

## 六味地黃湯合二至丸加減方이 멜라닌 생성과 관련 유전자 발현에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과교실

신선미, 유동열

### ABSTRACT

#### The Effect of *Yukmijihwangtanghapijihwangagambang* on Melanin Synthesis and Related Gene Expressions in B16F10 Mouse Melanoma Cell

Sun-Mi Shin, Dong-Youl Yoo

Dept. of Oriental Medicine Graduate School, Daejeon University

**Purpose:** This study was performed to elucidate the inhibitory effect of *Yukmijihwangtanghapijihwangagambang* (YM) on melanin synthesis in B16F10 melanoma cells.

**Methods:** To demonstrate the inhibitory effects of YM 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, PKA, PKC $\beta$ , ERK-1 ERK-2, AKT-1 and MITF in B16F10 melanoma cell.

#### Results:

1. YM decreased the release and production of melanin in B16F10 melanoma cells.
2. YM decreased tyrosinase activity *in vitro* and in B16F10 melanoma cells.
3. YM decreased the expression of tyrosinase, TRP-1, TRP-2 in B16F10 melanoma cells.
4. YM decreased the expression of PKA, PKC $\beta$  in B16F10 melanoma cells.
5. YM increased the expression of ERK-1, ERK-2 and AKT-1 in B16F10 melanoma cells.
6. YM decreased the expression of MITF in B16F10 melanoma cells.

**Conclusion:** From these results, it may be concluded that YM has antimelanogenetic effects.

**Key words:** *Yukmijihwangtanghapijihwangagambang* (YM), Melanin synthesis, TRP, PKA, PKC $\beta$ , ERK, AKT, MITF

## I. 서 론

피부가 자외선에 노출되거나 호르몬 등의 자극을 감지하면 표피의 기저층에 위치한 멜라닌 형성세포에 의해 멜라닌 색소의 생성이 촉진된다. 멜라닌은 자외선을 흡수 또는 산란시켜 자외선으로부터 피부가 손상되는 것을 방지하는 긍정적인 기능이 있는 반면, 색소 침착을 유발하는 부정적인 기능도 가지고 있다<sup>1,2)</sup>.

최근 환경오염으로 피부의 자외선 노출이 증가하고, 미용적인 이유로 피부 착색에 대한 관심이 높아지고 있어 효과적인 미백 소재를 발견하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>3,4)</sup>. 미백효과에 대한 연구는 구체적으로 tyrosinase 활성 억제, DOPA 산화 억제, 각질층 제거 촉진 및 자외선 차단 등에 대해서 이루어지고 있다<sup>5,6)</sup>.

한의학에서 색소침착증은 《黃帝內經·素門》 <至眞要大論><sup>7)</sup>에 面塵으로 처음 언급된 이래 黃褐斑, 胡蝶斑, 妊娠斑, 肝斑 등으로 다양하게 표현되고 있다. 보통 ‘기미’라 불리는 것이며, 임신 중인 여성이나 肝 질환 환자에게 많이 나타나서 妊娠斑, 肝斑이라 부르기도 한다<sup>8)</sup>.

黃褐斑의 발생 원인으로는 肝鬱氣滯, 脾虛, 衝任不調, 腎精虧損, 瘀血阻滯 등을 들 수 있는데, 六味地黃湯合二至丸加減方은 六味地黃湯合二至丸에서 白茯苓, 澤瀉, 牡丹皮를 去하고, 沙蔘, 菟絲子, 五味子, 當歸, 川芎을 加한 처방으로 만성 질환, 임신 등으로 인한 衝任不調, 腎精虧損으로 발생하는 黃褐斑을 치료하는데 사용되고 있다<sup>8,9)</sup>.

저자는 六味地黃湯合二至丸加減方の 미백효과를 실험적으로 확인하고자 mouse

의 melanoma cell인 B16F10을 이용하여 melanin 유리와 생성 및 tyrosinase 활성화에 미치는 영향을 측정하였으며, 작용 기전을 밝히기 위하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA, PKC $\beta$ , 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 六味地黃湯合二至丸加減方<sup>9)</sup> (이하 YM이라 함)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Scheme 1).

Scheme 1. Prescription of Yukmijihwangtanghapyijihwangagambang (YM)

Herb name	Scientific name	Weight (g)
沙 蔘	ADENOPHORAE RADIX	8
熟地黃	REHMANNIAE RADIX PREPARAT	6
山茱萸	CORNI FRUCTUS	6
山 藥	DIOSCOREAE RHIZOMA	6
菟絲子	CUSCUTAE SEMEN	6
女貞子	LIGUSTRI LUCIDI FRUCTUS	6
旱蓮草	ECLIPTAE HERBA	6
五味子	SCHIZANDRAE FRUCTUS	4
當 歸	ANGELICAE GIGANTIS RADIX	4
川 芎	CNIDII RHIZOMA	4
TOTAL		56

### 3) 시약 및 기기

#### (1) 시 약

본 실험에 사용된 시약 중 Hank's balanced salt solution, dimethyl sulfoxide (DMSO),  $\alpha$ -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, PKA, PKC $\beta$  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), CO<sub>2</sub> 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

YM 3침 분량을 증류수 1,500 ml에 넣고 열탕추출기에서 3시간 동안 가열 추출한 다음, 여과하여 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하고, freeze dryer로 동결 건조하여 분말 16.5 g (수득율 9.8%)을 얻었으며, 검액은 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 용해시켜 사용하였다.

### 2) 검액 조제

실험용 검액은 추출물을 PBS에 녹인 후 membrane filter (0.22  $\mu$ m)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 원심 분리 (1,000 rpm, 3분)를 하여 세척한 후 실험에 사용하거나 필요시 액체질소에서 냉동 보관하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 를 사용한 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

4) B16F10 Melanoma Cell (Melanocyte) Proliferation 측정

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

5) B16F10 Melanocyte의 Melanin 유리 및 생성량 측정

Melanin 유리 및 생성량 측정은 Hosoi 등의 방법<sup>10)</sup>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 µg/ml 농도의 YM을 가하여 3일간 배양한 후 (실험군), 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양을 측정하였는데, 약 24시간 후 부터 세포내 melanin의 생성을 현미경으로 관찰할 수 있었다.

