

六味地黃湯加減方이 멜라닌 생성 및 유전자발현에 미치는 영향

대전대학교 한의과대학 부인과교실
김진경, 유동열

ABSTRACT

The Effect of *Yukmijihwangtang-gagambang* (YMG) on Melanin Synthesis and Gene Expression

Jin-Kyung Kim, Dong-Youl Yoo
Dept. of Oriental Medicine Graduate School, Daejeon University

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

Methods: To demonstrate the inhibitory effects of YMG 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 expressions 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. YMG decreased the release and production of melanin in B16F10 melanoma cells.
2. YMG decreased tyrosinase activity *in vitro* and in B16F10 melanoma cells.
3. YMG decreased the expression of tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA, PKC β and MMP-2 in B16F10 melanoma cells.
4. YMG increased the expression of ERK-1, ERK-2, and AKT-1 in B16F10 melanoma cells.
5. YMG decreased the expression of MITF in B16F10 melanoma cells.

Conclusion: From these results, we suggest that YMG inhibit melanin synthesis *via* tyrosinase inhibition and regulation of the gene expression in B16F10 melanoma cells.

Key Words: *Yukmijihwangtang-gagambang*(YMG), melanogenesis, whitening

I. 서 론

피부의 색은 melanin, hemoglobin, carotene, 진피의 혈관 수 등 여러 가지 인자에 의해 결정되는데 그 중 melanin이 가장 주된 역할을 한다¹⁾. Melanin은 자외선을 흡수하거나 산란시켜 자외선에 의해 피부 기저층의 세포가 손상되는 것을 방지하나²⁻⁴⁾ 지나치게 많은 양의 melanin 색소가 피부에 침착되면 기미, 주근깨 등의 과색소 침착증을 유발한다³⁾. 최근에는 환경오염에 의한 오존층 파괴로 자외선 조사량이 증가하면서 이로 인한 과색소 침착증의 증가⁵⁾로 피부 미백에 대한 관심이 더욱 높아지고 있다.

한약재를 이용한 미백 관련 연구로는 瀉白散, 西施玉容散 등⁶⁻⁹⁾의 한방복합제제와 白蠟蠟, 五味子 등¹⁰⁻¹²⁾ 단미제에 대한 연구가 보고된 바 있다.

韓醫學에서 피부의 과색소 침착증은 형태와 색조에 따라 雀斑^{13,14)}, 黧黯¹⁵⁾, 黑斑¹⁴⁾, 黃褐斑¹⁶⁾ 등으로 다양하게 표현되어 왔다. 그 病因은 陽明之氣不足, 風邪와 痰飲으로 인한 氣血不和, 腎水不足으로 인한 虛火의 발생, 思慮過多와 飲食不節로 脾胃를 傷한 것 등으로 분류되는데¹⁷⁻¹⁹⁾, 특히 腎水不足으로 인한 雀斑과 관련하여 《外科正宗》¹³⁾에서는 六味地黃丸으로 腎水를 滋養해야 한다고 하였다.

六味地黃湯加減方은 六味地黃湯에서 白茯苓·牡丹皮·澤瀉를 去하고, 沙參·菟絲子·五味子·當歸·川芎·桂枝·附子·仙茅를 加한 처방으로 衝任不調, 肝腎虧損으로 인하여 발생하는 黃褐斑의 치료에 활용되고 있다²⁰⁾.

이에 저자는 六味地黃湯加減方の 미백 효과를 실험적으로 확인하고자 mouse의

melanoma cell을 이용하여 melanin 유리와 생성 및 tyrosinase 활성화에 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. 실험

1. 재 료

1) 세포주

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

2) 약 물

실험에 사용한 六味地黃湯加減方²⁰⁾(이하 YMG로 지칭)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다. 1첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Yukmijihwangtang-gagambang (YMG)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
沙參	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
五味子	Schizandrae Fructus	4
當歸	Angelicae Gigantis Radix	4
川芎	Cnidii Rhizoma	4
桂枝	Cinnamomi Ramulus	4
附子	Aconiti lateralalis Preparata Radix	4
仙茅	Curculiginis Rhizoma	4
TOTAL		56

3) 시약 및 기기

(1) 시 약

본 실험에 사용된 시약 중 Hank's balanced salt solution, dimethyl sulfoxide (DMSO), α -MSH, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), NaOH, mushroom tyrosinase, tyrosinase, L-tyrosine, phenol, isoamyl alcohol, isopropyl alcohol, ethanol, DTT, diethyl pyrocarbonate (DEPC), magnesium chloride ($MgCl_2$)는 Sigma (USA) 제품을, normal saline은 중외제약 제품을, TRIzol, superscript II RT는 Invitrogen (USA) 제품을, fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), trypsin-EDTA는 Gibco/BRL (USA) 제품을, RNase는 Pharmingen (USA) 제품을, TRP-1, TRP-2, 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 실험에는 centrifuge (Hanil unicon 54R, Korea), rotary vacuum evaporator (Büchi 461, Switzerland), deep freezer (Sanyo, Japan), freeze dryer (Eyela, Japan), roller mixer (Gowon scientific technology, Korea), 96 well plate, 24 well

plate, 6 well plate (Seolin, Korea), CO₂ incubator (Sanyo, Japan), hemacytometer (Fuchs-Rosenthal, Germany), clean bench (Sejong, Korea), autoclave (Sanyo, Japan), micro-pipet (Gilson, France), water bath (Vision scientific, Korea), vortex mixer (Vision scientific, Korea), MALDI-TOF (Shimadzu, Japan), thermocycler system (MWG Biotech., Germany), ice-maker (Vision scientific, Korea), corneal 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) 등의 기기를 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료 추출 및 분획조제

육미지황탕가감방 3첩 분량을 증류수 1,500 ml에 넣고 열탕추출기에서 3시간 동안 가열 추출한 다음, 여과하여 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하고, freeze dryer로 동결 건조하여 분말 16.3 g (수득율 9.7%)을 얻었으며, 검액은 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 용해시켜 사용하였다.

