝鬱氣滯로 인해 顔面에 氣血의 濡養이 이루어지지 못하여 발생하는 黃褐斑을 치료하는데에 활용되고 있다¹⁸⁾.

柴胡疎肝散加減方의 구성약물의 性味와 效能을 살펴보면, 柴胡는 性味が 苦涼하고 疏肝解鬱·升舉陽氣하며, 當歸는 性味が 溫甘辛하고 補血和血·調經止痛의 效能이 있으며, 香附子는 性味が 辛微苦甘平하고 理氣解鬱·調經止痛하며, 鬱金은 性味が 涼辛苦하고 行氣化痰·清心解鬱하며, 黃芩은 性味が 寒苦하고 瀉實火·除退熱하며, 白芍藥은 性味が 苦酸涼하고 養血斂陰·平抑肝陽의 效能이 있으며, 丹蔘은 性味が 微寒苦하고 活血去痰·涼血消癰의 效能이 있으며, 鷄血藤은 性味が 溫苦微甘하고 活血補血·舒筋活絡하며, 枳實은 性味が 微寒苦辛酸하고 破氣散結·瀉痰消積의 效能이 있으며, 川芎은 性味が 辛溫하고 活血行氣·祛風止痛의 效能이 있으며, 甘草는 性味が 甘平하고 補裨益氣·調和諸藥의 효능이 있다⁵²⁾. 이상으로 보아 시호소간산가 감방은 疏肝解鬱, 活血消斑하므로, 肝鬱

氣滯로 인한 黃褐斑에 효과가 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 시호소간산가감방 (SS)의 미백효과를 확인하고자, mouse melanoma cell인 B16F10을 이용하여 SS가 melanin 유리와 tyrosinase의 활성에 미치는 영향을 측정하였으며, 그 작용 기전을 밝히기 위하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, ERK-1 등의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하였다.

Melanin 은 외부 스트레스로부터 피부를 방어하는 기전의 일환으로 melanocyte에서 합성된다⁵³⁾. 그러나 피부미백에 부정적 영향을 주기 때문에 melanin 합성을 차단하기 위한 다양한 시도가 있었다. 본 연구에서는 시호소간산가감방 추출물을 이용하여 melanin 억제를 시도하였다. Melanin 생성세포로는 마우스에서 얻은 흑색종의 일종인 B16F10 melanoma cell을 이용하였다. α -MSH는 UV와 같은 외부 스트레스를 받으면 피부 각질세포로부터 유리되며 melanocyte에 존재하는 수용체에 결합하여 기능을 나타내는 growth hormone의 일종이다.

B16F10 melanoma cell은 α -MSH (10 μ M)를 처리한 경우 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양이 유의하게 증가하였다. 그러나 SS는 300, 150 μ g/ml의 농도에서 melanin의 양을 처리 대조군에 비해 각각 21%, 14% 감소시켰다(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 알려

져 있다. 그러므로 melanin 생성을 억제하는 피부 미백제 개발에는 tyrosinase의 활성을 억제하는 것이 필수적이다. 따라서 SS가 melanin 합성을 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, 머섯 tyrosinase를 이용한 시험관내 tyrosinase 활성억제실험은 피부미백제의 개발에 있어서 유용한 일차 평가법으로 인정되고 있다⁵⁴⁾. 실험 결과 SS는 300, 150 μ g/ml 농도에서 tyrosinase 활성을 대조군에 비해 각각 30%, 14% 억제하였다(Fig. 2).

Melanocyte내 유전자 발현이 증가하면 melanin 합성이 증가하게 된다⁵⁵⁻⁵⁷⁾. 따라서 tyrosinase 발현을 억제하면 melanin 합성을 억제할 수 있다. 본 연구에서는 SS가 melanin 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 tyrosinase의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. 실험 결과 tyrosinase는 α -MSH (10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 증가하였으며, SS는 증가한 유전자 발현을 200, 100, 25 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 3).

TRP-1은 tyrosinase related protein으로 알려져 있는 단백질로서 TRP-2에 의해 생성된 DHICA (5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid)를 oxidation 시켜 IQCA (indole-2-carboxylic acid)를 생성하는데, IQCA는 흑갈색을 나타낸다^{58,59)}.

따라서 TRP-1 발현을 억제하면 미백효과를 기대할 수 있다. 실험 결과 TRP-1은 α -MSH (10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 증가하였으며, SS는 200, 100, 50, 25 μ g/ml의 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 억제하였으나 유의성이 없었다(Fig. 4).

