

獨活寄生湯이 멜라닌 생성억제 및 유전자 발현에 미치는 영향

오원교 · 김기병 · 임진영¹ · 이수경* · 권영달 · 염승룡 · 송용선

원광대학교 한의과대학 한방재활의학과교실, 1: 원광대학교 광주원광병원 재활의학과

Effects of Dokhwalkisaeng-tang on Melanin Synthesis Inhibition and Gene Expression in B16F10 Melanoma Cells

Won Kyo Oh, Ki Byoung Kim, Jin Young Lim¹, Su Kyung Lee*, Young Dal Kwon, Seung Ryong Yeom, Yung Sun Song

Department of Oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,

1: Department of Physical Medicine & Rehabilitation Medicine, Wonkwang Hospital in Gwangju, Wonkwang University

The aim of this study was to elucidate the antimelanogenic effect of Dokhwalkisaeng-tang(Duohujisheng-tang) in B16F10 melanoma cells. Dokhwalkisaeng-tang(DKT) was used to develop the effective prescription of inhibition of melanin production. We determined inhibitory effects of DKT on melanin-release, melanin production, and tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells. And to explicate the action-mechanism of DKT, melanin-related gene expressions were determined using RT-PCR and real time RT PCR technique in B16F10 melanoma cells. DKT inhibited melanin-release, melanin production in B16F10 melanoma cells considerably. DKT inhibited tyrosinase activity in vitro and in B16F10 melanoma cells. DKT inhibited the expression of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 in B16F10 melanoma cells. DKT inhibited the expression of PKA, PKC, MMP-2 and MITF in B16F10 melanoma cells. On the other hand, DKT increased the expression of ERK-1, ERK-2, AKT-1 in B16F10 melanoma cells. From these results, we propose that DKT may have effect on the antimelanogenesis.

Key words : Dokhwalkisaeng-tang(Duhuoijisheng-tang, DKT), B16F10 melanoma cells, Melanogenesis, tyrosinase, Gene expression.

서 론

Melanin은 melanocyte 내의 독특한 소기관인 melanosome에서 만들어진다. melanosome 내에서의 melanin 생성은 tyrosinase의 합성 및 전달에 관여하는 세포내 조절인자와 호소, 금속이온 및 interferon(IFN), prostaglandin(PG), histamine 등이 melanin 합성과 전달에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 피부의 색소 침착은 melanin 합성 세포인 melanocyte에서 melanin 색소의 과잉 생산에 따른 melanin 색소의 피부 침착에 기인한다.

melanin 색소는 피부 표피의 기저층에 존재하는 melanocyte에서 호소 및 비호소적 산화반응에 의해 tyrosinase로부터 생성되며 표피를 구성하고 있는 각질 세포로 전이된다. melanocyte는

* 교신저자 : 이수경, 전북 군산시 지곡동 원광대학교 한의과대학 군산의료원

· E-mail : skolive@hanmail.net, · Tel : 063-472-5264

· 접수 : 2008/09/19 · 수정 : 2008/11/15 · 채택 : 2008/11/24

표피세포, 각질세포 등과 서로 밀접한 세포간 정보망을 구성하고 있다²⁾.

한의학에서는 색소침착증을 형태와 색조에 따라 간점(黥點), 면흑(面黑), 작란(雀卵), 반간증(斑點證), 염자(鰕子), 작반(雀斑), 흑반(黑斑) 등으로 다양하게 표현하여 왔다³⁾. 피부의 과색소 침착증에 대해 《黃帝內經·素門》<至真要大論>⁴⁾에 “歲陽明在天, 燥淫所勝... 面黧, 身無膏澤, 足外反熱”이라 하여 처음 수록되었고, 손⁵⁾은 기미의 원인을 五臟六腑에 痰飲, 瘀血, 咯痰 등과 같은 불순물질이 혈액순환 장애를 주거나 외부로부터 찬 바람이나 찬 기운, 제 철이 아닌 바람 등 나쁜 風邪를 자주 접하게 되어 氣와 血이 순조롭지 못할 때 기미가 생기기 쉽다고 하였다. 근래 문헌들은 과색소 침착증의 원인에 대해 肝鬱氣滯, 腎陰不足, 瘀血內停, 陰虛火旺, 濕熱內蘊, 火鬱孫絡, 風邪外搏 등으로 자세히 분류하고 있는 실정이다⁶⁻¹²⁾.

최근 미백에 대한 관심이 증가함에 따라 melanin 생합성의

부정적인 측면인 과색소 침착을 억제하는 미백 화장품에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며 현재 활용되고 있는 미백제로는 Kojic acid, arbutin, ascorbic acid, hydroquinone 등이 사용되고 있으나 제품의 안전성이 낮다는 문제가 있다^{13,14)}. 이에 따라 세포에 독성이 적으면서 melanin 합성을 감소시키고 동시에 non-mutagenic한 미백제를 찾기 위한 연구가 진행되고 있으며, 특히 천연물질이 날로 각광 받고 있다¹⁵⁾.

한편 한약재를 이용한 미백 관련 연구로는 서시옥용산(西施玉容散)의 미백효과에 관한 연구^{16,17)} 등 한약복합제에 대한 연구가 있으며, 윤 등¹⁸⁾은 白芨이 멜라닌 생성억제 효과를 가지고 있으며, 이러한 과정은 B16 melanoma 세포의 tyrosinase 활성과 tyrosinase protein 발현을 억제하여 melanin 형성을 억제시킨다고 보고 하였다.

獨活寄生湯은 風寒濕 三氣의 雜合으로 인한 痺痛을 다스리는 三痺湯의 변방으로, 三痺湯에서 桑寄生을 加하고 黃芪와 續斷을 祛한 처방이다^{19,20)}. 獨活寄生湯은 治肝腎虛弱, 筋孿骨痛, 脚膝偏枯, 冷痺의 효능이 있어서 痺와 脚氣, 四肢癱, 腰痛 등에 사용하였고, 育髓損傷後期, 中風癱瘓, 風濕, 神經痛, 류마티드 관절염, 혹은 痲痺 患者 등에도 응용되고 있다²¹⁻²⁴⁾.

獨活寄生湯에 대한 연구로는 뇌혈류 척수운동신경세포 혈액, 근위축, 간손상과 혈압, 진통 소염작용, 혈청변화, 근수축에 관한 연구가 조사되었으나²⁵⁻³⁰⁾, 아직까지 미백에 관한 연구는 없었다. 특히 기미의 병인 중 간신음허로 인한 혈행순환 장애로 발병하는 경우에는 효과의 유의성에 대한 연구가 일정 부분 가치가 있을 것으로 사료되었다.

이에 저자는 獨活寄生湯을 이용하여 melanin 생성에 미치는 영향과 melanin 생성과 관련되는 tyrosinase의 활성 및 관련된 유전자인 TRP-1, TRP-2, MMP-2, PKA, PKC, MITF, ERK-1, ERK-2, AKT 등에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 재료

본 실험에 사용한 獨活寄生湯의 처방내용은 <方藥合編>^{23,49)}에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였고, 獨活寄生湯의 1첩의 내용과 분량 및 생약명은 다음과 같다(Table 1).

2) 시료 추출 및 분획조제

獨活寄生湯(이하 "DKT") 3첩 분량인 108 g을 증류수로 2시간 환류 추출하고, 이를 감압 농축한 다음 동결 건조시켜 16.8 g의 실험용 시료를 얻었다.

3) 검액 조제

실험용 검액은 각각의 추출물을 DMSO에 녹인 후 0.22 μm pore size를 가지는 여과지를 이용하여 멸균하고 사용 시까지 냉장 보관하였다. 배양된 세포에 사용하기 직전에 실험농도에 맞도록 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, GiDKTo BRL Co. USA) 배지로 조정된 다음 사용하였다.

Table 1. Prescription of Dokhwalkisaeng-tang(DKT)

韓藥名	生藥名	重量(g)
독활	<i>Radix Aralia Cordatae</i>	2.8
백작약	<i>Radix Paeoniae Lactiflorae</i>	2.8
당귀	<i>Radix Angelicae Gigantis</i>	2.8
삼기생	<i>Ramulus Loranthe</i>	2.8
숙지황	<i>Rhizoma Rehmanniae</i>	2.0
천궁	<i>Rhizoma Cnidii</i>	2.0
인삼	<i>Radix Ginseng</i>	2.0
백복령	<i>Poria</i>	2.0
우슬	<i>Radix Achyranthis</i>	2.0
두충	<i>Cortex Eucommiae</i>	2.0
진교	<i>Radix Gentianae Macrophyllae</i>	2.0
세신	<i>Herba Asari</i>	2.0
방풍	<i>Radix Saposhnikoviae</i>	2.0
육계	<i>Cortex Cinnamini</i>	2.0
감초	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	1.2
생강	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	3.6
Total Amount		36.0

2. 방법

1) 세포주 및 세포배양

Melanocyte는 서울대학교 한국 세포주은행에서 분양한 B16F10을 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS와 penicillin/streptomycin 이 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. Cell에 각 조건 별로 96 well plate에는 well 당 100 μl, 24 well plate에는 well 당 500 ul로 medium을 넣어 주었다. 세포를 회수할 때는 trypsin-EDTA 1 ml을 가하여 37°C에서 1분간 반응시킴으로써 부착된 세포를 분리하고 배지 4 ml을 넣고 원심분리 (1,000 rDKT, 3분)를 하여 세척한 후 실험에 사용하거나 필요시 액체질소에서 냉동 보관하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂를 사용한 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2) 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, PBS로 희석하여 Hemacytometer(Fuchs-Rosenthal, Germany)로 B16F10 세포수를 계측하였다.