또한 세포내의 melanin 생성량을 측정하기 위하여 B16F10 melanoma cell에 α-MSH를 처리한 다음 YM을 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 µl에 넣고 80°C에서 1시간 동안 처리하여 melanin을 용해시켰다. 405 nm에서 흡광도 (optical density)를 측정하였으며, melanin 정량은 합성멜라닌을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

6) Mushroom Tyrosinase 활성에 미치는 영향 측정

Tyrosinase 활성에 미치는 영향은 Mason and Peterson 등의 방법<sup>11)</sup>을 사용하였다. 즉, 0.1M phosphate buffer (pH 6.8) 150 µl, 3 mM L-tyrosine 수용액 20 µl, 검액 20 µl를 차례대로 가한 다음, 2,500 U/ml mushroom tyrosinase 10 µl를 가하여 반응을 시작하였다. 반응은 37°C에서 30분간 incubation 시켰으며 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 가  
한 반응액의 흡광도

B : 검액이 첨가된 반응 액의 흡광도

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

7) B16F10 Melanocyte의 Tyrosinase  
활성도 측정

B16F10 melanocyte의 tyrosinase 활성  
은 Martinez-Esparza 등의 방법<sup>12)</sup> 사용  
하였다. 배양된 B16F10 melanocyte에  $\alpha$ -  
MSH 10  $\mu$ M를 처리한 다음 (대조군),  
다시 200, 100, 50, 25  $\mu$ g/ml 농도의 YM  
을 가하여 3일간 배양하였다 (실험군).  
배양된 세포를 trysin-EDTA를 처리하여  
수확한 다음 11,000 rpm에서 30초간 원  
심분리하고 lysis buffer (10 mM sodium  
phosphate containing 1% Triton X-100  
and 0.1 mM PMSF)를 첨가한 다음, 얼  
음 상에서 30분간 흔들면서 세포를 용해  
시켰다. 다시 원심분리하고 얻어진 세포  
용액을 사용하여 tyrosinase 활성을 측정  
하였다.

8) 유전자 발현에 대한 영향

(1) 총 RNA 분리

배양하고 있는 B16F10 melanocyte에  
1 ml TRIzol reagent를 처리하여 총 RNA  
를 분리하였다. 분리한 RNA에 100  $\mu$ l  
phenol과 100  $\mu$ l chloroform/isoamylalcohol  
(24:1)을 넣고 잘 섞은 후 원심 분리하는  
과정을 2번 반복함으로써 상층액을 분리  
하였다. 0.5 ml isopropyl alcohol을 이용  
하여 RNA를 침전시킨 후 70% ethanol  
로 세척하고 자연 건조시켰다. RNAase  
free water에서 RNA를 녹인 후 RNase-free  
DNase를 첨가하고 -70°C에서 저장, 보관  
하였다.

(2) cDNA 제조

대조군 및 시험군에서 각각 분리한 total  
RNA 액 2  $\mu$ l (2  $\mu$ g RNA 함유)에 oligo  
dT 2  $\mu$ l (10 pM)을 넣은 후 조심스럽게  
혼합한 다음, 90°C에서 5분간 incubation  
하였다. Primer가 annealing 하도록 4°C  
로 유지하며 10  $\times$  RT buffer 2  $\mu$ l, 0.1M  
DTT 2  $\mu$ l, 10mM dNTP nucleotide mix  
1  $\mu$ l, reverse transcriptase 1  $\mu$ l를 가하고  
여기에 H<sub>2</sub>O 10  $\mu$ l을 첨가하여 20  $\mu$ l로 한  
다음, 아주 조심스럽게 손으로 tipping 혼  
합하였다. 이 후, 42°C에서 90분간 incubation  
한 다음, 얼음에 방치하였다. 그리고 다시  
H<sub>2</sub>O 100  $\mu$ l을 첨가하여 -20°C에 보관하  
였다. 각의 시약은 Amersham Bioscience  
(USA)에서 구입하였다.

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

Oligo dT 12-18  $\mu$ l, reaction buffer (50  
mM tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>,  
10 mM DTT, pH 8.3), 1 mM dNTP과  
200 unit M-MLV-RT를 분리한 RNA에  
처리하여 역전사를 수행함으로써 cDNA  
를 합성하였다. PCR은 total volume 15  
 $\mu$ 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 GGT이었으며,  
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. PKA의 sense primer는 TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT, antisense primer는 TATA GGC TGG TCA GCG AAG AA 을 사용하였으며, PKC $\beta$ 의 sense primer는 AGA ACC ACA AAT TCA CCG CC, antisense primer는 TGA GAA CCT CTC TGT CGA TG, ERK-1의 sense primer는 ATC AGA TCC TGA GAG GGC TA, antisense primer는 CAG AGC TTT GGA GTC AGC AT을 사용하였다. ERK-2의 sense primer는 CAT TGT TCA GGA CCT CAT GG, antisense primer는 AGA GCA TCT CAG CCA GAA TG이였으며, AKT-1의 sense primer는 CCG CTA CTA TGC CAT GAA GA, antisense primer는 AGC CCG AAG TCC GTT ATC TT을 사용하였다. 또한, MITF의 sense primer는 TAG ACA TGC CAG CCA AGT CC, antisense primer는 CGC TGT GAG CTC CCT TTT TA이였다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA이였으며, antisense primer는 CAC GAC ATA CTC AGC ACC GGC 이였다. PCR 조건은 94°C 4분, 30 cycles의 (94°C 30초, 59°C 30초, 72°C 45초), 72°C 10분이였다. 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동한다. 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  $\mu$ g, random hexamer (50 pmol/3  $\mu$ l), 10 mM dNTP 1  $\mu$ l를 넣고 DEPC 처리된 증류수를 가하여 10  $\mu$ l의 RNA/primer mixture를 만

들었다. 실험용 sample을 65°C에서 5분 간 incubation 시킨 후 1분 이상 얼음물에 방치하였다. Reaction mixture으로 10 배의 RT buffer 2  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l, 0.1 M DTT 2  $\mu$ l, RNAase 1  $\mu$ l을 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 이였다. PKA의 sense primer는 TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT, antisense primer는 TATA GGC TGG TCA GCG AAG AA 을 사용하였으며, PKC $\beta$ 의 sense primer는 AGA ACC ACA AAT TCA CCG CC, antisense primer는 TGA GAA CCT CTC TGT CGA TG, ERK-1의 sense primer는 ATC AGA TCC TGA GAG GGC TA, antisense primer는 CAG AGC TTT GGA GTC AGC AT을 사용하였다. ERK-2의 sense primer는 CAT TGT TCA GGA CCT CAT GG, antisense primer는 AGA GCA TCT CAG CCA GAA TG이였으며, ARK-1의 sense primer는 CCG CTA CTA TGC CAT GAA GA, antisense primer는 AGC CCG AAG TCC GTT ATC TT을 사용하였다. 또한, MITF의 sense primer는 TAG ACA TGC CAG CCA AGT CC, antisense primer는 CGC TGT GAG CTC CCT TTT TA이였다. Control로는 GAPDH

를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA이었으며, 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  $\mu$ 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  $\mu$ l를 가하고 다시 37°C에서 20분간 incubation 시킨 다음, 사용 시까지 -20°C에 보관하였다. 각각의 optical tube에 2배의 SYBR Green Mix 12.5  $\mu$ l, cDNA 0.2  $\mu$ l, 5 pmol/ $\mu$ l primer pair mix 1  $\mu$ l, 11.3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O를 넣고, 50°C 2분 1 cycle, 95°C 10 분 1 cycle, (95°C 15초, 60°C 30초, 72°C 30초) 40 cycles, 72°C 10분 1 cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 5 $\mu$ 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. YM이 B16F10 Melanocyte의 Melanin 유리에 미치는 영향

YM은 300, 150  $\mu$ g/ml의 농도에서 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양을 대조

군에 비해 각각 약 25%, 16% ( $p < 0.01$ ) 억제하였다(Fig. 1).

