

美白散이 멜라닌 생성 및 유전자 발현에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과교실

김수민, 유동열

ABSTRACT

The Effect of *Mibaeksan*(MB) on Melanin Synthesis and Gene Expression

Soo-Min Kim, Dong-Youl Yoo

Dept. of Oriental Medicine Graduate School, Daejeon University

Purpose: This study was performed to elucidate the inhibitory effect of *Mibaeksan* (MB) on melanin synthesis in B16F10 mouse melanoma cell.

Methods: To demonstrate the inhibitory effects of MB on melanin synthesis, we measured the amount of released and produced melanin in B16F10 melanoma cell. Also, we evaluated tyrosinase-activity *in vitro* as well as in B16F10 melanoma cell. And to investigate the action mechanism, we assessed the gene expression of tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MMP-2, PKA, PKC β , ERK-1 ERK-2, AKT-1 and MITF in B16F10 melanoma cells.

Results:

1. MB decreased the release and production of melanin in B16F10 melanoma cells.
2. MB decreased tyrosinase activity *in vitro* and in B16F10 melanoma cells.
3. MB decreased the expression of tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA, PKC β and MMP-2 in B16F10 melanoma cells.
4. MB increased the expression of ERK-1, ERK-2 and AKT-1 in B16F10 melanoma cells.
5. MB decreased the expression of MITF in B16F10 melanoma cells.

Conclusion: From these results, it may be concluded that MB has the antimelanogenetic effects.

Key words: *Mibaeksan*(MB), Whitening, Melanogenesis

I. 서 론

미백화장품은 자외선에 의한 기미, 주근깨 등을 완화시키고 멜라닌 색소의 생성을 억제하는 목적으로 개발된 제품으로¹⁾, 3조 1억 원에 달하는 화장품 총매출 중 총 940억을 차지하고 있으며²⁾, 화이트닝 크림의 판매량이 2000년에 9%에서 2004년에는 14%로 전반적인 증가세를 나타내고 있어³⁾, 미백화장품 개발에 대한 관심이 증가하고 있다.

멜라닌은 표피 기저층에 존재하는 멜라닌 세포의 melanosome에서 합성되어 수상돌기를 통하여 표피의 각질화 세포로 이동되어 피부의 색을 나타낸다⁴⁾. Melanosome에는 정상적인 멜라닌을 합성하는데 필요한 효소들을 함유하고 있는데 이 효소들 중 가장 잘 알려진 것으로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1(TRP-1), TRP-2 등이 있다⁵⁻⁶⁾.

현재 미백화장품 원료개발에 대한 연구는 소비자들의 선호도가 높은 천연재료에 집중되고 있어¹⁾ 한약재 및 한의학의 외용처방이 갖는 미백 기능과 작용기전에 관한 연구의 필요성이 높아지고 있다.

한의학에서는 피부의 과색소 침착증에 대해 《黃帝內經·素門》〈至眞要大論〉⁷⁾에 “歲陽明在天，燥淫所勝... 面鹿，身無膏澤，足外反熱”이라 하여 처음 수록된 이래로 그 형태와 색조에 따라 黧點，面黑，雀卵，肝斑 등 다양하게 표현되어 왔다⁸⁾. 巢⁹⁾는 《諸病源候論》〈面肝黑黧候〉에서 병리기전과 형태에 대하여 구체적으로 언급하였는데 그는 肝斑의 원인을 風과 痰飲으로 보았고, 王¹⁰⁾은 肝斑이 婦女에게 多發한다고 하여 여성 특유의

性機能生理의 病變과 연관성이 있다고 인식하였다.

한약재를 이용한 미백 관련 연구로 송 등¹¹⁾은 赤何首烏가, 장¹²⁾은 柿葉이, 양 등¹³⁾은 山茱萸 추출물이, 박 등¹⁴⁾은 西施玉容散이 미백효과가 있다고 보고하였다.

美白散은 이미 연구¹⁵⁻¹⁷⁾를 통해 멜라닌 생성 억제 효과가 검증된 白芷, 天花粉, 黃柏 등을 주 구성약물로 한 처방으로 대전대학교 처방집¹⁸⁾에 기재되어있는 경험방이다. 따라서 저자는 美白散을 이용하여 미백 화장품 소재로 개발 가능성을 확인하고자 mouse의 melanoma cell인 B16F10을 이용하여 melanin 유리와 생성 및 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정하였으며, 작용 기전을 밝히기 위하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA, PKCβ, MMP-2, ERK-1, ERK-2, AKT-1 및 MITF 의 유전자 발현에 대하여 연구하였다.

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 美白散(MB)¹⁸⁾의 구성약물은 ○○ 병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of *Mibaeksan*(MB)

Herb name	Scientific name	Weight (g)
菟絲子	<i>CUSCUTAE SEMEN</i>	32
黃 精	<i>POLYGONATI RHIZOMA</i>	32
天花粉	<i>TRICHOSANTHIS RADIX</i>	16
黃 柏	<i>PHELLODENDRI CORTEX</i>	8
珍珠粉	<i>MARGARITA</i>	8
苦 蔘	<i>SOPHORAE RADIX ANGELICAE</i>	4
白 芷	<i>DAHURICAE RADIX</i>	4
TOTAL		104

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(MgCl₂)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, PKA, PKC β 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 vaccum 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), corncal 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

美白散 2첩 분량을 증류수 1,500 ml에 넣

고 열탕추출기에서 3시간 동안 가열 추출한 다음, 여과하여 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하고, freeze dryer로 동결건조하여 분말 19.1 g(수득율 9.2%)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) 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 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) 하여 세척한 후 실험에 사용하거나 필요시 액체질소에서 냉동 보관하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂를 사용한 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

4) B16F10 melanoma cell(melanocyte)

Proliferation 측정

세포를 2×10^4 cells/ml의 농도로 6 well plate에 넣고 6시간 배양하여 plate에 부

착시킨 다음, 분획하여 조제한 검액을 농도별로 첨가하여 1, 2, 3일간 배양하였다. 배양완료 후 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리한 다음, D-PBS로 희석하여 hemacytometer로 세포수를 계측하였다.

