

B16F10 멜라노마세포에서 과기음가미방의 멜라닌 생성 촉진 효과

문나랑^{1#}, 김세윤^{2#}, 이진혁², 이정복³, 박선민^{1*}

1 : 호서대학교 식품영양학과, 2 : 우보한의원, 3 : 소니메디

Stimulating effect of modified Goa-Gi-Um herbal remedy on melanogenesis in B16F10 melanoma cells

Na-Rang Moon^{1#}, Kim Se Yoon^{2#}, Lee Jin Hyuk², Jung Bok Lee³, Sunmin Park^{1*}

1 : Dept. of Food & Nutrition, Hoseo University, Asan-Si,

2 : Woobo Oriental Clinic, Seoul

3 : Sonimedi, Wonju-Si

ABSTRACT

Objectives : Since hypopigmentation is known to increase the risk of skin cancer, melanogenesis in the skin needs to be regulated. Here, we evaluated the melanogenesis stimulatory effects of a modified Goagium herbal remedy (HR) and HR+ox bile (*Bos taurus domesticus*) extract (OBE) to address hypopigmentation disorders.

Methods : B16F10 melanoma cells were treated with different dosages of HR and HR+OBE for 24 to 48 h after 1 h of 10 nM α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH). After the treatment, cell viability, tyrosinase activity, melanin synthesis and the expression of genes related to melanin synthesis were measured and the regulation of the α -MSH signalling through cAMP responding element binding protein (CREB) was determined.

Results : HR and HR+OBE with the ranges of 15~100 μ g/mL did not affect cell viability in melanoma cells. The 1 h treatment of HR+OBE (50 and 100 μ g/mL) potentiated the phosphorylation of CREB by enhancing α -MSH signaling and its 24 h treatment increased CREB expression. Consistent with CREB potentiation, their treatment for 24 h, the expression of microphthalmia-associated transcription factor (MIFT), tyrosinase, tyrosinase related protein (TRP)-1 and TRP-2 were increased in realtime PCR. Ultimately, the 48 h treatment of HR+OBE (50 and 100 μ g/mL) increased tyrosinase activity and melanin contents in the melanoma cells in comparison to the control.

Conclusions : HR+OBE (50 and 100 μ g/mL) increases melanin synthesis in B16F10 melanoma cells via the stimulation of tyrosinase activity and expression of MIFT, tyrosinase, TRP-1 and TRP-2. HR+OBE can be used as the a possible treatment for hypopigmentation of the skin.

Key words : tyrosinase, MIFT, melanin, CREB, hypopigmentation

서론

피부세포는 자외선이나 환경오염 그 밖의 외부 요인의 자극에 대해 방어기전으로 표피기저층에 존재하는 melanocyte 의 melanosome에서 멜라닌을 생성한다. 멜라닌은 동물들의

피부, 눈동자, 머리카락의 색을 결정하는 중요한 요인이다¹⁾. 저색소증은 피부암의 위험인자로도 알려졌다^{1,2)}. 동양인들은 멜라닌이 과다로 생성되는 것에 민감하여 멜라닌 생성을 억제하는 미백과 관련된 연구가 많이 수행되었다. 하지만 최근에는 멜라닌 생성이 억제되어 나타나는 백반증 (Vitiligo)에 대

*교신저자 : 박선민, 충청남도 아산시 배방면 세철리 165 호서대학교 식품영양학과

· Tel : 041-540-5633 · Fax : 041-548-0670 · E-mail : smpark@hoseo.edu

#제1저자 : 문나랑, 충청남도 아산시 배방면 세철리 165 호서대학교 식품영양학과

· Tel : 041-540-5249 · Fax : 041-548-0670 · E-mail : a213900@hanmail.net

김세윤, 서울 강남구 신사동 620-1 우보한의원

· Tel : 02-547-7770 · Fax : 02-544-2120 · E-mail : kyurijune@gmail.com

· 접수 : 2013년 4월 11일 · 수정 : 2013년 5월 6일 · 채택 : 2013년 5월 23일

한 관심이 증가하고 있어 이에 대한 연구도 진행되고 있다²⁾.