3) Mushroom tyrosinase 활성에 미치는 영향 측정

Tyrosinase 활성에 미치는 영향은 Mason and Peterson³¹⁾ 등의 방법을 사용하여 0.1 M phosphate buffer (PH 6.8) 150 μl, 3 mM L-tyrosine 수용액 20 μl, 검액 20 μl을 차례대로 가한 다음, 2500 U/ml mushroom tyrosinase 10 μl를 가하여 반응을 시작하였다. 반응은 37°C에서 30분간 incubation 시켰으며 매 10분 간격으로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 활성은 아래에 표시한 식으로 구하였다.

$$\text{Tyrosinase 활성도 (\%)} = (B-B') / (A-A') \times 100$$

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

4) Cell의 tyrosinase 활성도 측정

B16F10 cell의 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza³²⁾ 등의 방법을 사용하였다. 배양된 세포를 trypsin-EDTA를 처리하여 정확한 다음 11000 rpm에서 30초간 원심분리하고 100 μ l 세포 용해용 buffer (10 mM sodium phosphate containing 1% Triton X-100 and 0.1 mM PMSF)를 첨가한 다음 얼음 상에서 30분간 흔들면서 세포를 용해시켰다. 다시 원심분리하고 얻어진 세포용액을 사용하여 tyrosinase 활성을 측정하였다.

5) Melanin 생성량 측정

Melanin은 Hoesel³³⁾ 등의 방법을 사용하였다. 48시간 배양된 B16F10 세포 배지에서 배양을 이용하여 melanin을 측정하였다. 세포내 melanin 생성에 미치는 영향을 측정하기 위하여 48시간 배양된 세포를 PBS로 2회 씻고 1,500 rpm 으로 5분간 원심분리하였다. 10% DMSO가 함유된 1N NaOH 300 μ l를 넣고 80 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 처리하여 용해시켰다. 세포내에서 생성되는 Melanin량을 정량하기 위하여 475 nm에서 흡광도를 측정하고 합성 melanin을 표준품으로 사용하여 결정하였다. 또한, Washing buffer로 3번 다시 씻어 내고 Enzyme Conjugate 100 μ l를 가한 다음, 22 $^{\circ}$ C에서 45분간 incubation 시켰다. 다시 3번 씻어낸 다음 기질용액 100 μ l를 가하고 22 $^{\circ}$ C에서 30분간 incubation 시킨 다음 stop solution 50 μ l를 가하고 450 nm에서 optical density를 구했다.

6) 유전자 발현에 대한 영향

(1) 총 RNA 분리

배양하고 있는 M16F10 세포에 1 ml TRIzol reagent (Invitrogen, USA)를 처리하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA에 100 μ l phenol과 100 μ l chloroform : isoamylalcohol (24:1)을 넣고 잘 섞은 후 원심 분리하는 과정을 2번 반복함으로써 상층액을 분리한다. 0.5 ml isopropyl alcohol을 이용하여 RNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하고 자연 건조시킨다. RNAase free water에서 RNA를 녹인 후 RNase-free DNase를 첨가하고 -70 $^{\circ}$ C에서 저장하였다.

(2) cDNA 제조

대조군 및 시험군에서 각각 분리한 total RNA 액(13 ug RNA 함유)에 oligo dT 1 μ l을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 incubation하였다. primer가 annealing 하도록 실온에서 약 10분간 방치한 다음, cyscript buffer, 0.1M DTT, dUTP nucleotide, dUTP Cydye-labelled nucleotide, Cyscript reverse transcriptase을 첨가한 후, 아주 조심스럽게 혼합하였다. 이후, 42 $^{\circ}$ C에서 90분간 incubation 한 후, 얼음 상에 방치하였다. 여기에 2.5 M NaOH을 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 incubation하였으며, 2 M HEPES buffer를 가하여 중화시켰다.

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

Oligo (dT) 12-18 (Promega, USA), reaction buffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 8.3), 1

mM dNTP (Biotools, Spain)과 200 unit M-MLV-RT (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega)를 분리한 RNA에 처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA를 합성하였다. PCR은 total volume 15 μ l에 10X PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2 DKTol의 sense 및 antisense primer를 넣은 혼합액에 cDNA와 1.25 unit의 Taq polymerase (Biotools, Spain)을 넣어 PCR을 시행하였다. Tyrosinase의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT 이었으며, antisense는 TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC 을 사용하였다. TRP-1의 sense primer는 GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC, antisense는 AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT 을 사용하였으며, TRP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT, antisense는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC 이었다. PKA의 sense primer는 TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT, antisense는 TATA GGC TGG TCA GCG AAG AA 를 사용하였으며, PKC- β 의 sense primer는 AGA ACC ACA AAT TCA CCG CC, antisense는 TGA GAA CCT CTC TGT CGA TG, ERK-1의 sense primer는 ATC AGA TCC TGA GAG GGC TA, antisense는 CAG AGC TTT GGA GTC AGC AT 를 사용하였다. ERK-2의 sense primer는 CAT TGT TCA GGA CCT CAT GG, antisense는 AGA GCA TCT CAG CCA GAA TG 이었으며, AKT-1의 sense primer는 CCG CTA CTA TGC CAT GAA GA, antisense는 AGC CCG AAG TCC GTT ATC TT 를 사용하였다. 또한, MITF의 sense primer는 TAG ACA TGC CAG CCA AGT CC, antisense는 CGC TGT GAG CTC CCT TTT TA이였다. Control로는 GAPDH 를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA 이었으며, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C 4분, 30 cycles의 [94 $^{\circ}$ C (30초), 59 $^{\circ}$ C (30초), 72 $^{\circ}$ C (45초)], 72 $^{\circ}$ C 10분이였다(Perkin Elmer, USA). 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동한다. 전기영동 결과 나온 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1(Media Cybernetics, USA)을 이용하여 구했다.

(4) Real time RT-PCR

우선 시험관에 정량한 RNA 5 ug, 50 ng/ μ l 의 random hexamer 3 μ l, 10 mM dNTP 1 μ l를 넣고 DEPC H₂O를 가하여 10 μ l의 RNA/primer mixture를 만들었다. 실험용 samDKTe를 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 incubation 시킨 후 1분 이상 얼음에 방치하였다. Reaction mixture으로 10배의 RT buffer 2 μ l, 25 mM MgCl₂ 4 μ l, 0.1 M DTT 2 μ l, RNAaseOUT 1 μ l을 섞어 준비하였다. Tyrosinase의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT 이었으며, antisense는 TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC 를 사용하였다. TRP-1의 sense primer는 GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC, antisense는 AAG ACC CTG CAC TGC TGG TCT 를 사용하였으며, TRP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT, antisense는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC 이었다. PKA의 sense primer는 TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT, antisense는 TATA GGC TGG TCA GCG

AAG AA 를 사용하였으며, PKC-β의 sense primer는 AGA ACC ACA AAT TCA CCG CC, antisense는 TGA GAA CCT CTC TGT CGA TG, ERK-1의 sense primer는 ATC AGA TCC TGA GAG GGC TA, antisense는 CAG AGC TTT GGA GTC AGC AT 를 사용하였다. ERK-2의 sense primer는 CAT TGT TCA GGA CCT CAT GG, antisense는 AGA GCA TCT CAG CCA GAA TG 이었으며, AKT-1의 sense primer는 CCG CTA CTA TGC CAT GAA GA, antisense는 AGC CCG AAG TCC GTT ATC TT 을 사용하였다. 또한, MITF의 sense primer는 TAG ACA TGC CAG CCA AGT CC, antisense는 CGC TGT GAG CTC CCT TTT TA 이었다. Control로는 GAPDH 를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA 이었으며, antisense는 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℃에 10분간 incubation 시켰다. 다시 42℃에서 50분간 incubation 시킨 다음, 70℃에서 15분간 가열하여 inactivate 시키고 ice 상에서 식혔다. RNase 1 μl를 가하고 다시 37℃에서 20분간 incubation 시킨 다음, 사용 시까지 -20℃에 보관하였다. 각각의 optical tube에 2배의 SYBR Green Mix 12.5 μl, cDNA 0.2 μl, 5 DKTol/μl primer pair mix 1 μl, 11.3 μl H₂O를 넣고, 50℃ 2분 1 cycle, 95℃ 10 min 1 cycle, 95℃ 15 sec, 60℃ 30 sec, 72℃ 30 sec 40 cycles, 72℃ 10 min 1 cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 μl를 사용하여 3% agarose gel에서 PCR specificity를 측정했다. SDS 7,000 software 를 사용하여 real time PCR 결과를 분석하였다.

3. 통계학적 분석

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

결 과

1. 獨活寄生湯이 Melanocyte의 Melanin 유리에 미치는 영향

Melanin은 피부 미용에 부정적 영향 때문에 합성을 차단하기 위해 노력해 왔다. 그러나 Melanocyte는 외부 스트레스로부터 피부를 방어하는 기전의 일환으로 melanin을 합성한다. 본 연구에서는 獨活寄生湯 추출물을 이용하여 Melanin 억제를 시도하였다. DKT는 흑색종의 일종인 B16F10 세포에 독성이 없는 농도인 37, 75, 150, 300 ug/ml 농도로 48시간 처리한 다음 세포 배양액에 유출되는 melanin을 측정하였으며, 약 24시간 후부터 melanin의 생성을 현미경 관찰할 수 있었다. α-MSH(α-Melanocyte Stimulating Hormone)는 UV와 같은 외부 스트레스를 받으면 피부 각질세포로부터 유리되며 Melanocyte에 존재하는 수용체에 결합하여 기능을 나타내는 growth hormone의 일종이다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 Melanoma는 α-MSH (10 nM)로 처리하여 melanin 생성을 현저하게 증가시켰다. DKT를 48시간 처리한 후 측정된 melanin 생성량은 300, 150, 75 ug/ml 농도에

서 현저히 억제 되었다.