5) B16F10 Melanocyte의 Melanin 유리 및 생성량 측정

Melanin 유리 및 생성량 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 MB를 가하여 3일간 배양한 후(실험군), 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양을 측정하였는데, 약 24시간 후부터 세포내 melanin의 생성을 현미경으로 관찰할 수 있었다. 또한 세포내의 melanin 생성량을 측정하기 위하여 B16F10 melanoma cell에 α -MSH를 처리한 다음 MB를 가하여 3일간 배양하였다. 배양세포는 PBS로 2회 씻고 1,500 rpm으로 5분간 원심분리하여 수확하였다. 세포침전물에 1 ml의 증류수를 넣어 현탁 후 초음파로 분쇄하고, 다시 원심분리하여 침전물을 얻었다. 침전물을 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 합성멜라닌(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, 0.1 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 30 분간 incubation 시켰으며 매 10 분 간격으로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 활성은 아래에 표시한 식으로 구하였다.

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

A: 대조군 반응액의 흡광도

A': 대조군의 tyrosinase 대신 buffer 가한 반응액의 흡광도

B: 검액이 첨가된 반응액의 흡광도

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

7) B16F10 Melanocyte의 Tyrosinase 활성도 측정

B16F10 melanomacyte의 tyrosinase 활성은 Martinez-Esparza 등의 방법²¹⁾을 사용하였다. 배양된 B16F10 melanomacyte (정상군)에 α -MSH 10 μ M를 처리한 다음(대조군), 다시 300, 150, 75, 37 μ g/ml 농도의 MB를 가하여 3일간 배양 하였다(실험군). 배양된 세포를 trypsin-EDTA를 처리하여 수확한 다음, 11,000 rpm에서 30초간 원심분리하고, lysis 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.

8) 유전자 발현에 대한 영향

(1) 총 RNA 분리

배양하고 있는 B16F10 melanomacyte에 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 원심 분리하는 과정을 2번 반복함으로써 상층액을 분리하였다. 0.5 ml isopropyl alcohol을 이용하여 RNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하고 자연 건조시켰으며, 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 incubation 하였다. 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 tipping 혼합하였다. 이 후, 42°C에서 90분간 incubation 한 다음, 얼음에 방치하였다. 그리고 다시 H₂O 100 μ l을 첨가하여 -20°C에 보관하였다. 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 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 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 GGT를, antisense primer는 TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC 를 사용하였다. TRP-1의 sense primer는 GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC를, antisense primer는 AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT를 사용하였으며, TRP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT를, antisense primer는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC를 사용하였다. MMP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT를, antisense primer는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC를 사용하였다. PKA의 sense primer는 TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT를, antisense primer는 TATA GGC TGG TCA GCG AAG AA를 사용하였으며, PKC β 의 sense primer는 AGA ACC ACA AAT TCA CCG CC를, antisense primer는 TGA GAA CCT CTC TGT CGA TG를, ERK-1의 sense primer는 ATC AGA TCC TGA GAG GGC TA를, antisense primer는 CAG AGC TTT GGA GTC AGC AT를 사용하였다. ERK-2의 sense primer는 CAT TGT TCA GGA CCT CAT GG를, antisense primer는 AGA GCA TCT CAG CCA GAA TG를, AKT-1의 sense primer는 CCG CTA CTA TGC CAT GAA GA를, antisense primer는 AGC CCG AAG TCC GTT ATC TT를 사용하였다. 또한, MITF의 sense primer

는 TAG ACA TGC CAG CCA AGT CC를, antisense primer는 CGC TGT GAG CTC CCT TTT TA를 사용하였다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA를, antisense primer는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC를 사용하였다.. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C 4분, 30 cycles의(94 $^{\circ}$ C 30초, 59 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 45초), 72 $^{\circ}$ C 10분이었다. 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동하였다. 전기영동 결과 나온 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1을 이용하여 용량으로 산출하였다.

(4) Real time RT-PCR

우선 시험관에 정량한 RNA 5 μ g, random hexamer(50 pmol/3 μ l), 10 mM dNTP 1 μ l를 넣고 DEPC 처리된 증류수를 가하여 10 μ l의 RNA/primer mixture를 만들었다. 실험용 sample을 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 incubation 시킨 후 1분 이상 얼음물에 방치하였다. Reaction mixture로 10배의 RT buffer 2 μ l, 25mM MgCl₂ 4 μ l, 0.1 M DTT 2 μ l, RNase 1 μ l을 섞어 준비하였다. Tyrosinase의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT를, antisense primer는 TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC를 사용하였다. TRP-1의 sense primer는 GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC를, antisense primer는 AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT를 사용하였으며, TRP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT를, antisense primer는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC를 사용하였다. MMP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT를,

antisense primer는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC를 사용하였다. PKA의 sense primer는 TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT를, antisense primer는 TATA GGC TGG TCA GCG AAG AA를 사용하였으며, PKC β 의 sense primer는 AGA ACC ACA AAT TCA CCG CC를, antisense primer는 TGA GAA CCT CTC TGT CGA TG를, ERK-1의 sense primer는 ATC AGA TCC TGA GAG GGC TA를, antisense primer는 CAG AGC TTT GGA GTC AGC AT를 사용하였다. ERK-2의 sense primer는 CAT TGT TCA GGA CCT CAT GG를, antisense primer는 AGA GCA TCT CAG CCA GAA TG를, AKT-1의 sense primer는 CCG CTA CTA TGC CAT GAA GA를, antisense primer는 AGC CCG AAG TCC GTT ATC TT를 사용하였다. 또한, MITF의 sense primer는 TAG ACA TGC CAG CCA AGT CC를, antisense primer는 CGC TGT GAG CTC CCT TTT TA를 사용하였다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA를, antisense primer는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC를 사용하였다. 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, 사용 시까지 -20°C에 보관하였다. 각각

의 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 10 분 1 cycle, 95°C 15 초, 60°C 30초, 72°C 30초 40 cycles, 72°C 10 분 1 cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 μ l를 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. 실험결과

1. MB가 B16F10 Melanocyte의 Melanin 유리에 미치는 영향

B16F10 melanoma cell은 α -MSH(10 μ M)를 처리한 경우 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양이 현저하게 증가하였다. 그러나 MB는 300, 150 μ g/ml의 농도에서 melanin양을 대조군에 비해 각각 약 23%($p < 0.01$), 16%($p < 0.05$) 억제하였다(Fig. 1).