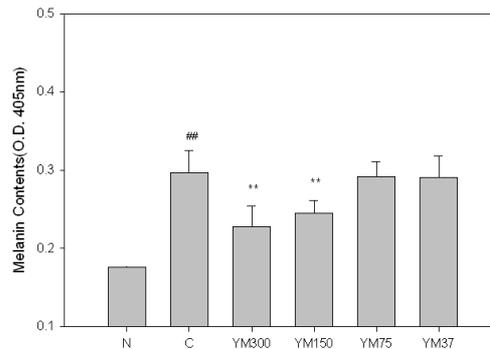


Fig. 1. Effects of YM on the release of melanin from B16F10 melanoma cells. Melanin were determined in the culture medium after 72hrs incubation.

N(Normal) : Vehicle

C(Control) :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)

YM300 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 300  $\mu$ g/ml of YM

YM150 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 150  $\mu$ g/ml of YM

YM75 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 75  $\mu$ g/ml of YM

YM37 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 37  $\mu$ g/ml of YM

## :  $p < 0.01$  vs N

\*\* :  $p < 0.01$  vs C

### 2. YM이 B16F10 Melanocyte의 Melanin 생성에 미치는 영향

세포내 용액으로부터 melanin을 정량한 결과, YM은 300, 150  $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 경우 melanin 생성을 대조군에 비해 각각 34%, 13% ( $p < 0.01$ ) 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2).

### 3. YM이 Mushroom Tyrosinase 활성에 미치는 영향

YM은 300, 150  $\mu$ g/ml의 농도로 가한 후 측정된 mushroom tyrosinase 활성을 대조군에 비해 각각 약 40%, 19% ( $p < 0.01$ ) 억제하였다(Fig. 3).

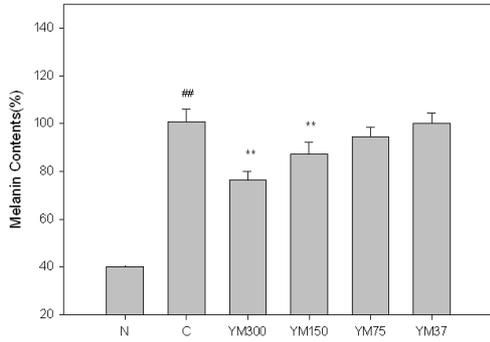


Fig. 2. Effects of YM on the production of melanin in B16F10 melanoma cells. Melanin were determined in the cell after 72hrs incubation.

N(Normal) : Vehicle

C(Control) :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)

YM300 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 300  $\mu$ g/ml of YM

YM150 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 150  $\mu$ g/ml of YM

YM75 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 75  $\mu$ g/ml of YM

YM37 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 37  $\mu$ g/ml of YM

#:  $p < 0.01$  vs N

\*\* :  $p < 0.01$  vs C

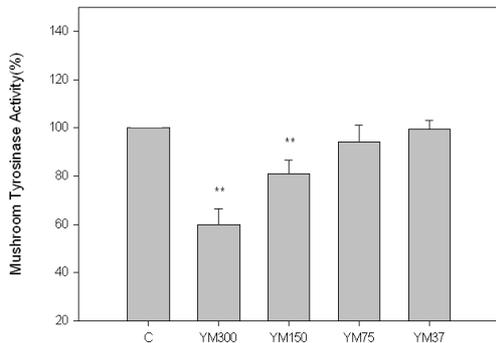


Fig. 3. Effects of YM on mushroom tyrosinase activity *in vitro*.

C(Control) :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)

YM300 : 300  $\mu$ g/ml of YM

YM150 : 150  $\mu$ g/ml of YM

YM75 : 75  $\mu$ g/ml of YM

YM37 : 37  $\mu$ g/ml of YM

\*\* :  $p < 0.01$  vs C

#### 4. YM이 B16F10 Melanocyte의 Tyrosinase 활성에 미치는 영향

YM은 300, 150  $\mu$ g/ml의 농도로 가한 후 측정된 B16F10 melanocyte의 tyrosinase 활성을 대조군에 비해 각각 30%, 19%

( $p < 0.01$ ) 억제하였다(Fig. 4).

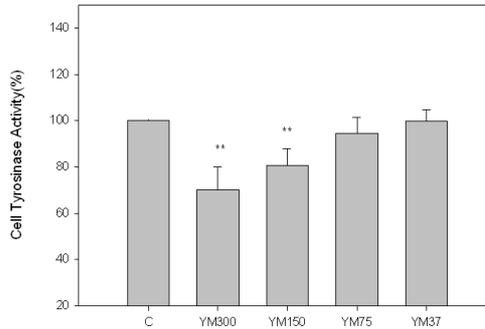


Fig. 4. Effects of YM on tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells.

C(Control) :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)

YM300 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 300  $\mu$ g/ml of YM

YM150 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 150  $\mu$ g/ml of YM

YM75 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 75  $\mu$ g/ml of YM

YM37 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 37  $\mu$ g/ml of YM

\*\* :  $p < 0.01$  vs C

#### 5. YM이 Tyrosinase 발현에 미치는 영향

Tyrosinase는  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. YM은 200, 100, 50, 25  $\mu$ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 ( $p < 0.01$ ) 억제하였다(Fig. 5).

#### 6. YM이 TRP-1 발현에 미치는 영향

TRP-1은  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. YM은 200, 100, 50  $\mu$ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 ( $p < 0.01$ ) 억제하였다(Fig. 6).