백반증은 피부색을 이루는 멜라닌 색소의 결핍으로 피부가 흰색으로 보이는 탄색반이 나타나는 질환으로 20~30 % 정도 가족력을 보인다. 발병의 원인으로는 자가면역설, 신경 체액설, 멜라닌 자가 파괴설, 고유세포 결손설 등의 가설이 있으나 아직 정설은 없다^{3,4)}. 그러므로 근본적인 치료는 하지 못하더라도 백반증의 증세를 완화시키는 방법으로 피부세포에서 멜라닌 합성을 증가시키는 것이 필요하다. 멜라닌은 멜라닌 생성세포 (melanocytes)로부터 합성되고 자외선조사나 독성 물질과 화학물질을 흡수함으로써 피부를 보호하는데 중요한 역할을 한다^{2,5,6)}. 그러므로 멜라닌 합성이 정상적으로 일어나지 않는 사람들에서는 모든 피부가 백색으로 되기보다는 부분적으로 백색으로 변해 얼룩이 생기는 외형적인 문제점도 있고 외부 자극에 민감해지는 것이 더 문제이다.

멜라닌 합성에 중요한 효소인 tyrosinase와 tyrosinase related protein (TRP)-1, TRP-2는 산화적 반응에 촉매로 작용한다⁵⁾. tyrosinase는 tyrosine을 L-3,4-dihydroxy phenylalanine (DOPA)로, DOPA를 DOPA quinone으로 산화시키는 효소이다. TRP-1은 dihydroxy indole carboxylic acid oxidase로서 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)를 indol-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화시키는 효소이고, TRP-1은 tyrosinase를 안정화시키고 tyrosinase의 활성을 조절하는 역할을 한다. TRP-2는 DOPA Chrome tautomerase으로써 DOPA chrome을 DHICA로 변화시켜 멜라닌세포를 이루는 eumelanon과 pheomelanon을 형성하고 이들의 비율에 따라 피부, 머리타락, 눈동자의 색깔 등이 결정된다^{5,6)}.

멜라닌 합성은 자외선 조사와 α -melanocyte stimulating hormone (MSH)로 인해 활성화된다⁶⁾. α -MSH는 펩타이드 호르몬으로 자외선에 의해 생성되며 뇌하수체 및 피부를 포함한 여러 세포에서 만들어지는 것으로 알려져 있다. α -MSH는 paracrine에 의해 멜라닌 생성세포의 melanocortin receptor (MCR)에 작용하여 전사인자인 microphthalmia-associated transcription factor (MITF)의 활성을 조절하고, 멜라닌 합성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase, TRP-1 (DHICA oxidase), TRP-2 (DOPACHrome tautomerase) 등의 활성을 조절한다. melanocyte가 자외선 또는 α -MSH에 의해서 자극이 되면 각각 p38이나 protein kinase A (PKA)에 의해서 tyrosinase가 활성화된다고 보고되었다^{7,8)}. 그런데 이 두 가지 경로 중 특히 α -MSH \rightarrow cAMP \rightarrow PKA 과정이 멜라닌 합성에 중요한 역할을 하는데, cAMP의 증가는 cAMP-responsive element binding protein (CREB) 인산화를 촉진시키고 이것이 전사인자인 MITF의 발현을 증가시키고, 이것은 tyrosinase의 활성을 향상시키고, tyrosinase mRNA 발현을 증가시킨다는 보고들이 있다⁹⁾. 그러므로 본 연구에서는 임상적으로 백반증 환자들에서 멜라닌 생성을 증가시켰던 한약재의 효과와 그 기전을 조사하기 위해서 B16F10 melanoma cell에 그 한약재를 처리하였을 때 멜라닌 생성 정도와 그 기전을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 백반증 완화를 위한 과기음가미방의 조성 및 구성

과기음치방을 바탕으로 임상연구에서 백반증 완화에 효과가 있는 한약재를 가미하여 과기음가미방 (HR)을 조제하였으며 Table 1에 보여 준 것과 같다. HR에 포함되는 한약재들을 (광명당제약, 울산, 한국) Table 1에 주어진 비율로 1 kg을 혼합하여 초음파병합추출기 (SM35EP, 소니메디, 원주, 한국)에 넣고 5 L의 물을 넣은 후, 70 °C에서 2시간 추출하고 추출액을 Whatman No. 2 여지로 여과하고 동결 건조하여 120 g (수율: 12 %)을 얻어 시료로 사용하였다. 또한, 동물성 한약재인 우담즙 (ox bile extract; Bovis Fel Sucus, OBE; 광명당제약) 5 kg을 초음파병합추출기 (SM35EP, 소니메디)에 넣고 2 시간 추출한 추출액을 Whatman No. 2 여지로 여과하고 동결 건조하여 310 g (수율: 6.2 %)을 얻어 시료로 사용하였다. 연구진들의 예비 임상연구에서 과기음가미방 자체도 효과가 있지만 HR과 OBE를 10:1로 혼합하였을 때 멜라닌 생성이 효과적이어서 이 연구에서는 두 가지 시료인 HR과 HR+OBE (10:1)의 멜라닌 생성에 대한 효과를 조사하였다.