2) 검액 조제

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

다음 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 µl로 medium을 넣어주었다. 세포를 회수할 때는 trypsin-EDTA 1 ml를 가하여 37°C에서 1분간 반응시킴으로써 부착된 세포를 분리하고 배지 4 ml를 넣고 원심분리 (1,000 rpm, 3분)를 하여 세척한 후 실험에 사용하거나 필요시 액체질소에서 냉동 보관하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂를 사용한 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

4) B16F10 melanoma cell (melanocyte) proliferation 측정

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

5) Melanin 유리 및 생성량 측정

Melanin 유리 및 생성량 측정은 Hosoi²¹⁾ 등의 방법을 사용하였다. Melanin 생성 세포로는 마우스에서 얻은 흑색종의 일종인 B16F10 melanoma cell을 이용하였다. 배양된 B16F10 melanoma cell (정상

군)에 α-MSH (α-melanocyte stimulating hormone, 10 µM)를 처리한 다음 (대조군), 다시 300, 150, 75, 37 µg/ml 농도의 YMG를 가하여 3일간 배양한 후 (실험군), 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양을 측정하였는데, 약 24시간 후부터 세포 내 melanin의 생성을 현미경으로 관찰할 수 있었다. 또한 세포 내의 melanin 생성량을 측정하기 위하여 B16F10 melanoma cell에 α-MSH (10 µM)를 처리한 다음 YMG를 가하여 3일간 배양하였다. 배양 세포는 PBS로 2회 씻고 1,500 rpm으로 5분간 원심분리하여 수확하였다. 세포침전물에 1ml의 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 합성멜라닌 (Sigma Co., USA)을 대조군으로 사용하여 작성된 표준곡선에서 구하였다.

6) Mushroom tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성에 미치는 영향은 Mason and Peterson²²⁾의 방법을 사용하였다. 즉, 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) 150 µl, 3 mM L-tyrosine 수용액 20 µl, 검액 20 µl을 차례대로 가한 다음, 2,500 U/ml mushroom tyrosinase 10 µl를 가하였다. 반응은 37°C에서 30 분간 incubation 시켰으며 매 10 분 간격으로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 활성은 아래에 표시한 식으로 구하였다.

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

A: 대조군 반응액의 흡광도

A': 대조군의 tyrosinase 대신 buffer를 가한 반응액의 흡광도

B: 검액이 첨가된 반응액의 흡광도

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

7) B16F10 melanocyte의 tyrosinase 활성 측정

B16F10 melanocyte의 tyrosinase 활성은 Martínez-Esparza²³⁾ 등의 방법을 사용하였다. 배양된 B16F10 melanocyte에 α -MSH 10 μ M를 처리한 다음 (대조군), 다시 200, 100, 50, 25 μ g/ml 농도의 YMG를 가하여 3일간 배양하였다 (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 0.1mM PMSF)를 첨가한 다음, 얼음에서 30분간 흔들면서 세포를 용해시켰다. 다시 원심분리하고 얻어진 세포용액을 사용하여 tyrosinase 활성을 측정하였다.

8) 유전자 발현 측정

(1) 총 RNA 분리

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

(2) cDNA 제조

대조군 및 실험군에서 각각 분리한 total RNA 액 2 μ l (2 μ g RNA 함유)에 oligo dT 2 μ l (10 pM)을 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 90°C에서 5분간 incubation하였다. Primer가 annealing 하도록 4°C로 유지하며 10 \times RT buffer 2 μ l, 0.1 M DTT 2 μ l, 10 mM dNTP nucleotide mix 1 μ l, reverse transcriptase 1 μ l를 가하고 여기에 H₂O 10 μ l를 첨가하여 20 μ l로 한 다음, 아주 조심스럽게 손으로 tipping 혼합하였다. 이후, 42°C에서 90분간 incubation한 다음, 얼음에 방치하였다. 그리고 다시 H₂O 100 μ l를 첨가하여 -20°C에 보관하였다. 각각의 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 GGT이었으며, antisense primer는 TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC을 사용하였다. TRP-1의 sense primer는 GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC, antisense primer는 AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT을 사용하였으며, TRP-2의 sense primer는 GGC CAG

CTT TCA GGC AGA GGT, antisense primer는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC를 사용하였으며, MMP-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 β 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 $^{\circ}$ C 4분, 30 cycles의 (94 $^{\circ}$ C 30초, 59 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 45초), 72 $^{\circ}$ C 10분이였다. 증폭된 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동하였다. 전기영동 결과 나온 band를 density 분석 프로그램인 Gel-Pro analyzer 3.1을 이용하여 용량을 산출하였다.

(4) Real time RT-PCR

우선 시험관에 정량한 RNA 5 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 얼음에 방치하였다. Reaction mixture으로 10배의 RT buffer 2 μ l, 25 mM MgCl₂ 4 μ l, 0.1 M DTT 2 μ l, RNAase 1 μ l을 섞어 준비하였다. Tyrosinase의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT이였으며, antisense primer는 TGG TGC TTC ATG GGC AAA ATC을 사용하였다. TRP-1의 sense primer는 GCT GCA GGA GCC TTC TTT CTC, antisense primer는 AAG ACG CTG CAC TGC TGG TCT을 사용하였으며, TRP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT, antisense primer는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC를 사용하였으며, MMP-2의 sense primer는 GGC CAG CTT TCA GGC AGA GGT, antisense primer는 CGG TTG TGA CCA ATG GGT GCC이였다. PKA의 sense primer는 TCC CGT TCC TGG TCA AAC TT, antisense primer는 TATA GGC TGG TCA GCG AAG AA 을 사용하였으며, PKC β 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 TG이었으며, 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 TA이었다. Control로는 GAPDH를 사용하였으며 sense primer는 CAGC CTC GTC CCG TAG ACA AA 이었으며, 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 μ l (50 units)를 가하고 25°C에 10분간 incubation 시켰다. 다시 42°C에서 50분간 incubation 시킨 다음, 70°C에서 15분간 가열하여 inactivate 시키고 얼음물에서 식혔다. RNase 1 μ l를 가하고 다시 37°C에서 20분간 incubation 시킨 다음, 사용시까지 -20°C에 보관하였다. 각각의 optical tube에 2배의 SYBR green mix 12.5 μ l, cDNA 0.2 μ l, 5 pmol/ μ l primer pair mix 1 μ l, 11.3 μ l H₂O를 넣고, 50°C 2분 1 cycle, 95°C 10 min 1 cycle (95°C 15초, 60°C 30초, 72°C 30초) 40 cycles, 72°C 10 분 1 cycle로 증폭시켰다. PCR을 마친 후 tube를 꺼낸 다음, 반응액 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. 실험 성적

1. B16F10 melanocyte의 melanin 유리에 미치는 영향

실험결과, 육미지황탕가감방 (이하 YMG)은 300, 150 μ g/ml의 농도에서 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양을 대조군에 비해 각각 28%, 19% (p<0.01) 억제하였다(Fig. 1).

