

Effects of *Doinseunggitang* on Melanin Synthesis and Gene Expression Inhibition in B16F10 Melanoma CellsJu-Young Hwang¹, Dong-Hee Kim¹, Hui-Jung Kim¹, Eun-Young Hwang¹, Tae-Soon Park¹, Jin-Young Lee² and Jun-Ho Son^{1*}¹Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry, Gyeongsan 712-260, Korea²Department of Herbal Cosmetic Science, Hoseo University, Chungnam 336-795, Korea

Received October 11, 2011 / Revised February 14, 2012 / Accepted February 16, 2012

This study involved observation of the inhibitory effect of 70% EtOH and water extracts from *Doinseunggitang* on melanin synthesis, tyrosinase activity, and western blotting using B16F10 melanoma cells. *Doinseunggitang* extracts inhibited melanin synthesis and tyrosinase activity in a dependent manner. As a result, it was found that *Doinseunggitang* 70% EtOH extracts inhibit melanin synthesis and tyrosinase activity, respectively, by 40% and 51%. In addition, western blotting analysis showed that 70% EtOH extracts inhibited tyrosinase, MITF, TRP-1, and TRP-2 expression. These results show that 70% ethanol extracts of *Doinseunggitang* could be developed as a skin whitening material in cosmetics.

Key words : *Doinseunggitang*, tyrosinase, microphthalmia transcription factor, tyrosinase related protein

서 론

사람의 피부색은 인종, 성별, 연령에 따라 다르지만 오늘날 사람들은 사회활동의 증가, 환경오염에 따른 오존층 파괴로 인하여 유해 자외선에 장기적으로 노출되고 있다. 피부가 자외선에 과다 노출됨에 따라 피부 홍반과 흑화, 색소침착, 광노화, 피부암 등 피부 건강뿐만 아니라 미적 측면에서도 크게 영향을 받고 있다. 특히 색소 침착과 같은 피부 흑화는 피부에 존재하는 melanin 합성이 원인이 되는 것으로 알려져 있다 [6,31].

멜라닌(melanin)은 자연계에 널리 존재하는 생체 고분자 물질로 인간의 피부 색깔을 결정짓는 색소로 알려져 있으며 자외선이나 free radical 로부터 피부가 손상되는 것을 방지하는 역할을 담당하고 있다[19]. 이 색소는 멜라닌형성세포 내에 위치하는 멜라노솜(melanosome)에 의해 만들어지며 형성된 멜라닌은 각질형성세포로 이동하여 피부 상피층에 축적되어 색소침착 현상이 나타난다[22]. 멜라닌 합성은 아미노산의 하나인 tyrosine을 기질로 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2)에 의해 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)를 거쳐 DOPA quinone으로 전환되고 자동산화반응과 효소반응으로 DOPA chrome을 거쳐 흑갈색의 공동합체인 멜라닌이 생성하게 된다[30]. 특히 tyrosinase 효소는 melanocyte에서 멜라닌 색소의 합성에서 주요 핵심 효소로써 eumelanin과 pheomelanin의 합성에 절대

적으로 필요한 것으로 알려져 있고[9,26,32,34], 최근에는 이와 같은 효소를 억제하여 멜라닌 합성 저해를 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다[28].

현재 알려진 미백원료로는 arbutin, kojic acid, ascorbic acid 등의 물질들이 대표적으로 사용되어 왔으나 이러한 물질들은 불안정하여 분해나 착색, 이취, 효과의 불분명 및 안전성 문제 등으로 사용이 제한되고 있는 실정이다[36,5,35,38]. 이에 따라 세포에 영향을 미치지 않으며 melanin 합성을 감소시키는 천연 미백제에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 천연소재를 활용한 미백 관련 연구로는 참나물, 라벤더, 복분자 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과[14,16,24] 등 연구가 있으며, 독활기생탕, 서시옥용산 등의 복합체제를 이용한 미백효과를 연구한 결과가 있다[25,27]. 이러한 연구들은 melanoma 세포의 tyrosinase 활성과 tyrosinase protein 발현을 억제하여 melanin 형성을 억제시킨다고 보고하였다.