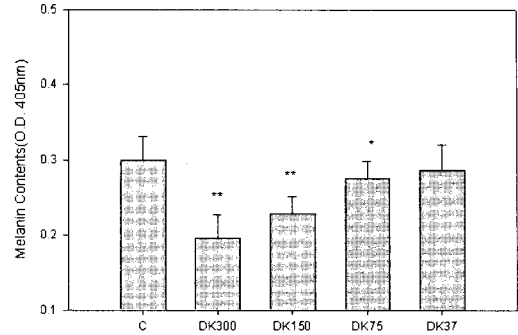


Fig. 1. Inhibitory effect of DKT on melanin-release from B16F10. Melanin was determined in the culture medium after 72hrs incubation. C: α-MSH (10 nM). DK300: α-MSH (10 nM) + 300 ug/ml of DKT. DK150: α-MSH (10 nM) + 150 ug/ml of DKT. DK75: α-MSH (10 nM) + 75 ug/ml of DKT. DK37: α-MSH (10 nM) + 37 ug/ml of DKT. ** p<0.01 vs C. * p<0.05 vs C.

2. 獨活寄生湯이 Melanocyte의 Melanin 생성에 미치는 영향

세포내의 melanin 생합성을 억제하는지 여부를 측정하기 위하여 DKT를 가하여 3일간 배양한 다음, 배양된 B16F10을 PBS로 씻은 후 원심분리하여 얻은 세포를 파괴하였다. 세포를 파괴하고 다시 원심분리한 다음 얻어진 세포내 용액으로부터 melanin을 정량하였다. 실험결과 DKT는 37 ug/ml의 농도에서는 거의 영향을 주지 못했으며, 300, 150, 75 ug/ml의 농도로 처리한 경우 α-MSH를 처리한 군에서 현저히 억제하였다(Fig. 2).

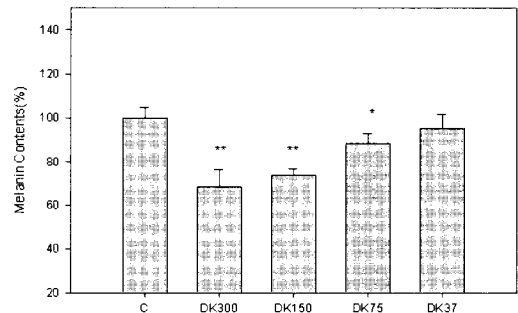


Fig. 2. Inhibitory effect of DKT on melanin production in B16F10. Melanin was determined in the cell after 72hrs incubation. C: α-MSH (10 nM). DK300: α-MSH (10 nM) + 300 ug/ml of DKT. DK150: α-MSH (10 nM) + 150 ug/ml of DKT. DK75: α-MSH (10 nM) + 75 ug/ml of DKT. DK37: α-MSH (10 nM) + 37 ug/ml of DKT. ** p<0.01 vs C. * p<0.05 vs C.

3. 獨活寄生湯이 Mushroom Tyrosinase 활성에 미치는 영향

Melanin 합성은 melanosome 내에 존재하는 tyrosinase의 작용을 통해 이루어진다. 이 tyrosinase는 L-tyrosine을 산화시켜 L-DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase로 작용하며 또한, DOPA를 산화시켜 DOPAquinone을 만드는 DOPA oxidase로 작용하여 melanin을 합성하는 중요한 효소로 알려져 있다. 따라서, melanin 생성을 억제하는 피부 미백제 개발에는 tyrosinase의 활성을 억제하는 것이 필수적이다. 따라서 DKT가 melanin 합성을 억제하는 것을 확인하고, tyrosinase 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 mushroom의 tyrosinase 활성에 미치는 영

향을 측정하였다. 실험결과 DKT를 300, 150, 75, 37 ug/ml의 농도로 가한 다음 측정된 tyrosinase 활성은 각각 약 37%, 31%, 9.7%, 5.6% 억제하였다(Fig. 3).

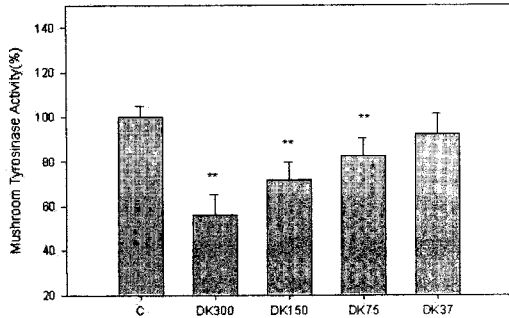


Fig. 3. Inhibitory effect of DKT on mushroom tyrosinase activity in vitro. C: α -MSH (10 nM). DK300: α -MSH (10 nM) + 300 ug/ml of DKT. DK150: α -MSH (10 nM) + 150 ug/ml of DKT. DK75: α -MSH (10 nM) + 75 ug/ml of DKT. DK37: α -MSH (10 nM) + 37 ug/ml of DKT. **: $p < 0.01$ vs C.

4. 獨活寄生湯이 Melanocyte의 Tyrosinase 활성에 미치는 영향

Melanin의 합성은 세포내에 존재하는 tyrosinase가 L-tyrosine을 산화시켜 L-DOPA를 만드는 과정과 DOPA를 산화시켜 DOPAquinone을 만드는 과정을 활성화시켜 시작된다. 이러한 과정은 세포 외적 인자인 UV, α -MSH, TGF β 와 각종 cytokine에 의해 조절된다. 약물이 실제로 세포 상태의 tyrosinase 활성을 저해할 수 있는지를 평가하기 위하여, 배양된 B16F10에 DKT를 처리한 다음 3일간 배양하고 PBS로 씻어낸 다음, 세포를 파괴하고 다시 원심분리하여 얻어진 세포내 용액으로부터 tyrosinase를 정량하였다. DKT를 37, 75, 150, 300 ug/ml의 농도로 처리한 후 3일간 배양한 다음, 얻은 세포액을 이용하여 tyrosinase 활성을 측정하였다. 실험결과, DKT는 300, 150 ug/ml의 농도로 처리한 경우 대조군에 비해 각각 72%, 66%를 나타내 현저한 효소활성 억제를 보였다(Fig. 4).

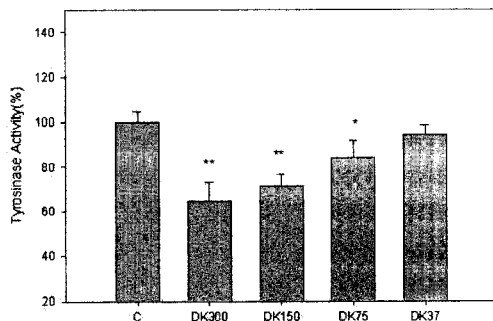


Fig. 4. Inhibitory effect of DKT on tyrosinase activity in B16F10 cell. C: α -MSH (10 nM). DK300: α -MSH (10 nM) + 300 ug/ml of DKT. DK150: α -MSH (10 nM) + 150 ug/ml of DKT. DK75: α -MSH (10 nM) + 75 ug/ml of DKT. DK37: α -MSH (10 nM) + 37 ug/ml of DKT. **: $p < 0.01$ vs C. *: $p < 0.05$ vs C.

5. 獨活寄生湯이 Tyrosinase 발현에 미치는 영향

Tyrosinase는 melanin을 생성하는 효소계로서 tyrosine hydroxylase, DOPA oxidase의 활성을 나타내며, L-tyrosine이

DOPA를 거쳐 DOPAquinone, melanin을 생성시킨다. Melanocyte 세포내 유전자 발현이 증가하면 melanin 합성이 증가하게 된다. 따라서, tyrosinase 발현을 억제하면 melanin 합성을 억제할 수 있다. 본 연구에서는 DKT가 melanin 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 Tyrosinase의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. 유전자 발현을 측정하기 위한 tyrosinase의 primer는 sense: GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT이였으며, antisense: TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC를 사용하였다. 대조군으로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. Fig. 5와 같이 α -MSH를 처리한 군은 처리하지 않은 군에 비해 tyrosinase 활성이 현저히 증가하였다. DKT는 200, 100, 50, 25 ug/ml 농도에서 DKT를 처리하지 않은 대조군에 비해 각각 약 75%, 70%, 35%, 20% 억제를 나타내었다.

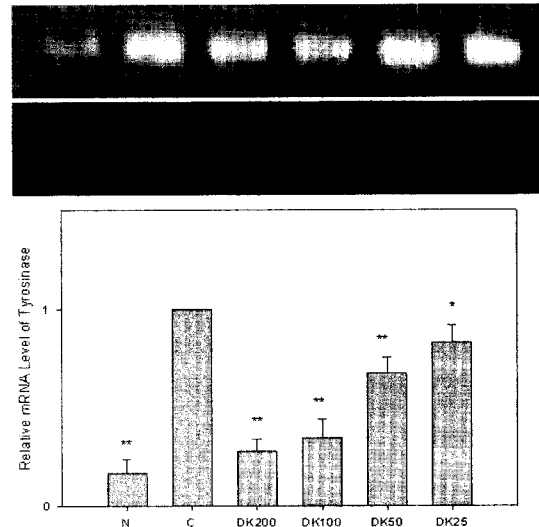


Fig. 5. Effect of DKT on the expression of tyrosinase(TRS) in B16F10 cell. N: Vehicle C: α -MSH (10 nM). DK200: α -MSH (10 nM) + 200 ug/ml of DKT. DK100: α -MSH (10 nM) + 100 ug/ml of DKT. DK50: α -MSH (10 nM) + 50 ug/ml of DKT. DK25: α -MSH (10 nM) + 25 ug/ml of DKT. **: $p < 0.01$ vs C. *: $p < 0.05$ vs C.