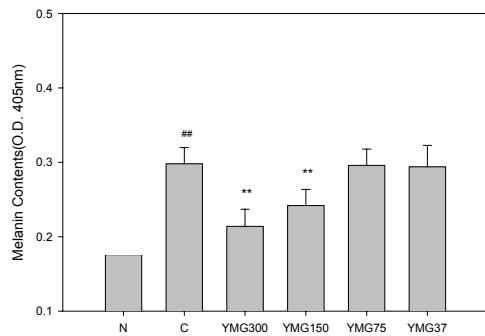


Fig. 1. Effects of YMG on the release of melanin from B16F10 melanoma cells. N(Normal): Vehicle

C(Control): α -MSH (10 μ M)

YMG300: α -MSH (10 μ M) + 300 μ g/ml of YMG

YMG150: α -MSH (10 μ M) + 150 μ g/ml of YMG

YMG75: α -MSH (10 μ M) + 75 μ g/ml of YMG

YMG37: α -MSH (10 μ M) + 37 μ g/ml of YMG

##: p<0.01 vs N

** : p<0.01 vs C

2. B16F10 melanocyte의 melanin 생성에 미치는 영향

세포내 용액으로부터 melanin을 정량한 결과, YMG를 300, 150 μ g/ml의 농도로 처리한 경우 melanin 생성을 대조군에 비해 각각 25%, 17% (p<0.01) 억제하였다(Fig. 2).

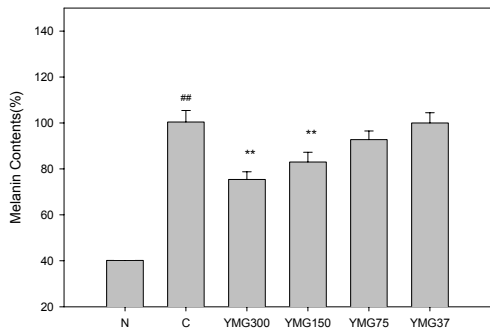


Fig. 2. Effects of YMG on the production of melanin in B16F10 melanoma cells.

N(Normal): Vehicle

C(Control): α -MSH (10 μ M)

YMG300: α -MSH (10 μ M) + 300 μ g/ml of YMG

YMG150: α -MSH (10 μ M) + 150 μ g/ml of YMG

YMG75: α -MSH (10 μ M) + 75 μ g/ml of YMG

YMG37: α -MSH (10 μ M) + 37 μ g/ml of YMG

##: $p < 0.01$ vs N

** : $p < 0.01$ vs C

3. Mushroom tyrosinase 활성에 미치는 영향

YMG는 300, 150 농도에서 mushroom tyrosinase 활성을 대조군에 비해 각각 약 37%, 17% ($p < 0.01$) 억제하였다(Fig. 3).

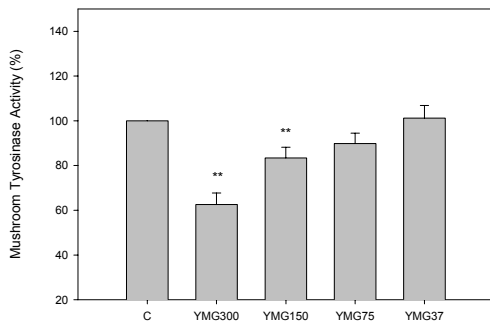


Fig. 3. Effects of YMG on mushroom tyrosinase activity *in vitro*.

C(Control): Vehicle

YMG300 : 300 μ g/ml of YMG

YMG150 : 150 μ g/ml of YMG

YMG75 : 75 μ g/ml of YMG

YMG37 : 37 μ g/ml of YMG

** : $p < 0.01$ vs C

4. B16F10 melanocyte의 tyrosinase 활

성에 미치는 영향

YMG는 300, 150, 75 μ g/ml 농도에서 B16F10 melanocyte의 tyrosinase 활성을 대조군에 비해 각각 30%, 19% ($p < 0.01$), 15% ($p < 0.05$) 억제하였다(Fig. 4).

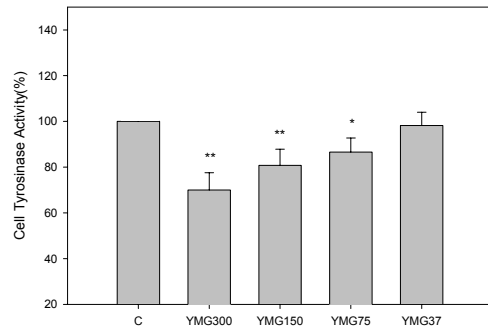


Fig. 4. Effects of YMG on tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells.

C(Control): α -MSH (10 μ M)

YMG300: α -MSH (10 μ M) + 300 μ g/ml of YMG

YMG150: α -MSH (10 μ M) + 150 μ g/ml of YMG

YMG75: α -MSH (10 μ M) + 75 μ g/ml of YMG

YMG37: α -MSH (10 μ M) + 37 μ g/ml of YMG

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

5. Tyrosinase 발현에 미치는 영향

Tyrosinase는 α -MSH (10 μ M) 처리 시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, YMG는 α -MSH에 의해 증가한 유전자 발현을 200 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도 ($p < 0.01$)와 50 μ g/ml, 25 μ g/ml 농도 ($p < 0.05$)에서 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 5).