도인승기탕(桃仁承氣湯)은 동의보감에서 기미, 미백, 여드름에 효능이 있다고 기록되어 있으며 어혈을 풀게 하여 피부가 거칠어진 사람에게 사용하는 천연약재의 복합처방으로 도인, 감초, 대황, 계지, 망초 등 5가지 한약재로 구성되어 있다 [15]. 특히 도인승기탕을 구성하는 주요 약재 중에서 도인은 복숭아씨로서 천연항산화제, 노화억제제, 항암억제제로 오래 전부터 여성의 질환과 퇴행성 질환 등에 사용되었으며 anti tumor promoter, 항 어혈 작용 등이 보고되어 있다[7,18,29]. 그리고 감초는 tyrosinase 억제제로 작용하여 멜라닌 합성을 억제하는 효과가 있어 kojic acid 보다 효능이 우수한 것으로 알려져 있으므로[8], 도인승기탕의 미백효과에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 현재까지 도인승기탕이 어혈을 풀게 해주는 효

*Corresponding author

Tel : +82-54-810-0320, Fax : +82-54-801-9896

E-mail : bio115@hanmail.net

능에 대한 연구결과는 나와있지만 미백에 관한 연구는 보고되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 B16F10 melanoma 세포를 배양한 후 도인승기탕 추출물을 처리하여 melanin 함량, tyrosinase 활성, western blot을 이용하여 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2 등의 단백질 발현을 통해 미백효과에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

시료 추출

도인승기탕 제조에 필요한 구성약재는 휴먼허브(경북 경산시)에서 구입하여 사용하였다. 시료는 대황 30 g, 계지 20 g, 도인 100 g, 망초 20 g, 감초 100 g을 혼합하여 열수 추출은 시료에 증류수를 1배의 양을 가하여 85°C에서 3시간 환류 냉각 추출한 뒤 상등액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하였다. 에탄올 추출물은 시료에 10배 양의 70% 에탄올을 첨가하여 실온에서 24시간 동안 침지 추출한 후 상등액과 침전물을 분리하는 방법으로 3회 반복 추출하였다. 그리고 Whatman No. 1 여과지로 여과하고 농축하여 동결건조 후 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

시약 및 기기

세포배양을 위한 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), streptomycin penicillin, trypsin 250은 Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였고, 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT), arbutin, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. 1차 항체 인 tyrosinase, MITF, TRP-1, TRP-2와 2차 항체는 santa cruz (CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 기기는 ELISA reader (Tecan, Mönndorf, Switzerland), rotary vacuum evaporator (Rikakikai Co., Tokyo, Japan), freeze drier (Ilsin, Gyonggi-do, Korea), centrifuge (Eppendorf, AG, Germany), microscope (Nikon, Tokyo, Japan), CO₂ incubator (Hanbaek, Gyeonggi-do, Korea), haemocytometer (Marienfeld, Germany)를 사용하였다.

세포 배양

B16F10 melanoma cell은 ATCC (American Type Culture Collection)에서 분양 받아 사용하였으며, Michikaw 등[23]의 방법에 따라 배양하였다. 세포에 0.25% trypsin 용액을 희석 처리한 후 세포를 분리한 다음 DMEM배지에 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에 적응시켜 배양하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존능력 측정

세포 생존률 측정은 Carmichael 등[3]의 방법에 따라 측정하였다. 세포를 96 well plate에 0.6~0.8×10³ cells/well이 되도록 180 µl 분주하고, 시료를 농도 별로 조제하여 20 µl 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 배양 후 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 20 µl를 첨가하여 3시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO 200 µl를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정한 후 (1-시료의 흡광도/대조구의 흡광도)×100에 의하여 생존율을 계산하였다.

Melanin 정량

멜라닌 양은 Hosoi 등[10]의 방법을 변형하여 사용하였다. B16F10 melanoma cell을 6 well에 5×10⁴ cell이 되도록 접종하여 배양하고, 24시간 뒤 각 well에 도인승기탕 추출물(10, 50, 100 µg/ml)과 arbutin (100 µg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 처리 후 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척한 후 원심 분리하여 세포 침전물을 만들었다. 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)가 첨가된 1N NaOH 용액을 150 µl 첨가하고 60°C에서 1시간 용해하였으며 405 nm에서 흡광도를 측정한 후 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하여 나타내었다.