Table 1. The composition of modified Goagiung herbal remedy and

Modified Goagiung herbal remedy (HR)	weight (g)	Ox bile extract (OBE)	weight (g)
<i>Cyperus rotundus</i> L. (Cyperi Rhizoma; 향부자)	8	<i>Bos taurus domesticus</i> (우담)	3
<i>Angelicae gigas</i> NAKAI (Angelicae Gigantis Radix; 당귀)	4		
<i>Cnidium officinale</i> MAKINO (Cnidii Rhizoma; 천궁)	4		
<i>Dioscorea batatas</i> DECNE (Dioscoreae Rhizoma; 산약)	4		
<i>Dictamnus dasycarpus</i> TURCZ (Dictamni Radicis Cortex; 백선피)	4		
<i>Prunus persica</i> (Linne) BAITSCH (Persicae Semen; 도인)	4		
<i>Carthamus tinctorius</i> L. (Carthami Flos; 홍화)	4		

2. 세포 배양

B16F10 멜라노마세포 (melanoma cellline)은 10 % fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Grand Island, USA)와 1 % penicillin (Invitrogen), 0.5 % glutamax (Invitrogen)가 첨가된 Dulbeccos Modified Eagle Medium High Glucose (High DMEM, Invitrogen)을 배양액으로 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다. 미디어는 2~3 일에 한 번씩 바꾸었다.

3. MTT assay

B16F10 멜라노마세포를 96 well plate에 2x10⁴ cells/well이 되도록 분주하여 24 시간동안 배양하였다. 24 시간이 지난 뒤 10 % FBS가 첨가되지 않고 5 % bovine

serum albumin (Sigma, St Louis, USA)가 첨가된 low glucose free-serum media에 10 nM α -MSH (Sigma)를 1 시간 동안 처리한 뒤 비타민 C는 50 ppm, HR와 HR+OBE를 각각 15, 50, 100 μ g/mL로 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 후 MTT 용액을 시료와 1:5 비율로 첨가 후 3 시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거 한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) 첨가한 후 상온에서 10분 동안 반응시킨 후 흡광도 540 nm에서 측정하였다.

4. tyrosinase 활성 측정

B16F10 멜라노마세포를 6 well plate에 3x10⁴ cells/well 이 되도록 분주하여 37 $^{\circ}$ C incubator에서 24 시간 동안 키웠다. 24 시간이 지난 뒤 10 % FBS가 첨가되지 않고 5 % BSA가 첨가된 low glucose free-serum DMEM (Invitrogen)에 α -MSH를 최종 농도가 10 nM이 되도록 1 시간 동안 처리한 뒤 약물을 농도를 비타민 C는 50 ppm, HR와 HR+OBE를 각각 15, 50, 100 μ g/mL로 분주해 48 시간 동안 배양하였다. 48 시간 후 PBS로 세척한 뒤 Ice 위에서 1% Triton X-100을 첨가한 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)인 lysis buffer를 첨가해준 뒤 30 분 동안 용해시켰다. 그 후 cell을 수확하여 4 $^{\circ}$ C, 10000 rpm에서 15 분 동안 원심분리를 한 뒤 상층액을 이용해 tyrosinase 활성 측정에 사용하였다. 96 well plate에 2 mg/mL L-DOPA (Sigma)가 첨가된 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 상층액과 1:4 비율로 넣고 37 $^{\circ}$ C water bath에서 30분 간격으로 2번 490 nm에서 흡광도를 측정했다. 단백질 정량은 Bradford 시약 (Bio-Rad, Hercules, USA)으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 보정 값으로 사용하였다.

5. melanin 합성량 측정

tyrosinase 활성에서 사용하고 남은 pellet을 이용해 측정하였다. pellet에 10 % DMSO가 첨가된 1 N NaOH 용액으로 65 $^{\circ}$ C에서 1 시간동안 멜라닌을 용해시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 정량은 Bradford 시약으로 595 nm에서 흡광도를 측정하여 보정값으로 사용하였다.