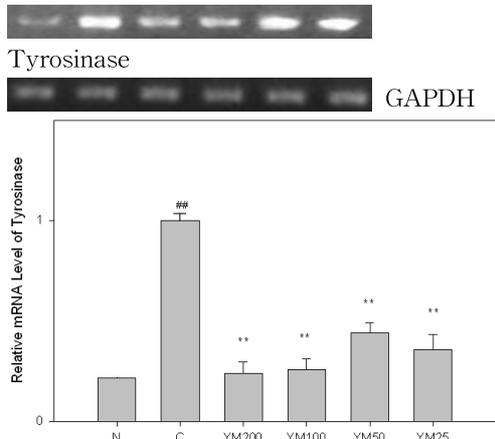


Fig. 5. Effects of YM on the expression of tyrosinase in B16F10 melanoma cells. N(Normal) : Vehicle  
C(Control) :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)  
YM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of YM  
YM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of YM  
YM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of YM  
YM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of YM  
## :  $p < 0.01$  vs N  
\*\* :  $p < 0.01$  vs C

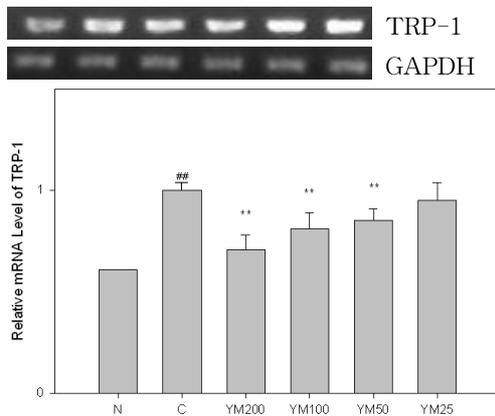


Fig. 6. Effects of YM on the expression of TRP-1 in B16F10 melanoma cells. N(Normal) : Vehicle  
C(Control) :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)  
YM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of YM  
YM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of YM  
YM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of YM  
YM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of YM  
## :  $p < 0.01$  vs N  
\*\* :  $p < 0.01$  vs C

### 7. YM이 TRP-2 발현에 미치는 영향

TRP-2는  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. YM은 200, 100, 50  $\mu$ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 ( $p < 0.01$ ) 억제하였다(Fig. 7).

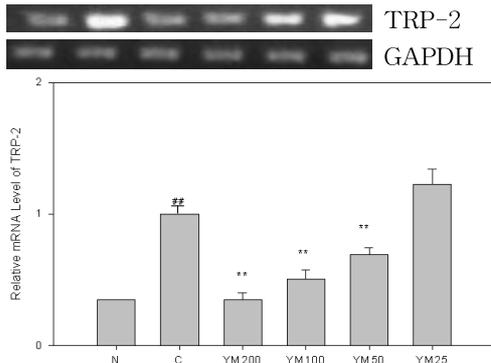


Fig. 7. Effects of YM on the expression of TRP-2 in B16F10 melanoma cells. N(Normal) : Vehicle  
C(Control) :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)  
YM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of YM  
YM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of YM  
YM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of YM  
YM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of YM  
## :  $p < 0.01$  vs N  
\*\* :  $p < 0.01$  vs C

### 8. YM이 PKA 발현에 미치는 영향

PKA는  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. YM은 200, 100, 50  $\mu$ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 ( $p < 0.01$ ) 억제하였다(Fig. 8).

### 9. YM이 PKC $\beta$ 발현에 미치는 영향

PKC $\beta$ 는  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. YM은 200, 100, 50  $\mu$ g/ml의 농도 ( $p < 0.01$ )와 25  $\mu$ g/ml 농도 ( $p < 0.05$ )에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 억제하였다(Fig. 9).

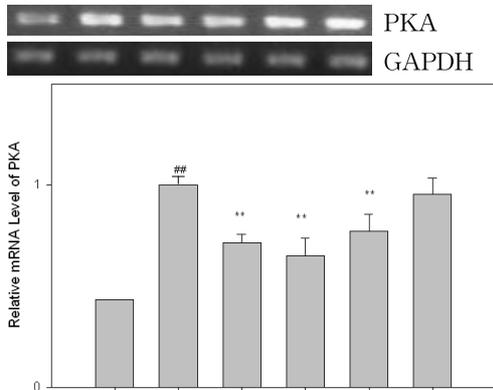


Fig. 8. Effects of YM on the expression of PKA in B16F10 melanoma cells.

N(Normal) : Vehicle

C(Control) :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)

YM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of YM

YM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of YM

YM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of YM

YM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of YM

#:  $p < 0.01$  vs N

\*\* :  $p < 0.01$  vs C

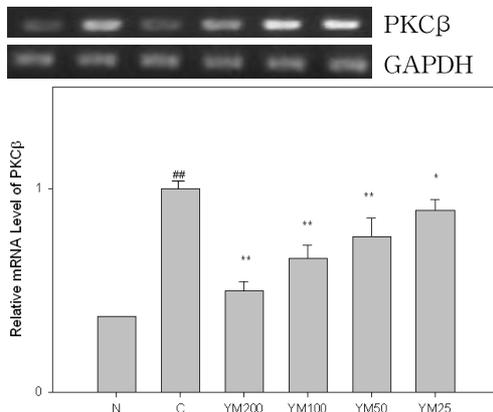


Fig. 9. Effects of YM on the expression of PKC $\beta$  in B16F10 melanoma cells.

N(Normal) : Vehicle

C(Control) :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)

YM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of YM

YM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of YM

YM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of YM

YM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of YM

#:  $p < 0.01$  vs N

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

#### 10. YM이 ERK-1 발현에 미치는 영향

ERK-1은  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리시 발

현이 정상군에 비해 현저히 감소하였다. YM은 100, 50  $\mu$ g/ml의 농도 ( $p < 0.05$ )와 25  $\mu$ g/ml의 농도 ( $p < 0.01$ )에서 감소한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다(Fig. 10).

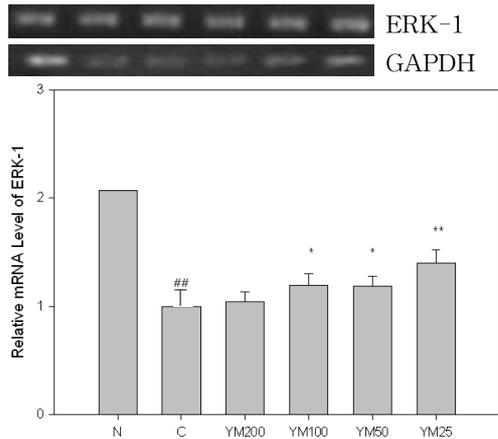


Fig. 10. Effects of YM on the expression of ERK-1 in B16F10 melanoma cells.