Tyrosinase 활성 측정

Tyrosinase 활성 측정은 Choi 등[4]의 방법을 변형하여 측정하였다. B16F10 melanoma cell을 6 well에 5×10⁴ cell이 되도록 접종하여 배양하고, 24시간 뒤 각 well에 도인승기탕 추출물(10, 50, 100 µg/ml)과 arbutin (100 µg/ml)을 48시간 동안 처리한다. 처리 후 PBS로 2회 세척한 후 각 well의 세포에 lysis buffer (1% triton X-100, 0.1 M Sodium phosphate buffer, 50 mM PMSF, pH 6.8)를 가하였다. 얼음 위에서 세포를 파괴시키고 원심 분리한 후 상층액만 따로 모아 효소용액으로 사용하였다. L-DOPA를 2 mg/ml 농도로 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)에 녹여 기질을 준비하고 기질 160 µl 에 효소용액 40 µl를 가하고 37°C에서 1시간 가온하고 생성된 DOPA chrome의 양을 490 nm에서 측정한 후 (1-시료의 흡광도/대조구의 흡광도)×100에 의하여 억제율을 계산하였다.

Western blot을 통한 미백 관련 단백질의 발현 측정

B16F10 melanoma cell를 6 well에 1×10⁵ cells/well이 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 각 cell에 도인승기탕 추출물(10, 50, 100 µg/ml)과 arbutin (100 µg/ml)을 48시간 동안 처리 후 PBS로 세척하였다. Lysis buffer 100 µl를 첨가하여 세포를 용해시키고 원심분리 하여 (12,000 rpm, 4°C, 20min) 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 BCA (bicinchoninic acid) kit assay로

정량하였으며, 60 µl의 단백질을 10%의 SDS-PAGE를 이용하여 전기 영동 한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 PVDF membrane에 옮긴 다음 400 mV에서 2시간 transfer하였다. Transfer가 끝난 membrane은 5% skim milk로 1시간 동안 blocking을 한 뒤 1차 antibody tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF는 3% skim milk로 1:1000 희석하여 사용하고 overnight 한다. Tris-buffered saline and tween 20 (TBST)로 3번 세척한 뒤 2차 antibody anti-goat, anti-mouse, anti-rabbit은 3% skim milk로 1:1,000 희석하여 1시간 동안 붙이고 TBST로 3번 세척한 뒤 enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Milipore, Germany)를 이용하여 발현 양상을 측정하였다. Band density는 gel doc (Amersham Pharmacia, England)을 이용하여 확인하였다.

통계처리

결과 통계처리는 SPSS 10.0을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(ANOVA: analysis of variance)을 한 후 α=0.05 수준에서 Tukey's HSD test에 의해 유의성을 분석하였다.

결과 및 고찰

세포 생존 능력 측정 결과

도인승기탕 추출물의 B16F10 melanoma cell 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 도인승기탕 70% 에탄올 추출물 및 물 추출물을 10, 25, 50, 75, 100, 250 µg/ml의 농도로 처리하고 48시간 후에 MTT방법으로 세포의 증식을 관찰한 결과 대조군의 세포 증식율을 100%로 하였을 때 250 µg/ml 이하 농도에서는 독성이 관찰되지 않았다(Fig. 1).

멜라닌 합성 억제 효과

피부 흑화는 피부에 존재하는 melanocyte가 UV 노출 등의 외부적 환경에 대응하여 melanin의 생성이 증가한다. 멜라닌 생합성으로 인한 색소 침착을 치유하기 위해 멜라닌 생성을 억제하는 hydroquinone, resorcinol 등의 페놀 유도체나, L-ascorbic acid와 그 유도체 및 kojic acid, arbutin, lactic acid, glucosamine, tunicamycin 등이 개발되었으나, 피부 저자극성이나 안정성에 문제가 있어 극히 제한된 양만 사용되고 있다 [2,11,20]. 도인승기탕 추출물의 멜라닌 합성을 확인한 결과, arbutin의 경우 100 µg/ml로 처리하였을 때 멜라닌 합성을 58% 저해하였다(Fig. 2). 멜라닌 합성 억제는 물 추출물보다 70% 에탄올 추출물을 처리하였을 때 우수하였으며 특히 70% 에탄올 추출물을 100 µg/ml로 처리하였을 때 55%의 멜라닌 합성 억제 효과를 관찰하였다.