6. Western blot

B16F10 멜라노마세포를 10 cm 페트리디쉬에 5x10⁴ cells/well이 되도록 분주하여 24 시간동안 배양하였다. 24 시간이 지난 뒤 10 % FBS가 첨가되지 않고 5 % BSA가 첨가된 low free serum media에 α -MSH를 10 nM이 되도록 1 시간 동안 처리한 뒤 약물을 농도를 비타민 C는 50 ppm, HR와 HR+OBE를 각각 15, 50, 100 μ g/mL로 분주해 1과 24 시간 동안 배양하였다. 1 또는 24 시간 동안 배양한 후 PBS로 세척한 뒤 cell lysis buffer를 첨가하여 30 분 동안 용해시켜 주었다. 용해 후 4 $^{\circ}$ C, 3000 rpm에서 5 분 동안 원심분리를 한 뒤 얻은 상층액으로 Bradford assay로 단백질을 정량하여 단백질 (30 μ g)을 10 % SDS-PAGE상에서 전기 영동하여 분리 하였다. 분리된 단백질은 nitrocellulose

membrane에 transfer한 다음 실온에서 1 시간 동안 blocking buffer (3 % BSA in TBST)로 blocking을 시켜주었다. washing buffer로 세척한 후 phospho-CREB과 CREB의 1 차 항체를 처리하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 반응시켜준 뒤 TBST로 washing하고 2차 항체를 처리하여 실온에서 1시간동안 반응시켜주었다. washing buffer로 세척한 후 immu-starTM WesternCTM Kit (Bio-Rad)을 이용하여 발광시켜 X-ray film을 통해 발광정도를 측정하였다.

7. Total RNA분리 와 real time PCR

B16F10 멜라노마세포를 10 cm 페트리디쉬에 5x10⁴ cells/well이 되도록 분주하여 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간이 지난 뒤 5 % BSA가 첨가된 low glucose free-serum DMEM에 α -MSH를 10 nM이 되도록 1 시간 동안 처리한 뒤 약물을 농도를 비타민 C는 50 ppm, HR와 HR+OBE를 각각 15, 50, 100 μ g/mL로 분주해 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 뒤 PBS로 세척한 뒤 Trizol (Invitrogen)을 넣고 scrapper를 이용하여 세포를 수확하여 microfuge tube에 넣어 준 뒤 15~30 $^{\circ}$ C 실온에서 10 분 동안 방치시켰다. 그 후 chloroform과 isopropanol을 이용하여 total RNA를 분리하였다. total RNA는 에탄올로 세척한 후 5~10 분 동안 air dry 하였다. 건조 후 pellet을 RNA free water (Invitrogen)를 넣어 55 $^{\circ}$ C에 5 분 동안 incubation하고 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 얻어진 total RNA는 100 배 희석하여 흡광도 260 nm와 280 nm에서 측정하여 순도와 양을 확인하였다. total RNA로부터 cDNA synthesis는 SuperScriptTM III First-Strand (Invitrogen)을 이용하여 합성하였다. realtime PCR은 cDNA를 25배로 희석하고 각각의 primer (forward, reverse)와 DEPC-water, SYBR Green (Bio-rad)을 이용하여 DNA를 증폭시켰다. 각 종류의 primer와 sequences는 Table 2에 주었다.

Table 2. Primer sequences

primer	primer sequences	Tm (°C)
β -actin	forward -TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT R-	60.9
	reverse -GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT-	60.6
Tyr	forward -AGT CGT ATC TGG CCA TGG CTT CTT G-	63.2
	reverse -GCA AGC TGT GGT AGT CGT CTT TGT C-	60.1
Trp-1	forward -CTG CGA TGT CTG CAC TGA TGA CTT G-	62.7
	reverse -TTT CTC CTG ATT GGT CCA CCC TCA G-	63.2
Mitf	forward -AGA AGA AGC TGG AGC ATG CGA ACC-	63.6
	reverse -GTT CCT GGC TGC AGT TCT CAA GAA C-	61.2

결 과

1. 세포 생존에 대한 효과

HR와 HR+OBE이 세포 독성을 일으키는 지를 MTT 방법으로 조사하였다. 멜라노마세포에 HR와 HR+OBE를 15, 50, 100 μ g/mL의 농도로 24 h과 48 h 동안 처리하였을 때 대조군에 비해 세포 독성을 일으키지 않았다 (Fig. 1). 오히려 비타민 C는 48 h 동안 50 ppm을 처리하였을 때 대조군에 비해 세포 독성을 나타내었다. 그러므로 본 연구에서는 멜라노마세포의 멜라닌 생성을 증가시키는 지 여부를 조사할 때

HR와 HR+OBE를 독성을 나타내지 않는 농도인 15, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 사용하였다.