6. 獨活寄生湯이 TRP-1 발현에 미치는 영향

TRP-1은 tyrosinase related protein으로 알려져 있는 효소로서 TRP-2에 의해 생성된 DHICA(5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid)를 oxidation 시켜 흑갈색을 나타내는 IQCA(indole-5,6-quinone-carboxylic acid)를 생성한다. 본 연구에서는 DKT가 melanin 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 TRP-1의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. 유전자 발현을 측정하기 위한 RP-1의 primer는 sense: GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC, antisense: AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT를 사용하였다. 대조군으로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA,

antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. 실험 결과 Fig. 6과 같이 DKT는 200, 100, 50 ug/ml 농도에서 DKT를 처리하지 않은 대조군에 비해 현저한 억제 효과를 나타내었다.

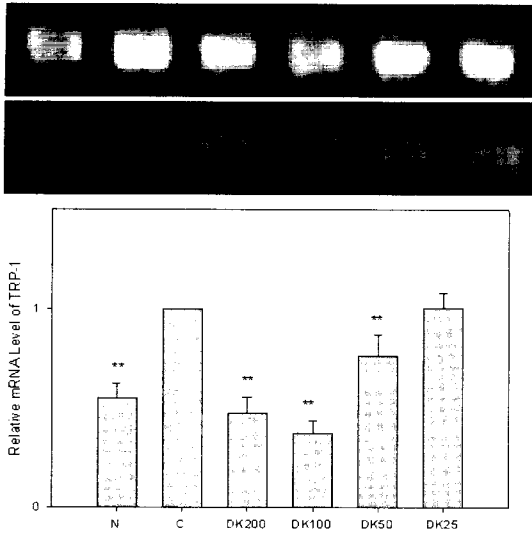


Fig. 6. Effect of DKT on the expression of TRP-1 in B16F10 cell. N: Vehicle, C: α -MSH (10 nM), DK200: α -MSH (10 nM) + 200 ug/ml of DKT, DK100: α -MSH (10 nM) + 100 ug/ml of DKT, DK50: α -MSH (10 nM) + 50 ug/ml of DKT, DK25: α -MSH (10 nM) + 25 ug/ml of DKT. **: $p < 0.01$ vs C.

7. 獨活寄生湯이 TRP-2 발현에 미치는 영향

DKT가 melanin 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 TRP-2의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 갈색 혹은 흑색을 나타내는 melanin인 eumelanin을 생성하는 eumelanogenesis를 살펴보면 DOPAquinone이 DOPAchrome으로 변환되고 DOPAchrome이 TRP-2(DOPAchrome tautomerase)에 의해 DHICA(5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid)를 생성하게 된다. 유전자 발현을 측정하기 위한 TRP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT, antisense는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC 이었다. 실험 결과 Fig. 7에서와 같이 DKT는 200 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml 농도에서 발현 억제 효과를 나타내었다.

8. 獨活寄生湯이 MMP-2 발현에 미치는 영향

MMP(matrix Metalloproteinase)는 Zn 의존적인 단백질 분해 효소로 세포외부의 matrix를 분해하는 역할을 한다. MMP-2는 gelatinase의 활성을 가지는 효소로 Melanocyte가 활성화될 때 발현될 수 있다. 본 연구에서는 DKT가 세포성을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 MMP-2의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 유전자 발현을 측정하기 위한 MMP-2의 primer는 sense: TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT, antisense: TATA GGC TGG TCA GCG AAG AA 을 사용하였다. 대조군으로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. 실험결과 Fig. 7에서와 같이 DKT는 200 ug/ml, 100 ug/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을

현저히 억제하였으나, DKT는 50 ug/ml, 25 ug/ml 농도에서는 영향을 주지 못했다.

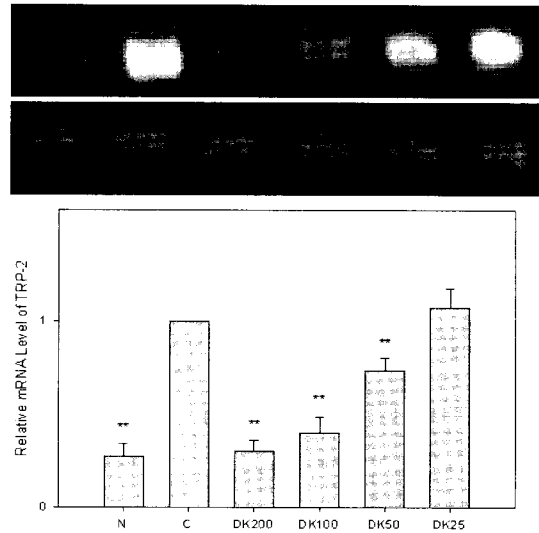


Fig. 7. Effect of DKT on the expression of TRP-2 in B16F10 cell. N: Vehicle, C: α -MSH (10 nM), DK200: α -MSH (10 nM) + 200 ug/ml of DKT, DK100: α -MSH (10 nM) + 100 ug/ml of DKT, DK50: α -MSH (10 nM) + 50 ug/ml of DKT, DK25: α -MSH (10 nM) + 25 ug/ml of DKT. **: $p < 0.01$ vs C.

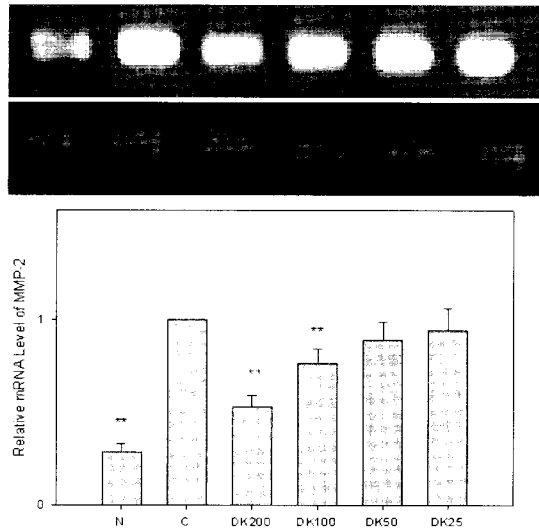


Fig. 8. Effect of DKT on the expression of MMP-2 in B16F10 cell. N: Vehicle, C: α -MSH (10 nM), DK200: α -MSH (10 nM) + 200 ug/ml of DKT, DK100: α -MSH (10 nM) + 100 ug/ml of DKT, DK50: α -MSH (10 nM) + 50 ug/ml of DKT, DK25: α -MSH (10 nM) + 25 ug/ml of DKT. **: $p < 0.01$ vs C.

9. 獨活寄生湯이 PKA 발현에 미치는 영향

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 유발한다. 따라서 PKA 발현을 억제하는 경우 tyrosinase의 활성화를 방지를 통하여 melanin 생성을 억제하게 된다. 본 연구에서는 DKT가 세포성을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 PKA의

발현에 미치는 영향을 평가하였다. 유전자 발현을 측정하기 위한 PKA의 primer는 sense: TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT, antisense: TATA GGC TGG TCA GCG AAG AA 을 사용하였다. 대조군으로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. 실험결과 Fig. 9에서와 같이 PKA는 α -MSH 처리시 발현이 증가하였으며 DKT는 200 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml, 25 ug/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 현저히 억제하였다.

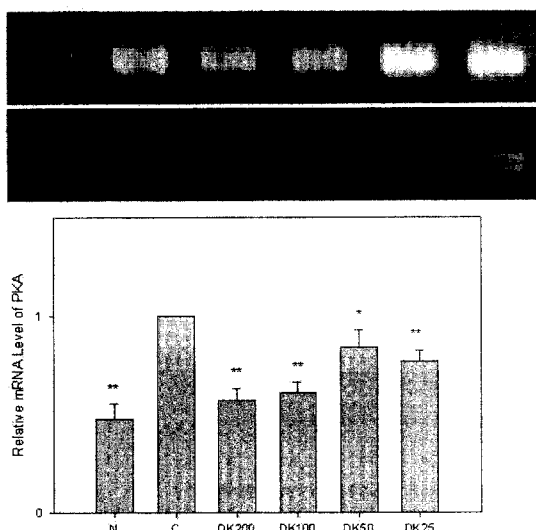


Fig. 9. Effect of DKT on the expression of PKA in B16F10 cell. N: Vehicle. C: α -MSH (10 nM). DK200: α -MSH (10 nM) + 200 ug/ml of DKT. DK100: α -MSH (10 nM) + 100 ug/ml of DKT. DK50: α -MSH (10 nM) + 50 ug/ml of DKT. DK25: α -MSH (10 nM) + 25 ug/ml of DKT. **: $p < 0.01$ vs C. *: $p < 0.05$ vs C.

10. 獨活寄生湯이 PKC 발현에 미치는 영향

PKC는 여러 효소를 인산화하여 활성을 증가시키며, 세포의 증식을 자극하는 효소이다. 따라서 PKC의 활성이 증가하면 melanocyte의 기능이 증가한다. 따라서 PKC 발현을 억제하는 경우 tyrosinase의 활성화를 방지하여 melanin 생성을 억제하게 된다. 본 연구에서는 DKT가 세포성을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 PKC의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 유전자 발현을 측정하기 위한 PKC의 primer는 sense: TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT, antisense: TATA GGC TGG TCA GCG AAG AA 을 사용하였다. 대조군으로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. 실험결과 Fig. 10에서와 같이 PKC β 는 α -MSH 처리시 발현이 증가하였으며, DKT는 200 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 현저히 억제하였으나, 25 ug/ml 농도에서는 영향을 주지 못했다.