Tyrosinase 활성 측정 결과

Tyrosinase의 활성은 melanosome에서 멜라닌이 생성되게

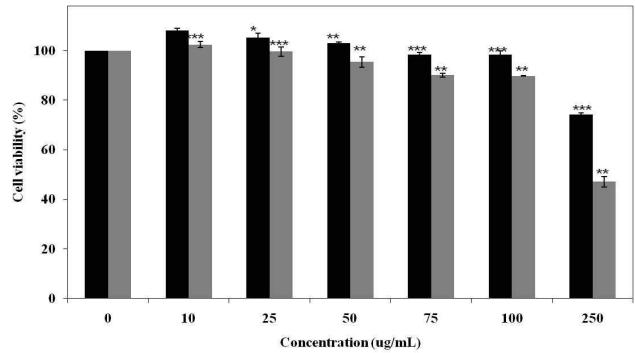


Fig. 1. Cell viability of B16F10 melanoma cells after treatment with *Doinseunggitang* (Black: water extracts, Gray: 70% ethanol extracts). The cell were cultured in the presence of various concentration of extracts for 48 hr. The viability of the cells was measured by MTT assay. Cells were treated of *Doinseunggitang* at the indicated concentration for 48 hr. The data represent the mean±SD of three separate experiments (Significant as compared to control. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

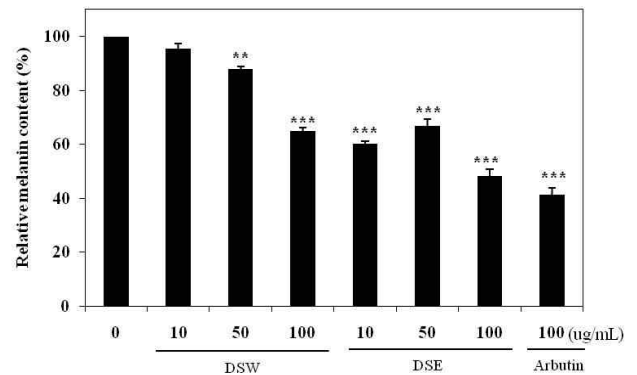


Fig. 2. Effects of 70% ethanol and water extracts from *Doinseunggitang* (DS) on melanin synthesis in B16F10 melanoma cells. Cells were absence of *Doinseunggitang* at the indicated concentration for 48 hr. (DSW: *Doinseunggitang* water extracts 10, 50, 100 µg/ml, DSE: *Doinseunggitang* 70% ethanol extracts 10, 50, 100 µg/ml, Arbutin: 100 µg/ml). The data represent the mean±SD of three separate experiments (Significant as compared to control. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

하는 효소로써 피부노화 촉진 및 색소 침착 등의 문제를 야기시킬 수 있다[33]. 도인승기탕 추출물 첨가에 따른 tyrosinase 활성 측정 결과 시료의 처리 농도가 높아질수록 tyrosinase 활성이 억제 됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 3). 도인승기탕 70% 에탄올 추출물 100 µg/ml에서 51%의 활성 억제가 관찰 되었고 물 추출물은 100 µg/ml에서 28%의 억제효과가 나타났다. Kim 등[17]의 연구 결과에 따르면 정공피 추출물 100 µg/ml에서 6.3% 억제한 것을 보았을 때 도인승기탕 70% 에탄올 추출물의 tyrosinase 활성 억제능이 우수함을 알 수 있다.