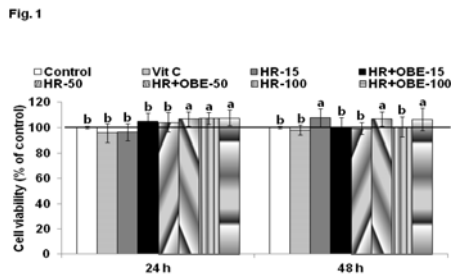


Figure 1. Effects of modified Goagium herbal remedies (HR) on cell viability of B16F10 melanoma cells. Cells were treated with 0, 15, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$ of HR and HR+OBE and ascorbic acid for 28 and 48 h. Cell viability was measured by MTT assay. Values were represented as the percentage of cell viability in the control group (vehicle treatment). Data were expressed as mean \pm SD (n=7). Bars with different letter are significantly different at P<0.05.

2. HR와 HR+OBE가 세포내 tyrosinase 활성과 멜라닌 형성에 대한 효과

멜라노마세포에 10 nM α -MSH를 1시간 동안 미리 처리하고, 15, 50 그리고 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 HR와 HR+OBE를 48 시간 동안 처리하여 배양하였을 때 tyrosinase 활성은 비타민 C (50 ppm)는 대조군에 비해 약 17% 정도 감소하였다 (Fig. 2A). 반면에 15와 50 $\mu\text{g/mL}$ HR+OBE가 대조군에 비해 tyrosinase 활성을 증가시켰다 (Fig. 2A). 멜라닌 함량도 tyrosinase 활성과 유사하여 50과 100 $\mu\text{g/mL}$ HR+OBE는 멜라닌 함량을 증가시켰고 비타민 C는 감소시켰다 (Fig. 2B). 100 $\mu\text{g/mL}$ HR+OBE를 처리하였을 때는 tyrosinase 활성이 오히려 감소하는 경향을 나타내었는데 이것은 tyrosinase의 함량이 증가하여 시간이 지나면서 활성은 감소한 것으로 사료된다.

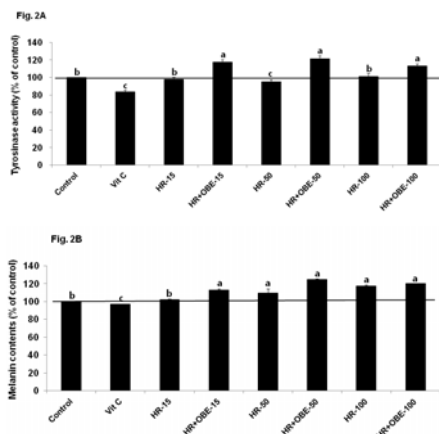


Figure 2. Effect of modified Goagium herbal remedies (HR) on melanogenesis in B16F10 melanoma cells. Cells were treated with 0, 15, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$ of HR and HR+OBE and ascorbic acid for 48 h after 1 h treatment of the α -MSH (10 nM). A. tyrosinase activity of cell lysate B. melanin contents of cell lysate Data were expressed as mean \pm SD (n=7). Bars with different letter are significantly different at P<0.05.

3. HR와 HR+OBE가 세포내 CREB의 인산화에 대한 영향

멜라노마세포에서 1 시간 동안 α -MSH를 처리하고 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 HR와 HR+OBE를 1 시간 동안 처리한 후와 24 시간 동안 처리한 후에 CREB의 발현과 인산화를 조사하였다. tyrosinase 활성이나 멜라닌의 함량은 24과 48 시간 후에 측정된 반면에 신호전달은 1과 24 시간 후에 측정된 이유는 α -MSH를 처리한 지 1 시간 후가 신호전달이 가장 강하고 이 후에는 신호전달은 약화되기 때문이다. 이때 특히 HR+OBE는 1 시간 후에 CREB의 인산화를 증가시켰고 24 시간 후에도 CREB의 발현을 증가시켰으나 1시간 보다는 증가폭이 적었다 (Fig. 3). 이것은 궁극적으로 HR+OBE이 CREB을 활성화시킴으로써 멜라노마 세포에서 멜라닌 합성을 증가시킨다는 것을 알 수 있었다.