6. TRP-1 발현에 미치는 영향

TRP-1은 α -MSH (10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, YMG는 α -MSH에 의해 증가한 유전자의 발현을 200 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.01$) 억제하였다(Fig. 6).

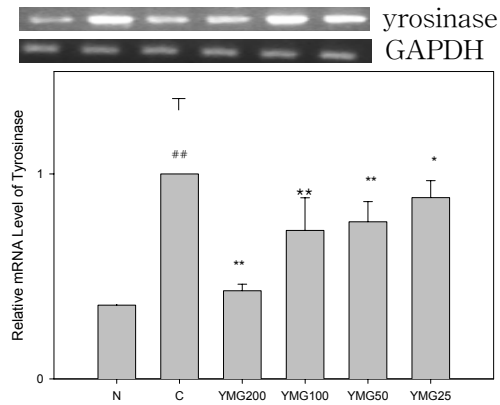


Fig. 5. Effects of YMG on the expression of tyrosinase in B16F10 melanoma cells. N(Normal): Vehicle
C(Control): α -MSH (10 μ M)
YMG200: α -MSH (10 μ M) + 200 μ g/ml of YMG
YMG100: α -MSH (10 μ M) + 100 μ g/ml of YMG
YMG50: α -MSH (10 μ M) + 50 μ g/ml of YMG
YMG25: α -MSH (10 μ M) + 25 μ g/ml of YMG
##: $p < 0.01$ vs N
**: $p < 0.01$ vs C, *: $p < 0.05$ vs C

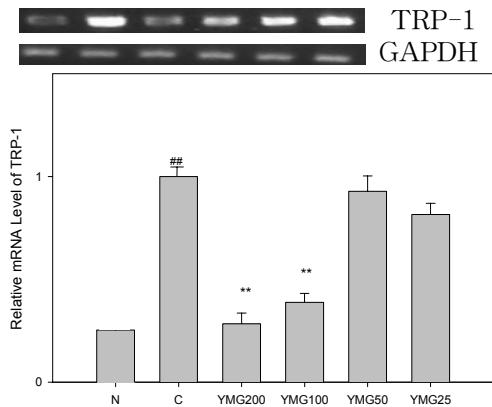


Fig. 6. Effects of YMG on the expression of TRP-1 in B16F10 melanoma cells. N(Normal): Vehicle
C(Control): α -MSH (10 μ M)
YMG200: α -MSH (10 μ M) + 200 μ g/ml of YMG
YMG100: α -MSH (10 μ M) + 100 μ g/ml of YMG
YMG50: α -MSH (10 μ M) + 50 μ g/ml of YMG
YMG25: α -MSH (10 μ M) + 25 μ g/ml of YMG
##: $p < 0.01$ vs N
**: $p < 0.01$ vs C

7. TRP-2 발현에 미치는 영향

TRP-2는 α -MSH (10 μ M) 처리시 발

현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, YMG는 α -MSH에 의해 증가한 유전자의 발현을 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml의 농도 ($p < 0.01$)와 25 μ g/ml 농도 ($p < 0.05$)에서 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 7).

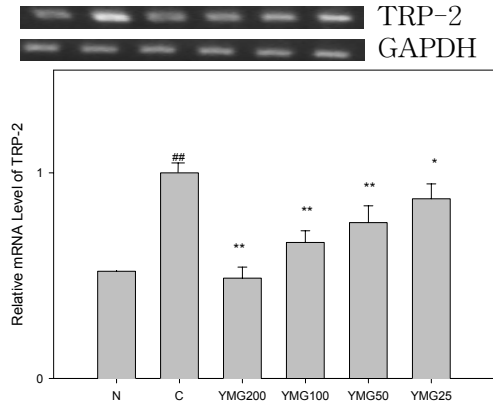


Fig. 7. Effects of YMG on the expression of TRP-2 in B16F10 melanoma cells. N(Normal): Vehicle
C(Control): α -MSH (10 μ M)
YMG200: α -MSH (10 μ M) + 200 μ g/ml of YMG
YMG100: α -MSH (10 μ M) + 100 μ g/ml of YMG
YMG50: α -MSH (10 μ M) + 50 μ g/ml of YMG
YMG25: α -MSH (10 μ M) + 25 μ g/ml of YMG
##: $p < 0.01$ vs N
**: $p < 0.01$ vs C, *: $p < 0.05$ vs C

8. PKA 발현에 미치는 영향

PKA는 α -MSH (10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, YMG는 α -MSH에 의해 증가한 유전자 발현을 200 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도($p < 0.01$)와 50 μ g/ml 농도 ($p < 0.05$)에서 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 8).

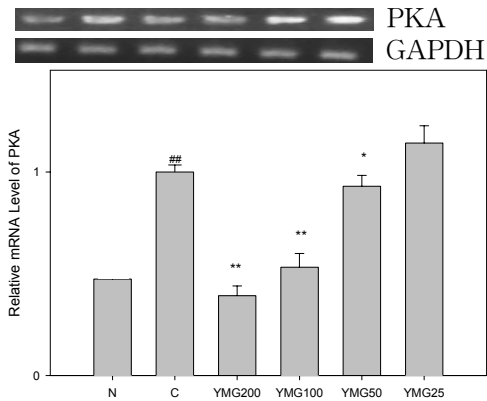


Fig. 8. Effects of YMG on the expression of PKA in B16F10 melanoma cells.

N(Normal): Vehicle

C(Control): α -MSH (10 μ M)

YMG200: α -MSH (10 μ M) + 200 μ g/ml of YMG

YMG100: α -MSH (10 μ M) + 100 μ g/ml of YMG

YMG50: α -MSH (10 μ M) + 50 μ g/ml of YMG

YMG25: α -MSH (10 μ M) + 25 μ g/ml of YMG

##: $p < 0.01$ vs N

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

9. PKC β 발현에 미치는 영향

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

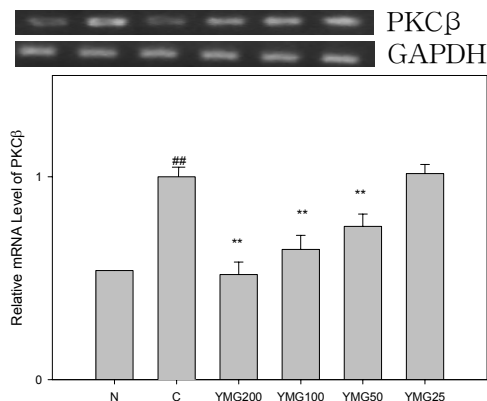


Fig. 9. Effects of YMG on the expression of PKC β in B16F10 melanoma cells.