2. MB가 B16F10 Melanocyte의 Melanin 생성에 미치는 영향

세포내 용액으로부터 melanin을 정량한 결과, MB는 300, 150, 75 μ g/ml의 농도에서 melanin 생성을 대조군에 비해 각각 27%($p < 0.01$), 17%($p < 0.01$), 12%($p < 0.05$) 억제하였다(Fig. 2).

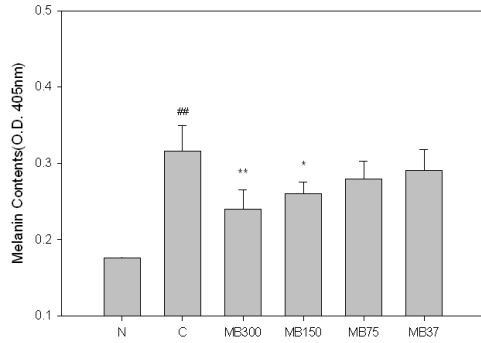


Fig. 1. Effects of MB on the release of melanin from B16F10 melanoma cells.

N(Normal) : Vehicle

C(Control) : α -MSH(10 μ M)

MB300 : α -MSH(10 μ M) + MB 300 μ g/ml

MB150 : α -MSH(10 μ M) + MB 150 μ g/ml

MB75 : α -MSH(10 μ M) + MB 75 μ g/ml

MB37 : α -MSH(10 μ M) + MB 37 μ g/ml

: $p < 0.01$ vs N

** : $p < 0.01$ vs C, * : $p < 0.05$ vs C

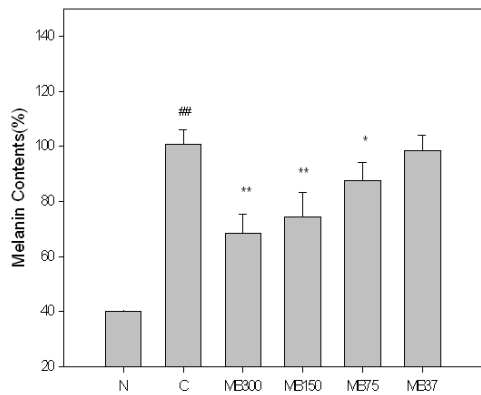


Fig. 2. Effects of MB on the production of melanin in B16F10 melanoma cells.

N(Normal) : Vehicle

C(Control) : α -MSH(10 μ M)

MB300 : α -MSH(10 μ M) + MB 300 μ g/ml

MB150 : α -MSH(10 μ M) + MB 150 μ g/ml

MB75 : α -MSH(10 μ M) + MB 75 μ g/ml

MB37 : α -MSH(10 μ M) + MB 37 μ g/ml

: $p < 0.01$ vs N

** : $p < 0.01$ vs C, * : $p < 0.05$ vs C

3. MB가 Mushroom Tyrosinase 활성에 미치는 영향

Mushroom tyrosinase 활성을 측정한다

결과, MB는 300, 150, 75 μ g/ml의 농도에서 mushroom tyrosinase 활성을 대조군에 비해 각각 약 35%($p < 0.01$), 20% ($p < 0.01$), 12%($p < 0.05$) 억제하였다(Fig. 3).

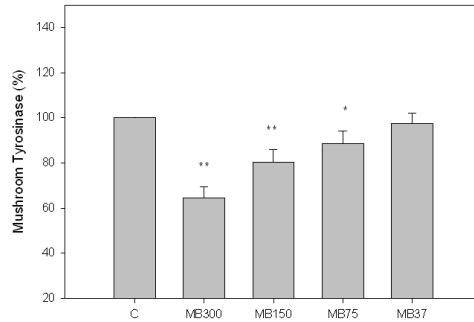


Fig. 3. Effects of MB on mushroom tyrosinase activity *in vitro*.

C(Control) : Vehicle

MB300 : MB 300 μ g/ml

MB150 : MB 150 μ g/ml

MB75 : MB 75 μ g/ml

MB37 : MB 37 μ g/ml

** : $p < 0.01$ vs C, * : $p < 0.05$ vs C

4. MB가 B16F10 Melanocyte의 Tyrosinase 활성에 미치는 영향

α -MSH(10 μ M)를 처리하여 B16F10 melanocyte의 tyrosinase 활성을 측정한 결과, MB는 300, 150 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 각각 27%($p < 0.01$), 23% ($p < 0.01$) 억제하였다(Fig. 4).

5. MB가 Tyrosinase 발현에 미치는 영향

α -MSH(10 μ M)를 처리한 경우 tyrosinase의 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, MB는 200, 100, 50 μ g/ml의 농도($p < 0.01$)와 25 μ g/ml의 농도($p < 0.05$)에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 5).

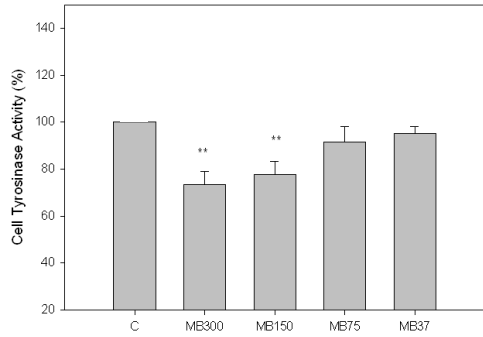
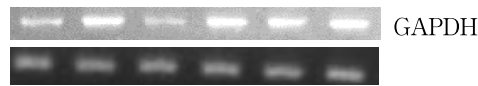


Fig. 4. Effects of MB on tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells.

C(Control) : α -MSH(10 μ M)
 MB300 : α -MSH(10 μ M) + MB 300 μ g/ml
 MB150 : α -MSH(10 μ M) + MB 150 μ g/ml
 MB75 : α -MSH(10 μ M) + MB 75 μ g/ml
 MB37 : α -MSH(10 μ M) + MB 37 μ g/ml
 ** : $p < 0.01$ vs C



Tyrosinase

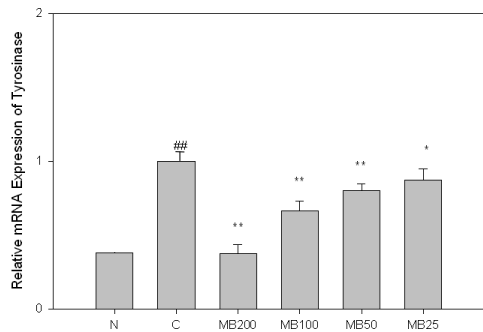


Fig. 5. Effects of MB on the expression of tyrosinase in B16F10 melanoma cells.