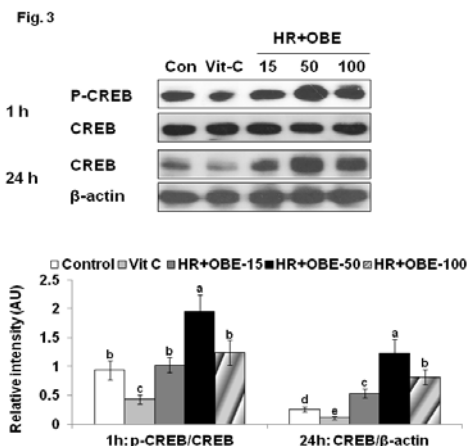


Figure 3. Effect of modified Goagium herbal remedies (HR) on the phosphorylation of CREB in B16F10 melanoma cells. After cells were treated with 0, 15, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$ of HR and HR+OBE and ascorbic acid for 1 or 24 h after 1 h treatment of the α -MSH (10 nM), the phosphorylation of CREB and CREB protein contents were determined by western blotting. Data were expressed as mean \pm SD (n=4). Bars with different letter are significantly different at P<0.05.

4. HR와 HR+OBE가 세포내 멜라닌 생성관련 유전자 발현에 대한 영향

멜라노마세포에 10 nM α -MSH를 1 시간 동안 미리 처리하고, 15, 50 그리고 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 HR와 HR+OBE를 24와 48 시간 동안 처리하여 배양하였을 때 멜라닌 생성에 관여하는 유전자인 tyrosinase, TRP-1과 TRP-2의 발현을 조사하였다. HR와 HR+OBE를 24 시간 처리하였을 때는 대조군에 비해 HR와 HR+OBE가 농도 의존적으로 tyrosinase, TRP-1과 TRP-2의 발현을 증가하였다. 특히 HR+OBE를 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하였을 때 tyrosinase, TRP-1과 TRP-2의 발현이 가장 많이 증가하였다 (Fig. 4). 반면에 비타민 C는 대조군에 비해 tyrosinase, TRP-1과 TRP-2의 발현이 감소하였다. 그러나 HR와 HR+OBE를 48 시간 동안 처리하였을 때 tyrosinase, TRP-1, TRP-2의 발현이 대조군과 차이가 없었다 (data not shown). 비타민 C도 48 시간 처리하였을 때 이 유전자들의 발현이 대조군과 차이가 없었다.

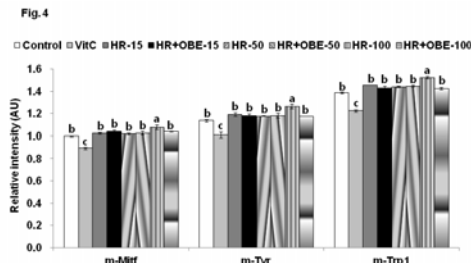


Figure 4. Effect of modified Goagium herbal remedies (HR) on mRNA expression of melanogenic enzymes in B16F10 melanoma cells

After cells were treated with 0, 15, 50, and 100 µg/mL of HR and HR+OBE and ascorbic acid for 24 or 48 h after 1 h treatment of the α -MSH (10 nM), mRNA expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 were measured by realtime PCR.

Data were expressed as mean \pm SD (n=4).

Bars with different letter are significantly different at P<0.05.

고찰

우리나라를 비롯한 동양인들은 누구나 하얀 피부색을 가지기를 원하기 때문에 멜라닌 생성을 억제하는 미백 성분에 대한 연구를 많이 수행해 왔다¹⁰⁻¹². 그러나 멜라닌은 피부의 멜라닌 생성세포로부터 합성되며 자외선조사나 독성 물질과 화학물질을 흡수함으로써 피부를 보호하는데 중요한 역할을 한다. 멜라닌의 정상적인 합성이 나타나지 않는 경우는 피부가 외부 자극에 민감하고 외형적으로도 비정상적으로 보이므로 멜라닌 합성이 정상화될 수 있도록 치료하는 것이 필요하고 이에 대한 연구도 수행된 것들이 있다^{13,14}. 그러나 아직까지 멜라닌 합성을 촉진시키는 것에 대한 연구가 충분히 수행되지 않았다. 본 연구는 임상적으로 백반증을 가진 환자에서 멜라닌 합성이 촉진시키는 결과를 나타낸 HR과 HR+OBE를 멜라노마세포에 처리하였을 때 멜라닌 생성에 대한 효과와 그 기전을 연구하였다. 멜라노마세포에서 HR+OBE를 처리하였을 때 tyrosinase의 활성을 증가시켜 멜라닌 합성을 증가시켰으며 그 기전은 TRP-1과 TRP-2의 발현을 증가시켜 tyrosinase를 활성을 증가시킨 것과 관련이 있었다. 결과적으로 HR+OBE는 멜라닌 합성을 증가시키는 한약처방으로 사용할 수 있겠다.