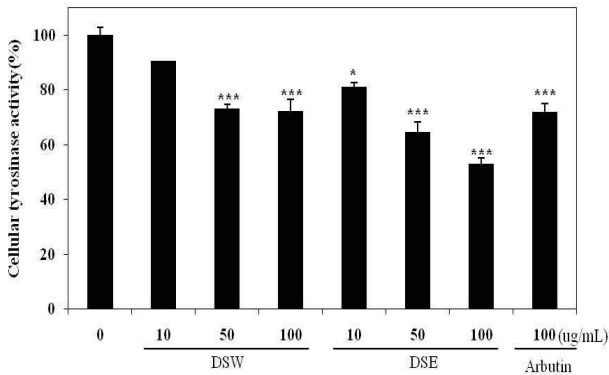


Fig. 3. Effects of 70% ethanol and water extracts from *Doinseunggitang* (DS) on tyrosinase activity in B16F10 melanoma cells. Cells were absence of *Doinseunggitang* at the indicated concentration for 48 hr. (DSW: *Doinseunggitang* water extracts 10, 50, 100 µg/ml, DSE: *Doinseunggitang* 70% ethanol extracts 10, 50, 100 µg/ml, Arbutin: 100 µg/ml). The data represent the mean±SD of three separate experiments (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Western blot을 이용한 단백질 발현의 측정 결과

B16F10 melanoma cell은 melanocyte의 세포막에 존재하는 melanocortin 1 receptor (Mc1R)을 통해 멜라닌 합성의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다[1]. 이 과정에서 microphthalmia transcription factor (MITF)는 핵으로 이동하여 DNA의 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 promotor에 결합하여 각각의 유전자 발현을 증가시켜 melanogenesis를 유도하는 것으로 알려져 있다[21]. 이 중 TRP-1과 TRP-2는 tyrosinase related protein 으로 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 하며 DOPA chrome을 DHICA로 이성화하는 효소로써[12], 이러한 MITF의 역할은 tyrosinase 및 TRP-1, TRP-2의 발현억제를 통하여 melanin 색소 생성을 억제할 수 있다.

도인승기탕 추출물의 멜라닌 생성 억제 효과를 분석하기 위해 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 유전자 발현 양상을 관찰하였다(Fig. 4). Tyrosinase에 관한 도인승기탕 추출물은