N(Normal) : Vehicle

C(Control) :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)

YM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of YM

YM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of YM

YM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of YM

YM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of YM

#:  $p < 0.01$  vs N

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

#### 11. YM이 ERK-2 발현에 미치는 영향

ERK-2는  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 감소하였다. YM은 200, 100, 50, 25  $\mu$ g/ml 농도에서 감소한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 ( $p < 0.01$ ) 증가시켰다(Fig. 11).

#### 12. YM이 AKT-1 발현에 미치는 영향

AKT-1은  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 감소하였다. YM은 200, 100, 50  $\mu$ g/ml 농도 ( $p < 0.01$ )와 25  $\mu$ g/ml 농도 ( $p < 0.05$ )에서  $\alpha$ -MSH

에 의해 감소한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다(Fig. 12).

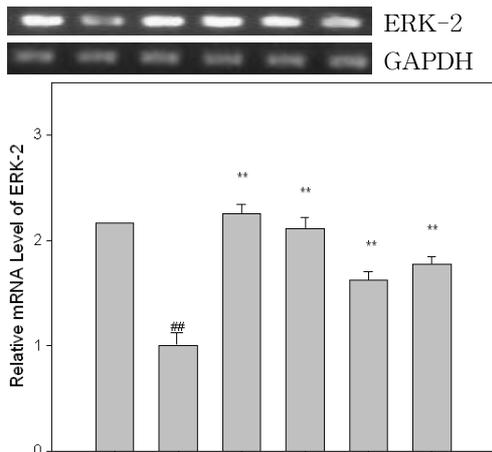


Fig. 11. Effects of YM on the expression of ERK-2 in B16F10 melanoma cells.  
 N(Normal) : Vehicle  
 C(Control) :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)  
 YM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of YM  
 YM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of YM  
 YM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of YM  
 YM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of YM  
 # :  $p < 0.01$  vs N  
 \*\* :  $p < 0.01$  vs C

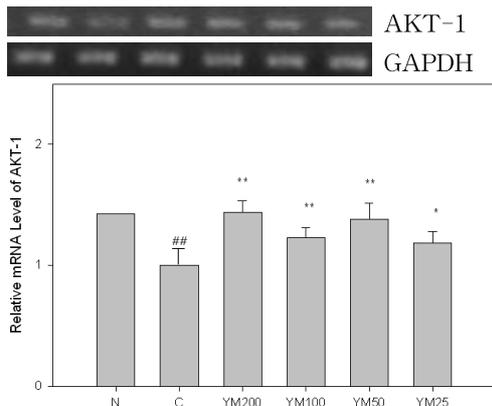


Fig. 12. Effects of YM on the expression of AKT-1 in B16F10 melanoma cells.  
 N(Normal) : Vehicle  
 C(Control) :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)  
 YM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of YM  
 YM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of YM  
 YM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of YM

YM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of YM  
 # :  $p < 0.01$  vs N  
 \*\* :  $p < 0.01$  vs C, \* :  $p < 0.05$  vs C

### 13. YM이 MITF 발현에 미치는 영향

MITF는  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. YM은 200, 100, 50  $\mu$ g/ml 농도 ( $p < 0.01$ )와 25  $\mu$ g/ml 농도 ( $p < 0.05$ )에서  $\alpha$ -MSH에 의해 증가된 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다(Fig. 13).

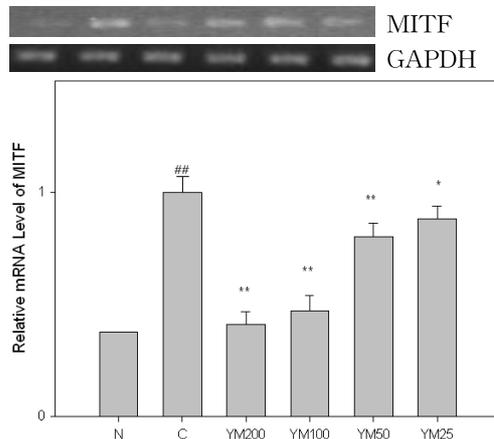


Fig. 13. Effects of YM on the expression of MITF in B16F10 melanoma cells.  
 N(Normal) : Vehicle  
 C(Control) :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M)  
 YM200 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 200  $\mu$ g/ml of YM  
 YM100 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 100  $\mu$ g/ml of YM  
 YM50 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 50  $\mu$ g/ml of YM  
 YM25 :  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) + 25  $\mu$ g/ml of YM  
 # :  $p < 0.01$  vs N  
 \*\* :  $p < 0.01$  vs C, \* :  $p < 0.05$  vs C

## IV. 고 찰

피부의 기저층에는 멜라닌 형성세포가 존재하며 세포분열에 의해 점차 위쪽으로 이동하게 되는데, 멜라닌 형성세포에서 형성되는 멜라닌 색소에 의해 기미와 같은 피부색소침착이 발생하게 된다. 멜

라닌 색소의 생성조절이나 피부의 침착 정도는 유전적, 환경적, 호르몬 요인 등에 의해 결정된다<sup>2,13</sup>.

미백의 기전과 관련된 연구는 다음의 네 가지 관점에서 주로 연구되어 왔다. 첫째, melanin 합성의 주효소인 tyrosinase 활성을 조절하기 위하여 tyrosinase 합성 저해물질이나, tyrosinase의 기질에 대한 길항물질을 개발하는 연구, 둘째, melanin 생합성 장소인 melanocyte의 기능을 저하시키기 위해 melanocyte에 독성을 나타내는 물질을 개발하는 연구, 셋째, Dopa의 산화방지를 위해 dopa 환원 물질을 개발하는 연구, 넷째, 멜라닌 생성기구인 tyrosinase와 DOPochrome에서 DHIC로의 변환을 촉매하는 제2효소인 DOPochrome tautomerase, DHICA (dihydroxyindole carboxylic acid)에서 indole-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 변환을 촉매하는 제3의 효소의 활성을 동시에 감소시키는 연구가 진행되어 왔다<sup>5</sup>.

사실 지금까지 많은 연구들은 피부의 비정상적인 색소 침착에 대하여 멜라닌 합성과정의 메카니즘을 규명 하는데 초점이 맞춰졌으며 이러한 관계로 tyrosinase 저해제 개발에 집중되어 왔다. 현재 tyrosinase 저해제로써 잘 알려진 arbutin, kojic acid, vitamin C와 같은 물질들을 tyrosinase 활성도뿐만 아니라 멜라닌 생성과정의 최종산물인 멜라닌 양까지 억제한다. 그러나 vitamin C는 자체가 불안정하고 arbutin, kojic acid 등은 이미 의약품이나 미백제로 사용되고 있지만 세포독성, 돌연변이 유발 등의 부작용이 보고되고 있어, 활성 및 안전성에 문제점이 있다<sup>3,14-16</sup>.