멜라닌 합성은 tyrosinase, TRP-1과 TRP-2에 의해서 조절된다는 것은 알려졌다¹⁵⁻¹⁸. 이 중에서도 tyrosinase의 발현과 활성에 의해서 멜라닌 합성이 주로 조절되므로 tyrosinase의 발현의 증가나 활성이 촉진되면 멜라닌 합성이 증가할 수 있다. 이러한 tyrosinase의 활성과 발현은 α -MSH에 의해서 향상되는데 이 과정에 세포내 cAMP 기전을 활성화시킴으로 일어난다. α -MSH는 멜라닌 생성세포의 MCR에 결합하여 cAMP의 발생을 증가시키고 이것이 CREB의 인산화를 촉진하여 전사인자인 MITF의 발현을 증가시켜 tyrosinase의 mRNA 발현을 증가시키고, tyrosinase 활성을 향상시킨다는 보고가 많이 있다^{16,17}. 특히, MITF는 tyrosinase 발현을 조절하는 중요 전사인자이다. Roh 등은¹⁶ bisabolangelone는 세포내 cAMP생성을 억제하였고 이것이 CREB 인산화를 억제하였으며 tyrosinase의 활성을 억제하고 멜라닌 합성을 저해하였다고 보고하였다. 반면에 본 연구에서는 α -MSH를 처리한 후 24 시간 동안 HR+OBE를 처리하

였을 때 CREB 인산화를 향상시키고 MITF의 발현이 현저하게 증가하였고, 이것이 tyrosinase 발현을 증가시켰다. 이것은 HR+OBE가 α -MSH의 작용기전을 촉진시키는 활성자로 작용하여 melanin 합성을 촉진시킨다는 것을 보여준 것이다.

멜라닌 합성시에 tyrosinase를 안정화시키고 melanosome 구조를 유지할 수 있도록 도와주는 것이 TRP-1이고 이것은 효소 기능도 있어 dihydroxyindole carboxylic acid oxidase로서 DHICA를 indol-5,6-quinone-2-carboxylic acid로 산화시켜 tyrosinase의 downstream에서 멜라닌을 생성하는데 중요한 역할을 한다^{5,6}. 일부 연구에서는 멜라닌 합성 정도는 tyrosinase의 발현과 활성에 의해서 조절되지만, TRP-1과 TRP-2의 발현과는 관련이 없다는 보고도 있지만^{11,19}, 본 연구처럼 멜라닌의 합성은 TRP-1과 TRP-2의 발현과 관련이 있다는 연구도 있다²⁰. 그러므로 tyrosinase의 발현이나 활성이 높더라도 TRP-1이나 TRP-2가 없으면 멜라노마세포에 존재하는 tyrosinase가 불안정하고 세포 성장이 감소할 수 있다는 것을 보여주었다. 본 연구에서 멜라노마세포에서 HR+OBE의 처리는 tyrosinase의 발현을 증가시켰을 뿐 아니라 TRP-1의 발현을 증가시켰고 이것이 멜라닌 합성에 영향을 준 것으로 보여진다.

결론

본 연구에서는 임상적으로 백반증에 효과가 있는 것으로 보여 준 한약처방을 B16F10 melanoma cell에 처리하였을 때 α -MSH를 활성화시켜 멜라닌 생성을 촉진시키는 효과와 그 기전을 규명하였으며 다음과 같은 결론을 확인하였다.

1. B16F10 멜라노마세포에서 HR+OBE (50과 100 µg/mL)는 α -MSH의 작용을 향상시켜 CREB의 인산화를 증가시키고 이것이 MITF의 발현을 증가시켜 tyrosinase의 발현을 증가시켰을 뿐 아니라 tyrosinase의 활성을 향상시켜 멜라닌 합성을 증가시켰다.
2. HR+OBE (50과 100 µg/mL)는 tyrosinase의 downstream에 존재하는 TRP-1의 발현도 증가시켜 멜라닌 합성을 안정화시킴으로 지속적으로 멜라닌 합성을 촉진시켰다.
3. HR과 OBE로 구성된 한약처방은 백반증의 치료제로서 사용할 수 있다.