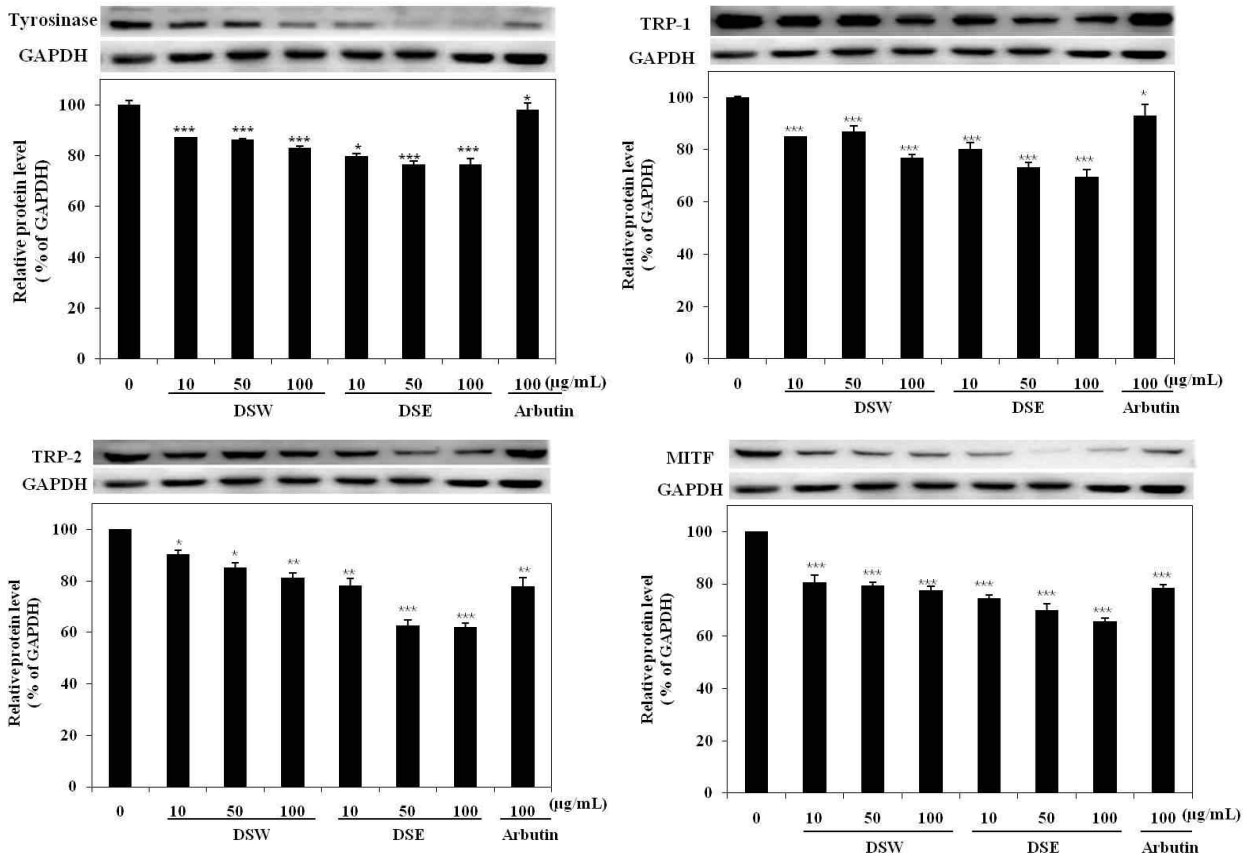


Fig. 4. Effect of 70% ethanol and water extracts from *Doinseunggitang* on tyrosinase, TRP-1, TRP-2 and MITF expression in B16F10 melanoma cells. Cells were absence of *Doinseunggitang* at the indicated concentration for 48 hr. (DSW : *Doinseunggitang* water extracts 10, 50, 100 µg/ml, DSE: *Doinseunggitang* 70% ethanol extracts 10, 50, 100 µg/ml, Arbutin: 100 µg/ml). The data represent the mean±SD of three separate experiments (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

물 추출물 및 70% 에탄올 추출물 100 µg/ml에서 각각 17%, 24%를 저해하였고 arbutin은 2% 저해하였다. TRP-1은 물 추출물과 70% 에탄올 추출물 100 µg/ml에서 각각 23%, 31% 저해하였으며 arbutin은 100 µg/ml에서 7% 저해율을 관찰할 수 있었다. TRP-2의 발현 양상 역시 TRP-1과 마찬가지로 도인승기탕 70% 에탄올 추출물이 물 추출물과 arbutin보다 저해율이 우수하였다. 그리고 도인승기탕 추출물의 MITF 발현에 미치는 효과를 관찰한 결과 물 추출물과 70% 에탄올 추출물 100 µg/ml에서 각각 23%, 35% 저해되었고 arbutin은 100 µg/ml에서 22% 저해되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 도인승기탕 추출물이 세포신호전달 경로 중 지속적인 ERK 활성화를 저해함으로써 MITF에 영향을 미쳐 멜라닌 생합성에 직접적으로 관여하는 효소인 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2의 발현을 저해하는 것으로 생각된다.

Ye 등[37]의 San-bai-tang (백출, 토복령, 작약 1:1:1 혼합추출물)이 미백관련 단백질 발현 정도를 보면 본 연구 결과와 같은 양상으로 MITF와 tyrosinase의 발현양의 감소 시킴으로써 TRP-1과 TRP-2도 농도의존적으로 감소하는 것을 관찰하였다. 김 등[13]의 연구결과에 따르면 이러한 MITF의 억제제는 tyrosinase의 발현 억제를 통하여 melanin 색소 생성을 억제할 수 있으며 MITF의 발현이 억제되면 색소생성이 억제될 수 있다고 보고하였다.

본 연구에서는 멜라닌 생합성에 관여하는 MITF, tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 단백질 발현을 측정된 결과와 멜라닌 생합성을 확인한 실험 결과와 연관성이 있는 것으로 확인할 수 있었다.

이와 같은 연구결과를 바탕으로 향후 도인승기탕 추출물이 천연 미백 소재로 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