이러한 이유로 미백 효과가 있는 천연

물로부터 소재를 발굴하기 위해 한약재를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다.

한약재를 이용한 미백과 멜라닌 생성 억제 관련 연구로는 獨活寄生湯<sup>17</sup>, 逍遙散加減方<sup>18</sup>, 丹梔逍遙散<sup>19</sup>, 羌活續斷湯<sup>20</sup> 등 한약복합제에 대한 연구가 있으며, 天花粉<sup>21</sup>, 白芨<sup>22</sup>, 뽕나무가지<sup>23</sup>, 赤何首烏<sup>24</sup>, 柿葉<sup>25</sup>, 白朮<sup>26</sup> 등의 단미제의 연구가 있다.

한의학에서 색소침착증은 《黃帝內經·素門》<至真要大論><sup>7</sup>에 “歲陽明在天, 燥淫所勝, 則霧霧清暝, 民病喜嘔, 嘔有苦, 善太息, 心脇痛不能反側, 甚則噎乾面塵, 身無膏澤, 足外反熱”이라 하여 面塵으로 처음 언급된 이래 黃褐斑, 胡蝶斑, 妊娠斑, 肝斑 등으로 다양하게 표현되고 있다<sup>8</sup>.

黃褐斑의 한의학적 病因을 살펴보면, 첫째는 肝鬱氣滯로 정서적 손상이나 정신적 긴장 등에 의해 肝氣의 鬱滯가 발생하고, 이로 인한 氣血의 정체로 안면에 氣血의 濡養이 이루어지지 못하여 발생한다. 둘째는 脾虛로 思慮傷脾하거나 과로 등으로 脾氣의 손상이 일어나 氣血의 허약을 유발해 발생한다. 셋째는 衝任不調, 腎精虧損로 만성질환, 임신 등으로 衝任不調하거나 腎精의 虧損으로 발생한다. 넷째는 瘀血阻滯로 상기의 病因의 만성적인 경과에 의해 유발된 瘀血이나 체질적 인자 등에 의한 瘀血로 인해 脈絡의 阻滯가 발생한다. 이 중 六味地黃湯合二至丸加減方은 衝任不調, 腎精虧損로 발생한 黃褐斑에 쓰이는 처방으로 흑갈색의 비교적 짙은 기미가 안면에 있으며, 어지럼증과 이명, 허리와 무릎의 시큰거림, 월경 불순 등의 증상을 동반

할 때 사용된다<sup>8)</sup>.

六味地黃湯은 錢乙의 《小兒藥證直結》<sup>27)</sup>에 최초로 收錄된 처방으로 腎陰虛로 인한 諸證을 치료하는데 사용되어 왔고, 한방부인과 임상에서는 腎虛로 인한 月水不調, 咳嗽, 帶下, 產前產後雜病을 치료하는데 두루 사용되고 있다<sup>28)</sup>. 二至丸은 《醫方集解》<sup>29)</sup>에 收錄된 처방으로 女貞子, 旱蓮草로 구성되어 補腎養肝하는 효능이 있으며, 肝腎陰虛로 口苦咽乾, 頭昏眼花, 腰膝酸軟, 遺精 등의 증상을 치료한다<sup>30)</sup>. 六味地黃湯合二至丸에서 白茯苓, 澤瀉, 牡丹皮를 去하고, 沙參, 菟絲子, 五味子, 當歸, 川芎을 加한 처방이다<sup>8,9)</sup>.

六味地黃湯合二至丸加減方 구성약물의 효능을 살펴보면, 沙參은 養陰清肺, 祛痰止咳, 熟地黃은 滋陰補血, 益精填髓, 山茱萸는 補益肝腎, 澀精固脫, 山藥은 健脾, 補肺, 固腎, 益精, 菟絲子는 補肝腎, 益精髓, 明目, 止瀉, 女貞子는 滋補肝腎, 明目烏髮, 旱蓮草는 補腎益陰, 涼血止血, 五味子는 斂肺, 滋腎, 生津, 收汗, 澀精, 當歸는 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸, 川芎은 活血行氣, 祛風止痛하는 효능이 있다<sup>31)</sup>. 이로 보아 六味地黃湯合二至丸加減方은 滋腎養肝, 益精填髓하므로 衝任不調, 腎精虧損으로 인해 발생하는 피부질환에 효과가 있을 것으로 생각되어 이번 연구에 응용하였다.

본 연구에서는 六味地黃湯合二至丸加減方の 미백효과를 실험적으로 확인하고자, mouse melanoma cell인 B16F10을 이용하여 melanin 유리와 생성 및 tyrosinase의 활성화에 미치는 영향을 측정하였으며, 그 작용기전을 밝히기 위하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA, PKC $\beta$ , ERK-1,

ERK-2, AKT-1, MITF 등의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하였다.

Melanocyte에서 melanin 유리에 미치는 영향을 측정하기 위하여 마우스에서 얻은 흑색종의 일종인 B16F10 melanoma를 이용하였다. 세포 독성이 없는 농도인 300, 150, 75, 37  $\mu\text{g/ml}$  농도로 YM을 72시간 처리한 다음 세포 배양액에 유출되는 melanin을 측정하였으며, 약 24시간 후부터 melanin의 생성을 현미경으로 관찰할 수 있었다.

Melanin은 외부 스트레스로부터 피부를 방어하는 기전의 일환으로 melanocyte에서 합성되고<sup>2)</sup>, melanocyte는 자외선 등의 자극에 의해 각질형성세포에서 분비되는  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone) 같은 인자들에 의해 피부색소를 증가시키게 되는데<sup>32)</sup>,  $\alpha$ -MSH는 melanocyte의 막에 있는 MC1에 결합하여 cAMP를 활성화시키고, 이것은 다시 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 유전자의 발현을 유도하는 MITF를 활성화시켜 결과적으로 멜라닌의 생성을 증가시킨다<sup>33,34)</sup>.

실험 결과, B16F10 melanoma cell은  $\alpha$ -MSH (10  $\mu\text{M}$ )를 처리한 경우 세포 배양액에서 유출되는 melanin의 양이 현저하게 증가하였으며, YM은 300, 150  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양을 대조군에 비해 각각 약 25%, 16% 억제하였다(Fig. 1).

세포내의 melanin 생합성을 억제하는지 여부를 측정하기 위하여 YM을 가하여 3일간 배양한 다음, 배양된 B16F10 melanoma cell을 PBS로 씻은 후 원심분리하여 얻은 세포를 파괴하였다. 세포를 파괴하고 다시 원심분리한 다음 얻어진 세포내 용액으로부터 melanin을 정량하

였다. 실험 결과, YM은 300, 150  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 경우 melanin 생성을 대조군에 비해 각각 34%, 13% 억제하였다(Fig. 2).