References

1. Yu JS, Kim AK. Effect of combination of taurine and azelaic acid on antimelanogenesis in murine melanoma cells. J Biomed Sci. 2010 ; 17(Suppl 1) : S45.
2. Kim do Y, Lee JW, Whang SH, Park YK, Hann SK, Shin YJ. Quality of life for Korean patients with vitiligo: Skindex-29 and its correlation with clinical profiles. J Dermatol. 2009 ; 36(6) :

- 317–22.
3. Felsten LM, Alikhan A, Petronic-Rosic V. Vitiligo: a comprehensive overview Part II: treatment options and approach to treatment. *J Am Acad Dermatol*. 2011 ; 65(3) : 493–514.
 4. Alikhan A, Felsten LM, Daly M, Petronic-Rosic V. Vitiligo: a comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. *J Am Acad Dermatol*. 2011 ; 65(3) : 473–91.
 5. Imokawa G, Mishima Y. Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glucosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res*. 1982 ; 42(5) : 1994–2002.
 6. Manga P, Sheyn D, Yang F, Sarangarajan R, Boissy RE. A role for tyrosinase-related protein 1 in 4-tert-butylphenol-induced toxicity in melanocytes: Implications for vitiligo. *Am J Pathol*. 2006 ; 169(5) : 1652–62.
 7. Wong G, Pawelek J. Melanocyte-stimulating hormone promotes activation of pre-existing tyrosinase molecules in Cloudman S91 melanoma cells. *Nature*. 1975 ; 255(5510) : 644–6.
 8. Hunt G, Todd C, Creswell JE, Thody AJ. Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7 alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J Cell Sic*. 1994 ; 107(pt 1) : 205–11.
 9. Fordin M, Peraldi P, Van Obberghen E. Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *J Biol Chem*. 1994 ; 269(8) : 6207–14.
 10. Chao HC, Najjaa H, Villareal MO, Ksouri R, Han J, Neffati M, Isoda H. *Arthrophytum scoparium* inhibits melanogenesis through the down-regulation of tyrosinase and melanogenic gene expressions in B16 melanoma cells. *Exp Dermatol*. 2013 ; 22(2) : 131–6.
 11. Kim HE, Ishihara A, Lee SG. The effects of Caffeyol serotonin on inhibition of melanogenesis through the downregulation of MITF via the reduction of intracellular cAMP and acceleration of ERK activation in B16 murine melanoma cells. *BMB Rep*. 2012 ; 45(12) : 724–9.
 12. Mitani K, Takano F, Kawabata T, Allam AE, Ota M, Takahashi T, Yahagi N, Sakurada C, Fushiya S, Ohta T. Suppression of melanin synthesis by the phenolic constituents of sappanwood (*Caesalpinia sappan*). *Planta Med*. 2013 ; 79(1) : 37–44.
 13. Villareal MO, Han J, Matsuyama K, Sekii Y, Smaoui A, Shigemori H, Isoda H. Lupenone from *Erica multiflora* leaf extract stimulates melanogenesis in B16 murine melanoma cells through the inhibition of ERK1/2 activation. *Planta Med*. 2013 ; 79(3–4) : 236–43.
 14. Madi L, Rosenberg-Haggen B, Nyska A, Korenstein R. Enhancing pigmentation via activation of A3 adenosine receptors in B16 melanoma cells and in human skin explants. *Exp Dermatol*. 2013 ; 22(1) : 74–7.
 15. Gaggioli C, Buscà R, Abbe P, Ortonne JP, Ballotti R. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is required but is not sufficient to induce the expression of melanogenic genes. *Pigment Cell Res*. 2003 ; 16(4) : 374–82.
 16. Roh E, Yun CY, Young Yun J, Park D, Doo Kim N, Yeon Hwang B, Jung SH, Park SK, Kim YB, Han SB, Kim Y. cAMP-binding site of PKA as a molecular target of bisabolangelone against melanocyte-specific hyperpigmented disorder. *J Invest Dermatol*. 2013 ; 133(4) : 1072–9.
 17. Buscà R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res*. 2000 ; 13(2) : 60–9.
 18. Jeong HS, Choi HR, Yun HY, Baek KJ, Kwon NS, Park KC, Kim DS. Ceramide PC102 inhibits melanin synthesis via proteasomal degradation of microphthalmia-associated transcription factor and tyrosinase. *Mol Cell Biochem*. 2013 ; 375(1–2) : 81–7.
 19. Park S, Kim Y, Kim Y, Park G, Lee S. Beta-carboline alkaloids harmaline and harmalol incude melanogenesis through p38 mitogen-activated protein kinase in B16F10 mouse melanoma cells. *BMB Rep*. 2010 ; 43(12) : 824–9.
 20. Lee CS, Park M, Han J, Lee JH, Bae IH, Choi H, Son ED, Park YH, Lim KM. Liver X receptor activation inhibits melanogenesis through the acceleration of ERK-mediated MITF degradation. *J Invest Dermatol*. 2013 ; 133 : 1063–71.