N(Normal) : Vehicle
 C(Control) : α -MSH(10 μ M)
 MB200 : α -MSH(10 μ M) + MB 200 μ g/ml
 MB100 : α -MSH(10 μ M) + MB 100 μ g/ml
 MB50 : α -MSH(10 μ M) + MB 50 μ g/ml
 MB25 : α -MSH(10 μ M) + MB 25 μ g/ml
 ## : $p < 0.01$ vs N
 ** : $p < 0.01$ vs C, * : $p < 0.05$ vs C

6. MB가 TRP-1 발현에 미치는 영향

TRP-1은 α -MSH(10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, MB는 200, 100, 50, 25 μ g/ml의 농도

에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.01$)억제하였다(Fig. 6).

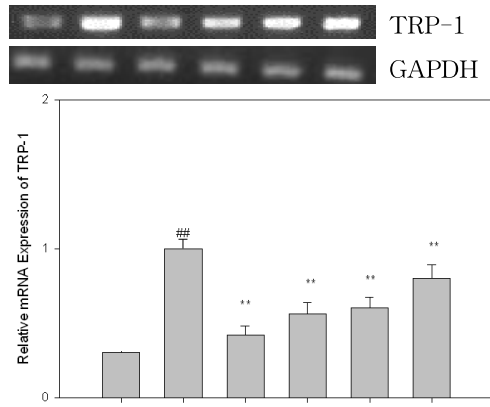


Fig. 6. Effects of MB on the expression of TRP-1 in B16F10 melanoma cells.

N(Normal) : Vehicle
 C(Control) : α -MSH(10 μ M)
 MB200 : α -MSH(10 μ M) + MB 200 μ g/ml
 MB100 : α -MSH(10 μ M) + MB 100 μ g/ml
 MB50 : α -MSH(10 μ M) + MB 50 μ g/ml
 MB25 : α -MSH(10 μ M) + MB 25 μ g/ml
 ## : $p < 0.01$ vs N
 ** : $p < 0.01$ vs C

7. MB가 TRP-2 발현에 미치는 영향

TRP-2는 α -MSH(10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, MB는 200, 100, 50 μ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.01$) 억제하였다(Fig. 7).

8. MB가 PKA 발현에 미치는 영향

PKA는 α -MSH(10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, MB는 200 μ g/ml 농도($p < 0.01$)와 100 μ g/ml 농도($p < 0.05$)에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 8).

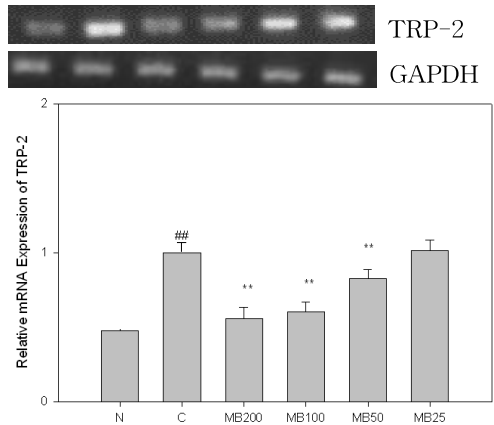


Fig. 7. Effects of MB on the expression of TRP-2 in B16F10 melanoma cells.
 N(Normal) : Vehicle
 C(Control) : α -MSH(10 μ M)
 MB200 : α -MSH(10 μ M) + MB 200 μ g/ml
 MB100 : α -MSH(10 μ M) + MB 100 μ g/ml
 MB50 : α -MSH(10 μ M) + MB 50 μ g/ml
 MB25 : α -MSH(10 μ M) + MB 25 μ g/ml
 #: $p < 0.01$ vs N
 **: $p < 0.01$ vs C

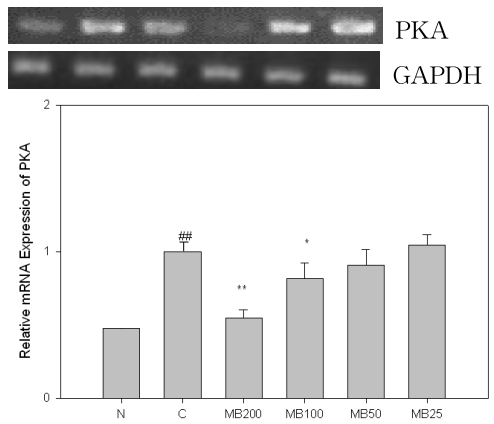


Fig. 8. Effects of MB on the expression of PKA in B16F10 melanoma cells.
 N(Normal) : Vehicle
 C(Control) : α -MSH(10 μ M)
 MB200 : α -MSH(10 μ M) + MB 200 μ g/ml
 MB100 : α -MSH(10 μ M) + MB 100 μ g/ml
 MB50 : α -MSH(10 μ M) + MB 50 μ g/ml
 MB25 : α -MSH(10 μ M) + MB 25 μ g/ml
 #: $p < 0.01$ vs N
 **: $p < 0.01$ vs C, * : $p < 0.05$ vs C

9. MB가 PKC β 발현에 미치는 영향

PKC β 는 α -MSH(10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, MB는 200, 100, 50 μ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.01$) 억제하였다(Fig. 9).

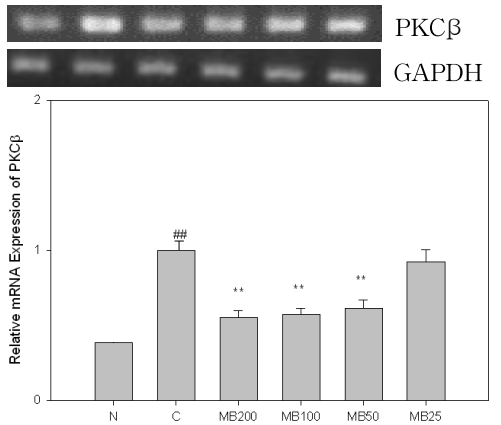


Fig. 9. Effects of MB on the expression of PKC β in B16F10 melanoma cells.
 N(Normal) : Vehicle
 C(Control) : α -MSH(10 μ M)
 MB200 : α -MSH(10 μ M) + MB 200 μ g/ml
 MB100 : α -MSH(10 μ M) + MB 100 μ g/ml
 MB50 : α -MSH(10 μ M) + MB 50 μ g/ml
 MB25 : α -MSH(10 μ M) + MB 25 μ g/ml
 #: $p < 0.01$ vs N
 **: $p < 0.01$ vs C

10. MB가 MMP-2 발현에 미치는 영향

MMP-2는 α -MSH(10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, MB는 200, 100 μ g/ml 농도($p < 0.01$)와 25 μ g/ml 농도($p < 0.05$)에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 10).