References

- Abdel-Malek, Z. A., V. B. Swope, I. Suzuki, D. Harriger, S. T. Boyce, K. Urabe, and V. J. Hearing. 1995. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1789-1793.
- Ando, S., O. Ando, Y. Suemoto, and Y. Mishima. 1993. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitors. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 150S-155S.
- Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**, 936-942.
- Choi, B. W., B. H. Lee, K. J. Kang, E. S. Lee, and N. H. Lee. 1998. Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Korean J. Pharmacogn.* **29**, 237-242.
- Choi, Y. J. and J. Kim. 2006. A study on the propensity to consume oriental herbal cosmetics. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* **32**, 283-229.
- Ferguson, C. A. and S. H. Kidson. 1997. The regulation of tyrosinase gene transcription. *Pigment Cell Res.* **10**, 127-138.
- Ge, R. Y., C. H. Zhou, and Y. C. She. 1983. Influences of stigma croci and *Semen persicae* on function of ovary-uterus in pseudopregnant rats. *J. Tradit. Chin. Med* **3**, 23-26.
- Han, Y. S. and E. S. Jung. 2003. A study of correlation between antioxidant activity and whitening effect of plant extracts. *Korean J. Aesthetic Society* **1**, 11-22.
- Hearing, V. J. and K. Tsukamoto. 1991. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB. J.* **5**, 2902-9
- Hosoi, J., E. Abe, T. Suda, and T. Kuroki. 1985. Regulation of melanin synthesis of B16 melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**, 1474-1478.
- Imokawa, G. and Y. Mishima. 1982. Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glucosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res.* **42**, 1994-2002.
- Jimenez, C. C. 2004. Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient down regulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor. *J. Cell Sci.* **114**, 2335-2344.
- Kim, D. H., B. J. An, S. H. Kim, T. S. Park, G. H. Park, and J. H. Son. 2011. Antimelanogenic effect of *Ligularia fischeri*, *Solidago virga-aurae*, *Aruncus dioicus* extracts from ullung island in murine melanoma cells. *J. Life Sci.* **21**, 279-285.
- Kim, H. M., Y. M. Jang, K.S. Han, D. W. Moon, Y. J. Mun, and W. H. Woo. 2008. Effect of the ethanol extract from *Lavandula vera* on α-MSH induced melanogenesis. *Korean J. Oriental Physiology Pathology* **22**, 1444-1448.
- Kim, J. B., S. H. Choi, and K. S. An. 1997. Study on the effects of Taorenchengqitang and its components on blood Stasis model. *Korean J. Oriental Physiology Pathology* **11**, 65-76.
- Kim, J. H., G. S. Sim, D. H. Lee, G. S. Lee, B. C. Lee, and H. B. Pyo. 2007. New whitening agent from pimpinella brachycarpa. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **33**, 203-208.
- Kim, S. M. and D. Y. Yoo. 2009. The effect of Mibaeksan on melanin synthesis and gene expression. *Korean J. Oriental Obstetrics Gynecology* **22**, 1-18.
- Kosuge, T., H. Ishida, and M. Ishii. 1985. Studies on active substances in the herbs used for oketsu in chinese medicine. II. On the anticoagulative principle in persicae seme. *Chem Pharm. Bull.* **33**, 1496-1498.
- Lee, H. H., S. Bae, and J. E. Chin. 2005. Inhibitory effect of *Lithospermum erythrorhizon* extracts on melanin biosynthesis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 1325-1329.
- Lin, C. B., L. Babiarz, F. Liebel, P. Roydon, M. Kizoulis, G. J. Gendi menico, D. E. Fisher, and M. Seiberg. 2002. Modulation of microphthalmia-associated transcription factor gene expression alters skin pigmentation. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 1330-1340.
- Lin, J. W., H. M. Chiang, Y. C. Lin, and K. C. Wen. 2008. Natural products with skin-whitening effects. *J. Food and Drug Analysis* **16**, 1-10.
- Majmudar, G., G. Jacob, Y. Laboy, and L. Fisher. 1998. An in vitro method for screening skin-whitening products. *J.*