N(Normal): Vehicle

C(Control): α -MSH (10 μ M)

YMG200: α -MSH (10 μ M) + 200 μ g/ml of YMG

YMG100: α -MSH (10 μ M) + 100 μ g/ml of YMG

YMG50: α -MSH (10 μ M) + 50 μ g/ml of YMG

YMG25: α -MSH (10 μ M) + 25 μ g/ml of YMG

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

10. MMP-2 발현에 미치는 영향

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

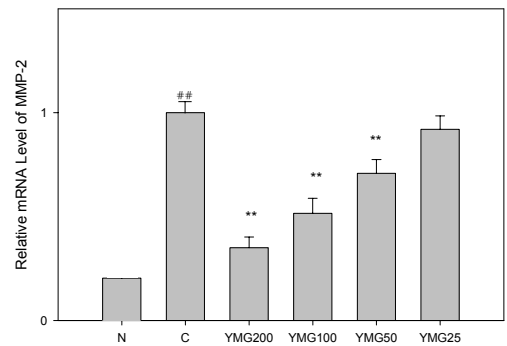
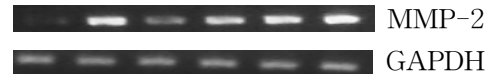


Fig. 10. Effects of YMG on the expression of MMP-2 in B16F10 melanoma cells.

N(Normal): Vehicle

C(Control): α -MSH (10 μ M)

YMG200: α -MSH (10 μ M) + 200 μ g/ml of YMG

YMG100: α -MSH (10 μ M) + 100 μ g/ml of YMG

YMG50: α -MSH (10 μ M) + 50 μ g/ml of YMG

YMG25: α -MSH (10 μ M) + 25 μ g/ml of YMG

##: $p < 0.01$ vs N

** : $p < 0.01$ vs C

11. ERK-1 발현에 미치는 영향

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

있게 ($p < 0.01$) 증가시켰다(Fig. 11).

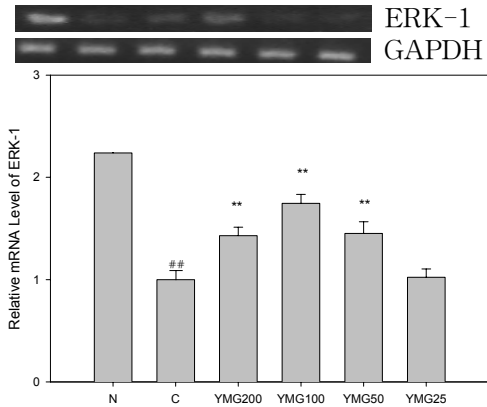


Fig. 11. Effects of YMG on the expression of ERK-1 in B16F10 melanoma cells.

N(Normal): Vehicle
 C(Control): α -MSH (10 μ M)
 YMG200: α -MSH (10 μ M) + 200 μ g/ml of YMG
 YMG100: α -MSH (10 μ M) + 100 μ g/ml of YMG
 YMG50: α -MSH (10 μ M) + 50 μ g/ml of YMG
 YMG25: α -MSH (10 μ M) + 25 μ g/ml of YMG
 #: $p < 0.01$ vs N, **: $p < 0.01$ vs C

12. ERK-2 발현에 미치는 영향

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

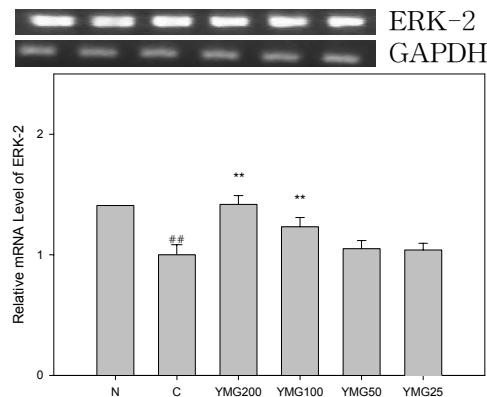


Fig. 12. Effects of YMG on the expression

of ERK-2 in B16F10 melanoma cells.

N(Normal): Vehicle
 C(Control): α -MSH (10 μ M)
 YMG200: α -MSH (10 μ M) + 200 μ g/ml of YMG
 YMG100: α -MSH (10 μ M) + 100 μ g/ml of YMG
 YMG50: α -MSH (10 μ M) + 50 μ g/ml of YMG
 YMG25: α -MSH (10 μ M) + 25 μ g/ml of YMG
 #: $p < 0.01$ vs N
 **: $p < 0.01$ vs C

13. AKT-1 발현에 미치는 영향

AKT-1은 α -MSH (10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 감소하였으며, YMG는 α -MSH에 의해 감소된 유전자 발현을 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml 농도 ($p < 0.01$)와 25 μ g/ml 농도 ($p < 0.05$)에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 13).

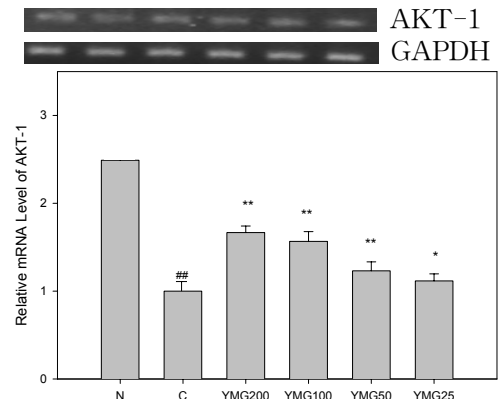


Fig. 13. Effects of YMG on the expression of AKT-1 in B16F10 melanoma cells.