TRP-2는 DOPAchrome tautomerase로 알려져 있는 효소로서 DOPAchrome을 이용하여 DHICA (5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid)를 생성한다. DHICA는 TRP-1에 의해 산화되어 IQCA (indole-2-carboxylic acid)를 생성하는데, IQCA는 흑갈색을 나타낸다^{58,59}. 따라서, TRP-2 발현을 억제하면 미백효과를 기대할 수 있다. 실험 결과 TRP-2는 α -MSH (10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 유의성 있게 증가하였으며, SS는 200, 100, 50 μ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 5).

ERK는 extracellular regulated kinase로 알려져 있는 세포내 신호전달단백질로 유전자 발현을 조절하는 인자로 알려져 있으며, ERK의 발현이 억제되면 melanin 색소 생성이 증가하는 것으로 알려져 있다⁵⁶. 따라서 ERK-1의 발현이 증가하면 색소 생성이 억제될 수 있다. 실험 결과 ERK-1은 α -MSH (10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 감소하였으며, SS는 200, 100, 50, 25 μ g/ml 농도에서 감소한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 6).

이상의 결과 시호소간산가감방 (SS)는 melanin 생성에 관여하는 tyrosinase, TRP-2 발현을 억제하고, 신호전달 단백질로 유전자 조절인자들인 ERK-1의 발

현을 증가시켜, melanocyte의 melanin 생성을 억제하는 것으로 판단된다.

V. 결 론

柴胡疎肝散加減方 (SS)의 추출물을 이용하여 melanin 유리에 미치는 영향을 측정하였다. 또한, melanin 생성과 관련된 tyrosinase의 활성과 유전자 발현에 대한 연구를 통하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. SS는 B16F10 melanoma cell의 melanin 유리를 유의성 있게 억제하였다.
2. SS는 tyrosinase의 활성을 유의성 있게 억제하였다.
3. SS는 B16F10 melanoma cell에서 tyrosinase 및 TRP-2의 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였으나, TRP-1의 발현에는 유의성이 없었다.
4. SS는 B16F10 melanoma cell에서 ERK-1의 발현을 유의성 있게 증가시켰다.

이상의 결과, 시호소간산가감방 추출물은 melanocyte에서 melanin 생성을 억제함으로써 미백효과를 나타낸다고 생각된다. 따라서 향후 시호소간산가감방에 대한 연구가 한방부인과 영역에서 黃褐斑 치료를 위한 토대가 되기를 기대한다.

참고문헌

1. 하병조. 화장품학. 서울: 壽文社. 1999 ;92-94.

2. Maeda K, Fukuda M. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc Cosmet Chem.* 1991;42:361-368.
3. Mishima Y, Kondoh H, Hatae S. Overview for development of future innovative skin whitening agents. *Fragrance J.* 1996;24(13):13-22.
4. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. *피부과학.* 서울: 여문각. 2001;1-9, 24-29, 334, 409-412, 533-535.
5. 김종대. *피부관리학.* 서울: 고문사. 1994;23-26, 111-113.
6. 김복희. *뉴피부미용학.* 서울: 양생의학사. 1998;73-74, 302-311.
7. 홍원식. *精校 黃帝內經素問.* 서울: 동양의학연구원출판부. 1985;11, 295-296.
8. 巢元方. *巢氏諸病源候論.* 서울: 대성문화사. 1992;200.
9. 오한철 등. 더덕 분획별 抽出液이 멜라닌 生成에 미치는 影響. *대한 안이비인후피부과학지.* 2004;17(2):59-71.
10. 송중석, 유동열. 赤何首烏의 멜라닌 생성 억제와 작용기전에 관한 연구. *대한한방부인과학회지.* 2008;21(2):59-75.
11. 오준석 등. 차전자(車前子)로부터 멜라닌 생성 억제물질의 분리. *생약학회지.* 2007;38(4):376-381.
12. 이종구 등. 황백(黃柏)으로부터 멜라닌 생합성 억제 물질의 분리. *생약학회지.* 2007;38(4):387-393.
13. 이현우, 홍승욱. 加味大黃膏의 멜라닌세포 활성억제가 자외선 조사로 인한 피부 손상완화에 미치는 영향. *한방안이비인후피부과학회지.* 2007;20(2):47-67.
14. 김은섭 등. 逍遙散加減化裁의 멜라닌 생성 억제와 작용기전에 관한 연구. *대한한방부인과학회지.* 2008;21(1):83-98.
15. 정민호 등. 柴胡疎肝散이 스트레스로 인한 기억저하와 우울행동에 미치는 영향. *대한본초학회지.* 2007;22(2):127-135.
16. 박미연 등. 柴胡疎肝散이 投與된 中風以後 併發한 脇痛患者의 臨床經過報告. *대한한방내과학회지.* 2003;24(1):144-150.
17. 冉小峰. *歷代名醫良方注釋.* 北京: 科學技術文獻出版社. 1983;176, 188.
18. *한방여성의학 편찬위원회. 한방여성의학 I.* 서울: 정담. 2007;454, 488.
19. 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.
20. Mason HS, Paterson EW. Melanoproteins I. Reaction between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochem. Biophys. Acta.* 1965;111:134-146.
21. 국홍일. *고운피부 젊은피부.* 서울: 아침나라. 1999;17-18.
22. 박경아. *조직학.* 서울: 고려의학. 1999;405-411.
23. 은희철 등. *피부면역학.* 서울: 서울대학교 출판부. 1999;143.
24. 최국주. *피부미인.* 서울: 동명사. 1996;17-23.
25. 강호석 등. *조직학 제 2판.* 서울: 고문사. 1994;319, 327.
26. 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.