11. 獨活寄生湯이 ERK-1 발현에 미치는 영향

ERK(extracellular regulated kinase)는 세포내 신호전달단백질로 유전자 발현을 조절하는 인자로 알려져 있으며, ERK의 발

현이 억제되면 melanin 색소 생성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 DKT가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 ERK-1의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 유전자 발현을 측정하기 위한 ERK-1의 primer는 sense: ATC AGA TCC TGA GAG GGC TA, antisense: CAG AGC TTT GGA GTC AGC AT을 사용하였다. 대조군으로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. 실험 결과 Fig. 11과 같이 ERK-1은 α -MSH 처리시 발현이 감소하였으며, DKT는 200 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml, 25 ug/ml 농도에서 감소한 유전자 발현을 현저히 증가시켰다.

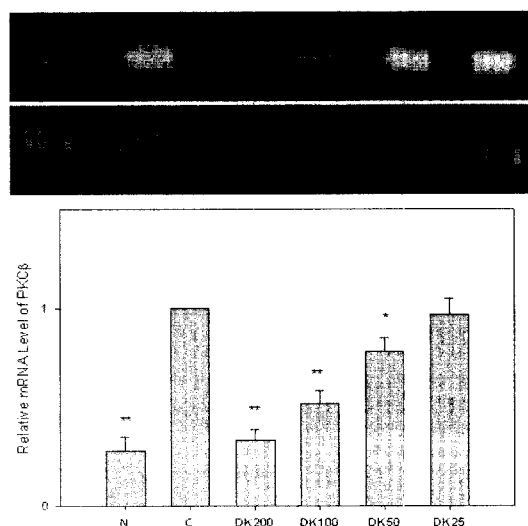


Fig. 10. Effect of DKT on the expression of PKC in B16F10 cell. N: Vehicle. C: α -MSH (10 nM). DK200: α -MSH (10 nM) + 200 ug/ml of DKT. DK100: α -MSH (10 nM) + 100 ug/ml of DKT. DK50: α -MSH (10 nM) + 50 ug/ml of DKT. DK25: α -MSH (10 nM) + 25 ug/ml of DKT. **: $p < 0.01$ vs C. *: $p < 0.05$ vs C.

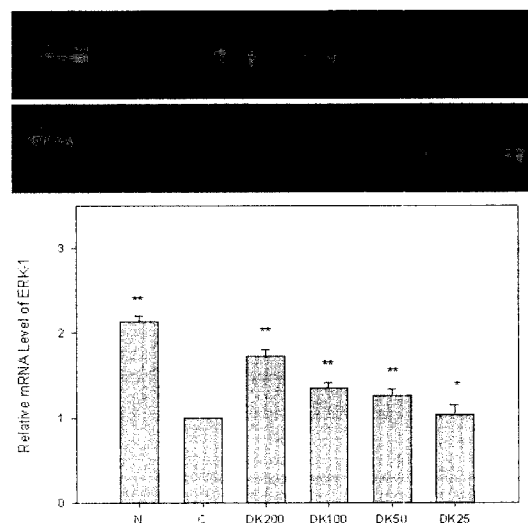


Fig. 11. Effect of DKT on the expression of ERK-1 in B16F10 cell. N: Vehicle. C: α -MSH (10 nM). DK200: α -MSH (10 nM) + 200 ug/ml of DKT. DK100: α -MSH (10 nM) + 100 ug/ml of DKT. DK50: α -MSH (10 nM) + 50 ug/ml of DKT. DK25: α -MSH (10 nM) + 25 ug/ml of DKT. **: $p < 0.01$ vs C. *: $p < 0.05$ vs C.

12. 獨活寄生湯이 ERK-2 발현에 미치는 영향

ERK(extracellular regulated kinase)는 세포내 신호전달단백질로 유전자 발현을 조절하는 인자로 알려져 있으며, ERK의 발현이 억제되면 melanin 색소 생성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서 ERK-2의 발현이 증가하면 색소 생성이 억제될 수 있다. 본 연구에서는 DKT가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 ERK-2의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 유전자 발현을 측정하기 위한 ERK-2의 primer는 sense: CAT TGT TCA GGA CCT CAT GG, antisense: AGA GCA TCT CAG CCA GAA TG를 사용하였다. 대조군으로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. 실험 결과 Fig. 12와 같이 ERK-2는 α-MSH 처리시 발현이 감소하였으며, DKT는 200 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml, 25 ug/ml 농도에서 감소한 유전자 발현을 현저히 증가시켰다.

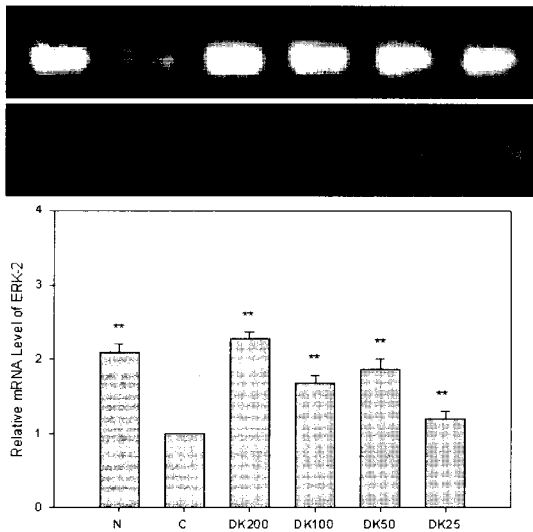


Fig. 12. Effect of DKT on the expression of ERK-2 in B16F10 cell. N: Vehicle, C: α-MSH (10 nM), DK200: α-MSH (10 nM) + 200 ug/ml of DKT, DK100: α-MSH (10 nM) + 100 ug/ml of DKT, DK50: α-MSH (10 nM) + 50 ug/ml of DKT, DK25: α-MSH (10 nM) + 25 ug/ml of DKT. **; p<0.01 vs C.

13. 獨活寄生湯이 AKT-1 발현에 미치는 영향

세포내 신호전달단백질의 일종인 AKT는 ERK, CREB, RSK-1등과 함께 세포 기능을 조절하는 신호전달 단백질로 유전자 발현을 조절하는 인자로 알려져 있다. AKT의 발현이 증가하면 MITF(microphthalmia transcription factor)의 발현이 억제되어 tyrosinase 발현을 억제한다. Tyrosinase의 발현억제는 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다. 따라서 AKT-1의 발현이 증가하면 색소 생성이 억제될 수 있다. 본 연구에서는 DKT가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 AKT-1의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 유전자 발현을 측정하기 위한 AKT-1의 primer는 sense: CCG CTA CTA TGC CAT GAA GA, antisense는 AGC CCG AAG TCC GTT ATC TT를 사용하였다. 대조군으로는 GAPDH를 사용하였으며 sense

primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. 실험 결과 Fig. 13과 같이 AKT-1은 α-MSH 처리시 발현이 감소하였으며 DKT는 200 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml 농도에서 α-MSH에 의해 감소한 유전자 발현을 현저히 증가시켰으나, 25 ug/ml 농도에서는 별다른 영향을 주지 못했다.

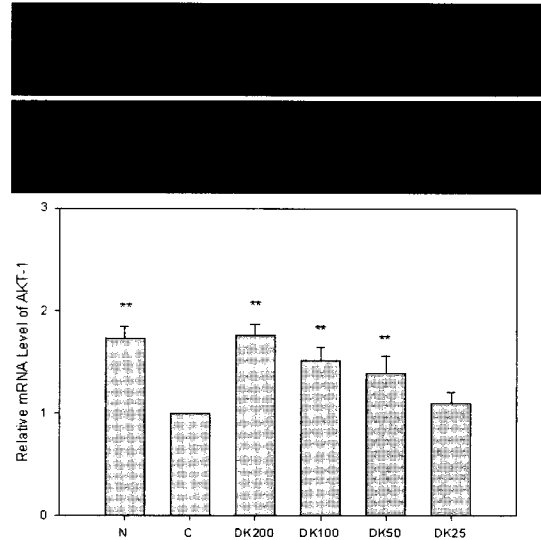


Fig. 13. Effect of DKT on the expression of AKT-1 in B16F10 cell. N: Vehicle, C: α-MSH (10 nM), DK200: α-MSH (10 nM) + 200 ug/ml of DKT, DK100: α-MSH (10 nM) + 100 ug/ml of DKT, DK50: α-MSH (10 nM) + 50 ug/ml of DKT, DK25: α-MSH (10 nM) + 25 ug/ml of DKT. **; p<0.01 vs C.