Melanin 합성은 melanosome 내에 존재하는 tyrosinase라는 enzyme에 의해 시작되어지는 연쇄적이며 특이적인 효소 반응을 통해 이루어진다. 이 tyrosinase는 L-tyrosine을 산화시켜 L-DOPA를 만드는 tyrosine hydroxylase로 작용하며 또한, DOPA (3,4-dihydroxy phenylalanine)를 산화시켜 DOPAquinone을 만드는 DOPA oxidase로 작용하여 melanin을 합성하는 중요한 효소로 알려져 있다<sup>35</sup>. 따라서 YM이 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, mushroom의 tyrosinase를 이용한 시험관내 tyrosinase 활성억제 실험은 피부미백제의 개발에 있어서 유용한 일차 평가법으로 인정되고 있다<sup>36</sup>. 실험 결과, YM은 300, 150  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 가한 후 측정된 mushroom tyrosinase 활성을 대조군에 비해 각각 약 40%, 19% 억제하였다(Fig. 3).

Melanocyte에서의 melanin의 합성하는 과정은 세포 외적 인자인 UV,  $\alpha$ -MSH, TGFbeta와 각종 cytokine에 의해 조절된다<sup>37</sup>. 따라서 약물이 실제로 세포 상태의 tyrosinase 활성을 저해할 수 있는지를 평가하는 것은 중요한 일이라 할 수 있다. 실험결과, YM은 300, 150  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 가한 후 측정된 melanocyte의

tyrosinase 활성을 대조군에 비해 각각 30%, 19% 억제하였다(Fig. 4).

본 연구에서는 YM이 melanin 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 tyrosinase의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. 실험 결과, Tyrosinase는  $\alpha$ -MSH (10  $\mu\text{M}$ ) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. YM은 200, 100, 50, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 억제하였다(Fig. 5).

TRP-1은 tyrosinase related protein으로 알려져 있는 단백질로서 TRP-2에 의해 생성된 DHICA (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)를 oxidation 시켜 IQCA (indole-2-carboxylic acid)를 생성하는데, IQCA는 흑갈색을 나타낸다<sup>38,39</sup>. 따라서 YM이 melanin 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 TRP-1, TRP-2의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR 및 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. 실험 결과, TRP-1은  $\alpha$ -MSH (10  $\mu\text{M}$ ) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. YM은 200, 100, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 억제하였다(Fig. 6). 또한, TRP-2는  $\alpha$ -MSH (10  $\mu\text{M}$ ) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였고, YM은 200, 100, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 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 증

식에 관여하는 것으로 알려져 있다. PKA의 활성 증가는 tyrosinase의 인산화와 활성 증가를 유발한다<sup>40)</sup>. 따라서 PKA 발현을 억제하는 경우 tyrosinase의 활성화를 방지를 통하여 melanin 생성을 억제하게 된다. YM이 세포성을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 PKA의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, PKA는  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. YM은 200, 100, 50  $\mu$ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 억제하였다(Fig. 8).

PKC $\beta$ 는 protein kinase C의  $\beta$ -isoform으로, tyrosinase의 cytoplasmic domain에 포함되어 있는 2개의 serine residue (잔기)를 인산화함으로써 결과적으로 tyrosinase를 활성화시켜 melanin 생성을 촉진시킨다<sup>41)</sup>. 따라서 PKC $\beta$ 의 활성이 증가하면 melanocyte의 기능이 증가한다. 실험 결과 PKC $\beta$ 는  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. YM은 200, 100, 50, 25  $\mu$ g/ml의 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 억제하였다(Fig. 9).

ERK는 extracellular regulated kinase로 알려져 있는 세포내 신호전달단백질로 유전자 발현을 조절하는 인자로 알려져 있으며, ERK의 활성은 MITF (Microphthalmia-associated transcription factor)의 인산화와 그에 수반되는 degradation을 유도하여 melanin 합성을 감소시킴으로써 melanin 합성에 중요한 조절 역할을 한다고 알려져 있다<sup>42,43)</sup>. 따라서 ERK-1, ERK-2의 발현이 증가하면 색소 생성이 억제될 수 있다. YM이 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하

는 일환으로 ERK-1, ERK-2의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, ERK-1은  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 감소하였다. YM은 100, 50, 25  $\mu$ g/ml의 농도에서 감소한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다(Fig. 10). ERK-2는  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 감소하였다. YM은 200, 100, 50, 25  $\mu$ g/ml 농도에서 감소한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다(Fig. 11).

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<sup>42,44)</sup>. Tyrosinase의 발현억제는 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다. 따라서, AKT-1의 발현이 증가하면 색소 생성이 억제될 수 있다. 본 연구에서는 YM가 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 AKT-1의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, AKT-1은  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 감소하였다. YM은 200, 100, 50, 25  $\mu$ g/ml 농도에서  $\alpha$ -MSH에 의해 감소한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다(Fig. 12).

MITF는 microphthalmia transcription factor로서 핵으로 이동하여 DNA의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 promoter에 결합하여 각각의 유전자 발현을 증가시켜 melanogenesis를 유도한다. 그러므

로 MITF의 억제는 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 발현억제를 통하여 melanin 색소 생성을 억제할 수 있으므로 결과적으로 melanin 생성이 억제될 수 있다<sup>79)</sup>. 따라서 MITF의 발현이 억제되면 색소 생성이 억제될 수 있다. 본 연구에서는 YM이 유전자 발현을 조절하는 인자에 미치는 영향을 평가하는 일환으로 MITF의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험 결과, MITF는  $\alpha$ -MSH (10  $\mu$ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. YM은 200, 100, 50, 25  $\mu$ g/ml 농도에서  $\alpha$ -MSH에 의해 증가된 유전자 발현을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다 (Fig. 13).

이상의 결과를 종합하면, 六味地黄湯合二至丸加減方 추출물은 melanin 합성에 관여하는 효소의 활성 및 유전자 발현을 억제함으로써 미백효과를 나타내는 것으로 판단된다.

## V. 결 론

피부 미백제를 개발하기 위한 연구의 일환으로 六味地黄湯合二至丸加減方 (YM) 추출물을 이용하여 melanin 생성에 미치는 영향을 측정하였다. 또한, melanin 생성과 관련되는 tyrosinase의 활성과 유전자 발현에 대한 연구를 통하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. YM은 B16F10 melanoma cell 의 melanin 유리 및 생성을 유의하게 억제하였다.
2. YM은 tyrosinase 활성 *in vitro*와 B16F10 melanoma cell 수준에서 유의하게 억제하였다.