27. Romero GC et al. J Clin. Invest. 1997;99(4):635-642.
28. 손애량, 이승자. 한국미용학회지. 2000 ;6(1):239-254.
29. 樓 英. 醫學綱目. 서울: 대성문화사. 1986;1081.
30. 陳實功. 外科正宗. 상해: 상해과학기 술출판사. 1989;290, 298.
31. 程國彭. 醫學心悟. 香港: 友聯出版社. 1961;290.
32. Curto EV 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.
33. Chakraborty AK et al. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. Pigment Cell Res. 1998;11(4):206-212.
34. 오한철 등. 더덕 분획별 추출액이 멜라닌 생성에 미치는 영향. 韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 2004;17(2):59-71.
35. 두인선 등.五味자의 멜라닌 생성 억제와 미백효과에 관한 연구. 韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 2007;20(3):51-62.
36. 오찬철 등. 백강잠의 멜라닌 생성 억제와 미백효과에 관한 연구. 韓方眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 2007;20(3):1-13.
37. 정재호, 서형식. 보골지 추출물이 B16F10 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 미치는 영향. 大韓韓醫學會誌. 2005;26(3):55-65.
38. 이수형 등. 측백엽(側柏葉) 메탄올 추출물이 멜라닌 형성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2005;19(3):662-670.
39. 박종훈 등. 천궁 메탄올 추출액의 멜라닌 형성 억제 효과. 동의생리병리학회지. 2005;19(4):938-944.
40. 정민환 등. 백출의 멜라닌 생성 억제 물질. 생약학회지. 2005;36(1):60-63.
41. 최은향 등. 세신으로부터 멜라닌 생성 억제 성분의 분리. 생약학회지. 2007;38(4):394-399.
42. 손애량 등. 지실의 멜라닌 생성 억제 물질. 생약학회지. 2005;36(1):1-8.
43. 정희욱 등. 계피로부터 멜라닌 생성 억제 성분의 분리. 생약학회지. 2007 ;38(4):382-386.
44. 이상희. 麻黃 및 摩風膏의 미백효과에 관한 연구. 경희대학교 동서의학 대학원 석사학위 논문. 2001.
45. 김성각. 瀉白散의 미백효과 검증에 관한 연구. 경희대학교 대학원 석사 학위논문. 2000.
46. 손동석, 김윤범. 加減西施玉容散의 미백효과에 관한 연구. 대한안이비인후 피부과학회지. 2002;15(2):104-117.
47. 박호순 등. 가미귀비탕의 미백효과에 관한 연구. 대한안이비인후피부과학회지. 2004;7(2):48-58.
48. 陳貴廷,楊思澍. 實用中西醫結合診斷治療學. 서울: 일중사. 1998;959-964.
49. 張介賓. 景岳全書. 東洋綜合通信教育院. 1982;1170.
50. 尹甲用. 東醫方劑와 處方解說. 서울: 醫聖堂. 1998;412-413.
51. 宋炳基. 方藥合編. 서울: 東南出版社. 1983;296,371.
52. 辛民教 등. 本草學. 서울: 永林社. 2000;149, 178, 350, 354, 409, 414, 419, 445, 540, 578, 581.
53. Romero GC et al. J Clin. Invest.

- 1997;99(4):635-642.
54. 山孝一 良, Hearing VJ. メラニン産生の制御因子. *Fragrance Journal*. 1990;6:24-28.
55. Lee J, Kim YS, Park D. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. *Biochem Pharmacol*. 2007;74(7):960-968.
56. Huang SC. 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.
57. Jiménez CC 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.
58. Jackson IJ et al. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *EMBO J*. 1992;11:519.
59. 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.