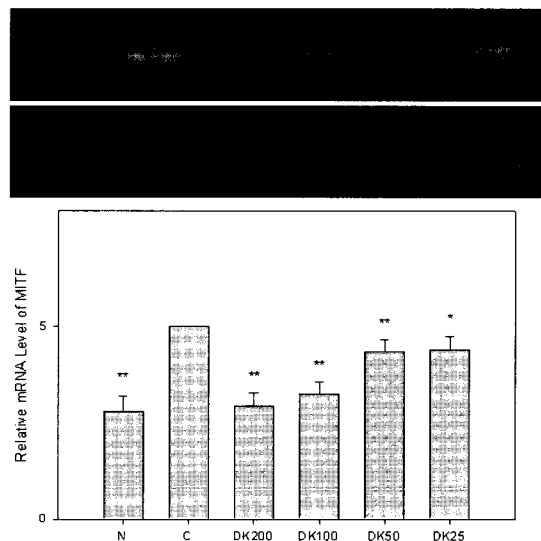


Fig. 14. Effect of DKT on the expression of MITF in B16F10 cell. N: Vehicle, C: α-MSH (10 nM), DK200: α-MSH (10 nM) + 200 ug/ml of DKT, DK100: α-MSH (10 nM) + 100 ug/ml of DKT, DK50: α-MSH (10 nM) + 50 ug/ml of DKT, DK25: α-MSH (10 nM) + 25 ug/ml of DKT. **; p<0.01 vs C, *; p<0.05 vs C.

14. 獨活寄生湯이 MITF 발현에 미치는 영향

MITF는 microphthalmia transcription factor로서 tyrosinase 발현을 조절한다. MITF의 억제는 tyrosinase의 발현억제를 통하여 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다. 따라서 MITF의 발현이

억제되면 색소 생성이 억제될 수 있다. 본 연구에서는 DKT가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 MITF의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 유전자 발현을 측정하기 위한 MITF의 primer는 sense: TAG ACA TGC CAG CCA AGT CC, antisense: CGC TGT GAG CTC CCT TTT TA 이었다. 대조군으로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA, antisense는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이었다. 실험 결과 Fig. 14와 같이 MITF는 α -MSH 처리시 발현이 증가하였으며, DKT는 200 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml, 25 ug/ml 농도에서 모두 α -MSH에 의해 증가된 유전자 발현을 현저히 감소시켰다.

고 찰

한의학에서는 색소침착증을 형태와 색조에 따라 간점(點點), 면흑(面黑), 작란(雀卵), 반간증(斑點), 여자(鰐子), 작반(雀斑), 흑반(黑斑) 등으로 다양하게 표현하여 왔다^{9,11)}. 피부의 과색소 침착증에 대해 《黃帝內經·素門》<至真要大論>에 “歲陽明在天, 燥淫所勝... 面黧, 身無膏澤, 足外反熱”이라 하여 처음 수록되었고, 손²⁷⁾은 醫家の說과 현대적인 이론을 결부하여 얼굴에 생기는 질병의 대부분은 위장이 주관을 하고 심장에서 내보내어지는 혈액의 순환 및 그 상태와 직접적인 관련이 있다고 하면서 기미의 원인을 크게 2가지로 구별하였는데 五臟六腑에 痰飲, 즉 비생리적인 수분-어혈-가래 등과 같은 불순물질이 생겨 혈액순환 장애를 주거나 외부로부터 찬 바람이나 찬 기운, 제 철이 아닌 바람 등 나쁜 風邪를 자주 접하게 되어 氣와 血이 순조롭지 못할 때 기미가 생기기 쉽다고 하였다.

獨活寄生湯은 <千金要方>에 최초로 기재되어 있으며, 風寒濕 三氣의 雜습으로 인한 痺痛을 다스리는 三痺湯의 변방으로, 三痺湯에서 桑寄生을 加하고 黃芪와 續斷을 祛한 처방이다^{19,20)}.

獨活寄生湯은 治肝腎虛弱, 筋攣骨痛, 脚膝偏枯, 冷痺의 효능이 있어서 痺와 脚氣, 四肢癱, 腰痛 등에 사용하였고, 育髓損傷後期, 中風癱瘓, 風濕, 神經痛, 류마티드 관절염, 혹은 癱瘓 患者 등에도 응용되고 있다²¹⁻²⁴⁾. 肝腎虛弱은 만약 腎陰이 부족하게 되면 乙癸同原으로 인해 肝陰도 부족하게 됨으로써 筋膜이 濡潤되지 못해 陰不制陽으로 인한 頭暈, 眩暈, 筋惕, 肢體痿廢, 疼痛과 脇肋脹痛, 呃逆, 雀斑, 閉經 등이 발생된다³⁴⁾.

근래 문헌들은 과색소 침착증의 원인에 대해 肝鬱氣滯, 腎陰不足, 瘀血內停, 陰虛火旺, 濕熱內蘊, 火鬱孫絡, 風邪外搏 등으로 자세히 분류하였는데⁶⁻¹²⁾, 치료방법으로는 辨證施治에 의한 滋補肝腎, 祛風濕, 疏肝解鬱, 通經活絡, 健脾益氣, 滋陰降火, 清熱解毒 등의 內治法과 연고제나 분말 제제 등을 사용하는 外治法, 體針, 耳針 등을 이용하는 鍼灸療法 등이 서술되어있다^{35,36)}.

이중에서 肝腎陽虛로 인한 경우는 노년층에 多發되는 病因으로 四肢의 筋肉이 무력하고 이완되거나 뇌기능 저하를 동반할 뿐만 아니라, 피부의 노화로 인해 발생하는 색소침착을 유발할 수 있으므로 治法으로 滋補肝腎을 활용한다. 또한 風邪外搏으로 인한 색소침착의 경우는 祛風濕의 內治法을 활용하여 증상을 개

선할 수 있다³⁷⁻³⁹⁾. 따라서 獨活寄生湯의 치료 원리인 滋補肝腎과 祛風濕의 효과는 피부의 항노화 작용에 유의한 결과가 있을 것으로 사료된다.

melanin은 melanocyte 내의 독특한 소기관인 melanosome에서 만들어진다. melanosome 내에서의 melanin 생성은 tyrosinase의 합성 및 전달에 관여하는 세포내 조절인자, tyrosinase, dopachrome tautomerase, peroxidase, catalase, glutathione reductase 등의 효소 그리고 구리, 아연, 철 등의 금속이온 및 interferon(IFN), prostaglandin(PG), histamine 등이 melanin 합성과 전달에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁾.

melanogenesis는 피부의 모낭 내부의 melanocyte에서 melanin이 생성되는 과정으로, 대표적인 관여효소는 tyrosinase이다. tyrosinase는 생체내 아미노산인 tyrosine이 L-DOPA가 DOPAquinone으로 산화되는 과정에 관여한다. DOPAquinone은 두 가지 다른 경로를 통해 pheomelanin과 eumelanin을 생합성하게 되는 중요한 전구물질로서 작용하게 된다. 갈색 혹은 흑색을 나타내는 melanin인 eumelanin을 생성하는 eumelanogenesis를 살펴보면 DOPAquinone이 DOPochrome으로 변환되고, DOPochrome이 TRP-2(DOPochrome tautomerase)에 의해 DHICA(5,6-dihydroxy indole-2-carboxylic acid)를 생성한다.

DHICA는 DHICA oxidase에 의해 Indole-5,6-quinone-carboxylic acid가 생성되며 이것이 갈색을 나타낸다. 한편 DOPochrome은 환원 및 탈탄산 반응에 의해 DHI(5,6-dihydroxyindole)이 생성되고 이것이 DHI oxidase에 의해 Indole-5,6-quinone이 생성되며 이것은 흑색을 나타낸다. 그리고 적색 혹은 황색의 색소를 만드는 pheomelanogenesis는 cysteine, glutathione과 같은 황 함유 아미노산이 관여하는 경로이다. 일반적으로 melanin이라고 하면 eumelanogenesis에 의해 생성된 eumelanin을 지칭한다^{40,41)}.

한편 한약재를 이용한 미백 관련 연구로는 마황(麻黃) 및 마황고(麻黃膏)의 미백효과에 관한 연구⁴²⁾와 사백산(漂白散)의 미백효과 검증에 관한 연구⁴³⁾, 서시옥용산(西施玉容散)의 미백효과에 관한 연구^{16,17)} 등 한약복합제제에 대한 연구가 있으며, 조⁴⁴⁾는 連翹 메탄을 추출물이 인체 멜라닌 세포주에서 멜라닌 생성 억제효과를 연구하였는데 세포내 tyrosinase 활성을 억제할 뿐 아니라 멜라닌합성 관련 효소의 단백질인 tyrosinase 단백질 발현과 TRP-1 단백질 발현을 억제하고, tyrosinase 유전자발현을 유의성 있게 감소시켰으며 세포내 cAMP의 농도를 감소시킨다고 보고하였다. 이⁴⁵⁾는 側柏葉 메탄을 추출물이 멜라닌 형성에 미치는 영향에 대한 연구에서 側柏葉이 B16 melanoma 세포의 증식과 멜라닌 생성을 억제할 뿐 아니라, tyrosinase의 mRNA 발현도 억제하는데 이 과정은 tyrosinase 활성의 감소로 인한 α -MSH 경로 억제의 결과라고 추론하였다. 김⁴⁶⁾은 川芎 메탄을 추출액의 멜라닌 형성 억제 효과를 연구하였는데, B16/F10 세포의 tyrosinase 활성을 농도 의존적으로 억제한다고 보고하였다.