3. YM은 B16F10 melanoma cell에서  $\alpha$ -MSH에 의해 증가되는 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 유전자 발현을 유의하게 억제하였다.
4. YM은 B16F10 melanoma cell에서  $\alpha$ -MSH에 의해 증가되는 PKA, PKC $\beta$ 의 유전자 발현을 유의하게 억제하였다.
5. YM은 B16F10 melanoma cell에서  $\alpha$ -MSH에 의해 감소되는 유전자 조절 신호전달인자인 ERK-1, ERK-2, AKT-1의 발현을 유의하게 증가시켰다.
6. YM은 B16F10 melanoma cell에서  $\alpha$ -MSH에 의해 증가되는 MITF의 발현을 유의하게 억제하였다.

- 투 고 일 : 2009년 10월 26일
- 심 사 일 : 2009년 11월 2일
- 심사완료일 : 2009년 11월 9일

## 참고문헌

1. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 피부과학 제5판. 서울:여문각. 2008:12-8, 501, 502, 716.
2. 이향우, 김주연, 이연희. 피부과학. 서울:광문각. 2003:23.
3. Maeda K, Fukuda M. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes, J. Soc Cosmet Chem. 1991;42:361-8.
4. Mishima Y, Hatae S, Kondo H. Overview for development of future innovative skin whitening agents. Fragrance J. 1996;24:13.
5. 손애량, 이승자. 미백화장품 효능 검증

- 에 대한 고찰. 한국미용학회지. 2000;6(1):239-54.
6. 이향복 등. 특허분석으로 본 미백 연구의 기술 동향. 대한화장품학회지. 2007;33(4):209-17.
7. 李慶雨. 編注譯解 黃帝內經素問 5. 서울:여강출판사. 1999:29, 30.
8. 한방여성의학 편찬위원회. 한방여성의학 상. 서울:정담. 2007:453, 454, 455, 497, 499.
9. 郭子光 등. 現代中醫治療學. 四川科學技術出版社. 1997:375-83.
10. Junichi H et al. Regulation of melanin synthesis of B16F10 mouse melanoma cells by vitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 1985;45:1474-8.
11. Mason HS, Peterson EW. Melanoproteins I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochem. Biophys Acta.* 1965;111(1):134-46.
12. María ME et al. Mechanism and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor- $\alpha$  in B16F10 mouse melanoma cells. *Eur J. Biochem.* 1998;225:139-46.
13. 이해영 등. 피부과학. 서울: 군자출판사. 2007:20-5.
14. Ruthellen MD, William HF. 4-Hexylresorcinol a potent inhibitor of mushroom tyrosinase. *J. Food Sci.* 1993;58(3):609-10.
15. Koji T et al. A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using streptomyces bikiniensis. *J. Antibiot.* 1990;43(12):1601-5.
16. Duncan CL, Foster EM. Effect of sodium nitrite, sodium chloride and sodium nitrate on germination and outgrowth of anaerobic spores. *Appl Environ. Microbiol.* 1968;16(2):406-11.
17. 오원교. 獨活寄生湯이 멜라닌 生成抑制 및 遺傳子 發現에 미치는 影響. 원광대학교 대학원 박사학위논문. 2008.
18. 김은섭 등. 逍遙散加減化裁의 멜라닌 생성 억제와 작용기전에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 2008;21(1):83-98.
19. 최규웅. 丹樞逍遙散의 melanin 생합성 억제효과. 경원대학교 대학원 박사학위논문. 2008.
20. 양수광. 羌活續斷湯이 멜라닌 생성 및 유전자 발현에 미치는 영향. 경원대학교 대학원 박사학위논문. 2008.
21. 김정근 등. 天花粉 메탄올 추출물의 멜라닌 형성 억제 효과. 대한한의학회지. 2002;23(4):45-54.
22. 윤화정 등. 白芨이 멜라닌 형성 억제에 미치는 영향. 大韓眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 2003;16(1):100-11.
23. 이정훈 등. 뽕나무가지 추출물의 melanin 생성 억제효과. 대한피부연구학회지. 2001;8(2):86-90.
24. 송중석, 유동열. 赤何首烏의 멜라닌 생성 억제와 작용기전에 관한 연구. 대한한방부인과학회지. 2008;21(2):59-75.
25. 장두현. 柿葉의 멜라닌 생성 억제와 작용기전에 관한 연구. 대전대학교 대학원 박사학위논문. 2008.
26. 천현자 등. 백출의 에탄올 추출물에 의한 melanin 생성억제 효과. 약학회지. 2001;45(3):269-75.
27. 錢乙. 小兒藥證直結. 서울:醫聖堂. 1994:47.
28. 김시영, 이인선. 韓方婦人科領域에서 六味地黃湯과 附益地黃丸의 效能에

- 關한 文獻的 考察. 대한한방부인과학 회지. 1997;10(1):133-50.
29. 汪昂. 國譯 醫方集解. 서울:대성문화사. 1984:73-4.
30. 한의과대학 방제학교수 공편저. 방제학. 서울:영림사. 1999:307.
31. 전국한의과본초학교수. 본초학. 서울:영림사. 2000:409, 538, 569, 579, 580, 587, 599, 600, 623, 626.
32. Gregory SB. The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. Trends Genet. 1996;12(8):299-305.
33. Itaru S et al. Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin. J. Invest Dermatol. 1997;108:838-42.
34. Thody AJ. Alpha-MSH and the regulation of melanocyte function. Ann NY Acad. Sci. 1999;885:217-29.
35. Rescigno A et al. Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. J. Enzyme Inhib Med. Chem. 2002;17(4):207-18.
36. 山孝一 良, Hearing VJ.メラニソ産生の 制御因子. Fragrance Journal. 1990;6:24-8.
37. Tong X et al. Apigenin prevents UVB-induced cyclooxygenase 2 expression: coupled mRNA stabilization and translational inhibition. Mol. Cell Biol. 2007;27(1):283-96.
38. Tsukamoto K et al. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. EMBO J. 1992;11(2):519-26.
39. 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(1):55-65.
40. Jongsung Lee, Yeongshik Kim, Deokhoon Park. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. Biochem. Pharmacol. 2007;74(7):960-8.
41. Hee-Young Park et al. MITF mediates cAMP-induced protein kinase C-β expression in human melanocytes. Biochem. J. 2006;395(3):571-8.
42. 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. 2001;114:2335-44.
43. Min Wu et al. c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. Genes Dev. 2000;14(3):301-12.
44. Shiu-Chen H. et al. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-κB and c-Jun. Biochem. Pharmacol. 2005;69(2):221-32.