11. MB가 ERK-1 발현에 미치는 영향

ERK-1은 α -MSH(10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 감소하였으며, MB는 200, 100, 50 μ g/ml 농도에서 감소한 유전자 발현을 대조군에 비해 유

의성 있게($p < 0.01$) 증가시켰다(Fig. 11).

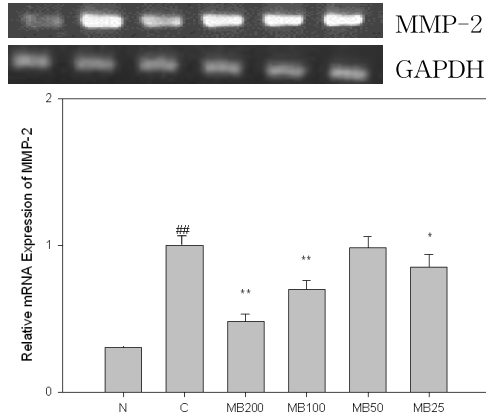


Fig. 10. Effects of MB on the expression of MMP-2 in B16F10 melanoma cells.

N(Normal) : Vehicle
 C(Control) : α -MSH(10 μ M)
 MB200 : α -MSH(10 μ M) + MB 200 μ g/ml
 MB100 : α -MSH(10 μ M) + MB 100 μ g/ml
 MB50 : α -MSH(10 μ M) + MB 50 μ g/ml
 MB25 : α -MSH(10 μ M) + MB 25 μ g/ml
 #: $p < 0.01$ vs N
 **: $p < 0.01$ vs C, * : $p < 0.05$ vs C

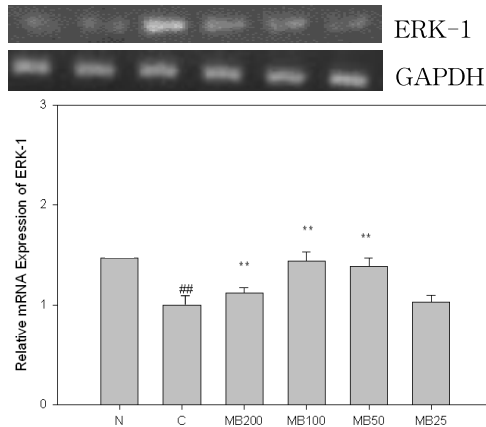


Fig. 11. Effects of MB on the expression of ERK-1 in B16F10 melanoma cells.

N(Normal) : Vehicle
 C(Control) : α -MSH(10 μ M)
 MB200 : α -MSH(10 μ M) + MB 200 μ g/ml
 MB100 : α -MSH(10 μ M) + MB 100 μ g/ml
 MB50 : α -MSH(10 μ M) + MB 50 μ g/ml
 MB25 : α -MSH(10 μ M) + MB 25 μ g/ml
 #: $p < 0.01$ vs N
 **: $p < 0.01$ vs C

12. MB가 ERK-2 발현에 미치는 영향

ERK-2는 α -MSH(10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 유의성 있게($p < 0.01$) 감소하였으며, MB는 200, 100, 50, 25 μ g/ml 농도에서 감소한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.01$) 증가시켰다(Fig. 12).

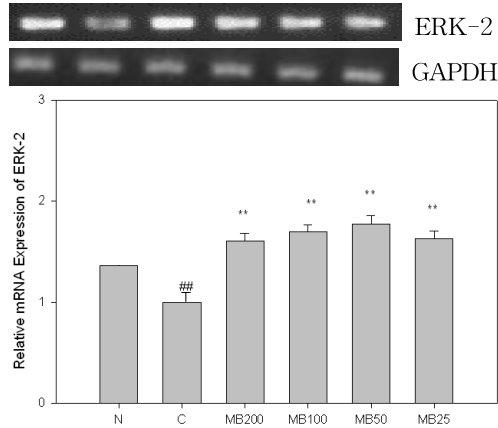


Fig. 12. Effects of MB on the expression of ERK-2 in B16F10 melanoma cells.

N(Normal) : Vehicle
 C(Control) : α -MSH(10 μ M)
 MB200 : α -MSH(10 μ M) + MB 200 μ g/ml
 MB100 : α -MSH(10 μ M) + MB 100 μ g/ml
 MB50 : α -MSH(10 μ M) + MB 50 μ g/ml
 MB25 : α -MSH(10 μ M) + MB 25 μ g/ml
 #: $p < 0.01$ vs N
 **: $p < 0.01$ vs C

13. MB가 AKT-1 발현에 미치는 영향

AKT-1은 α -MSH(10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 감소하였으며, MB는 200, 100, 50 μ g/ml 농도에서 감소한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.01$) 증가시켰다(Fig. 13).

14. MB가 MITF 발현에 미치는 영향

MITF는 α -MSH(10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, MB는 200, 100 μ g/ml 농도에서 증가

된 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.01) 감소시켰다(Fig. 14).

#: p<0.01 vs N
** : p<0.01 vs C

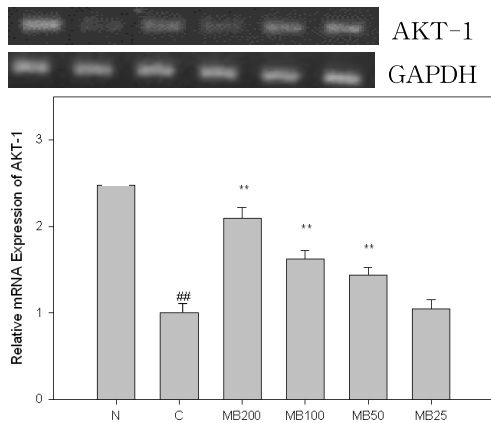


Fig. 13. Effects of MB on the expression of AKT-1 in B16F10 melanoma cells.