N(Normal): Vehicle
 C(Control): α -MSH (10 μ M)
 YMG200: α -MSH (10 μ M) + 200 μ g/ml of YMG
 YMG100: α -MSH (10 μ M) + 100 μ g/ml of YMG
 YMG50: α -MSH (10 μ M) + 50 μ g/ml of YMG
 YMG25: α -MSH (10 μ M) + 25 μ g/ml of YMG
 #: $p < 0.01$ vs N
 **: $p < 0.01$ vs C, $p < 0.05$ vs C

14. MITF 발현에 미치는 영향

MITF는 α -MSH (10 μ M) 처리시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으

며, YMG는 α -MSH에 의해 증가된 유전자 발현을 200 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 ($p < 0.01$) 감소시켰다(Fig. 14).

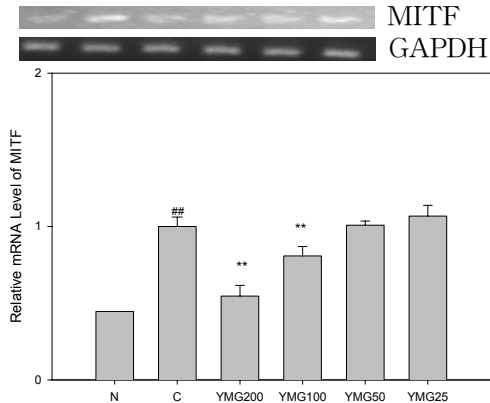


Fig. 14. Effects of YMG on the expression of MITF in B16F10 melanoma cells.

N(Normal): Vehicle

C(Control): α -MSH (10 μM)

YMG200: α -MSH (10 μM) + 200 $\mu\text{g/ml}$ of YMG

YMG100: α -MSH (10 μM) + 100 $\mu\text{g/ml}$ of YMG

YMG50: α -MSH (10 μM) + 50 $\mu\text{g/ml}$ of YMG

YMG25: α -MSH (10 μM) + 25 $\mu\text{g/ml}$ of YMG

#: $p < 0.01$ vs N

**: $p < 0.01$ vs C

IV. 고찰

피부는 자외선에 노출되면 파장에 따라 즉시형 색소침착과 지연형 색소침착이 나타난다. 즉시형 색소침착은 주로 UVA (320-400nm), 가시광선, 장파장의 UVB에 의해 생기는데, 자외선에 의해 기존의 melanin이 산화되고 melanocyte 내에 있던 melanosome이 수상돌기를 통해 주로 기저세포로 빠르게 이동하기 때문에 생기는 것이다^{24,25}. 지연형 색소침착에는 UVA, UVB (290-320 nm), UVC (200-290 nm)와 가시광선이 관여하는데, 자외선을 조사하고 72시간 경과 후에 색

소침착이 생기며 즉시형 색소침착에 비해 melanin이 표피 전층에 분포한다²⁴.

韓醫學에서 피부의 과색소 침착증은 《黃帝內經素問·至真要大論》²⁶에 “面塵”이라 하여 처음 언급된 이후로 黧黑斑¹³, 黑斑¹⁴, 雀斑^{13,14}, 黚黯¹⁵, 黃褐斑¹⁶ 등으로 다양하게 표현되어 왔다. 病因에 대한 歷代 諸家들의 설을 종합해보면 陽明之氣不足, 風邪와 痰飲으로 인한 氣血不和, 腎水不足으로 인한 虛火의 발생, 思慮過多와 飲食不節로 脾胃를 傷한 것 등으로 분류된다¹⁷⁻¹⁹. 그 중 특히 腎水不足과 관련하여 《外科正宗》¹³에서는 “雀斑乃腎水不能榮華于上 火滯結而爲斑 宜六味地黃丸 以滋化源 外以玉容丸 早晚搽洗漸愈.”라 하여 六味地黃丸을 治方으로 제시하였다.

六味地黃湯은 宋代 錢乙의 《小兒藥證直結》²⁷에 최초로 기재되었으며, 효능은 肝腎을 滋補하는 것으로 肝腎陰虛로 인한 여러 증상에 널리 활용된다. 韓方 婦人科 영역에서는 婦人科의 질병특성을 고려한 약물들을 加味하여 月經量異常, 無月經, 五色帶下, 妊娠中の 膀胱病, 妊娠血症, 妊娠眩暈, 産後腰痛 등의 증상에 사용되어 왔다²⁸.

六味地黃湯加減方은 六味地黃湯에서 白茯苓·牡丹皮·澤瀉를 去하고, 沙參·菟絲子·五味子·當歸·川芎·桂枝·附子·仙茅를 加한 처방으로 衝任不調, 肝腎虧損으로 인하여 발생하는 黃褐斑의 치료에 활용된다²⁰.

六味地黃湯加減方 構成藥物의 效能을 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, 固腎, 益精, 菟絲子는 補肝腎, 益精髓, 五味子는

斂肺, 滋腎, 當歸는 補血和血, 調經止痛, 川芎은 活血行氣, 祛風止痛, 桂枝는 發汗解肌, 溫經通脈, 附子는 回陽補火, 散寒除濕, 仙茅는 補腎陽, 強筋骨 한다²⁹⁾.

이상의 效能을 綜合하여 보면 六味地黃湯加減方은 補益肝腎, 滋陰補血, 溫經通脈 하는 效能이 있어 衝任不調, 肝腎虧損으로 인한 과색소 침착증의 治療에 적합한 方劑라고 사료된다.