- Cosmet. Sci.* **49**, 361-367.
23. Michikawa, M., K. T. Lim, J. G. McLarnon, and S. U. Kim. 1994. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J. Neuro Sci. Res.* **37**, 62-70.
 24. Oh, S. M., Y. J. Mun, and W. H. Woo. 2007. Effects of *Rubus coreanus* Miquel on the expressions of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in B16 melanoma cells. *Korean J. Oriental Physiology Pathology* **21**, 1456-1461.
 25. Oh, W. K., K. B. Kim, J. Y. Lim, S. K. Lee, Y. D. Kwon, S. R. Yeom, and Y. S. Song. 2009. Effects of Dokhwalkisaeng-tang on melanin synthesis inhibition and gene expression in B16F10 melanoma cells. *Korean J. Oriental Physiology Pathology* **23**, 63-75.
 26. Orlow, S. J., R. E. Boissy, D. J. Mortan, and S. Pifkohirst. 1993. Subcellular distribution of tyrosinase and tyrosinase related protein. 1: Implication for melanosomal biogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 55-64.
 27. Park, J. S., W. Y. Nam, Y. J. Mun, K. H. Cho, B. W. Jeon, and W. H. Woo. 2000. Effect of Seosikyongsan on the Melanogenesis of B16 Melanoma Cell Line. *Korean J. Oriental Physiology Pathology* **14**, 160-170.
 28. Parvze, S., M. K. Kang, W. S. Chung, C. W. Cho, M. C. Hong, M. K. Shin, and H. S. Bae. 2006. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother. Res.* **20**, 921-934.
 29. Sakamoto, S., H. Kudo, T. Kawasaki, K. Kuwa, N. Kasahara, S. Sassa, and R. Okamoto. 1988. Effects of a chinese herbal medicine, keishi-bukuryo-gan on the gonadal system of rats. *J. Ethnopharmacol.* **23**, 151-158.
 30. Seo, E. J., E. S. Hong, M. H. Choi, K. S. Kim, and S. J. Lee. 2010. Antioxidant and skin whitening effects of *Ramnus yoshinoi* Extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**, 750-754.
 31. Shin, J. Y. 2001. Screening of natural products that have activities against skin-aging. *Korean J. Food Nutr.* **14**, 568-572.
 32. Tobin, D., A. Quinn, S. Ito, and A. Thody. 1994. The presence of tyrosinase and related protein in human epidermis and their relationship in melanin type. *Pigment Cell Res.* **7**, 204-209.
 33. Tomohiro, I. and F. Yukio. 2005. Hot water extracts from *Adzuki beans*(*vigna angularis*) stimulate not only melanogenesis in cultured mouse B16 melanoma cells but also pigmentation of hair color in C3H mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 873-882.
 34. Veronique, D. M. and B. Friedrich. 1996. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.* **381**, 165-168.
 35. Wang, K. H., R. D. Lin, L. H. Feng, H. H. Yen, H. C. Chang, C. Y. Huang, and M. H. Lee. 2006. Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *J. Ethnopharmacol.* **106**, 353-359.
 36. Yamakoshi, J., F. Otsuka, A. Sano, S. Tokutake, M. Saito, M. Kikuchi, and Y. Kubota. 2003. Litening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Pigment Cell Res.* **16**, 629-638.
 37. Ye, Y., J. H. Chu, H. Wang, H. Xu, G. X. Chou, and A. K. Leung. 2010. Involvement of p38 MAPK signaling pathway in the anti-melanogenic effect of San-bai-tang, a Chinese herbal formula, in B16 cells. *J. Ethnopharmacol.* **132**, 533-535.
 38. Zhong, S., W. Yan, S. M. Ahn, Z. Junya, K. Wang, S. Yang, J. H. Yeon, and X. Zhu. 2006. Depigmentation of melanocytes by the treatment of extracts from traditional Chinese herbs: a cell culture assay. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 1947-1951.

초록 : 도인승기탕의 B16F10 세포주에서의 멜라닌 생성 및 유전자 발현 억제 효과

황주영¹ · 김동희¹ · 김희정¹ · 황은영¹ · 박태순¹ · 이진영² · 손준호^{1*}

(¹한국한방산업진흥원, ²호서대학교 한방화장품과학과)

본 연구는 B16F10 melanoma 세포를 사용하여 도인승기탕의 70% EtOH와 물 추출물의 멜라닌 생합성, tyrosinase 활성, western blotting으로 측정하였다. 도인승기탕 추출물은 농도 의존적으로 멜라닌 생합성과 tyrosinase활성을 저해하였다. 그 결과 도인승기탕 70% 에탄올 추출물이 멜라닌 합성을 40%, tyrosinase는 51% 저해효과를 나타내었다. Western blot을 이용하여 B16F10 melanoma 세포 내에 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF의 발현을 억제하는 효과를 관찰하였다. 이상의 결과에 따라 도인승기탕의 70% 에탄올 추출물은 미백 소재로서 가능성을 가지는 것으로 나타났다.