이⁴⁷⁾는 天花粉 추출물이 B16 melanoma 세포의 melanin 생성을 억제하였으며, c-MSH와 c-AMP에 의한 과색소생성 유도시에도 melanin 생성을 감소시켰다고 보고하였고, 윤 등¹⁸⁾은 白芨

이 멜라닌 생성억제 효과를 가지고 있으며, 이러한 과정은 B16 melanoma 세포의 tyrosinase 활성과 tyrosinase protein 발현을 억제하여 melanin 형성을 억제시켰다고 보고하였다. 이 밖에도 檉白皮 메탄올추출물, 白朮추출액, 蘇木 에틸아세테이트추출물, 沙蔘 메탄올 추출물, 甘草 물추출물이 B16/F10 흑색포세포의 멜라닌 합성을 억제하는 연구가 보고된 바 있다⁴⁸⁻⁵²⁾. 또 이⁵³⁾는 더덕, 임 등⁵⁴⁾은 甘草 물추출물이 HM3KO세포의 멜라닌 생성을 억제 한다고 하였다. 이 외에도 미백 효과가 있는 천연물로는 人蔘, 辛荑, 牡丹皮, 大戟, 蘇木, 前胡 등이 있다고 보고되었다⁴⁴⁾. 한편 정⁵⁵⁾의 補骨脂 추출물이 B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 미치는 영향의 연구와 양 등⁵⁶⁾의 山茱萸 물추출물이 B16/F10 melanoma 세포주의 멜라닌 생성에 미치는 영향에 대한 연구에서는 이들 한약재가 tyrosinase 활성을 오히려 증가시켜 멜라닌 합성을 증가하는 것으로 보고 하였다.

미백에 관련된 연구는 다음의 세가지 관점에서 주로 연구되어 왔다. 첫째 melanin 합성의 주요소인 tyrosinase 활성을 조절하기 위하여 tyrosinase 합성저해물질이나 tyrosinase의 기질에 대한 길항물질을 개발한다. 둘째 melanin 생합성 장소인 melanocyte의 기능을 저하시키기 위해 melanocyte에 독성을 나타내는 물질을 개발한다. 셋째 멜라닌 생성기구인 tyrosinase와 DOPA chrome에서 DHICA(dihydroxyindole carboxylic acid)로의 변환을 촉매하는 제2효소인 DOPA chrome tautomerase와 DHICA에서 DHICA oxidase를 통해 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 변환을 촉매하는 제3의 효소의 활성을 동시에 감소시킨다⁵⁵⁾.

본 연구에서는 獨活寄生湯(DKT) 추출물을 분획한 다음 얻어진 CHCl₃ 층을 이용하여 melanin 생성, tyrosinase의 활성 및 melanin 생합성에 관여하는 여러 효소에 미치는 영향과, 이 과정에서 유전자 발현에 관련된 인자에 대해 관찰하였다.

Melanocyte에서 melanin 유리에 미치는 영향을 측정하기 위하여 DKT를 이용하여 melanin 억제를 시도하였다. Melanin 생성세포로는 마우스에서 얻은 흑색종의 일종인 B16F10 melanoma를 이용하였다. 세포 독성이 없는 농도인 37, 75, 150, 300 ug/ml 농도로 DKT를 48시간 처리한 다음 세포 배양액에 유출되는 melanin 을 측정하였으며, 약 24시간 후부터 melanin의 생성을 현미경 관찰할 수 있었다. α -MSH(α -melanocyte stimulating hormone)는 UV와 같은 외부 스트레스를 받으면 피부 각질세포로부터 유리되며 Melanocyte에 존재하는 수용체에 결합하여 기능을 나타내는 growth hormone의 일종이다.

Melanoma는 α -MSH (10 nM)처리한 경우 정상군에 비해 melanin 생성이 현저하게 증가하였다. DKT를 48 시간 처리한 후 측정된 melanin 생성량은 정상 대조군 및 α -MSH 처리군에서 모두 현저히 억제 되었다.

세포내의 melanin 생합성을 억제하는지 여부를 측정하기 위하여 DKT를 가하여 3일간 배양한 다음, 배양된 B16F10을 PBS로 씻은 후 원심분리하여 얻은 세포를 파괴하였다. 세포를 파괴하고 다시 원심분리한 다음 얻어진 세포내 용액으로부터 melanin을 정량하였다. 실험결과, DKT는 37 ug/ml의 농도에서는 거의 영

향을 주지 못했으며 75, 150, 300 ug/ml의 농도로 처리한 경우 α -MSH를 처리한 군에서 현저히 억제하였다.

Melanin 합성은 melanosome 내에 존재하는 tyrosinase의 작용을 통해 이루어진다. 이 tyrosinase는 L-tyrosine을 산화시켜 L-DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase로 작용하며 또한, DOPA를 산화시켜 DOPAquinone을 만드는 DOPA oxidase로 작용하여 melanin을 합성하는 중요한 효소로 알려져 있다. 따라서, melanin 생성을 억제하는 피부 미백제 개발에는 tyrosinase의 활성을 억제하는 것이 필수적이다. 따라서, DKT가 melanin 합성을 억제하는 것을 확인하고, tyrosinase 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 mushroom의 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 실험결과, DKT는 75, 150, 300 ug/ml의 농도로 가한 다음 측정된 tyrosinase 활성을 현저히 억제하였다.

Melanocyte에서의 melanin의 합성하는 과정은 세포 외적 인자인 UV, α -MSH, TGFbeta와 각종 cytokine에 의해 조절된다.

따라서 약물이 실제로 세포 상태의 tyrosinase 활성을 저해할 수 있는지를 평가하는 것은 중요한 일이다. 배양되는 B16F10에 DKT를 처리한 다음 3일간 배양하고 PBS로 씻어낸 다음, 세포를 파괴하고 다시 원심분리하여 얻어진 세포내 용액으로부터 tyrosinase를 정량하였다. DKT를 37, 75, 150, 300 ug/ml의 농도로 처리한 후 3일간 배양한 다음, 얻은 세포액을 이용하여 tyrosinase 활성을 측정하였다. 실험결과 DKT는 75, 150, 300 ug/ml의 농도로 처리한 경우 대조군에 비해 현저한 효소활성 억제를 보였다.

Melanocyte 세포내 유전자 발현이 증가하면 melanin 합성이 증가하게 되므로 tyrosinase 발현을 억제하면 melanin 합성을 억제할 수 있다. 본 연구에서는 DKT가 melanin 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 Tyrosinase의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. 실험결과, DKT는 37, 75, 150, 300 ug/ml 농도에서 DKT를 처리하지 않은 대조군에 비해 현저한 억제를 나타내었다. 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-5,6-quinone-carboxylic acid)를 생성하는데 IQCA는 흑갈색을 나타낸다. 따라서 TRP-1 발현을 억제하면 미백효과를 기대할 수 있다. DKT가 melanin 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 TRP-1의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. 실험 결과 DKT는 75, 150, 300 ug/ml 농도에서 DKT를 처리하지 않은 대조군에 비해 현저한 억제를 나타내었다.

Commo⁵⁷⁾ 등은 Human eumelanin hair bulb의 멜라닌 세포에서 tyrosinase와 TRP-1은 검출되었으나 TRP-2는 검출되지 않았는데 이는 TRP-2 유전자 발현이 약하기 때문이라고 하였고, 조⁴⁴⁾는 連翹 메탄올 추출물에서 TRP-1 단백질의 발현이 감소하였으나 TRP-2는 검출되지 않았다고 보고한 바 있다. 본 실험에서는 DKT는 200 ug/ml 100 ug/ml 50 ug/ml 농도에서 TRP-2 유전자 발현 억제 효과를 나타내었다.

Melanocyte가 활성화되어 melanogenesis가 진행될 때, adenylylate 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 유발한다. 따라서 PKA 발현을 억제하는 경우 tyrosinase의 활성화 방지를 통하여 melanin 생성을 억제하게 된다. DKT가 세포성을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 PKA의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험결과 PKA는 α-MSH 처리시 발현이 증가하였으며, DKT는 200 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml, 25 ug/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 현저히 억제하였다.

ERK는 extracellular regulated kinase로 알려져 있는 세포내 신호전달단백질로 유전자 발현을 조절하는 인자로 알려져 있으며, ERK의 발현이 억제되면 melanin 색소 생성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 따라서 ERK-1, ERK-2의 발현이 증가하면 색소 생성이 억제될 수 있다. DKT가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 ERK-1, ERK-2의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험결과 ERK-1의 발현에서는 α-MSH 처리시 발현이 감소하였으며, DKT는 200 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml, 25 ug/ml 농도에서 감소한 유전자 발현을 현저히 증가시켰다. ERK-2의 발현에서는 α-MSH 처리시 발현이 감소하였으며, DKT는 200 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml, 25 ug/ml 농도에서 감소한 유전자 발현을 현저히 증가시켰다.

세포내 신호전달단백질의 일종인 AKT는 ERK, CREB, RSK-1등과 함께 세포 기능을 조절하는 신호전달 단백질로 유전자 발현을 조절하는 인자로 알려져 있다. AKT의 발현이 증가하면 MITF(microphthalmia transcription factor)의 발현이 억제되어 tyrosinase 발현을 억제한다. Tyrosinase의 발현억제는 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다. 따라서 AKT-1의 발현이 증가하면 색소 생성이 억제될 수 있다. 본 연구에서는 DKT가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 AKT-1의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험결과 α-MSH 처리시 발현이 감소하였으며 DKT는 200 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml 농도에서 α-MSH에 의해 감소한 유전자 발현을 현저히 증가시켰으나 25 ug/ml 농도에서는 별다른 영향을 주지 못했다.

MITF는 microphthalmia transcription factor로서 tyrosinase 발현을 조절한다. MITF의 억제는 tyrosinase의 발현억제를 통하여 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다. 따라서 MITF의 발현이 억제되면 색소 생성이 억제될 수 있다. 본 연구에서는 DKT가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 MITF의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험결과 α-MSH 처리시 발현이 증가하였으며, DKT는 200 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml, 25 ug/ml 농도에서 모두 α-MSH에 의해 증가된 유전자 발현을 현저히 감소시켰다.