이에 저자는 六味地黃湯加減方의 미백 효과를 실험적으로 확인하고자 mouse melanoma cell인 B16F10을 이용하여 六味地黃湯加減方이 melanin 유리와 생성 및 tyrosinase의 활성에 미치는 영향을 측정하였으며, 그 작용 기전을 밝히기 위하여 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, PKA, PKC β , MMP-2, 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 melanoma cell을 이용하였다. 세포 독성이 없는 농도인 300, 150, 75, 37 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 YMG를 72시간 처리한 다음 세포 배양액에 유출되는 melanin을 측정하였으며, 약 24시간 후부터 melanin의 생성을 현미경으로 관찰할 수 있었다. Melanocyte는 자외선 등의 자극에 의해 각질형성세포에서 분비되는 α -MSH 같은 인자들에 의해 피부색소를 증가시키게 되는데³⁰⁾, α -MSH는 melanocyte의 막에 있는 MC1에 결합하여 cAMP를 활성화시키고 이것은 다시 tyrosinase, TRP-1, TRP-2 유전자의 발현을 유도하는 MITF를 활성화시켜 결과적으로 멜라닌 생성을 증가시킨다^{31,32)}. 실험결과 B16F10 melanoma

cell은 α -MSH (10 μM)를 처리한 경우 세포 배양액에 유출되는 melanin의 양이 증가하였으며, YMG는 300, 150 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유출되는 melanin의 양을 대조군에 비해 각각 28%, 19% 억제하였다 (Fig. 1).

세포내의 melanin 생성을 억제하는지 여부를 측정하기 위하여 YMG를 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. 실험결과, YMG는 300, 150 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 melanin 생성을 대조군에 비해 각각 25%, 17% 억제하였다(Fig. 2).

melanin의 생합성은 구리함유 단백질인 tyrosinase로부터 촉매 되어 진다³³⁾. 그러므로 melanin 생성을 억제하는 피부 미백제의 개발에는 tyrosinase의 활성을 억제하는 것이 필수적이다. 따라서 YMG가 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, mushroom tyrosinase를 이용한 시험관 내 tyrosinase 활성억제실험은 피부 미백제의 개발에 있어서 유용한 일차 평가 방법으로 인정되고 있다³⁴⁾. 실험결과, YMG는 300, 150 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 가한 다음 측정된 mushroom tyrosinase 활성을 대조군에 비해 각각 약 37%, 17% 억제하였다(Fig. 3). 또한 B16F10 melanocyte에서는 YMG 300, 150, 75 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도

에서 tyrosinase 활성을 대조군에 비해 각각 30%, 19%, 15% 억제하였다(Fig. 4).

본 연구에서는 YMG가 melanin 생성에 관여하는 유전자들에 미치는 영향을 RT-PCR 및 real time PCR system을 이용하여 평가하였다. Tyrosinase는 melanin 생합성의 key enzyme이므로 tyrosinase 발현을 억제하면 melanin 합성을 억제할 수 있다. 따라서 우선 tyrosinase의 발현에 미치는 영향을 평가하였다. 실험결과, tyrosinase는 α -MSH (10 μ M) 처리 시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, YMG는 200, 100, 50, 25 μ g/ml의 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 5).

TRP는 eumelanin의 생성 과정에서 중요한 역할을 하는 효소로서, TRP-1과 TRP-2의 두 종류가 있다³⁵⁾. 따라서 TRP-1, TRP-2의 발현을 억제하면 미백 효과를 기대할 수 있다. 실험 결과, TRP-1은 α -MSH (10 μ M) 처리 시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, YMG는 200 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 6). TRP-2는 α -MSH (10 μ M) 처리 시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, YMG는 200, 100, 50, 25 μ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 7).

PKA는 c-AMP 의존적인 Serine/threonine kinase로서, CREB를 인산화 시켜 CRE에 의한 MITF의 전사 활성화를 유도하는데^{36,37)}, MITF는 melanin 생성의 속도 조절단계 효소인 tyrosinase의 발현을 증가시킴으로써 melanin 생성을 촉진하게 된다³⁸⁾. 따라서 PKA 발현을 억제하

는 경우 tyrosinase의 활성화를 방지를 통하여 melanin 생성을 억제하게 된다. 실험결과, PKA는 α -MSH (10 μ M) 처리 시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였고, YMG는 200, 100, 50 μ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 8).

PKC β 는 tyrosinase의 cytoplasmic domain에 포함되어 있는 2개의 serine residue를 인산화함으로써 결과적으로 tyrosinase를 활성화시켜 melanin 생성을 촉진시킨다³⁹⁾. 따라서 PKC β 의 활성이 억제되면 melanin 생성이 억제될 수 있다. 실험결과, PKC β 는 α -MSH (10 μ M) 처리 시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였으며, YMG는 200, 100, 50 μ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 9).

MMP-2 (gelatinase A)는 gelatinase에 속하여 주로 제 IV형 교원질을 분해하는 작용을 하며, melanocyte가 활성화될 때 발현될 수 있다⁴⁰⁾. 실험결과 MMP-2는 α -MSH (10 μ M) 처리시 발현이 현저히 증가하였으며, YMG는 200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml 농도에서 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 억제하였다(Fig. 10).

ERK는 Map Kinase의 일종으로, MEK에 의해 인산화됨으로써 활성화된다⁴¹⁾. ERK의 활성은 MITF의 인산화와 그에 수반되는 degradation을 유도하여 melanin 합성을 감소시킴으로써 melanin 합성에 중요한 조절 역할을 한다고 알려져 있다⁴²⁾. 따라서 ERK-1, ERK-2의 발현이 증가하면 melanin 생성이 억제될 수 있다. 실험결과, ERK-1은 α -MSH (10 μ M) 처리 시 발현이 정상군에 비해 현저히

감소하였으며, YMG는 200 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 감소한 유전자 발현을 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 11). ERK-2는 α -MSH (10 μM) 처리 시 발현이 유의성 있게 감소하였으며, YMG는 200 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 감소한 유전자 발현을 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 12).

Ras/ERK와 PI3 kinase/AKT pathway 같은 signaling pathway는 MITF의 인산화에 관련되는 것으로 알려져 있는데, MITF의 인산화는 protein level에서 MITF의 분해 (degradation)를 촉진시킨다⁴³⁾. AKT의 발현이 증가하면 MITF의 발현이 억제되어 tyrosinase 발현을 억제하므로 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다. 실험결과, AKT-1은 α -MSH (10 μM) 처리 시 발현이 정상군에 비해 현저히 감소하였고, YMG는 200, 100, 50, 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 α -MSH에 의해 감소한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 13).