N(Normal) : Vehicle
C(Control) : α -MSH(10 μ M)
MB200 : α -MSH(10 μ M) + MB 200 μ g/ml
MB100 : α -MSH(10 μ M) + MB 100 μ g/ml
MB50 : α -MSH(10 μ M) + MB 50 μ g/ml
MB25 : α -MSH(10 μ M) + MB 25 μ g/ml
#: p<0.01 vs N
** : p<0.01 vs C

IV. 고 찰

미백화장품은 자외선에 의한 기미, 주근깨 등을 완화시키고 멜라닌 색소의 생성을 억제하는 목적으로 개발된 제품으로¹⁾, 최근 환경오염으로 인해 피부의 광노화를 촉진시키는 자외선 노출이 증가하고 있어 미백화장품에 대한 관심이 증가하고 있다.

한의학에서는 피부의 과색소 침착증에 대해 《黃帝內經·素門》 <至真要大論>⁷⁾에 “歲陽明在天, 燥淫所勝... 面鹿, 身無膏澤, 足外反熱”이라 하여 面塵으로 처음 언급된 이래 그 형태와 색조에 따라 黥點, 面黑, 雀卵, 斑點, 黧子, 雀斑, 肝斑 등 다양하게 표현되어 왔다^{8,12)}.

肝斑의 원인에 대해서 巢⁹⁾는 風과 痰 飲으로, 王¹⁰⁾은 思慮過多로 보았으며 특히 肝斑이 婦女에게 多發한다고 하여 여성 특유의 性機能生理의 病變과 연관성이 있다고 인식하였다. 吳²²⁾는 水火不調로 기인한다 하였는데 脾胃機能과 血液의 관계로 요약 할 수 있다.

한약재를 이용한 미백 관련 연구로 송 등¹¹⁾은 赤何首烏가, 장¹²⁾은 柿葉이, 양 등¹³⁾은 山茱萸 추출물이 멜라닌 생성억제 효과를 가지고 있다고 보고하였고, 박 등¹⁴⁾은 西施玉容散이, 이²³⁾는 麻黃 및 摩風膏가 미백효과가 있다고 보고하였다.

美白散은 대전대학교 처방집¹⁸⁾에 기재되어있는 경험방으로서 白芷, 苦參, 珍珠粉, 黃柏, 天花粉, 黃精, 菟絲子를 1 : 1 : 2 : 2 : 4 : 8 : 8의 비율로 분말하여

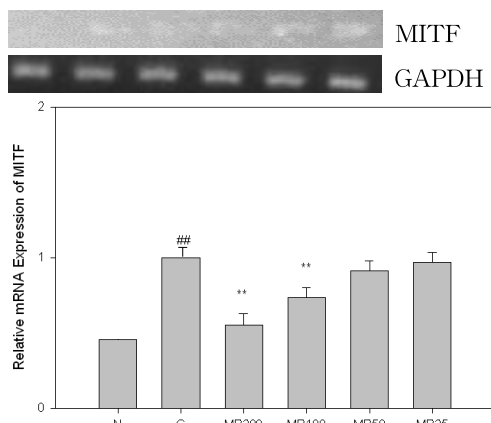


Fig. 14. Effects of MB on the expression of MITF in B16F10 melanoma cells.

N(Normal) : Vehicle
C(Control) : α -MSH(10 μ M)
MB200 : α -MSH(10 μ M) + MB 200 μ g/ml
MB100 : α -MSH(10 μ M) + MB 100 μ g/ml
MB50 : α -MSH(10 μ M) + MB 50 μ g/ml
MB25 : α -MSH(10 μ M) + MB 25 μ g/ml

매회 5 g을 물이나 오이즙에 개어서 안면에 30분 내외로 도포²⁴⁾하는 외용약이다. 美白散 구성약물의 효능을 살펴보면, 白芷는 祛風除濕 燥濕止痒, 苦參은 清熱燥濕, 祛風止痒, 珍珠粉은 生肌斂瘡 祛風豁痰, 黃柏은 瀉火解毒 清熱燥濕, 天花粉은 降火潤燥 消腫生肌, 黃精은 補中益氣 養陰益精, 菟絲子는 補陽益陰 養肌強陰하는 효능이 있다²⁵⁻²⁶⁾. 종합해보면 美白散은 祛風燥濕豁痰의 효과가 있어 肝斑의 원인이 되는 風濕邪와 痰을 없애고, 補陽益陰生肌함으로써 피부를 윤택하게 하고 재생시키는 효과가 있어 피부노화 및 색소침착 질환에 유효할 것으로 사료된다. 아울러 美白散의 구성약물 중 白芷, 天花粉, 黃柏은 이미 연구¹⁵⁻¹⁷⁾를 통해 멜라닌 생성 억제 효과가 있는 것으로 나타나 미백 화장품 소재로 개발 가능성을 확인하고자 美白散을 전탕하여 실험에 응용하였다.

이를 위하여 mouse의 melanoma cell인 B16F10을 이용하여 melanin 유리와 생성 및 tyrosinase 활성억제에 미치는 영향을 측정하였으며, 작용 기전을 밝히기 위하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA, PKC β , MMP-2, ERK-1, ERK-2, AKT-1 및 MITF 의 유전자 발현에 대하여 연구하였다.

Melanocyte에서 melanin 유리에 미치는 영향을 측정하기 위하여 마우스에서 얻은 흑색종의 일종인 B16F10 melanoma cell을 이용하였다. 300, 150, 75, 37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 MB를 72시간 처리한 다음 세포 배양액에 유출되는 melanin을 측정하였으며, 약 24시간 후부터 melanin의 생성을 현미경 관찰할 수 있었다. B16F10 melanoma cell은 α -melanocyte stimulating

hormone(α -MSH)에 의해 melanogenesis가 시작되며, α -MSH는 melanocyte의 세포막에 존재하는 melanocortin 1 receptor (Mc1R)을 통해 adenylylate cyclase를 활성화시켜 세포내 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)의 양을 증가시키고, 순차적으로 protein kinase A(PKA)를 활성화시켜 tyrosinase의 발현을 유도하거나 발현된 tyrosinase의 활성을 유도하는 것으로 알려져 있다²⁷⁻²⁸⁾.