이상의 결과, DKT는 α-MSH에 의해 증가되는 melanin 합성에 직접적으로 관여하는 효소인 Tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 발현을 억제하고 Melanocyte 세포 수준에서의 활성을 억제하여 melanin 합성을 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 작용은 α

-MSH에 의해 melanocyte에서 증가되는 PKA, PKC의 활성 억제, α-MSH에 의해 자극된 melanocyte에서 발현이 감소하여 tyrosinase 활성을 증가시키고 melanin 생합성을 증가시키는 유전자 조절하는 인자 들인 ERK-1, ERK-2, AKT-1의 활성 증가, Tyrosinase 발현에 관여하는 MITF 발현을 억제하는 작용기전을 통하여 나타나는 것으로 판단되었다.

결론

獨活寄生湯(DKT)을 Melanoma cell인 B16F10에 미치는 영향을 측정하였다. 또한, melanin 생성과 관련된 tyrosinase의 활성과 유전자 발현에 대한 실험을 통하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

DKT는 B16F10의 melanin 생성을 현저히 억제하였다. DKT는 Tyrosinase의 활성 및 세포내 합성을 현저히 억제하였다. DKT는 B16F10에서의 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2, MMP-2 유전자 발현을 억제하였다. DKT는 B16F10에서 PKA, PKC 발현을 억제하였다. DKT는 B16F10의 유전자 발현을 조절하는 신호전달 인자인 ERK-1, ERK-2, AKT-1의 발현을 증가시켰다. DKT는 B16F10의 MITF의 발현을 억제하였다. 이상의 결과 獨活寄生湯 추출물은 melanin 생성에 관여하는 유전자인 Tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF, PKA, PKC 발현 억제와 ERK, AKT 증가를 통하여 melanocyte의 tyrosinase의 생합성을 억제하여 melanin 합성을 억제했다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 원광대학교 교비연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. 山孝一 良, hearing, V.J.メラニン産生の 制御因子. Fragrance Journal 6: 24-28, 1990.
2. 崔鍾玩. A study on the antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of uv-b sunscreen and preservative in cosmetic products. 건국대학교 대학원, 1996.
3. 신연상, 노석선. 기미에 관한 文獻的 考察. 大韓外官科學會誌 11(1):82-98, 1998.
4. 楊維傑 編. 黃帝內經 素門. 臺化, 樂羣出版社業 有限公司, pp 624-679, 1994.
5. 송점식. 한방피부미용. 효림, pp 223-225, 188-192, 1993.
6. 李 林. 實用中醫皮膚病學. 北京, 中醫古籍出版社, pp 1-17, 1998.
7. 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.
8. 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.
9. 朱震亨. 丹溪心法. 北京, 人民衛生出版社, p 24, 1993.
10. 費廷賢. 萬病回春. 서울, 醫聖堂, p 271, 1993.

11. 巢元方. 巢氏諸病原侯論. 서울, 大星文化社, p 200, 302, 1992.
12. 劉愛民. 損容性皮膚病的診斷與治療. 北京, 中國中醫藥出版社, p 177, 1992.
13. Curto, E.V. Inhibitors of mammalian melanocytes tyrosinase: In vitro Comparisons of alkyl Esters of Gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology* 57: 663-672, 1992.
14. Chakraborty, A.K. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res* 11(4): 206-212, 1998.
15. 강현성. 沙蔘 물 추출액의 멜라닌 형성 억제 효과. *대한안이비인후과과학회지* 17(1):82-93, 2004.
16. 조광호, 전병욱, 박지선, 우원홍, 문현자. B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 대한 西施玉容散의 효과. *大韓東醫病理學會* 14(1):160-170, 2000.
17. 우원홍, 남우열, 정우열, 박래길, 김지수, 전병훈. 멜라닌 합성의 신호전달기전에 미치는 西施玉容散의 효과. *大韓東醫病理學會誌* 15(1):73-83, 2001.
18. 윤화정, 윤정원, 윤소원, 고우신, 우원홍. 白芨이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향. *대한안이비인후과과학회지* 16(1): 100-111, 2003.
19. 孫思邈. 千金要方. 臺北, 自由出版社, pp 166-167, 1976.
20. 申載鏞. 方藥合編解說. 서울, 成輔社, p 78, 1991.
21. 江克明. 外. 簡明方劑辭典. 上海, 上海科學技術出版社, p 803, 1989.
22. 清·汪昂. 醫方集解. 서울, 大星文化社, pp 205-206, 1993.
23. 林準圭, 申鉉大. 東醫物理療法科學. 서울, 高文社, p 367, 1990.
24. 辛民教. 臨床本草學. 서울, 永林社, p 506, 2000.
25. 宋政錫. 獨活寄生湯이 뇌혈류역학 변화와 사이토카인 생성에 미치는 실험적 연구. 원광대학교 한의학전문대학원, 2004.
26. 이영보. 獨活寄生湯加味方이 배양 척수운동신경세포에 미치는 영향. 원광대학교 한의과대학, 2002.
27. 박수진. 이온삼투요법을 위한 獨活寄生湯의 안정성에 관한 연구. 동국대학교한의과대학, 2000.
28. 권영달, 신병철. 獨活寄生湯 및 白屈菜가 손상된 배양척수감각신경세포에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 15(6):998-1005, 2001.
29. 김점영, 이상용, 이광규. 獨活寄生湯이 흰쥐의 혈청변화에 미치는 영향. *大韓東醫病理學會* 8(2):99-104, 1998.
30. 김점영, 김정연, 이상용. 獨活寄生湯이 glycine과 arginine의 생성에 미치는 영향. *한방재활의과학회지* 8(2):328-337, 1998.
31. Mason, H.S., Paterson, E.W., Melanoproteins, I. Reaction between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta.* pp 111, 134-146, 1965.
32. Martinez-Esparza, M. Mechanism and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* pp 139-146, 225, 1998.
33. Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by vitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* pp 45, 1474-1478, 1985.
34. 鄭遇悅, 安圭錫. 韓方臨床病理學. 서울, 永林社, p 514, 552, 1998.
35. 范瑞強. 實用皮膚病性病驗方精選. 廣東:廣東出版社, p 336, 1994.
36. 柳基遠. 診療와 優秀處方. 서울, 成輔社, p 328, 1992.
37. 대한병리학회. 병리학. 서울, 고문사, pp 87-99, 1263-1264, 1994.
38. 李鳳教 編譯. 症狀鑑別治療. 서울, 成輔社, pp 67-70, 296-299, 1991.
39. 黃度淵. 方藥合編. 서울, 南山堂, pp 217-218, 1985.
40. JacDKTon, I.J. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *EMBO J* 11: 519, 1992.
41. Jimbow, K. Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. *British J. Derma* 144: 55, 2001.
42. 이상희. 麻黃 및 麻黃膏의 미백효과에 관한 연구. 경희대학교 동서의학대학원, 2001.
43. 김성각. 瀉白散의 미백효과 검증에 관한 연구. 경희대학교한의과대학, 2000.
44. 조미경. 인체 멜라닌세포주에서 連翹 메탄올추출물의 멜라닌 생성 억제효과. 원광대학교 한의학전문대학원, 2005.
45. 이수형. 側柏葉 메탄올 추출물이 멜라닌 형성에 미치는 영향. 원광대학교한의과대학, 2004.
46. 김양진. 川芎 메탄올 추출액의 멜라닌 형성 억제 효과. 상지대학교한의과대학, 2005.
47. 이관순. 天花粉이 멜라닌 형성에 미치는 영향. *大韓外官科學會誌* 14(1):209-225, 2001.
48. 정승일, 김춘관, 전병훈, 백승화, 우원홍, 천현자. 榆白皮 메탄올 추출물에 의한 Melanin 합성 조절. *大韓東醫病理學會誌* 15(5):807-812, 2001.
49. 박지선, 김용수, 이진우, 박래길, 전병훈, 우원홍, 정우열. 白朮추출액이 멜라닌 생성에 미치는 영향. *大韓東醫病理學會誌* 13(2):91-98, 1999.
50. 천현자, 김용수, 남향우, 윤성찬, 우원홍. 蘇木의 에틸아세테이트 추출물이 B16/F10 흑색종세포의 멜라닌 합성에 미치는 효과. *동의생리병리학회지* 15(6):961-966, 2001.
51. 임난영, 권광수, 김윤석, 백승기, 임주라, 문연자, 우원홍. 沙蔘 메탄올 추출물의 멜라닌 생성 억제효과. *동의생리병리학회지* 18(3):747-753, 2004.
52. 문연자, 김진, 임난영, 이승연, 곽성, 황충연, 우원홍. 甘草 물 추출물의 멜라닌 형성 억제효과. *동의생리병리학회지* 16(6): 1230-1235, 2002.
53. 이승연. 더덕 물추출물이 멜라닌 생성에 미치는 영향. *대한한의학방제학회지* 10(2):199-211, 2002.
54. 임숙정, 임난영, 이성원, 곽근신, 안성훈, 문연자, 우원홍. 甘草 물추출물이 HM3KO 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 17(2):368-373, 2003.
55. 김은철, 안소영, 홍은숙, 이광화, 김은기, 노경호. 천연물에 포함된 미백성분의 추출 및 미백효과. *한국공업화학학회지* 16(3):348-353, 2005.

56. 정재호. 補骨脂 추출물이 B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 미치는 영향. 상지대학교 대학원 한의학과, pp 1-22, 2005.
57. 양현옥, 최원영, 전병훈, 백승화, 천현자. 山茱萸 물추출물이 B16/F10 melanoma 세포주의 멜라닌 생성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 16(4):818-822, 2002.
58. Stephane, C., Oliver, G. et al. Absence of TRP-2 in Melanogenic Melanocytes of Human Hair Pigment Cell Res 17: 488-497, 2004.