MITF는 microphthalmia transcription factor로서 melanocyte의 생존, 성장, 분화를 조절하는 signaling pathway에서 중심역할을 하며, tyrosinase, TRP-1, TRP-2와 같이 melanin 합성에 관련된 효소들의 발현을 증가시킨다⁴⁴⁾. 따라서 MITF의 억제는 tyrosinase의 발현 억제를 통하여 melanin 생성을 억제할 수 있다. 실험 결과, MITF는 α -MSH (10 μM) 처리 시 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였고, YMG는 200, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 α -MSH에 의해 증가한 유전자 발현을 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 14).

이상의 결과를 종합해 보면, 육미지황탕가감방 추출물은 tyrosinase의 활성 및

melanin 생성에 관련된 유전자의 발현을 억제하여 melanin 생성을 억제함으로써 미백효과를 내는 것으로 사료된다. 따라서 향후 임상에서 황갈반을 비롯한 과색소 침착증의 치료나 피부 미백제의 개발에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

육미지황탕가감방의 미백효과를 확인하고자 육미지황탕가감방 (YMG) 추출물이 melanin 생성에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

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

□ 투 고 일 : 2009년 7월 28일

□ 심 사 일 : 2009년 8월 3일

□ 심사완료일 : 2009년 8월 10일

참고문헌

1. 서울대학교 의과대학 피부과학교실. 의대생을 위한 피부과학. 서울:고려의학. 2001:10, 197.
2. 이향우, 김주연, 이연희. 피부과학. 서울:광문각. 2003:64, 66-7.
3. 김선미 등. 피부미용을 위한 피부과학. 서울:현문사. 2005:49, 52.
4. 이혜영 등. 피부과학. 서울:군자출판사. 2007:24.
5. Fisher GJ et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. Arch Dermatol. 2002;138(11):1460-70.
6. 김성각. 瀉白散의 미백효과 검정에 관한 연구. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 2000.
7. 박지선 등. B16 melanoma 세포주의 멜라닌 합성에 대한 西施玉容散의 효과. 동의병리학회지. 2000;14(1):160-70.
8. 손동식. 加減西施玉容散의 미백효과에 관한 연구. 경희대학교 대학원 석사학위논문. 2002.
9. 박호순, 김혜정, 김윤범. 가미귀비탕의 미백효과에 관한 연구. 大韓眼耳鼻咽喉皮膚科學會誌. 2004;17(2):48-58.
10. 오한철. 백강잠의 멜라닌 생성 억제와 미백효과에 관한 연구. 원광대학교 대학원 박사학위논문. 2007.
11. 두인선. 五味子の 멜라닌 생성 억제와 미백효과에 관한 연구. 원광대학교 대학원 박사학위논문. 2007.
12. 안재형. 乾漆의 항주름 효과와 미백효과 연구. 경원대학교 대학원 석사학위논문. 2008.
13. 陳實功. 外科正宗. 北京:人民衛生出版社. 2007:288, 297.
14. 顧世澄. 瘍醫大全. 北京:人民衛生出版社. 1996:479, 481.
15. 張璐. 張氏醫通. 上海:第二軍醫大學出版社. 2006:370.
16. 한방여성의학 편찬위원회. 한방여성의학 (I). 서울:도서출판 정담. 2007:453-5.
17. 남혜정, 채병윤. 肝斑에 關한 文獻的 考察. 大韓外官科學會誌. 1996;9(1):16-24.
18. 박인기, 김경준. 雀斑에 關한 文獻的 考察. 東醫學會誌. 2001;5(1):139-66.
19. 박혜준, 고우신. 雀斑의 原因, 症狀 및 治方에 關한 文獻的 考察. 大韓外官科學會誌. 1997;10(1):247-62.
20. 郭子光 등. 現代中醫治療學. 四川:四川科學技術出版社. 1997:563.
21. Hosoi J et al. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res. 1985; 45(4):1474-8.
22. Mason HS, Peterson EW. Melanoproteins. I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. Biochim Biophys Acta. 1965;111(1):134-46.
23. Martínez-Esparza M et al. Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. Eur J Biochem. 1998; 255(1):139-46.
24. 대한피부과학회 교과서 편찬위원회. 피부과학 제5판. 서울:여문각. 2008:17-8, 133-4.
25. 김기연 등. 피부과학. 서울:수문사.

- 2001:145-6.
26. 李慶雨. (譯解·編注)黃帝內經素問. 서울:여강출판사. 2007:952.
27. 錢乙. 小兒藥證直結. 서울:醫聖堂. 2002:32.
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. 大韓韓方婦人科學會誌. 1997;10(1):133-50.
29. 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. 서울:永林社. 2000:124, 332, 409, 538, 552, 569, 579, 580, 587, 623, 626.
30. Barsh GS. The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. Trends Genet. 1996;12(8):299-305.
31. Suzuki I et al. Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin. J Invest Dermatol. 1997;108(6):838-42.
32. Thody AJ. Alpha-MSH and the regulation of melanocyte function. Ann N Y Acad Sci. 1999;885:217-29.
33. 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.
34. 龜山孝一良, Hearing VJ.メラニン産生の制御因子. Fragrance Journal. 1990; 6:24-8.
35. Kobayashi T et al. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. EMBO J. 1994;13(24):5818-25.
36. Saito H et al. Microphthalmia-associated transcription factor in the Wnt signaling pathway. Pigment Cell Res. 2003; 16:261-5.
37. Shibahara S et al. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation. J Invest Dermatol Symp Proc. 2001;6:99-104.
38. 분당서울대병원. 기능성화장품의 효력 및 유효성 평가 연구, 신호전달을 이용한 MITF 전사인자의 조절과 미백 원료의 효력 평가방법 연구. 식품의약품 안전청. 2004.
39. Park HY et al. MITF mediates cAMP-induced protein kinase C-β expression in human melanocytes. Biochem J. 2006;395(3):571-8.
40. 신봉석 등. 멜라닌 세포성 모반과 악성 흑색종의 MMP-2와 MMP-9 metalloproteinase 발현에 관한 면역조직화학적 연구. 대한피부과학회지. 2003;41(8):991-6.
41. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. Curr Opin Cell Biol. 1997;9(2):180-6.
42. Wu M 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.
43. Goding CR. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. Genes Dev. 2000;14(14):1712-28.
44. 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.