실험 결과 B16F10 melanoma cell은 α -MSH(10 μM)를 처리한 경우 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양이 현저하게 증가하였다. 그러나 MB는 300, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 melanin양을 대조군에 비해 각각 약 23%, 16% 억제하였다(Fig. 1).

세포내의 melanin 생성을 억제하는지 여부를 측정하기 위하여 MB를 가하여 3일간 배양한 다음, 배양된 B16F10 melanoma cell을 PBS로 씻은 후 원심분리하여 얻은 세포를 파괴하였다. 세포를 파괴하고 다시 원심분리한 다음 얻어진 세포내 용액으로부터 melanin을 정량하였다. 실험 결과 세포내 용액으로부터 melanin을 정량한 결과, MB는 300, 150, 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 melanin 생성을 대조군에 비해 각각 27%, 17%, 12% 억제하였다(Fig. 2).

Melanin의 합성은 tyrosinase라는 enzyme에 의해 시작되어지는 연쇄적이며 특이적인 효소반응에 의해 일어난다⁴⁾. 그러므로 melanin 생성을 억제하는 피부 미백제 개발에는 tyrosinase의 활성을 억제하는 것이 필수적이다. mushroom tyrosinase의 저해제는 tyrosinase 활성부위 구리이온의 상태변화에 관여함으로써 tyrosinase의 산화, 환원과정을 조절할 수 있기 때문에, 버섯 tyrosinase를 이용한 시험관

내 tyrosinase 활성억제실험은 피부미백제의 개발에 있어서 유용한 일차 평가법으로 인정되고 있다²⁹⁾. 따라서 MB의 melanin 생성 억제 효과를 확인하기 위하여 MB가 mushroom의 tyrosinase 활성과 α -MSH를 처리한 melanocyte의 tyrosinase 활성에 미치는 영향을 측정하였다. Mushroom tyrosinase 활성을 측정한 결과, MB는 300, 150, 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 mushroom tyrosinase 활성을 대조군에 비해 각각 약 35%, 20%, 12% 억제하였다(Fig. 3). 또한 α -MSH(10 μM)를 처리하여 B16F10 melanocyte의 tyrosinase 활성을 측정한 결과, MB는 300, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조군에 비해 각각 27%, 23% 억제하였다(Fig. 4).

Melanocyte 세포내 유전자 발현이 증가하면 melanin 합성이 증가하게 되므로 tyrosinase 발현을 억제하면 melanin 합성을 억제할 수 있다³⁰⁾. 본 연구에서는 MB가 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 μM) 처리시 유전자 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, MB는 200, 100, 50, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 5).

TRP-1은 tyrosinase related protein으로 알려져 있는 단백질로서 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid(DHICA)를 흑갈색을 나타내는 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화하는 효소이며 TRP-2는 DCT라고도 불리는데 Dopa chrome을 DHICA로 이성화하는 효소이다³¹⁾. 따라서, TRP-1

와 TRP-2 발현을 억제하면 미백효과를 기대할 수 있다. MB가 melanin 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 TRP-1과 TRP-2의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. 실험 결과, TRP-1은 α -MSH(10 μM) 처리시 유전자 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, MB는 200, 100, 50, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 6). 또한, TRP-2는 α -MSH(10 μM) 처리시 유전자 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, MB는 200, 100, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 7).

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 유발한다³²⁾. 따라서, PKA 발현을 억제하는 경우 tyrosinase의 활성화 방지를 통하여 melanin 생성을 억제하게 된다. MB가 세포성을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 PKA의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, PKA는 α -MSH(10 μM) 처리시 유전자 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, MB는 200, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 8).

또한, PKC β 는 여러 효소를 인산화하

여 활성을 증가시키며, 세포의 증식을 자극하는 효소이다. 따라서, PKC β 의 활성이 증가하면 melanocyte의 기능이 증가한다³³⁾. 실험 결과, PKC β 는 α -MSH (10 μ M) 처리시 유전자 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, MB는 200, 100, 50 μ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 9).

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 있다³⁴⁾. 실험 결과, MMP-2는 α -MSH(10 μ M) 처리시 유전자 발현이 정상군에 비하여 현저히 증가하였으며, MB는 200, 100, 25 μ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 10).

ERK는 extracellular regulated kinase로 알려져 있는 세포내 신호전달단백질로 유전자 발현을 조절하는 인자로 알려져 있다³⁴⁾. 최근 melanogenesis의 signal로써 ERK pathway의 활성은 MITF의 ubiquitination으로 MITF가 degradation되어 melanin의 형성 억제를 유도한다는 연구결과가 보고되었다³⁵⁾. 따라서, ERK-1과 ERK-2의 발현이 증가하면 색소 생성이 억제될 수 있다. MB가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 ERK-1과 ERK-2의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, ERK-1은 α -MSH(10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 감소하였으며, MB는 200, 100, 50 μ g/ml 농도(p<0.01)에서 감소한 유전자 발현을 유의성 있게

증가시켰다(Fig. 11). ERK-2는 α -MSH (10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 유의성 있게 감소하였으며, MB는 200, 100, 50, 25 μ g/ml 농도에서 감소한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 12).

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 억제한다³⁶⁾. Tyrosinase의 발현 억제는 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다. 따라서, AKT-1의 발현이 증가하면 색소 생성이 억제될 수 있다. 본 연구에서는 MB가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 AKT-1의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, AKT-1은 α -MSH(10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 감소하였으며, MB는 200, 100, 50 μ g/ml 농도에서 감소한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 13).

MITF는 microphthalmia transcription factor로서 핵으로 이동하여 DNA의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 promoter에 결합하여 각각의 유전자 발현을 증가시켜 melanogenesis를 유도한다. 그러므로 MITF의 억제는 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 발현억제를 통하여 melanin 색소 생성을 억제할 수 있으므로 결과적으로 melanin 생성이 억제될 수 있다³⁶⁾. 본 연구에서는 MB가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 MITF의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험

험 결과, MITF는 α -MSH(10 μ M) 처리 시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, MB는 200, 100 μ g/ml 농도에서 증가된 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 14).

이상의 결과, 美白散은 melanin 생성에 관여하는 효소의 활성 및 유전자 발현 억제 효과를 보임으로써 향후 미백 기능성 화장품의 재료로 응용될 수 있으리라고 사료된다.

V. 결 론

피부 미백제를 개발하기 위한 연구의 일환으로 美白散(MB) 추출물을 이용하여 melanin 생성에 미치는 영향을 측정하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. MB는 B16F10 melanoma cell에서 melanin 유리 및 생성을 유의성 있게 억제하였다.
2. MB는 tyrosinase 활성을 *in vitro*와 B16F10 melanoma cell 수준에서 유의성 있게 억제하였다.
3. MB는 B16F10 melanoma cell에서 α -MSH에 의해 증가되는 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA, PKC β 및 MMP-2의 유전자 발현을 유의성 있게 억제하였다.
4. MB는 B16F10 melanoma cell에서 α -MSH에 의해 감소되는 유전자 조절 신호전달인자인 ERK-1, ERK-2 및 AKT-1의 발현을 유의성 있게 증가시켰다.
5. MB는 B16F10 melanoma cell에서 α -MSH에 의해 증가되는 MITF의 발

현을 유의성 있게 억제하였다.

□ 투 고 일 : 2009년 7월 28일

□ 심 사 일 : 2009년 8월 3일

□ 심사완료일 : 2009년 8월 10일

참고문헌

1. 김은기, 이향복. 기능성 화장품-미백. NEW & INFORMATION FOR CHEMICAL ENGINEERS. 2007;25(2):138-43.
2. 2000년 화장품공업협회 생산수입실적 자료.
3. 한덕희, 박길순. 미백화장품의 구매실태 및 만족도 분석. 한국패션뷰티학회지. 2006;4(4):42-55.
4. Kameyama K et al. Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase. TRP-1, TRP-2 and a melanogenic inhibitor. J. Invest Dermatol.. 1993;100:126.
5. J. Cabanes, S. Chazarra, F. Garcia-Carmona. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. J. Pharm Pharmacol. 1994 ;46:982.
6. M. Veronique, B. Friedrich. Tyrosinase and related protein in mammalian pigmentation. FEBS Letters. 1996;381 :165.
7. 楊維傑 編. 黃帝內經 素門. 臺化: 樂羣出版社業 有限公司. 1994;624-79.
8. 신연상, 노석선. 기미에 관한 문헌적 고찰. 대한의관과학회지. 1998;11(1):82-98.
9. 巢元方. 諸病源候論. 北京:人民軍醫出

- 版社. 2006;290.
10. 王肯堂. 證治準繩. 北京:中國中醫藥出版社. 1997;281.
 11. 송중석, 유동열. 적하수오의 멜라닌 생성 억제와 작용기전에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 2008;21(2):59-75.
 12. 장두현. 시엽의 멜라닌 생성억제와 작용기전에 관한 연구. 대전대 대학원. 2008.
 13. 양현옥 등. 산수유 추출물이 B16F10 melanoma 세포주의 멜라닌 생성에 미치는 영향. 동의병리학회지. 2002;16(4):818-22.
 14. 박지선 등. B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 대한 西施玉容散의 효과. 대한동의병리학회지. 2000;14(1):160-70.
 15. 홍의석 등. 백지의 α -Melanocyte Stimulating Hormone에 유도된 B16 흑색종 세포의 멜라닌 형성에 미치는 영향. 한방안이비인후피부과학회지. 2005;18(1):1-2.
 16. 이관순 등. 天花粉이 멜라닌 형성에 미치는 영향. 대한외관과학회지. 2001;14(1):209-25.
 17. 이종구 등. 황백으로부터 멜라닌 생합성 억제 물질의 분리. 생약학회지. 2007;38(4):387-93.
 18. 대전대학교 한방병원. 한방병원처방집. 대전:한국출판사. 2001:549.
 19. Hosoi J et al. Regulation of melanin synthesis of B16F10 mouse melanoma cells by vitamin D₃ and retinoic acid. Cancer Res. 1985;45:1474-8.
 20. Mason HS, Peterson EW. Melanoproteins I. Reaction between enzyme-generated quinones and amino acids. Biochim Biophys Acta. 1965;111:134-46.
 21. Martinez EM. Mechanism and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- α in B16F10 mouse melanoma cells. Eur. J. Biochem. 1998;225:139-46.
 22. 吳克潛. 病源辭典. 서울:萬岳出版社. 1975:458.
 23. 이상희. 麻黃 및 摩風膏의 미백효과에 관한 연구. 경희대학교 동서의학대학원. 2001.
 24. 한방여성의학 편찬위원회. 한방여성의학 상. 서울:정담. 2007:453, 455.
 25. 김창민 등. 중약대사전. 서울:정담. 1999:261, 4015, 4179, 4435, 5053, 5083.
 26. 전국한의학과대학본초학교수. 본초학. 서울:영림사. 1995:129, 182, 185, 514, 568, 594.
 27. Abdel MZ et al. Mitogenic and melanogenic stimulating of normal human melanocytes by melanotropic peptides. Proc Natl Acad Sci USA. Feb 28 1995;92(5):1789-93.
 28. Abdel MZ et al. The melanocortin-1 receptor and human pigmentation. Ann NY Acad Sci. Oct 20 1999;885:117-33.
 29. 山孝一 良, Hearing VJ.メラニン産生の制御因子. Fragrance Journal. 1990;6:24-8.
 30. Kim DS et al. A new 2-imino-1,3-thiazoline derivative. KHG22394, inhibits melanin synthesis in mouse B16 melanoma cells. Biol Pharm Bull. 2007;30(1):180-3.
 31. VJ Hearing, K Tsukamoto. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. J. Invest. Dermatol. 1999

- ;4:24-8.
32. Lee J, Kim YS, Park D. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(7):960-8.
 33. Bertolotto C et al. In B16 melanoma cells, the inhibition of melanogenesis by TPA results from PKC activation and diminution of microphthalmia binding to the M-box of the tyrosinase promoter. *Oncogene.* 1998;16(13):1665-70.
 34. Huang SC et al. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor- κ B and c-Jun. *Biochem. Pharmacol.* 2004;69(2):221-32.
 35. Kim DS et al. Sphingosin-1-phosphate decrease melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *J. Cell Sci.* 2003;116:1699.
 36. 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):2335-44.